Utjecaj ciklodekstrina na antioksidacijsku učinkovitost ekstrakta komine masline

Spaić, Markonija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:163:483396

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Markonija Spaić

Utjecaj ciklodekstrina na antioksidacijsku učinkovitost ekstrakta komine masline

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na posvećenom vremenu te stručnim savjetima i vodstvu tijekom izrade ovog rada. Također se zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za kemiju prehrane koji su mi olakšali izvođenje diplomskog rada, a posebna zahvala mojim roditeljima, sestrama i zaručniku na razumijevanju i nesebičnoj podršci tijekom cijelog studija.

Sadržaj:

1. UVOD 1
1.1. Općenito o maslini 1
1.1.1. Maslinovo ulje 2
1.1.2. Komina masline 3
1.2. Antioksidansi 4
1.2.1. Fenoli kao antioksidansi 5
1.3. Ciklodekstrini 7
1.4. Metode određivanja antioksidacijske učinkovitosti 10
1.4.1. Kemijske metode 10
1.4.1.1. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala ($DPPH^{\cdot}$, $ABTS^{\cdot+}$) 11
1.4.1.2. Redukcija metalnih iona (testovi FRAP i CUPRAC) 11
1.4.1.3. Kompetitivne metode (testovi ORAC I TRAP) 12
1.4.1.4. Oksidacija lipoproteina niske gustoće (LDL-a) 12
1.4.1.5. Testovi temeljeni na nanočesticama 13
1.4.1.6. Ostali kemijski testovi 13
1.4.2. Određivanje na razini stanica 14
1.4.2.1. Test stanične antioksidativne aktivnosti (CAA) 14
1.4.2.2. Ekspresija antioksidacijskih enzima i inhibicija prooksidacijskih enzima 15
1.4.2.3. Aktivacija ili represija redoks transkripcijskih faktora 15

2. OBRAZLOŽENJE TEME 16

3. MATERIJALI I METODE 17
3.1. Materijali 17
3.1.1. Uzorci za analizu 17
3.1.2. Kemikalije i pribor 18
3.1.3. Instrumenti 18
3.2. Metode 18
3.2.1. Priprema uzoraka 18
3.2.2. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom 19
3.2.3 Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom 22
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH testom 25

4. REZULTATI 28
4.1. Utjecaj ciklodekstrina na ABTS antioksidacijsku učinkovitost 28
4.2. Utjecaj ciklodekstrina na ukupni reduktivni potencijal 29
4.3. Utjecaj ciklodekstrina na DPPH 30

5. RASPRAVA 34

6. ZAKLJUČCI 37

7. LITERATURA 38

8. SAŽETAK/SUMMARY 44/45

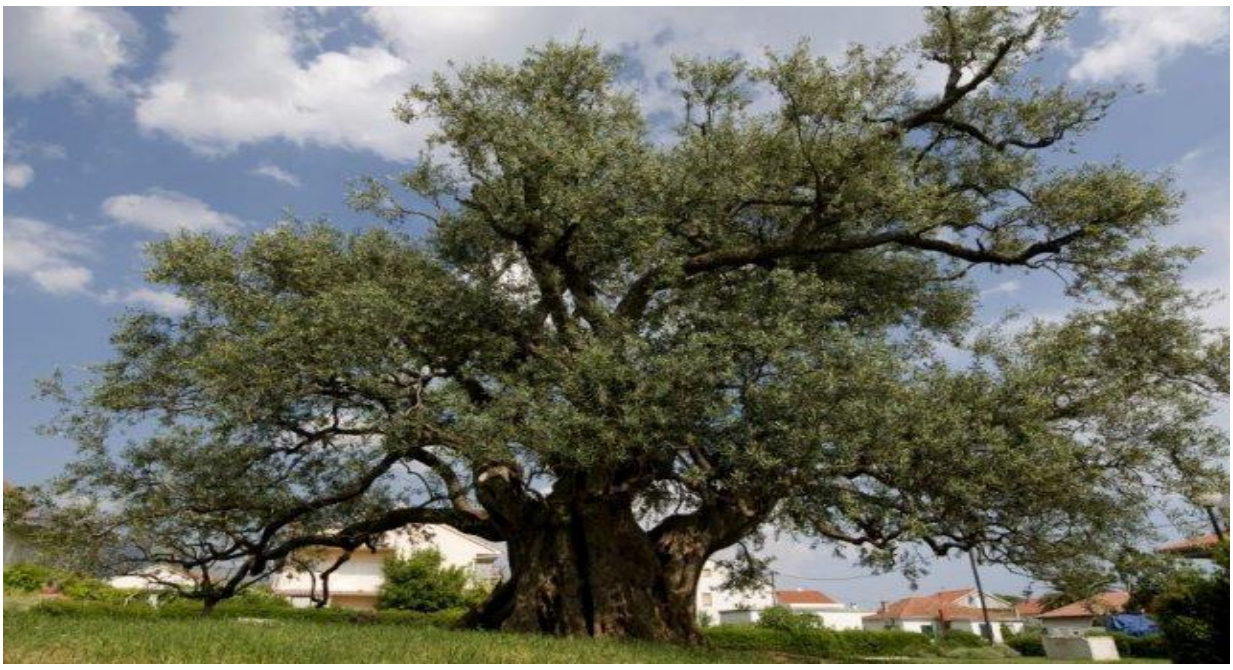
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Općenito o maslini

Maslina (*Olea europaea L.*, *Oleaceae*) je dugovječno, vazdazeleno, 8-12 m visoko drvo s mnoštvom grana. Ponegdje naraste i do 20 m. Listovi su duguljasti, kožasti, s gornje strane tamnozeleni, a s donje srebrnasti. Bijeli cvjetovi rastu u uspravnim grozdovima, a izbijaju obično u travnju. Plod je zelena, ovalna koštunica, dužine 2-3 cm, koja mijenja boju od zelene, crvenkaste pa sve do tamnomodre. Prve plodove donosi nakon deset godina, a tek s trideset daje puni prinos.

Pretpostavlja se da maslina potječe iz Palestine, odnosno Male Azije. Na otoku Kreti su postojale kulture već 3500. godine prije Krista i s njega se maslina proširila po Sredozemlju. Maslina raste vrlo polagano i može doživjeti duboku starost, čak i do 2000 godina. Najstarija maslina u Hrvatskoj (Slika 1) koja je ujedno i zaštićeni spomenik prirode, nalazi se u Kaštel Štafiliću gdje raste stablo staro preko 1500 godina. Obujam njegovog debla iznosi 6.20 m, a krošnje 18 m. Pripada sorti koje inače nema u ovim krajevima pa se pretpostavlja da je donesena iz južne Italije ili Grčke. Unatoč velikoj starosti, vitalna je i rađa svake godine, a od njezinih plodova se pravi vrlo vrijedno ulje.



Slika 1. Najstarija maslina u Hrvatskoj

Maslina je osjetljiva na niske temperature i voli umjerenu klimu. Pitoma maslina se uzgaja duž cijelog obalnog područja, a ponekad i drugdje ako to dopuštaju klimatski uvjeti. Na istočnoj obali Sredozemnog mora i u južnim predjelima središnje Azije maslina raste samoniklo. Kao uzgajana kultura poznata je u oko 1000 varijeteta, čije morfološke i anatomske osobine ovise o sastavu tla i klimi. U Hrvatskoj su maslinici rasprostranjeni najvećim dijelom po otocima i na uskom dijelu priobalja. Uzgajaju se domaće, ali i strane sorte maslina koje potječu iz Italije i Francuske. Danas se u svijetu daje prednost onim sortama koje su prikladne za dobivanje ulja i za konzerviranje jela. Takva je naša sorta oblica koja je u sortimentu maslina na području Dalmacije zastupljena s oko 80 %.

Maslina je simbol mira.

1.1.1. Maslinovo ulje

Maslinovo ulje (*Olivae oleum*) je oficinalno u brojnim nacionalnim farmakopejama (Njemačkoj, Austrijskoj, Švicarskoj i drugima), a Europska farmakopeja sadrži dvije monografije: Olive oleum virginale i Olivae oleum raffinatum.

- *Olivae oleum virginale* – djevičansko maslinovo ulje

Europska farmakopeja definira djevičansko maslinovo ulje kao masno ulje dobiveno hladnim tiještenjem ili drugim prikladnim mehaničkim postupkom iz zrelih koštunica Olea europaea L. To je bistra, žuta ili zelenožuta prozirna tekućina karakterističnog mirisa.

- *Olivae oleum raffinatum* – pročišćeno maslinovo ulje

Rafinirano maslinovo ulje je masno ulje dobiveno rafiniranjem sirova maslinovog ulja, koje se dobiva hladnim tiještenjem ili drugim prikladnim mehaničkim postupkom iz zrelih koštunica Olea europaea L. To je bistra, bezbojna ili zelenkastožuta prozirna tekućina.

U prometu se nalazi oko 25% maslinova ulja dobivenog ekstrakcijom. Naime, tiještenjem se ne može iz plodova kvantitativno izdvojiti ulje, pa se ekstrahira ostatak plodova (uljna pogača). Ulje je lokalizirano u mesnatom mezokarpu u količini od 40-60%, a u sjemenoj jezgri ga ima 12-15%. Djevičansko maslinovo ulje se sastoji od smjese glicerida koja sadrži oleinsku, palmitinsku i linolnu kiselinu, a u manjim količinama mogu se pronaći esteri miristinske, stearinske i arahinske kiseline. Ulje sadrži i vitamin E, male količine vitamina B i C, lecitina te ksantofila i klorofila od kojih potječe boja.

Maslinovo ulje se upotrebljava za ublažavanje raznih upala. Interno se koristi pri bolestima jetre i žučnog mjehura, a eksterno u obliku masti, mazila i melema. Maslinovo ulje je vrlo cijenjeno kao jestivo ulje. Ulja koja se ne mogu rabiti u prehrani služe za izradu

sapuna. U pučkoj medicini se maslinovo ulje rabi za izbacivanje žučnih kamenaca, pri opeklinama, kao i pri upali sluzokože želuca (Kuštrak, 2005).

1.1.2. Komina masline

Prerada plodova masline proizvodi velike količine nusproizvoda, uključujući tekući i čvrsti otpad koji proizlazi iz ekstrakcije maslinovog ulja i proizvodnje stolnih maslina. Poznato je da nekontrolirano odlaganje otpada maslina tj. komine (Slika 2) bez ikakve obrade uzrokuje ozbiljne ekološke probleme.

Međutim, tvornički otpad maslina se može koristiti na više načina:

- kao gnojivo ili regenerator tla
- kao herbicid ili pesticid
- kao stočna hrana
- za proizvodnju nafte
- za izolaciju organskih spojeva (pektina, antioksidansa, enzima)
- za proizvodnju različitih proizvoda (alkohola, biopolimera, aktivnog ugljena)
- za proizvodnju energije



Slika 2. Komina masline

Tehnologija obrade otpada s ciljem obnavljanja energije može predstavljati zanimljivu alternativu za održivo zbrinjavanje ostataka od proizvodnje maslinovog ulja, može proizvoditi energiju i smanjiti negativan utjecaj na okoliš. U Hrvatskoj je upotreba komine masline za proizvodnju energije u svojoj primarnoj fazi razvoja. U regiji Istri su istaknuta dva primjera primjene gdje se toplinska energija proizvedena iz ostataka maslina koristi za grijanje u privatnim kućama. Treba naglasiti da mlinare u Hrvatskoj zasad još uvijek proizvode relativno malu količinu ostataka, no u skladu s povećanjem, navedene primjene bi mogli smatrati pozitivnim inicijativama i mogućim optimalnim rješenjem za hrvatske mlinare (www.moreinteligentenergy.eu).

1.2. Antioksidansi

Tijekom proteklih godina, sve je više saznanja o važnosti reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i reaktivnih dušikovih spojeva (RNS) u nastanku i intenzitetu brojnih procesa kao što su oksidacijsko kvarenje prehrambenih proizvoda kao i u patogenezi velikog broja bolesti kao što su ateroskleroza, dijabetes melitus, kronične upale, neurodegenerativne bolesti i neki oblici raka (Valko i sur., 2007; Frankel i sur., 2006). Reaktivni kisikovi spojevi su visoko reaktivne molekule dobivene metabolizmom kisika. ROS uključujući superoksid radikal, hidroksil radikal i molekule vodikovog peroksida često nastaju kao produkti bioloških reakcija (npr. metabolizam hranjivih tvari, proces starenja i sl.) ili egzogenih čimbenika (npr. duhanski dim, ionizirajuće zračenje, zagađenje zraka, organska otapala, pesticidi itd.) (Buyukokuroglu i sur., 2001). Prekomjerna količina ROS je štetna zato što pokreću bimolekularnu oksidaciju što dovodi do smrti stanice i izazivanja oksidacijskog stresa. Osim toga, oksidacijski stres uzrokuje prekomjernu enzimsku aktivaciju i oksidativno oštećenje staničnog sustava (Wiseman i Halliwell, 1996). Stanice u ljudskom organizmu su opremljene različitim mehanizmima koji se bore protiv ROS i održavaju redoks homeostazu stanice. Na primjer, antioksidacijski enzimi kao što su superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza imaju važnu ulogu u hvatanju slobodnih radikala i sprječavanju ozljeda stanica (Bergendi i sur., 1999). Međutim, kada mehanizam antioksidacijske zaštite postane neuravnotežen u ljudskom tijelu, potrebno je povećati unos antioksidansa kao pomoć u smanjenju oštećenja uzrokovanih oksidacijskim stresom. Pretpostavljeno zaštitno djelovanje antioksidansa protiv ovih štetnih procesa predmet je brojnih istraživanja u područjima

biologije, medicine, znanosti o prehrani i agrokemije. Dok su oksidans i reducens kemijski pojmovi, u biološkom okruženju se obično nazivaju prooksidans i antioksidans. Prooksidans je tvar koja može izazvati oksidativno oštećenje različitih bioloških meta kao što su nukleinske kiseline (modifikacija baza, prekid uzvojnice), lipidi (peroksidacija, gubitak masnih kiselina) i proteini (oksidacija specifičnih aminokiselinskih ostataka, nastajanje karbonila). Antioksidans je tvar koja može učinkovito reducirati prooksidans s istodobnim stvaranjem produkata koji nisu toksični (Magalhaes i sur., 2008). Širu definiciju antioksidansa predložili su Halliwell i sur., 1995. kao „bilo koja tvar koja, kada je prisutna u niskoj koncentraciji u odnosu na oksidativni supstrat, značajno usporava ili sprječava oksidaciju tog supstrata“. Prema ovoj definiciji nisu svi reducensi uključeni u kemijsku reakciju antioksidansi, nego samo oni spojevi koji su u mogućnosti zaštiti biološku metu udovoljavaju navedenim kriterijima.

Antioksidativna zaštita može se temeljiti na nekoliko mehanizama djelovanja, a to su:

- inhibicija stvaranja i sposobnost hvatanja ROS/RNS
- sposobnost redukcije
- sposobnost keliranja metala
- aktivacija antioksidativnih enzima
- inhibicija oksidativnih enzima

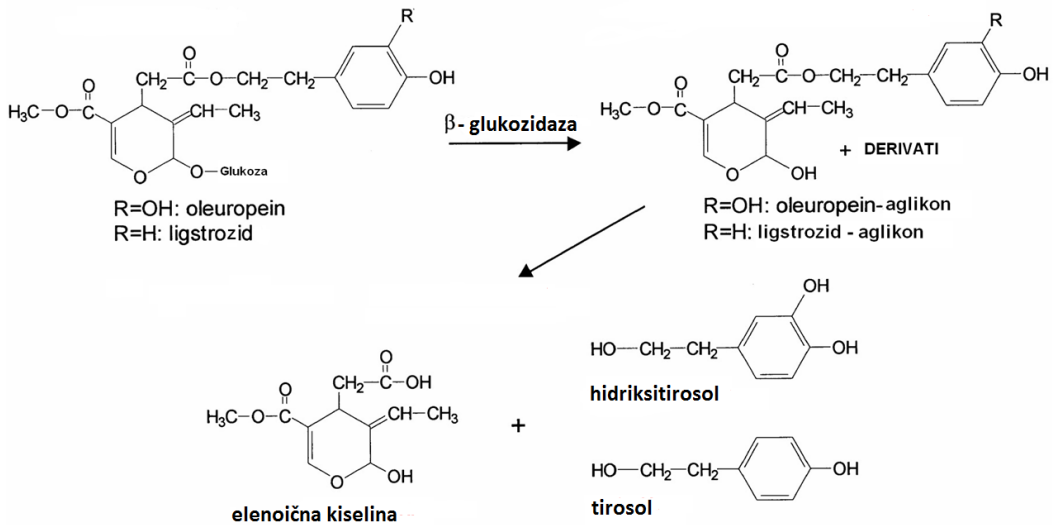
Istraživanja prirodnih antioksidansa u zadnje vrijeme su sve češća u različitim područjma. Prema tome, objavljeni su brojni članci o prirodnim antioksidansima uključujući polifenole, flavonoide, vitamine i hlapljive tvari.

1.2.1. Fenoli kao antioksidansi

Ljekovite biljke su važan izvor antioksidansa (Rice-Evans, 2004). Prirodni antioksidansi povećavaju antioksidacijski kapacitet plazme i smanjuju rizik od određenih bolesti kao što su rak, srčane bolesti i moždani udar (Prior i Cao, 2000). Sekundarni metaboliti biljaka poput fenola i flavonoida opisani su kao potentni hvatači slobodnih radikala. Oni se nalaze u svim djelovima biljaka kao što su listovi, plodovi, sjemenke, korijenje i kora (Mathew i Abraham, 2006). Također, upotrebljavaju se i mnogi sintetski antioksidansi, ali je ispitivanjima na laboratorijskim životinjama otkriveno da uzrokuju nekoliko nuspojava kao što su rizik od oštećenja jetre i karcinogeneza (Gao i sur., 1999; Williams i sur., 1999; Osawa i Namiki, 1981). Prema tome, postoji potreba za učinkovitijim, manje otrovnim i isplativijim antioksidansima čemu odgovaraju prirodni antioksidansi iz biljaka.

Biljni polifenoli, odnosno raznolika skupina fenolnih spojeva (flavanoli, flavonoli, antocijani, fenolne kiseline itd.) posjeduje idealnu kemijsku strukturu za aktivnost hvatanja slobodnih radikala. Antioksidativna svojstva polifenola proizlaze iz njihove visoke reaktivnosti kao vodik ili elektron donora, mogućnosti da stabiliziraju radikal i delokaliziraju nespareni elektron te sposobnosti da keliraju metalne iona (Rice-Evans i sur., 2007). Općenito, fenolni spojevi uključuju mnoge organske molekule koje posjeduju aromatski prsten s jednom ili više supstituiranih hidroksilnih skupina i funkcionalni bočni lanac. Mogu biti konjugirani s različitim šećerima, organskim kiselinama, lipidima te drugim fenolima. Razlike u njihovim strukturama pridonose različitom načinu djelovanja i učinku na zdravlje.

Zahvaljujući modernim analitičkim metodama identificiran je velik broj fenolnih spojeva u maslinovom ulju i komini masline. Osnovni fenolni spoj kojeg najviše ima u nedozrelim maslinama, a koji je odgovoran za gorčinu maslina je oleuropein. Njegovom hidrolizom nastaju tirosol i hidroksitirosol, a hidrolizom antocijana i flavona kojih ima više u zrelom plodu, nastaju benzojeva i cimetna kiselina. Osim navedenih spojeva nađene su vanilinska, protokatehinska, sinirginska i 3,4 dihidroksicimetna kiselina te niz drugih fenolnih spojeva. Svi oni nemaju jednaka antioksidacijska svojstva. Pokazalo se da su najbolji antioksidansi o-difenoli (Giovannini i sur., 1999; Visioli i Galli, 1998; Papandopoulos i Boskou, 1991). Polifenoli karakteristični za kominu masline su tirosol, hidroksitirosol, oleuropein, demetiloleuropein, verbaskozid i ligstrozid (Slika 3). Udjel i sastav fenolnih spojeva uvjetovan je agronomskim, klimatsko-pedološkim i tehnološkim čimbenicima, kao što su sorta masline, klimatski uvjeti, stupanj zrelosti ploda i proizvodni proces (Cerretani i sur., 2005).

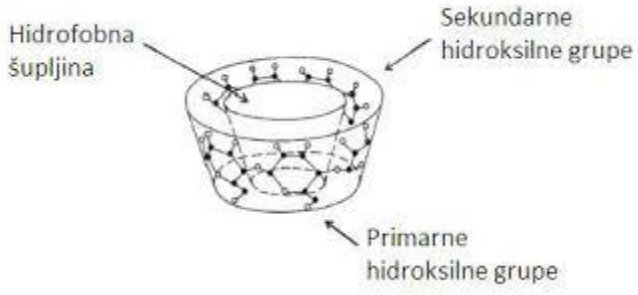


Slika 3. Polifenoli komine masline

1.3. Ciklodekstrini

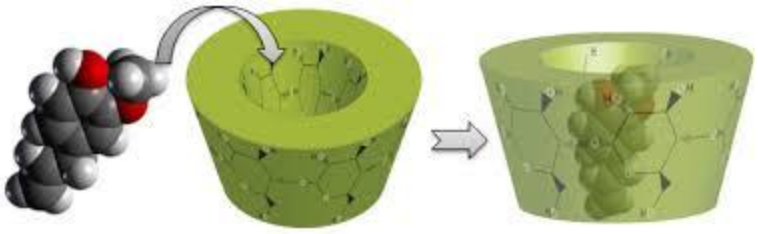
Zahvaljujući svojim multifunkcionalnim svojstvima, ciklodekstrini su sposobni ublažiti nepoželjna svojstva raznih spojeva formiranjem inkluzijskih kompleksa. Korištenje inkapsuliranih polifenola umjesto slobodnih, rješava probleme vezane uz njihovu stabilnost, prekriva neugodan okus ili miris te također povećava bioraspoloživost i poluživot sastavnica *in vitro* i *in vivo* (Fang i Bhandari, 2010).

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi građeni od 6, 7 ili 8 glukopiranoznih monomera međusobno vezanih α-1,4-glikozidnom vezom. Raspored monomera u molekuli ciklodekstrina je takav da se može vizualizirati kao krnji stožac s centralnom šupljinom. Primarne i sekundarne hidroksilne skupine nalaze se na suprotnim stranama šupljine, dok unutarnje zidove CD-a tvori hidrofobna okosnica ugljika glukopiranoznih monomera, što čini centralnu šupljinu nešto hidrofobnijom od vanjske površine (Slika 4). Takva građa odgovorna je za hidrofilna svojstva vanjskog dijela molekule i relativno dobru topljivost ciklodekstrina u vodi te za lipofilni karakter šupljine i sposobnost stvaranja inkluzijskih kompleksa s brojnim hidrofobnim molekulama (Szejtli, 1998).



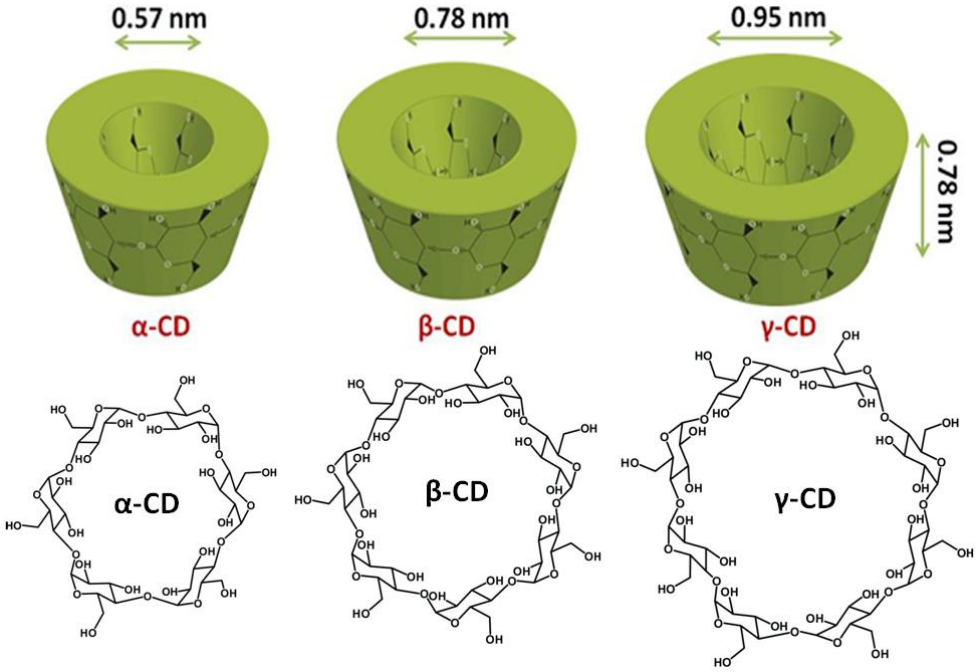
Slika 4. 3D prikaz ciklodekstrina

CD inkluzijski kompleksi su molekularni kompleksi karakterizirani zarobljavanjem lipofilne molekule lijeka ili lipofilne skupine slabo vodo-topljivog lijeka u hidrofobnoj centralnoj šupljini ciklodekstrina (Slika 5). Glavna pokretačka snaga koja vodi do stvaranja inkluzijskog kompleksa je oslobađanje entalpijom bogatih molekula vode iz središnje šupljine molekule ciklodekstrina. Molekule vode se zamjenjuju lipofilnim ostatkom molekula lijeka prisutnog u otopini. Kod stvaranja inkluzijskog kompleksa nema stvaranja ni kidanja kovalentnih veza. Sile odgovorne za formiranje kompleksa su elektrostatske interakcije, Van der Waalsove veze, vodikove veze, otpuštanje konformacijskog naprezanja te interakcije prijenosa naboja (Brewster i Loftsson, 2007).



Slika 5. Formiranje inkluzijskog kompleksa

Sirovina za proizvodnju ciklodekstrina je lako dostupan ugljikohidratni polimer škrob. Razgradnjom škroba uz enzim ciklomaltodekstrin glukanotransferazu (CGT), kojeg prirodno proizvodi *Bacillus macerans* i neke druge vrste, nastaje smjesa α-, β-, γ-ciklodekstrina (redom građeni od 6, 7 i 8 glukopiranoznih monomera) (Slika 6). Moguće je usmjeriti sintezu prema željenom derivatu dodatkom nekih tvari te kontrolom pH i temperature reakcijskog medija. Dodatkom toluena u reakcijsku smjesu uglavnom nastaje β-CD koji s toluenom tvori netopljivi kompleks te tako pomiče ravnotežu reakcije u smjeru nastajanja β-CD. Na analogan način, dodatkom dekana u reakcijsku smjesu preferirano nastaje α-CD, a dodatkom α-naftola i metiletilketona nastaje γ-CD (Frömming i Szejtli, 1994).



Slika 6. Strukture prirodnih ciklodekstrina

Danas se zbog veličine centralne šupljine, jednostavnog načina dobivanja i ekonomskih razloga najčešće upotrebljava β-CD. Nedostatak β-CD je ograničena topljivost u vodi zbog koje s lipofilnim lijekovima često tvori teško topljive komplekse. Niska topljivost je posljedica vrlo jakih vodikovih veza unutar molekule ciklodekstrina. Supstitucijom hidroksilnih skupina koje sudjeluju u nastajanju vodikovih veza, može se znatno povećati topljivost β-CD. Ostali derivati ciklodekstrina bitni za farmaceutsku primjenu su hidroksipropilni derivati α- i γ- ciklodekstrina te sulfoalkileterski derivati kao što je sulfobutileter-β-ciklodekstrin, alkilirani ciklodekstrini kao što je djelomično metilirani-β-ciklodekstrin (METIL-β-CD) i razni razgranati ciklodekstrini kao što su glukozil- i maltozil-β-ciklodekstrin (Tablica 1). Određeni derivati, kao što su 2-hidroksipropil (HP-β-CD i HP-γ-CD) i sulfobutileter (SBE-β-CD), posjeduju poboljšane toksikološke profile u usporedbi sa samim ciklodekstrinima (Brewster i Loftsson, 2007).

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva nekih farmaceutsko važnih ciklodekstrina

Ciklodekstrin	**N[(a)]**	**R**	**Supstitucija[(b)]**	**Mr (g/mol)**	**Topljivost[(c)]**
α-CD	6	-H	-	972	145
β-CD	7	-H	-	1135	18.5
HP-β-CD	7	$-CH_2CHOHCH_3$	0.65	1400	>600
SBE-β-CD	7	$-(CH_2)_4SO_3^-Na^+$	1.8	1312	>500
METIL-β-CD	7	$-CH_3$	0.9	2163	>500
γ-CD	8	-H	-	1297	80

(a) broj glukopiranoznih jedinica; (b) prosječan broj supstitenata po glukopiranoznoj jedinici; (c) topljivost u vodi pri 25°C

Budući da ciklodekstrini imaju veliki potencijal za primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, temeljito su istražena njihova toksikološka i biološka svojstva. Toksikološke studije su pokazale da su oralno primijenjeni ciklodekstrini gotovo netoksični, zbog nedostatka apsorpcije iz probavnog trakta. Prirodni ciklodekstrini teško prolaze kroz lipofilne biološke membrane zbog velike molekularne težine i hidrofilne prirode. Stoga se samo 1-3 % primijenjene doze ciklodekstrina apsorbira u probavnom traktu i izlučuje nepromijenjeno putem bubrega, dok se glavnina metabolizira u primarne metabolite kao što su aciklički maltodekstrini, maltoza i glukoza, djelovanjem mikroflore u debelom crijevu. Nakon apsorpcije u sistemsku cirkulaciju, primarni se metaboliti dalje metaboliziraju i naposljetku izlučuju kao CO_2 i H_2O (Jug i Bećirević-Laćan, 2008).

1.4. Metode određivanja antioksidacijske učinkovitosti

Razvijeni su različiti *in vitro* kemijski testovi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta prirodnih produkata. Oni se temelje na različitim strategijama i daju različite informacije o interakciji ROS/RNS s uzorkom. Međutim, za proučavanje potencijalnog, zaštitnog antioksidativnog učinka prirodnih produkata na zdravlje, s obzirom na složenost mehanizama koji su uključeni u *in vivo* djelovanje, ni jedna *in vitro* kemijska metoda nije dovoljna za procjenu i usporedbu njihovih antioksidacijskih svojstava. Osim toga, kemijski testovi ne uzimaju u obzir mjerodavne parametre koji uključuju biološko okruženje kao što su lipofilnost i bioraspoloživost pa dobivene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta ne moraju nužno odgovarati djelovanju koje bi se ispoljilo *in vivo*.

Dobar antioksidans nije samo dobar hvatač radikala i reducens spoja, nego molekula koja može iskazati antioksidativno djelovanje aktivacijom transkripcijskih faktora koji induciraju ekspresiju antioksidacijskih enzima, a time i poboljšanje stanja oksidativnog stresa (Jones, 2006). Prema tome, da bi se procijenio novi produkt u obliku antioksidansa, kao tvari koja može promijeniti stanično redoks stanje, potrebno je napraviti ispitivanje na razini stanica jer je sudjelovanje različitih komponenti stanice ključno za konačni razvoj antioksidacijskog odgovora (Lopez-Alarcon i Denicola, 2013).

Prilikom određivanja antioksidacijske učinkovitosti poželjno je odabrati metode koje su općenito prihvaćene, validirane i standardizirane, s brojnim usporedivim podacima dostupnim u literaturi.

1.4.1. Kemijske metode

Uzimajući u obzir kompleksnost koja je uključena u *in vivo* djelovanje antioksidansa, razvijene su različite *in vitro* metode da na jednostavan eksperimentalan način procijene kapacitet antioksidansa i njegov utjecaj na ROS/RNS. Te metode se temelje na različitim strategijama s ciljem da procijene:

- potrošnju antioksidansa na stabilne slobodne radikale
- kapacitet antioksidansa da reducira bakrene ili željezne ione
- sposobnost antioksidansa da zaštiti ciljnu molekulu izloženu izvoru slobodnih radikala
- kapacitet antioksidansa da inhibira oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL-a)

1.4.1.1. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala ($DPPH^{\cdot}$, $ABTS^{\cdot+}$)

DPPH (2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal i ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) radikal kation su dva stabilna i obojena slobodna radikala koja se naširoko koriste za određivanje antioksidacijskog kapaciteta (Brand-Williams i sur., 1995; Miller i sur. 1993). $DPPH^{\cdot}$ je komercijalno dostupan, a $ABTS^{\cdot+}$ treba proizvesti oksidacijom ABTS-a uz pomoć oksidansa kao što su $K_2S_2O_8$, MnO_2 ili peroksil radikali (Henriquez i sur., 2002). $DPPH^{\cdot}$ je topljiv u organskim otapalima i pokazuje tipičnu apsorpciju pri 517 nm (u etanolu), dok je $ABTS^{\cdot+}$ topljiv u vodenom i alkoholnom mediju te se koristi njegova apsorpcija na 734 nm. Obično se intenzitet smanjenja apsorpcije u prisutnosti uzoraka koji sadrže antioksidanse, bilježi nakon fiksnog vremena inkubacije (30 min ili manje) što znači da kinetički podaci nisu uzeti u obzir. Prema tome, uvodi se parametar antiradikalne učinkovitosti koji uključuje kinetičke čimbenike da bi se karakterizirala reakcija između $DPPH^{\cdot}$ i polifenola (Sanchez-Moreno i sur., 1998).

Nedostaci ovih testova su složeni mehanizmi reakcija, ovisnost indeksa o eksperimentalnim uvjetima te mala sličnost između kemijskih struktura $DPPH^{\cdot}$ i $ABTS^{\cdot+}$ sa slobodnim radikalima stvorenim u biološkim sustavima (Roginsky i Lissi, 2005).

1.4.1.2. Redukcija metalnih iona (testovi FRAP i CUPRAC)

Ove metode imaju za cilj procijeniti sposobnost uzorka da reducira željezne i bakrene ione u vodenom mediju. FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) test izvorno razvijen za procjenu djelovanja ljudske plazme kao antioksidansa, temelji se na reakciji Fe (III)- tripiridil-triazin kompleksa (Fe^{III}-TPTZ)) s antioksidansima (Benzie i Strain, 1996), dok CUPRAC (*Cupric ion-Reducing Antioxidant Capacity*) test određuje sposobnost uzorka da reducira Cu (II)-neokuproin kompleks (Cu^{II}-Nc) (Apak i sur., 2004). Osnova obiju metodologija je da kompleksi TPTZ ili Nc s reduciranim oblikom metala prikazuju karakteristične vidljive apsorpcijske vrpce s maksimalnim intenzitetom na 593 i 450 nm za FRAP i CUPRAC test. Prema tome, sposobnost uzorka da reducira metalne komplekse, nakon određenog vremena inkubacije stvara odgovarajuće vidljive apsorpcijske vrpce koje se koriste za određivanje FRAP ili CUPRAC vrijednosti. FRAP test zahtijeva kiseli pH (3.6), dok se CUPRAC provodi pri pH 7.0 pa bolje simulira fiziološke uvjete (Gungor i sur., 2011).

Glavna prednost ovih metoda je jednostavnost eksperimentalnih uvjeta. Međutim, kao i kod testova temeljenih na $DPPH^{\cdot}$ i $ABTS^{\cdot+}$, FRAP i CUPRAC indeksi ovise o vremenu reakcije. Ovisno o uzorku koji se istražuje, mogu biti registrirane različite krajnje točke

reakcija. U novije vrijeme je predložen odgovarajući kinetički pristup da izrazi antioksidacijski kapacitet na više standardiziran način (Magalhaes i sur., 2012).

1.4.1.3. Kompetitivne metode (testovi ORAC I TRAP)

Ove metodologije procjenjuju sposobnost određenog uzorka da inhibira potrošnju ciljne molekule posredovanu peroksil radikalima, što se prati UV-vidljivom apsorpcijom ili fluorescencijskom spektroskopijom. Obično se AAPH (2,2´-Azobis-(2-metilpropionamidin) hidroklorid) koristi kao izvor peroksil radikala ($ROO^{\cdot}$), koji proizvodi $ROO^{\cdot}$ poznatom brzinom u prvim satima inkubacije u vodenom mediju, prema reakciji (Niki, 1990):

$AAPH + O_2 \rightarrow 2ROO^{\cdot} + N_2$

Inkubacija AAPH s određenom ciljnom molekulom (CM) dovodi do promjene u UV-vidljivoj apsorpciji ili intenzitetu fluorescencije te CM. Dakle, ko-inkubacija CM, AAPH i čistog antioksidansa ili njegove složene smjese (XH) obično dovodi do inhibicije potrošnje CM. Reakcije koje sudjeluju u ovim testovima su:

$ROO^{\cdot} + CM \rightarrow$ potrošnja

$ROO^{\cdot} + XH \rightarrow X^{\cdot} + ROOH$

$2ROO^{\cdot} \rightarrow$ ne-radikalni produkti

ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) test je jedan od najviše upotrebljavanih. U njemu se antioksidacijski kapacitet procjenjuje iz površine ispod krivulje (AUC) od kinetičkih profila potrošnje ciljne molekule. AUC vrijednosti se uspoređuju s galnom kiselinom ili Troloxom® (hidrosolubilni analog vitamina E) što omogućava određivanje ORAC indeksa u odnosu na ove referentne spojeve. ORAC test je jednostavna i standardizirana metoda, ali nedostatak su mu sekundarne reakcije koje mogu biti prisutne (Bisby i sur., 2008).

TRAP (*Total radical-trapping antioxidant parameter*) test se temelji na unosu kisika koji je povezan s procesom peroksidacije u ljudskoj plazmi (Wayner i sur., 1985). Važno je uzeti u obzir da TRAP indeks odražava uglavnom broj $ROO^{\cdot}$ uhvaćenih po molekuli antioksidansa, što nam govori da je on isključivo pokazatelj stehiometrijskog odnosa.

1.4.1.4. Oksidacija lipoproteina niske gustoće (LDL-a)

Oksidacija LDL-a posredovana ROS/RNS je istraživana prije mnogo godina. Sada je dobro poznato da ROS imaju središnju ulogu u inicijaciji, propagaciji i terminaciji procesa lipidne peroksidacije LDL-a (Halliwell i Gutteridge, 2007). *In vitro* testovi obično koriste bakrov sulfat kao pokretač procesa LDL oksidacije i lipidne peroksidacije koji se mogu lako

pratiti UV-spektroskopijom i/ili kemiluminescencijom (Puhl i sur., 1994). Kada se bakrov sulfat doda u otopinu LDL-a, kinetički profili su karakterizirani postojanjem vremena zaostajanja povezanog s prisutnošću endogenih antioksidansa (uglavnom vitamina E i koenzima Q) u čestici LDL-a. U prisutnosti antioksidansa vrijeme zaostajanja se povećava što ukazuje na dodatnu zaštitu LDL-a u uzorku. Prema tome, mjerenje spomenutog vremena se koristi za procjenu antioksidacijskog kapaciteta.

Glavna prednost ovog testa je upotreba biološki značajne mete, a jedan od najvažnijih nedostataka je varijabilnost zbog složenosti LDL-čestice. Isto tako, kada se bakrov sulfat koristi kao pokretač oksidacije, treba uzeti u obzir da antioksidacijski učinak također može potjecati kao posljedica mogućeg keliranja bakra u uzorku.

1.4.1.5. Testovi temeljeni na nanočesticama

U novije vrijeme su za procjenu antioksidacijskog kapaciteta predloženi novi kemijski testovi temeljeni na nanotehnologiji. Upotrebom zlatnih nanočestica iz Au^{III} otopine ($HauCl_4$) procijenjena je antioksidativna moć nekoliko fenolnih kiselina. Optička svojstva nastalih Au-nanočestica dobro koleriraju s redukcijskim potencijalom fenolnih kiselina što je izmjereno cikličkim voltametrom te je predloženo kao oblik za procjenu antioksidacijskog kapaciteta čistih spojeva i složenih smjesa (Scampicchio i sur., 2006).

U kasnijim studijama koriste se srebrne nanočestice u metodi nazvanoj SNPAC (*Silver NanoParticle Antioxidant Capacity*). Ova metoda upotrebljava Trolox® kao standardni antioksidans i odražava ukupni antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Ispitivanje se temelji na sposobnosti polifenola da reduciraju Ag^+ ione u prisutnosti citrata te se ocjenjuje intenzitet apsorbancije vidljive na 423 nm da bi se kvantitativno odredio antioksidacijski kapacitet (Ozyurek i sur., 2012).

Kao prednost, metoda je pokazala dobru linearnost s koncentracijom polifenola na koju nije utjecala prisutnost reducirajućih šećera, voćnih kiselina ni aminokiselina sadržanih u ekstraktu. Ovi novi testovi temeljeni na nanočesticama obuhvaćaju nova i obećavajuća područja, kombinirajući nanoznanost s hranom i zdravstvenim istraživanjima.

1.4.1.6. Ostali kemijski testovi

Osim već opisanih testova, također su predložene i druge metodologije za procjenu antioksidacijskog kapaciteta. Te metode imaju za cilj procijeniti aktivnost hvatanja ROS/RNS nastalih *in vivo* kao što su superoksidni anion, hidroksilni radikal, peroksinitrit i hipoklorit.

1.4.2. Određivanje na razini stanica

Testovi izvan *in vitro* kemijskih testova za ispitivanje potencijalnih antioksidansa su skuplji jer zahtijevaju složeni stanični sustav za testiranje ili potpuna klinička ispitivanja analizirajući uzorke krvi prije i nakon konzumacije proizvoda. Međutim, veoma je važno nastaviti stanične analize nakon određivanja antioksidacijske aktivnosti *in vitro* kemijskim metodama kako bi se približili nekim pokazateljima bioraspoloživosti potencijalnog antioksidansa kao što su apsorpcija, metabolizam i odjeljivanje kroz membrane koji su od ključne važnosti za učinkovitost antioksidansa *in vivo*. Istraživanja na životinjama i ljudima su prikladnija, ali skuplja i dugotrajnija, čineći testove na staničnim kulturama veoma primamljivim kao prijelaznim metodama ispitivanja.

Budući da se prema novoj definiciji antioksidans opisuje kao aktivni redoks spoj ili smjesa koja može modulirari redoks stanje stanice, vrlo je važno koristiti stanične analize kako bi se procijenio antioksidativni potencijal spoja ili ekstrakta. Antioksidacijsko djelovanje nije ograničeno samo na hvatanje ROS/RNS već obuhvaća i povećanu regulaciju antioksidacijskih i detoksikacijskih enzima, modulaciju stanične signalizacije i gensku ekspresiju (Lopez-Alarcon i Denicola, 2013).

1.4.2.1. Test stanične antioksidativne aktivnosti (CAA)

CAA (*Cellular antioxidant activity*) test se upotrebljava za procjenu antioksidacijskog djelovanja ekstrakata hrane i dodataka prehrani (Wolfe i Liu, 2007). U njemu se koriste ljudske stanice hepatokarcinoma HepG2 zajedno s dihidrodiklorofluoresceinom $DCFH_2$ koji se lako oksidira s peroksil radikalima (iz AAPH) na fluorescentni diklorofluorescein DCF. Ovom metodom mjeri se sposobnost spojeva da spriječe unutarstaničnu oksidaciju $DCFH_2$ koja se može pratiti fluorescencijom, a rezultati se izražavaju u molovima ekvivalenta kvercetina (Lopez-Alarcon i Denicola, 2013). Među čistim spojevima koji su ispitani CAA testom, kvercetin je pokazao najveću aktivnost, nakon čega slijede kemferol, miricetin, epigalokatehin galat i luteolin. Nasuprot tome, kafeinska kiselina, galna kiselina i askorbinska kiselina pokazale su manje od 1% aktivnosti (Wolfe i Liu, 2007).

Rad sa stanicama ne može se poistovjetiti s izoliranim kemijskim reakcijama. Stanični odgovor je poprilično složen pa se očekuje više varijabilnih rezultata ovisno o uvjetima ispitivanja kao što su rast staničnih linija, razina endogenih antioksidansa i početna proizvodnja ROS/RNS. Korišteni su različiti tipovi stanica osim HepG2 , uključujući zrele diferencirane crijevne stanice Caco-2 (Sessa i sur., 2011), ljudske stanične linije

adenokarcinoma želuca AGS sa svojstvom brze proliferacije (Xu i sur., 2010), vaskularne endotelne stanice EA.hy926 (Ziberna i sur., 2010), ljudske stanične linije makrofaga U937 (Roy i sur., 2009) te ljudske plućne fibroblaste WI38, IMR-90 (Ahn i Je, 2011). Svojstva stanične linije korištene u CAA testu mogu utjecati na rezultat.

Drugi test koji se temelji na stanici koristi kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao jednostavan model za procjenu antioksidacijskog kapaciteta prirodnih produkata u živim sustavima (Dani i sur., 2008; Belinha i sur., 2007; Wilmsen i sur., 2005).

1.4.2.2. Ekspresija antioksidacijskih enzima i inhibicija prooksidacijskih enzima

Prethodno opisan CAA test procjenjuje antioksidacijsko djelovanje pojedinog spoja ili složene smjese, ali ne govori o mehanizmu djelovanja koji se koristi za smanjenje oksidativnog stresa. Prema tome, može se ići dalje i istražiti je li spoj inhibira oksidazu (npr. NADPH oksidazu koja proizvodi superoksid) ili inducira ekspresiju antioksidacijskih enzima (npr. superoksid dismutazu) što u oba slučaja dovodi do smanjene razine superoksida/H_2O_2 (Lopez-Alarcon i Denicola, 2013).

1.4.2.3. Aktivacija ili represija redoks transkripcijskih faktora

Ako je antioksidans u mogućnosti međusobno djelovati s redoks transkripcijskim faktorom, pojačavajući ekspresiju antioksidativnih enzima, to dovodi do pojačanog antioksidacijskog odgovora. Naspram toga, količina antioksidacijskog spoja koja je potrebna za dobivanje istog odgovora uslijed direktne redukcije je puno veća, čak i s jakim redukcijskim spojem. Međutim, antioksidativna sposobnost hvatanja slobodnih radikala je brzi put za zaštitu bioloških meta od oksidacije, dok je učinak posredovan regulacijom antioksidativnih enzima puno sporiji, ovisno o biosintezi novih proteina.

Otkriveno je da izolirani polifenoli (poput kurkumina i kvercetina) kao i ekstrakti prirodnih produkata vrše antioksidacijski odgovor aktivacijom Nrf-2 (Arredondo i sur., 2010; Tanigawa i sur., 2007; Shen i sur., 2006; Balogun i sur., 2003). Pored toga, inhibicija Nf-kB pruža protuupalni/antioksidativni odgovor koji je dobiven inkubacijom staničnih kultura s fenolnim spojevima poput kurkumina (Biswas i sur., 2005) ili voćnim ekstraktima poput borovnice (Xie i sur., 2011).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Prerada plodova masline rezultira velikom količinom komine koja se smatra otpadom, iako je ona zapravo vrijedan nusproizvod koji se dalje može koristiti u mnogim različitim putevima. Komina masline je bogata polifenolima za koje se pokazalo da su izvrsni antioksidansi. Zbog spoznaja o štetnom utjecaju slobodnih radikala na organizam i njihovoj ulozi u razvoju brojnih bolesti, povećan je interes za biljke bogate fenolnim spojevima, s ciljem pronalaska sredstava za prevenciju i liječenje bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom.

U ovom radu istražen je utjecaj različitih vrsta ciklodekstrina korištenih tijekom ultrazvučne ekstrakcije na antiradikalnu i reduktivnu učinkovitost dobivenih liofiliziranih ekstrakta komine masline. Ciklodekstrini predstavljaju skupinu farmaceutski pomoćnih tvari koja mijenja nepovoljne karakteristike lijekova stvaranjem inkluzijskih kompleksa. Inkapsulacijom polifenola povećava se njihova kemijska stabilnost čime se utječe na zadržavanje antioksidativne aktivnosti fenolnih spojeva. Zahvaljujući biokompatibilnosti i netoksičnosti, ciklodekstrini se mogu koristiti u ljekovitim oblicima namijenjenim za različite putove primjene. Prema tome, cilj ovog diplomskog rada je bio odrediti najpogodniju vrstu i koncentraciju ciklodekstrina uz koji će dobiveni liofilizati komine ispoljiti najveću antioksidacijsku učinkovitost. Rezultati ovog istraživanja predstavljaju važan korak u razvoju i optimizaciji postupaka za dobivanje funkcionalnih ekstrakata komine masline.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci za analizu

Analizirani uzorci su liofilizirani ekstrakti komine masline (*Olea europea sativa L. Oleaceae*). Uzorci komine su ekstrahirani prema prethodno optimiranom postupku ultrazvučne ekstrakcije bez ciklodekstrina te uz dodatak različitih ciklodekstrina u različitim koncentracijama, što je prikazano u Tablici 2.

Tablica 2 . Različite vrste i koncentracije ciklodekstrina primijenjenih u analizi

oznaka	**ekscipijens**	**koncentracija**
1	/	/
2	β-CD	1.6 g/200 mL
3	γ-CD	1.6 g/200 mL
4	γ-CD	3.2 g/200 mL
5	HP-β-CD	1.6 g/200 mL
6	HP-β-CD	3.2 g/200 mL
7	METIL-β-CD	1.6 g/200 mL
8	METIL-β-CD	3.2 g/200 mL

3.1.2. Kemikalije i pribor

- Diamino-2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiaazolin-6-sulfonska kiselina), Sigma, St. Luis, USA
- Kalijev persulfat, p.a., Sigma, St. Luis, USA
- Etanol, p.a., Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Natrijev karbonat, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu fenol reagens, Fluka, Buchs, Švicarska
- 2, 2'-difenil-1-pikrilhidrazil slobodni radikal, p.a., Sigma, St. Luis, USA
- Metanol, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Ependorf kivete
- Falcon kivete
- mikropipete

3.1.3. Instrumenti

- Analitička vaga, AB265-S, Metler Toledo, Indija
- Vortex miješalica, tip VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan
- UV-VIS spektrometar UV 4-100, ATI Unicam, Cambridge, Velika Britanija
- Termostat, Inko, Zagreb, Hrvatska

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzoraka

Svaki liofilizirani uzorak otopi se zasebno u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 5 mL s tim da se odvage uzoraka razlikuju. Masa uzorka 1 koji je bez ekscipijensa treba iznositi 250 mg, zatim masa uzoraka koji sadrže 1.6 g ekscipijensa treba biti 430 mg te uzorke s 3.2 g ekscipijensa treba odvagnuti u količini od 640 mg. Na taj način dobivaju se ekstrakti sa jednakim sadržajem čistog ekstrakta komine (odvage su korigirane na masu ekscipijensa u liofilizatu). Nakon toga, svaki uzorak potrebno je dodatno razrijediti destiliranom vodom kako bi podesili koncentracije za daljnja ispitivanja ovisno o primijenjenoj metodi.

3.2.2. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) test obuhvaća stvaranje dugoživućeg radikal kationa $ABTS^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) koji ima apsorpcijske maksimume na 414, 645, 734 i 815 nm. Temelji se na mjerenju sposobnosti antioksidansa da neutralizira $ABTS^{\cdot+}$ što rezultira smanjenjem apsorbancije reakcijske otopine i njenim obezbojenjem. Izvorni test kojeg su razvili Miller i sur. temeljio se na aktivaciji metmioglobina s vodikovim peroksidom pri čemu nastaje ferimioglobin radikal. Stvoreni radikal zatim reagira s ABTS-om što rezultira stvaranjem ABTS radikal kationa i pojavom karakterističnog plavo-zelenog obojenja (Miller i sur., 1993). Redoslijed dodavanja reagensa i uzorka je tada istaknut kao glavna zamka jer antioksidansi mogu reagirati s H_2O_2 i/ili deriviranim oksidirajućim vrstama koje inhibiraju ABTS radikal kation, što vodi do viših vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (Strube i sur., 1997). Poboljšana verzija ove metode je stabilni ABTS radikal kation koji ima plavo-zeleni kromofor apsorpcije, proizveden oksidacijom ABTS-a s kalijevim persulfatom prije dodavanja antioksidansa.

Uzimajući u obzir uvjete analize provode se različiti postupci za stvaranje ABTS-a, bira se različito vrijeme reakcije, valna duljina za praćenje reakcije te referentni antioksidans. ABTS radikal kation može nastati kemijskom reakcijom koristeći manganov dioksid (Miller i sur., 1996), AAPH (Van den berg i sur., 1999) ili kalijev persulfat (Re i sur., 1999), enzimskom reakcijom pomoću metmioglobina (Miller i sur., 1993) ili peroksidaze iz hrena (Cano i sur., 1998) te elektrokemijskim stvaranjem (Alonso i sur., 2002). Usvojeno je vrijeme reakcije u rasponu od 1 do 30 minuta. Obzirom na valnu duljinu detekcije, poželjno je određivanje na 734 nm zbog minimalnih smetnji drugih apsorpcijskih komponenti, a kao referentni spojevi mogu se koristiti Trolox®, askorbinska kiselina, butilhidroksitoluol, rutin i galna kiselina. Prema Trolox® ekvivalentima je opisani antioksidativni test dobio i naziv.

Ovaj spektrofotometrijski test je tehnički jednostavan, što objašnjava njegovu primjenu za rutinska mjerenja. Hvatanje $ABTS^{\cdot+}$ može se procijeniti u širokom pH području što je korisno za proučavanje učinka pH na antioksidativne mehanizme. Budući da je ABTS radikal topljiv u vodi i organskim otapalima, moguće je određivanje antioksidacijskog kapaciteta i hidrofilnih i lipofilnih spojeva. Međutim, ovo ispitivanje je kritizirano pošto ABTS radikal nije predstavnik biomolekule niti se može naći u nekom biološkom sustavu. Termodinamički gledano, bilo koji spoj koji ima redoks potencijal niži od $ABTS^{\cdot+}$ može reagirati s radikalom (Magalhaes i sur., 2008).

REAGENSI:

1. ABTS stock otopina

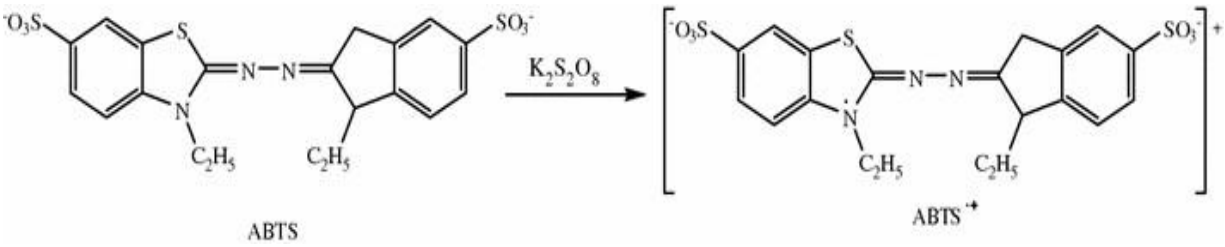
Pripremi se 7 mM otopina ABTS-a otapanjem 10 mg ABTS-a u 2.6 mL destilirane vode.

2. Otopina kalijevog persulfata ($K_2S_2O_8$)

Za pripremu 2.45 mM otopine treba odvagati 33.1 mg $K_2S_2O_8$ i otopiti u 50 mL destilirane vode.

3. Otopina ABTS radikala

Nastaje miješanjem otopine ABTS-a i kalijevog persulfata u jednakim omjerima pri čemu momentalno počinje stvaranje ABTS radikala (Slika 7). To se očituje nastankom plavog-zelenog obojenja, a reakcija je završena tek nakon više od 6 sati. Zbog toga je otopinu potrebno držati 12 sati u mraku do nastanka konačnog intenziteta boje. Nakon 12 sati otopina se mora razrijediti tako da njena apsorbancija na 732 nm iznosi 0,700±0,02. Prema tome, O.5 mL otopine ABTS radikala razrijedi se dodatkom 20 mL destilirane vode pri čemu je izmjerena apsorbancija iznosila A_{732nm}=0,709.



Slika 7. Formiranje stabilnog ABTS radikal kationa djelovanjem kalijevog persulfata

4. Trolox stock otopina

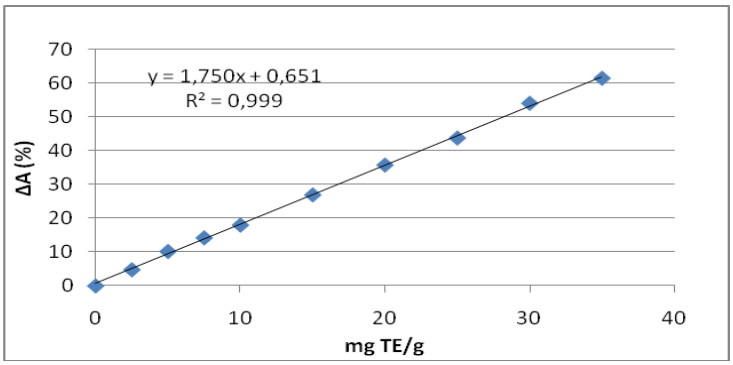
Prvo se pripremi 20 mL stock 1 otopine koncentracije 1 mg/mL otapanjem Trolox®-a u 96% etanolu. Razrjeđivanjem pripremljene otopine 10 puta dobiva se stock 2 otopina (2.5 mL razrijediti na 25 mL).

- Izrada baždarnog dijagrama

Baždarni dijagram izrađuje se mjerenjem apsorbancija radnih otopina poznate koncentracije. Radne otopine izrađuju se razrjeđivanjem etanolom različitih volumena stock otopine Trolox®-a (0.25, 0.5, 0.7, 1.2, 1.9, 2.3, 2.8, 3.5) mL na 10 mL.

Reakcijska smjesa (mjerna otopina) izrađuje se miješanjem 300 µL radne otopine Trolox®-a i 2,5 mL otopine ABTS radikala. Apsorbancija se mjeri nakon tri minute.

Iz vrijednosti baždarnog dijagrama očitavaju se vrijednosti antioksidacijskog potencijala izražene kao Trolox® ekvivalenti (Slika 8). To je koncentracija Trolox® otopine (mM) koja ima istu antioksidativnu aktivnost kao i 1.0 mM otopina tvari koja se ispituje.



Slika 8. Baždarni dijagram za određivanje antioksidacijskog potencijala (izraženog kao ekvivalenti Troloxa®)

POSTUPAK:

U Ependorf kivete otpipetira se po 150 µL uzorka komine masline koji je razrijeđen 30 puta. Reakcijska smjesa se pripremi tako da se na uzorak doda 1.75 mL ABTS radikala te se odmah počne mjeriti vrijeme. Pripremljena smjesa se izvorteksira i prebaci u kivetu spektrofotometra pa se nakon tri minute mjeri apsorbancija na 732 nm (A). Maksimalna apsorbancija (u vremenu t=0) određuje se tako da se u kiveti pomiješa 150 µL otapala i 1.75 mL ABTS radikala te se izmjeri apsorbancija nakon 2 min (Amax). Uzorci su analizirani u triplikatu. Postotak gašenja apsorbancije proprcionalan je koncentraciji antioksidansa u uzorku a računa se prema formuli:

$$\Delta A = \frac{Amax - A}{Amax} * 100$$

3.2.3 Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala FOLIN-CIOCALTEU metodom

Folin-Ciocalteu metoda temelji se na prijenosu elektrona u alkalnom mediju s fenola i drugih redukcijskih vrsta na molibden, stvarajući plave komplekse koji se mogu detektirati spektrofotometrijski na 750-765 nm. Nastali plavi kompleksi ne ovise o strukturi fenolnih spojeva pa se odbacuje mogućnost koordinacijskih kompleksa formiranih između metala i fenolnih spojeva (Singleton i sur., 1999). Udio polifenola i ostalih reducirajućih tvari u uzorku proporcionalan je intenzitetu nastalog obojenja. Kao referentni standardni spoj, obično se koristi galna kiselina te se rezultati izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (GAE- *Gallic Acid Equivalence*).

Točna kemijska svojstva Folin-Ciocalteu reagensa nisu poznata, ali se zna da sadrži smjesu fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline koja je žute boje. FC reagens nije specifičan za fenolne spojeve i može biti reduciran s mnogim ne-fenolnim spojevima (npr. aromatskim aminima, sumpornim dioksidom, askorbinskom kiselinom, bakrom, željezom itd.), pa zbog toga nije prikladan za određivanje ukupnog sadržaja fenola, osim ako su interferirajuće vrste uzete u obzir ili uklonjene (Prior i sur., 2005; Singleton i sur., 1999). Dakle, FC test se upotrebljava za mjerenje ukupnog redukcijskog potencijala uzorka.

FC metoda je jednostavna za izvođenje, ponovljiva i prikladna za procjenu antioksidacijskog kapaciteta budući da je postupak standardiziran, reagens komercijalno dostupan, a interferncije matriksa minimalne jer stvoreni kompleksi apsorbiraju na velikim valnim duljinama. Međutim, originalna metoda je dugotrajna (2h) što otežava njezinu provedbu za rutinsku analizu te nije primjenjiva za lipofilne spojeve/matrikse jer se provodi u vodenoj fazi (Magalhaes i sur., 2008).

REAGENSI:

1. Folin-Ciocalteu reagens

Koristi se nerazrijeđeni originalni reagens.

2. Otopina Na_2CO_3

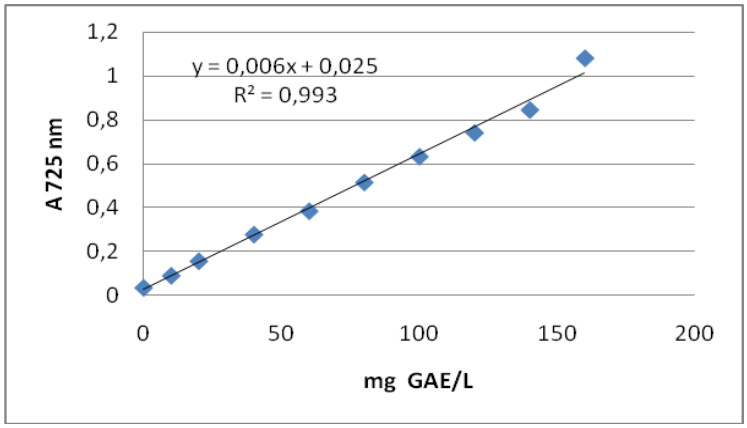
6 g bezvodnog Na_2CO_3 otopi se u 80 mL vode i prokuha. Nakon hlađenja doda se par kristala Na_2CO_3 i ostavi stajati 24 h. Otopina se nakon toga profiltrira kroz gusti filter papir i nadopuni u odmjernoj tikvici do 100 mL.

3. Standardna otopina galne kiseline

Ishodna otopina galne kiseline koncentracije 4 mg/mL izrađuje se otapanjem 400 mg galne kiseline u 10 mL etanola i nadopunjavanjem do 100 mL sa destiliranom vodom→ IO1. Ishodna otopina galne kiseline koncentracije 0.4 mg/mL izrađuje se razrjeđivanjem ishodne otopine 1 (IO1) 10 puta (10 mL razrijediti na 100 mL destiliranom vodom)→ IO2.

- Izrada baždarnog dijagrama

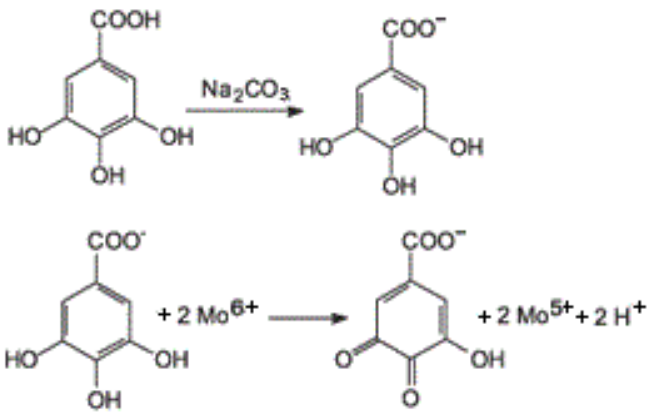
Radne otopine izrađuju se razrjeđivanjem destiliranom vodom različitih volumena ishodne otopine 2 (0.25, 0.50, 0.75, 1.25, 1.75, 2.50, 3.00, 3.75) mL na 10 mL. Od svake otopine poznate koncentracije galne kiseline pripremi se mjerna otopina (kako je u nastavku opisano za uzorak) te se mjeri apsorbancija na 725 nm (Slika 10). Dobivene vrijednosti koriste se za izradu baždarnog dijagrama (Slika 9).



Slika 9. Baždarni dijagram za određivanje ukupnog redukcijskog potencijala uzorka (izraženog kao ekvivalenti galne kiseline)

POSTUPAK:

U Falcon kivetu od 15 mL otpipetira se 200 μL adekvatno razrijeđenog uzorka, doda 1.35 mL destilirane vode te 150 μL FC reagensa i dobro promućka. Nakon 5 minuta doda se 1.5 mL 6 % Na_2CO_3 i ponovno dobro promućka. Vrši se inkubacija 30 minuta na 50 °C pri čemu se razvija plava boja. Poslije hlađenja uzoraka mjeri se apsorbancija svake otopine na 725 nm, a kao slijepa proba koristi se mjerna otopina pripremljena s ekstrakcijskom sredstvom. Uzorci su analizirani u triplikatu. Pomoću baždarnog dijagrama izračunaju se koncentracije polifenola i izraze kao ekvivalenti galne kiseline.

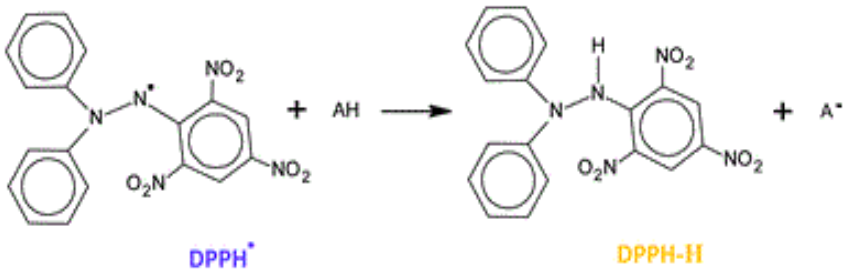


Slika 10. Reakcija galne kiseline s molibdenom (komponentom FC-reagensa)

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH testom

U ovom testu, ljubičasti kromogen 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH$^{\bullet}$) se reducira s antioksidansima/redukcijskim spojevima u odgovarajući blijedožuti hidrazin (DPPH-H) što je prikazano na Slici 11 (Blois, 1958). Sposobnost hvatanja radikala općenito se procjenjuje u organskom mediju, praćenjem smanjenja apsorbancije pri (515-528 nm) dok ne postane konstantna (Brand-Williams i sur., 1995) ili pomoću elektronske spinske rezonancije (Calliste i sur., 2001). Nasuprot onoga što je vjerovano na početku istraživanja metode, reakcijski mehanizam se zasniva na reakciji prijenosa elektrona, dok je prijenos atoma vodika sekundarni reakcijski put koji se događa polako samo u jakim vodik-akceptorskim otapalima kao što su metanol i etanol (Foti i sur., 2004). Na kinetiku reakcije bitno utječu pH reakcijske smjese i otapalo. 50 % -tna voda/etanol otopina je prikladan izbor za lipofilne i hidrofilne antioksidanse, a brzina reakcije između DPPH$^{\bullet}$ i antioksidansa se može značajno povećati s povećanjem udjela vode. Međutim, pri sadržaju vode preko 60 % antioksidativni kapacitet se smanjuje jer dio DPPH radikala više nije dostupan za reakciju s antioksidansom uslijed međusobne reakcije dvaju radikala (Magalhaes i sur., 2008).

Sterička dostupnost DPPH radikala je glavna odrednica reakcije pa male molekule s boljim pristupom radikalu imaju veći antioksidacijski kapacitet (Huang i sur., 2005). S druge strane, mnogi veliki antioksidativni spojevi koji brzo reagiraju s peroksil radikalima, u ovom testu budu inertni ili reagiraju sporo. U biološkom sustavu DPPH$^{\bullet}$ i slični radikali ne postoje što također predstavlja nedostatak ove metode.



Slika 11. Redukcija DPPH radikala u hidrazin djelovanjem antioksidansa

REAGENSI:

1. Otopina DPPH radikala

Otopiti 7.2 mg DPPH u 100 mL metanola.

Svaki radni dan je potrebno pripremiti svježu otopinu.

2. Metanol

POSTUPAK:

Uzorak za analizu je ekstrakt komine masline razrijeđen s destiliranom vodom 20 puta.



Slika 12. Postupak određivanja antioksidacijskog potencijala DPPH TESTOM

U Falcon kivetama izrađuje se niz razrijeđenja prema shemi prikazanoj u Tablici 3 .

Tablica 3. Koncentracijski niz razrijeđenja uzorka

Volumen uzorka / µL	**Volumen metanola / µL**
100	400
200	300
300	200
400	100
500	0

Nakon toga se u svaku kivetu otpipetira po 1500 µL otopine DPPH radikala, dobro promućka i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi (Slika 12). Mjeri se početna apsorbancija (A_0) i apsorbancija nakon inkubacije od 30 minuta (A_{30min}). Kontrolni uzorak (A_0) sadrži 1500 µL DPPH radikala i 500 µL metanola. Uzorci su analizirani u duplikatu. Rezultati se prikazuju grafički, kao ovisnost postotka gašenja apsorbancije (ΔA) o koncentraciji uzorka. Iz jednadžbe pravca izračuna se parametar učinkovite koncentracije (EC_{50}). EC_{50} je koncentracija antioksidansa (uzorka) koja uzrokuje 50 %-tno smanjenje početne koncentracije $DPPH^{\cdot}$. Sposobnost vezanja radikala uzorka obrnuto je proporcionalna parametru učinkovite koncentracije.

Koncentracija uzorka izražava se u mg/mL. Ako je uzorak tekući, aproksimativno se uzima da 1 mL ekstrakta odgovara 1 g ekstrakta. Postotak gašenja apsorbancije (ΔA) računa se prema formuli:

$$\Delta A = \frac{100 \times (A_0 - A_{30})}{A_0}$$

4. REZULTATI

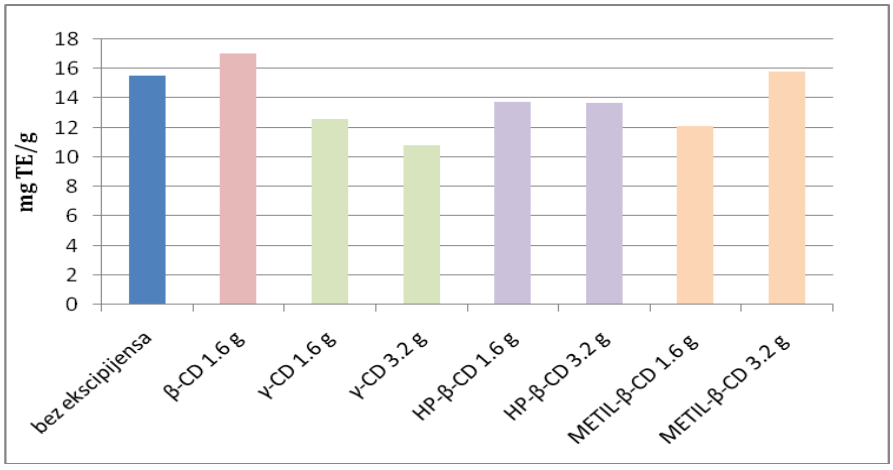
4.1. Utjecaj ciklodekstrina na ABTS antioksidacijsku učinkovitost

Za svaki uzorak u triplikatu izmjerena je apsorbancija pa se prema već navedenoj formuli izračuna postotak gašenja apsorbancije (ΔA). Ako je vrijednost izmjerene apsorbancije manja, postotak gašenja je veći, tj. veća je koncentracija antioksidansa u uzorku. Iz vrijednosti baždarnog pravca izračunaju se vrijednosti antioksidacijskog potencijala izražene kao Trolox® ekvivalenti i statistički parametri standardne devijacije (STDEV) i relativne standardne devijacije (RSD) koji ukazuju na točnost rezultata (Tablica 4). Rezultati su izraženi na korigiranu masu liofiliziranog ekstrakta koja je korigirana s obzirom na sadržaj ciklodekstrina u pripremljenom liofilizatu.

Tablica 4. Prikaz rezultata u TEAC metodi

UZORAK	mg TE/g	mg TE/g	mg TE/g	STDEV	RSD
bez ekcipijensa	14.952	15.865	15.865	0.527	3.389
β-CD 1.6 g	16.625	17.175	17.217	0.331	1.945
γ-CD 1.6 g	12.313	12.684	12.766	0.242	1.919
γ-CD 3.2 g	10.988	10.846	10.668	0.161	1.482
HP-β-CD 1.6 g	13.763	13.680	13.721	0.041	0.301
HP-β-CD 3.2 g	13.637	13.784	13.528	0.128	0.944
METIL-β-CD 1.6 g	11.391	12.666	12.241	0.649	5.371
METIL-β-CD 3.2 g	15.206	15.722	16.422	0.610	3.866

Najveća sposobnost vezanja radikala u TEAC metodi izmjerena je kod uzoraka koji su sadržavali ekscipijense β-CD 1.6 g, METIL-β-CD 3.2 g (Slika 13).



Slika 13. Ovisnost ABTS antioksidacijske učinkovitosti o koncentraciji i vrsti primijenjenog ekscipijensa

4.2. Utjecaj ciklodekstrina na ukupni reduktivni potencijal

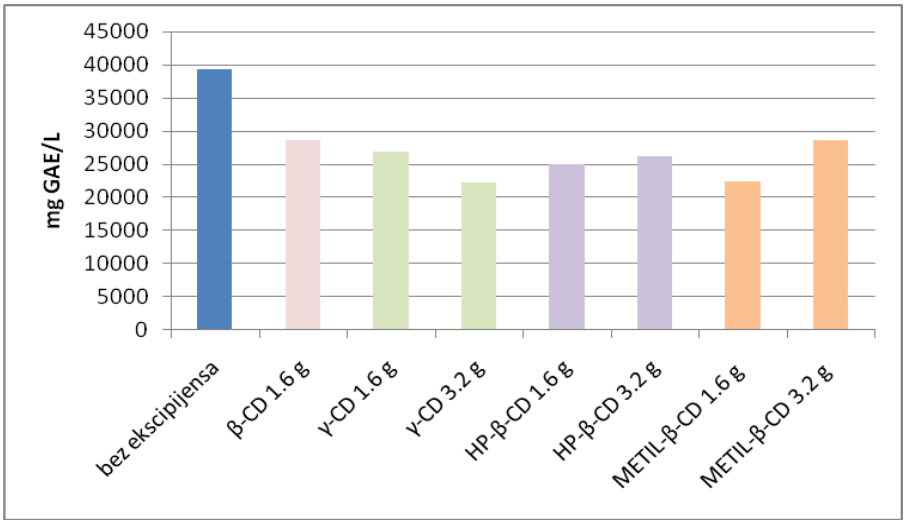
Kod određivanja ukupnog redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom mjere se apsorbancije uzoraka u triplikatu. Pomoću jednadžbe pravca dobivene iz baždarnog dijagrama s galnom kiselinom, za svaku izmjerenu apsorbanciju se izračuna koncentracija galne kiseline koja je ekvivalentna udjelu polifenola i ostalih reducirajućih tvari u uzorku. Iz izračunatih koncentracija dobiveni su statistički parametri standardna devijacija i relativna standardna devijacija (Tablica 5).

Tablica 5. Prikaz rezultata u Folin-Ciocalteu metodi

UZORAK	mg GAE/L	mg GAE/L	mg GAE/L	STDEV	RSD
bez ekcipijensa	39961.64	39327.98	38441.07	763.717	1.946
β-CD 1.6 g	28764.64	28816.49	28246.17	315.372	1.102
γ-CD 1.6 g	27434.44	25915.54	27382.07	862.214	3.204
γ-CD 3.2 g	22151.00	22015.33	22286.68	135.674	0.612
HP-β-CD 1.6 g	24303.16	24774.77	25717.97	720.382	2.889
HP-β-CD 3.2 g	26036.27	26533.66	25900.61	333.304	1.274
METIL-β-CD 1.6 g	22851.86	22694.55	21698.26	625.587	2.791
METIL-β-CD 3.2 g	28734.38	28507.34	28779.79	145.967	0.509

Rezultati su izraženi na korigiranu masu liofiliziranog uzorka uzevši u obzir sadržaj ciklodekstrina u liofilizatu.

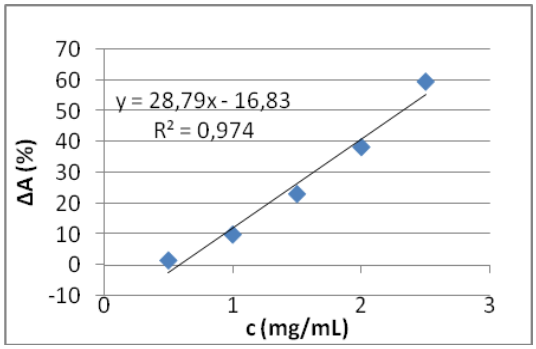
Najveći reduktivni potencijal u FC metodi je zapažen kod uzoraka koji su u svom sastavu kao ekscipijense sadržavali β-CD 1.6 g, METIL-β-CD 3.2 g te γ-CD 1.6 g (Slika 14).

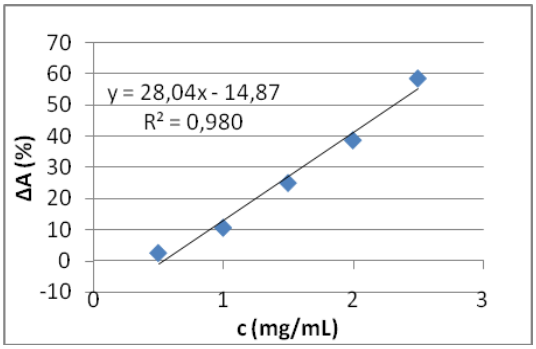


Slika 14. Ovisnost ukupnog reduktivnog potencijala o koncentraciji i vrsti primijenjenog ekscipijensa

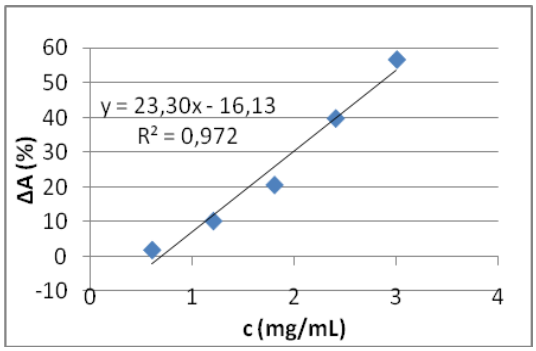
4.3. Utjecaj ciklodekstrina na DPPH

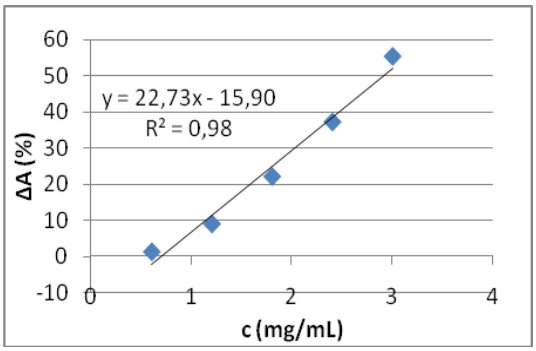
Nakon mjerenja apsorbancija pripremljenih reakcijskih smjesa i kontrolnog uzorka na 515 nm potrebno je izračunati postotak gašenja apsorbancije (ΔA) prema prethodno navedenoj formuli u postupku metode. Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost postotka gašenja apsorbancije o koncentraciji uzorka za svaki pojedini uzorak koji se radi u duplikatu (Slike 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) . Iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se EC_{50} tj. koncentracija uzorka koja je potrebna da bi se inicijalna apsorbancija otopine DPPH radikala (A_0) smanjila za 50 %. EC_{50} koncentracije su izražene na korigiranu masu liofiliziranog ekstrakta (korigirana obzirom na sadržaj ciklodekstrina u liofilizatu).



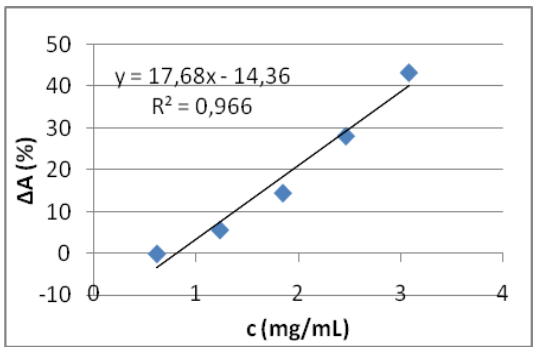


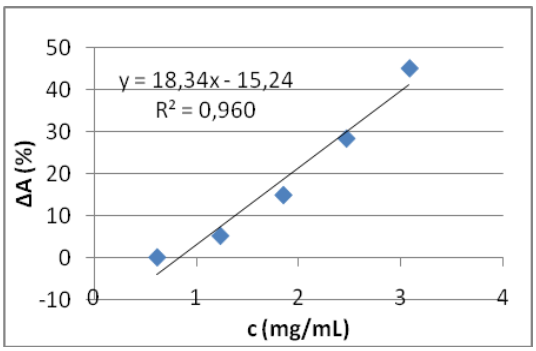
Slika 15. Graf ovisnosti gašenja apsorbancije o koncentraciji za uzorke 1 i 1´



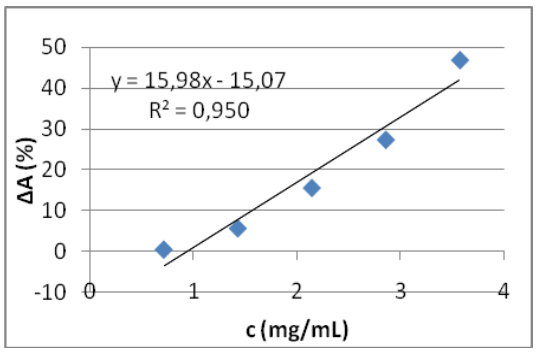


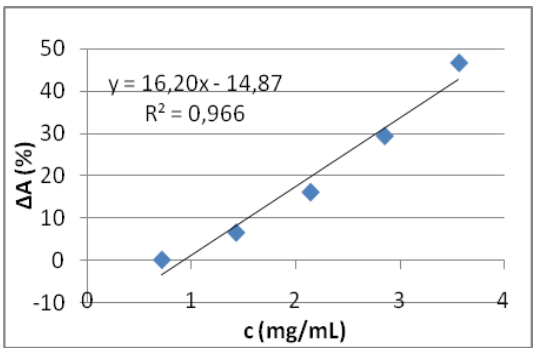
Slika 16. Graf ovisnosti gašenja apsorbancije o koncentraciji za uzorke 2 i 2´



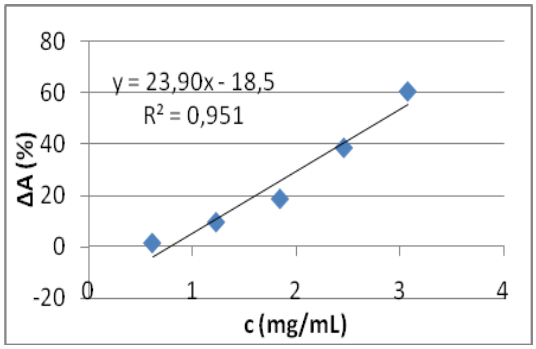


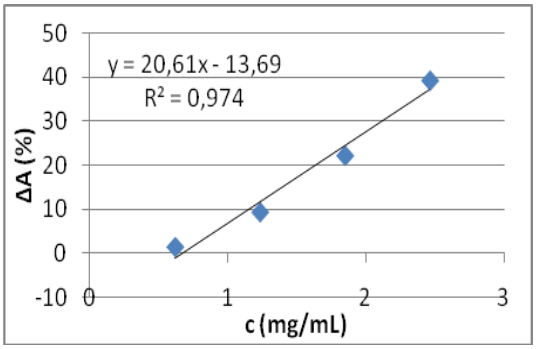
Slika 17. Graf ovisnosti gašenja apsorbancije o koncentraciji za uzorke 3 i 3´



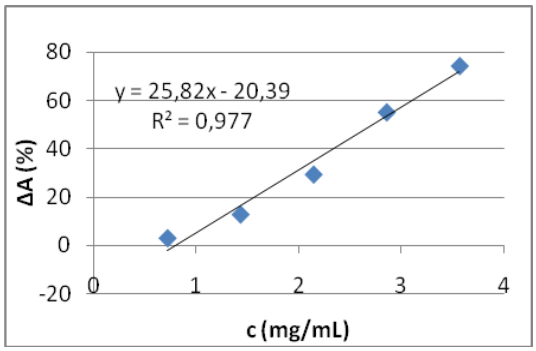


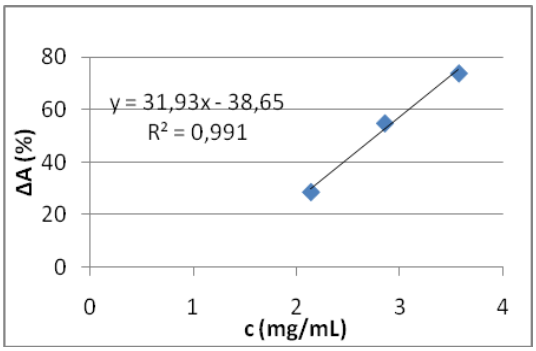
Slika 18. Graf ovisnosti gašenja apsorbancije o koncentraciji za uzorke 4 i 4´



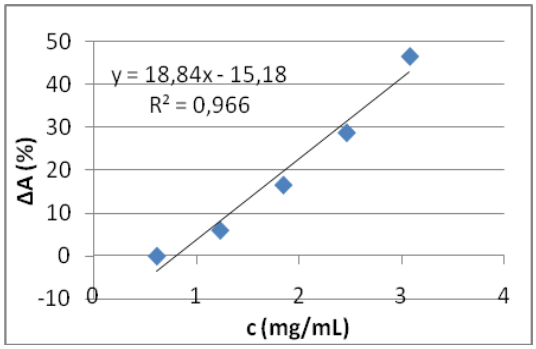


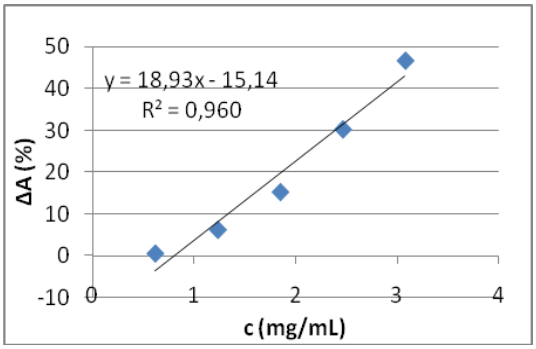
Slika 19. Graf ovisnosti gašenja apsorbancije o koncentraciji za uzorke 5 i 5´



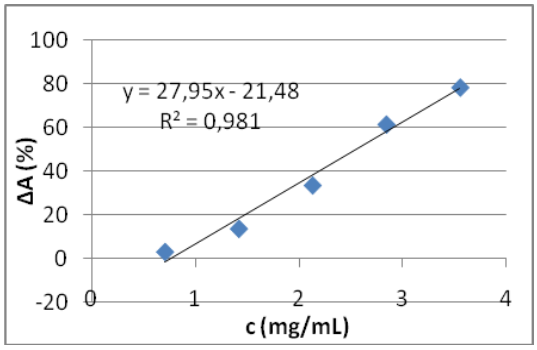


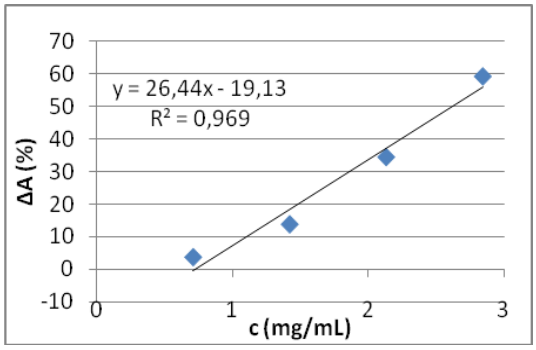
Slika 20. Graf ovisnosti gašenja apsorbancije o koncentraciji za uzorke 6 i 6´





Slika 21. Graf ovisnosti gašenja apsorbancije o koncentraciji za uzorke 7 i 7´



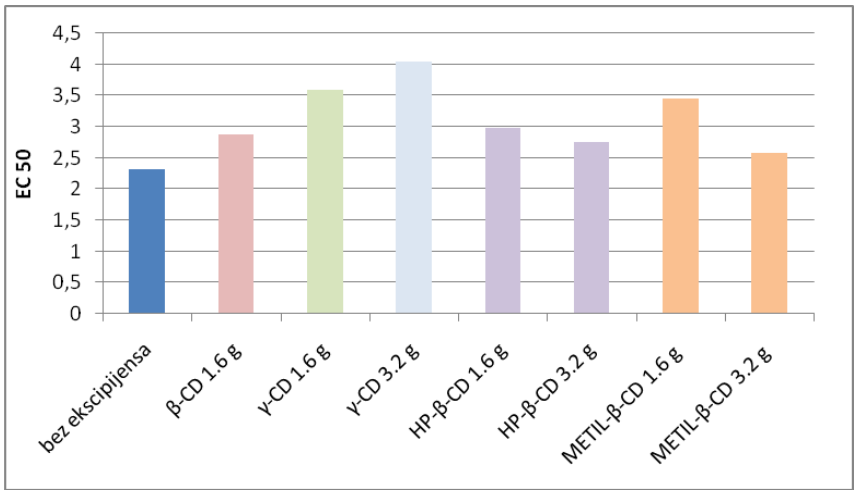


Slika 22. Graf ovisnosti gašenja apsorbancije o koncentraciji za uzorke 8 i 8´

U svim grafovima je vidljivo da se postotak gašenja apsorbancije povećava proporcionalno s povećanjem koncentracije uzorka. Preko izračunatih EC_{50} možemo dobiti vrijednosti standardne devijacije i relativne standardne devijacije, koje nam ukazuju na veliku točnost ovih mjerenja (Tablica 6).

Tablica 6. Prikaz rezultata u DPPH metodi

UZORAK	EC_{50}	EC_{50}	STDEV	RSD
bez ekcipijensa	2.321	2.313	0.005	0.238
β-CD 1.6 g	2.838	2.899	0.043	1.505
γ-CD 1.6 g	3.639	3.557	0.058	1.618
γ-CD 3.2 g	4.072	4.004	0.047	1.184
HP-β-CD 1.6 g	2.866	3.090	0.158	5.321
HP-β-CD 3.2 g	2.726	2.776	0.035	1.290
METIL-β-CD 1.6 g	3.459	3.441	0.013	0.380
METIL-β-CD 3.2 g	2.557	2.614	0.040	1.563



Slika 23. Ovisnost prosječne vrijednosti EC_{50} o koncentraciji i vrsti primijenjenog ekscipijensa

Budući da je sposobnost vezanja radikala u DPPH metodi obrnuto proprcionalna parametru učinkovite koncentracije iz Slike 23. može se očitati da najveći antioksidacijski potencijal imaju uzorci koji u svom sastavu sadrže ekscipijense METIL-β-CD 3.2 g, HP-β-CD 3.2 g te β-CD 1.6 g.

5. RASPRAVA

Iz dobivenih rezultata se može uočiti da je prema rezultatima dobivenim DPPH i Folin-Ciocalteu metodom najveću antioksidacijsku aktivnost imao uzorak pripremljen bez korištenja ekscipijensa, dok je TEAC antiradikalna učinkovitost nativnog uzorka bila nešto niža u odnosu na uzorke koji su sadržavali β-ciklodekstrin (1.6 g) i metil-β-ciklodekstrin (3.2 g). Dakle, u većini slučajeva prisutnost ciklodekstrina u uzorku smanjila je antioksidacijski potencijal dobivenog suhog ekstrakta. Budući da nativni suhi ekstrakti komine masline imaju izrazito loša organoleptička svojstva (ljepljiv, gumast, navlači vodu, neugodan miris) korištenje ekscipijensa je nužno. U tom smislu nužno je odabrati ekscipijens koji ima najmanji negativan utjecaj na udio bioaktivnih komponenti u suhom ekstraktu. Ciklodekstrini korišteni u ovom istraživanju odabrani su temeljem dostupnih literaturnih podataka gdje su korišteni kao sredstva za uklapanje u sličnim sustavima.

U dosadašnjim ispitivanjima različitih antioksidativnih spojeva (npr. epikatehina u zelenom čaju (Aree i Jongrungruagchok, 2016), kurkumina iz kurkume (Aadinath i sur., 2016), antocijana iz crnog graha (Aguilera i sur., 2016) itd.) najčešće je za inkapsulaciju korišten β-CD. On se općenito najčešće upotrebljava zbog ekonomskih razloga, jednostavnog načina dobivanja i najprikladnije veličine centralne šupljine, a uz to prema rezultatima ovog diplomskog rada, uzorci sa β-CD i njegovim derivatima su pokazivali veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na γ-CD. Kada su Ratnasoriya i Rupasinghe istraživali upotrebu vodene otopine ciklodekstrina za ekstrakciju odabranih bioaktivnih fenolnih spojeva iz komine grožda, uspoređeni su α, β i γ oblici. U tom slučaju, β-CD je također bio najučinkovitiji u ekstrakciji stilbena, flavanola i flavonola iz komine grožđa (Ratnasoriya i Rupasinghe, 2012). Općenito, veličina hidrofobne šupljine β-CD je pogodna za aromatske i heterocikličke spojeve s molarnom masom 200-800 g/mol (Waleczek i sur. 2003). Istraživanjem antioksidacijskog kapaciteta flavonola inkapsuliranih s HP-β-CD pomoću ORAC testa, uočena je povećana aktivnost flavonola koja je dostigla maksimalnu razinu kada je svaki flavonol bio uklopljen u hidrofobnu šupljinu ciklodekstrina. Antioksidativna aktivnost je porasla zbog zaštite flavonola od brze oksidacije slobodnim radikalima (Mercader-Ros i sur., 2010). Kfoury i suradnici su proučavali antioksidacijsko djelovanje kompleksa nastalih između ciklodekstrina i različitih fenilpropanoida koristeći DPPH metodu. Poznato je da antioksidativna aktivnost fenolnih spojeva kao što su fenilpropanoidi ovisi o stupnju hidroksilacije pa su spojevi bez hidroksilnih skupina slabije reagirali s DPPH radikalom. Međutim, njihova aktivnost je povećana u

prisutnosti CD-a što bi se moglo objasniti kao posljedica formiranja intramolekulskih vodikovih veza. Uočeno je da spojevi s jednom ili više hidroksilnih skupina zadržavaju aktivnost nakon kompleksacije s ciklodekstrinima što upućuje na to da ciklodekstrini ne interferiraju s aktivnim skupinama fenilpropanoida koje ostaju dostupne za reakciju s DPPH radikalima (Kfoury i sur., 2014).

Rezultati dobiveni u okviru ovog istraživanja pokazuju da se kao uzorci sa najvećom antioksidacijskom aktivnosti ističu oni sa dodatkom metil-β-CD (3.2 g/200 mL) i β-CD 1.2 g/200 mL) dok su uzorci s γ-CD (3.2 g/200 mL) u svim provedenim testovima pokazali najmanju aktivnost. Iz navedenih rezultata moguće je zaključiti da su za uklapanje polifenola u inkluzijske komplekse prikladniji β-ciklodekstrini koji imaju manju centralnu šupljinu u odnosu na γ-CD, a na antioksidacijsku aktivnost utječe i masa upotrijebljenog ekscipijensa.
U slučaju rezultata za ukupni redukcijski potencijal i DPPH antiradikalnu učinkovitost pokazalo se da svi uzorci pripremljeni sa dodatkom ciklodekstrina pokazuju manju antioksidacijsku učinkovitost u odnosu na nativni uzorak. Obzirom da je korištenje ekscipijensa nužno za formulaciju organoleptički prihvatljivog ekstrakta, bilo je potrebno izabrati uzorke kod kojih je opaženo najmanje smanjenje antioksidacijske učinkovitosti u odnosu na nativni uzorak. I u ovom slučaju metil-β-CD (3.2 g/200 mL) i β-CD (1.2 g/200 mL) su ekscipijensi izbora.

Neslaganja dobivenih rezultata mogu se objasniti činjenicom da su polifenolne komponente komine masline izrazito dobro topljive u 60% etanolu koji je odabran kao ekstrakcijsko sredstvo pa je nemoguće utvrditi značajan učinak ekscipijensa na povećanje topljivosti. Također radi se o termostabilnim supstancama tako da bez obzira na prisutnost ekscipijensa, tijekom postupka ekstrakcije i sušenja nije došlo do razgradnje polifenolnih komponenti. Nadalje je bitno napomenuti da je komina masline izrazito heterogen matriks koji sadrži različite vrste fenolnih kiselina, flavonoida i ostalih fenolnih komponenti prisutnih u obliku aglikona, ali uglavnom u glikozidnom obliku. Upravo je prisustvo velikih glikozida glavna prepreka stvaranju inkluzijskih kompleksa iako postoje literaturni navodi da ta fenolna komponenta u aglikonskoj formi može stvoriti inkluzijski kompleks. U našem slučaju, ciklodekstrini su zaštitili ili povećali topljivost nekih fenolnih komponenti koje dobro hvataju ABTS radikal-kation, dok je u slučaju Reduktivnog potencijala ili DPPH antiradikalne učinkovitosti topljivost ili interakcija polifenola sa ciljnom molekulom u reakcijskoj smjesi bila ometena prisutnošću ciklodekstrina. U svakom slučaju saznanja o antioksidacijskoj učinkovitosti ekstrakta komine masline su rijetka te do danas nije istraživan utjecaj stvaranja inkluzijskih kompleksa sa ciklodekstrinima na aktivnost završnog ekstrakta. Prema tome, ovaj

rad bitno doprinosi dosadašnjim saznanjima o antioksidansima iz komine masline te postavlja temelje za daljnja istraživanja o mogućnostima razvoja nutraceutika iz ove vrijedne, širokodostupne ali nedovoljno prepoznate sirovine.

6. ZAKLJUČCI

- Ispitivanja provedena u okviru ovog diplomskog rada pokazala su da svi ciklodekstrini obuhvaćeni ovim istraživanjem pokazuju značajan pozitivan utjecaj na organoleptička svojstva završnih ekstrakata – naime dodatkom ciklodekstrina u ekstrakcijsko sredstvo dobivaju se fini praškasti produkti, dok je čisti ekstrakt komine izrazito higroskopan te se već nakon kratkog izlaganja atmosferi pretvara u amorfan i ljepljiv produkt.
- Enkapsulacija ciklodekstrinima rezultirala je značajno povećanom ABTS antiradikalnom učinkovitošću dobivenih ekstrakata u slučaju β-ciklodekstrina (koncentracija 1.6 g/200 mL) i metil-β ciklodekstrina (koncentracija 3.2 g/200 mL). Povećan antiksidacijski potencijal vjerojatno je posljedica stvaranja inkluzijskih kompleksa aktivnih sastavnica komine sa β ili metil-β ciklodekstrinom čime se povećava njihova stabilnost tijekom postupaka ekstrakcije i sušenja smrzavanjem.
- Enkapsulacija ciklodekstrinima uzrokovala je blago smanjenje reduktivnog potencijala uzorka i antiradikalne učinkovitosti utvrđene DPPH testom. Pri tome su β-ciklodekstrin (koncentracija 1.6 g/200 mL) i metil-β ciklodekstrin (koncentracija 3.2 g/200 mL) pokazali najmanji negativni učinak te ih u tom smislu možemo smatrati ciklodekstrinima izbora.
- Dobiveni rezultati nisu u potpunosti u skladu sa literaturnim podacima koji uglavnom ukazuju na protektivno djelovanje ciklodekstrina na polifenole u biljnim ekstraktima
- Polifenoli komine masline su vrlo heterogena skupina spojeva te sposobnost stvaranja inkluzijskih kompleksa ovisi o strukturalnim karakteristikama pojedinih aglikona i glikozidnih oblika. Moguće je da dio komponenata sa antiradikalnim učinkom stvara inkluzijske komplekse sa β- i metil-β ciklodekstrinom dok ostale fenolne komponente ne ulaze u takve interakcije zbog strukturalnih inkompatibilnosti.
- Izostanak značajnijeg učinka ciklodekstrina može se objasniti i činjenicom da su ekstrakcije polifenola iz komine masline vršene pod prethodno optimiranim uvjetima otapala, temperature i trajanja kojima je osigurana izuzetno dobra topljivost bez obzira na prisustvo ciklodekstrina u ekstrakcijskom mediju.

7. LITERATURA

Ahn CB, Je JY. Antioxidant activity of traditional korean fermented soybean (damdusi) extract on free radical-mediated oxidative systems. *J Food Biochem,* 2011, 35, 1242–1256.

Alonso AM, Dominguez C, Guillen DA, Barroso CG. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem,* 2002, 35, 3112-3115.

Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem,* 2004, 52, 7970–7981.

Arredondo F, Echeverry C, Abin-Carriquiry JA, Blasina F, Antunez K,Jones DP, Go YM, Liang YL, Dajas F. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radic Biol Med,* 2010, 49, 738–747.

Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J,* 2003, 371, 887–895.

Belinha I, Amorim MA, Rodrigues P, Freitas V, Moradas-Ferreira P, Mateus N, Costa V. J. Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae.* *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 2446–2451.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of"antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem,* 1996, 239, 70–76.

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci,* 1999, 65, 1865-1874.

Bisby RH, Brooke R, Navaratnam S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chem,* 2008, 108, 1002–1007.

Biswas SK, McClure D, Jimenez LA, Megson IL, Rahman I. Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxid Redox Signal,* 2005, 7, 32–41.

Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature,* 1958, 181, 1199-1200.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT- Food Sci Technol*, 1995, 28, 25–30.

Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliver Rev*, 2007, 59, 645-666.

Buyukokuroglu ME, Gulcin I, Oktay M, Kufrevioglu OI. In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol Res*, 2001, 44, 491-494.

Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Simon A, Duroux JL. Free Radical Scavenging Activities Measured by Electron Spin Resonance Spectroscopy and B16 Cell Antiproliferative Behaviors of Seven Plants. *J Agric Food Chem*, 2001, 49, 3321-3327.

Cano A, Hernandez-Ruiz J, Garcia-Canovas F, Acosta M, Arnao MB. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem Anal*, 1998, 9, 196-202.

Cerretani L, Bendini A, Rotondi A, Lercker G, Gallinatoschi T. Analytical comparison of monovarietal olive oils obtained both a continuos industrial plant and a low-scale mill. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2005, 107, 93-100.

Dani C, Bonatto D, Salvador M, Pereira MD, Henriques JA, Eleutherio E. Antioxidant Protection of Resveratrol and Catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2008, 56, 4268–4272.

Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends Food Sci Tech*, 2010, 21, 510-523.

Foti MC, Daquino C, Geraci C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J Org Chem*, 2004, 69(7), 2309-14.

Frankel EN, German JB. Antioxidants in foods and health: problems and fallacies in the field. *J Sci Food Agric*, 2006, 86, 1999-2001.

Frömming KH, Szejtli J. Cyclodextrins in Pharmacy. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994.

Gao JJ, Igalashi K, Nukina M. Radical scavenging activity of phenylpropanoid glycosides in *Caryopteris incana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63, 983-988.

Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora A, De Vincennzi M, Malorni V, Masella R. Tirosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells, *J nutr*, 1999, 129, 1269-1277.

Gungor N, Ozyurek M, Guclu K, Cekic SD, Apak R. Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants measured by different in vitro methods. *Talanta*, 2011, 83, 1650–1658.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed. New York, Oxford University Press, 2007.

Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biol Med,* 1995, 18, 125–126.

Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1995, 35, 7-20.

Henriquez C, Aliaga C, Lissi E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. *Int J Chem Kinet*, 2002, 34, 659–665.

Huang DJ, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 1841-56.

Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8, 1865–1879.

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

Kuštrak D. Farmakognozija Fitofarmacija. Zagreb, Tehnička knjiga, 2005, str. 192-195.

Kfoury M, Landy D, Auezova L, Greige-Gerges H, Fourmentin S. Beilstein. Effect of cyclodextrin complexation on phenylpropanoids' solubility and antioxidant activity. *J Org Chem*, 2014, 10, 2322-2331.

Lopez-Alarcon C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta*, 2013, 763, 1-10.

Magalhaes LM, Barreiros L, Maia MA, Reis S, Segundo MA. Rapid assessment of endpoint antioxidant capacity of red wines through microchemical methods using a kinetic matching approach. *Talanta*, 2012, 97, 473–483.

Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JFLC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta*, 2008, 613, 1-19.

Mathew S, Abraham TE. *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44, 198-206.

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.

Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*, 1996, 384, 240-2.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, 1993, 84, 407–412.

Niki E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxyl radicals. *Methods Enzymol*, 1990, 186, 100–108.

Osawa T, Namiki M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric Biol Chem*, 1981, 45, 735-739.

Ozyurek M, Gungor N, Baki S, Guclu K, Apak R. Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. *Anal Chem*, 2012, 84, 8052–8059.

Papandopoulos G, Boskou D. Antioxidant effect of natural phenols in olive oil. *J Am Oil Chem Soc*, 1991, 68, 669-671.

Prior RL, Wu XL, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Agric Food Chem*, 2005, 53, 4290-302.

Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Method to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol*, 1994, 233, 425–441.

Rice-Evans C. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity. *Free Rad Biol Med*, 2004, 36, 827-828.

Ratnasooriya CC, Vasantha Rupasinghe HP. Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β-cyclodextrin. *J Agric Food Chem*, 2012, 134, 625-631.

Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, 1997, 2, 152-159.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26, 1231-7.

Report on best practices, 2008., https://ec.europa.eu/energy/intelligent/projects/sites/iee-projects/files/projects/documents/report_on_best_practices_m.o.r.e._en.pdf, pristupljeno 10. 08. 2016.

Roginsky V, Lissi E. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem*, 2005, 92, 235–254.

Roy JK, Juneja LR, Isobe S, Tsushida T. Steam processed broccoli (*Brassica oleracea*) has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems. *Food Chem*, 2009, 114, 263–269.

Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric*, 1998, 76, 270–276.

Scampicchio M, Wang J, Blasco AJ, Sanchez Arribas A, Mannino S, Escarpa A. Nanoparticle-based assays of antioxidant activity. *Anal Chem*, 2006, 78, 2060–2063.

Sessa M, Tsao R, Liu R, Ferrari G, Donosi F. Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion. *J Agric Food Chem*, 2011, 59, 12352–12360.

Shen G, Xu C, Hu R, Jain MR, Gopalakrishnan A, Nair S, Huang MT, Chan JY, Kong AN. Modulation of nuclear factor E2-related factor 2-mediated gene expression in mice liver and small intestine by cancer chemopreventive agent curcumin. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5, 39–51.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 1999, 299, 152.

Strube M, Haenen GRMM, Van den Berg H, Bast A. Pitfalls in a method for assessment off total antioxidant capacity. *Free Radic Res*, 1997, 26, 515.

Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev*, 1998, 98, 1743-1753.

Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42, 1690–1703.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease, *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39, 44.

Van den Berg R, Haenen GRIMM, Van den Bergh H, Bast A. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem, 1999,* 66, 511.

Visioli F, Galli C. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J Agric Food Chem*, 1998, 46, 4292-4296.

Waleczek K, Marques H, Hempel B, Schmidt P. Phase solubility studies of pure (-)-α-bisbolol and chamomile essential oil with β-cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 55, 247-251.

Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxyl-radical trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. FEBS Lett, 1985, 187, 33–37.

Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxyltoluene as antioxidant food additives. *Food Chem Toxico1, 1999*, 37, 1027-1038.

Wilmsen PK, Spada DS, Salvador M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 4757–4761.

Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role of inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J, 1996*, 313, 17-29.

Wolfe KL, Liu RH. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 8896–8907.

Xie C, Kang J, Ferguson ME, Nagarajan S, Badger TM, Wu X. Blueberries reduce pro-inflammatory cytokine TNF-α and IL-6 production in mouse macrophages by inhibiting NF-κB activation and the MAPK pathway. *Mol Nutr Food Res*, 2011,55, 1587–1591.

Xu B, Chang SK. Phenolic substance characterization and chemical and cell-based off antioxidant activites of 11 lentils grown in the northern United States. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 1509–1517.

Ziberna L, Lunder M, Moze S, Vanzo A, Tramer F, Passamonti S, Drevensek G. Acute cardioprotective and cardiotoxicb effects of bilberry anthocyanins in ischemia-reperfusion injury: beyond concentration-dependent antioxidant activity. *Cardiovasc Toxicol*, 2010, 10, 283–294.

8. SAŽETAK

Nakon proizvodnje maslinovog ulja zaostaje velika količina komine čije direktno odlaganje u okoliš predstavlja veliki ekološki problem. Ponovno iskorištavanje komine masline za izolaciju bioaktivnih komponenata i naknadno za proizvodnju energije izvrsna je mogućnost za održivo zbrinjavanje otpada kojom se ostvaruje i ekološka i ekonomska korist. Naime, polifenoli komine posjeduju dokazano protuupalno i antikancerogeno djelovanje te je stoga komina izvrsna sirovina za izolaciju bioaktivnih sastavnica koje se kasnije koriste kao prirodni aditivi i nutraceutici u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Upravo je zbog toga važno razviti učinkovite i ekološki prihvatljive postupke izolacije i formulacije ekstrakata komine što je zahtjevan proces zbog heterogenosti i kompleksnosti sastava same sirovine kao i vrlo loših tehnoloških parametara dobivenih ekstrakta. U ovom radu istražen je utjecaj uklapanja polifenola komine u inkluzijske komplekse s različitim ciklodekstrinima na različite tipove antioksidacijske aktivnosti. U tom smislu istražen je utjecaj različitih koncentracijskih nivoa β-ciklodekstrina, HP-β-ciklodekstrina, metil-β-ciklodekstrina i γ-ciklodekstrina na antiradikalnu učinkovitost protiv ABTS i DPPH radikala te utjecaj na redukcijski kapacitet dobivenih ekstrakta. Obzirom na dobivene rezultate β-ciklodekstrin i metil- β-ciklodekstrin mogu se smatrati ciklodekstrinima izbora u formulaciji suhog ekstrakta komine masline.

SUMMARY

After olive oil production there will remain a large amount of pomace, whose direct disposal into the environment is a major environmental problem. Re-use of olive pomace for the isolation of bioactive compounds and subsequent energy production is an excellent possibility for sustainable waste management which generates and environmental and economic benefits. The pomace polyphenols have shown anti-inflammatory and anti-cancer effects and therefore pomace is excellent raw material for the isolation of bioactive components that are later used as natural additives and nutraceuticals in the pharmaceutical and food industries. It is therefore important to develop efficient and environmentally friendly methods of isolation and formulation of extracts pomace which is a challenging process due to the heterogeneity and complexity of the composition of the raw materials themselves as very poor technological parameters obtained extract. This thesis will examine the influence of switching pomace polyphenols in inclusion complexes with different cyclodextrins at different types of antioxidant activity. In this sense, the influence of different concentration levels β-cyclodextrin, HP-β-cyclodextrin, methyl-β-cyclodextrin and γ-cyclodextrin on the antiradical activity against DPPH and ABTS radicals and reducing the impact on the volume of the extract obtained. Based on the obtained results, β-cyclodextrin and methyl-β-cyclodextrin can be considered in the choice of cyclodextrin formulation of dry extract of olive pomace.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

UTJECAJ CIKLODEKSTRINA NA ANTIOKSIDACIJSKU UČINKOVITOST EKSTRAKTA KOMINE MASLINE

Markonija Spaić

SAŽETAK

Nakon proizvodnje maslinovog ulja zaostaje velika količina komine čije direktno odlaganje u okoliš predstavlja veliki ekološki problem. Ponovno iskorištavanje komine masline za izolaciju bioaktivnih komponenata i naknadno za proizvodnju energije izvrsna je mogućnost za održivo zbrinjavanje otpada kojom se ostvaruje i ekološka i ekonomska korist. Naime, polifenoli komine posjeduju dokazano protuupalno i antikancerogeno djelovanje te je stoga komina izvrsna sirovina za izolaciju bioaktivnih sastavnica koje se kasnije koriste kao prirodni aditivi i nutraceutici u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Upravo je zbog toga važno razviti učinkovite i ekološki prihvatljive postupke izolacije i formulacije ekstrakata komine što je zahtjevan proces zbog heterogenosti i kompleksnosti sastava same sirovine kao i vrlo loših tehnoloških parametara dobivenih ekstrakta. U ovom radu istražen je utjecaj uklapanja polifenola komine u inkluzijske komplekse s različitim ciklodekstrinima na različite tipove antioksidacijske aktivnosti. U tom smislu istražen je utjecaj različitih koncentracijskih nivoa β-ciklodekstrina, HP-β-ciklodekstrina, metil-β-ciklodekstrina i γ-ciklodekstrina na antiradikalnu učinkovitost protiv ABTS i DPPH radikala te utjecaj na redukcijski kapacitet dobivenih ekstrakta. Obzirom na dobivene rezultate β-ciklodekstrin i metil- β-ciklodekstrin mogu se smatrati ciklodekstrinima izbora u formulaciji suhog ekstrakta komine masline.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 23 grafička prikaza, 6 tablica i 74 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: komina masline, fenoli, ciklodekstrini, antioksidacijska aktivnost

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. Mario Jug, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Petra Turčić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2016.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

THE IMPACT OF CYCLODEXTRINS ON THE ANTIOXIDANT EFFICIENCY OF THE OLIVE POMACE EXTRACT

Markonija Spaić

SUMMARY

There is a large amount of pomace remaining after olive oil production , whose direct disposal into the environment is a major environmental problem. Re-use of olive pomace for the isolation of bioactive compounds and subsequent energy production is an excellent possibility for sustainable waste management which generates both, environmental and economic benefits. The pomace polyphenols have shown anti-inflammatory and anti-cancer effects and therefore pomace is excellent raw material for the isolation of bioactive components that are later used as natural additives and nutraceuticals in the pharmaceutical and food industries. Developing efficient and environmentally friendly methods of isolation and formulation of pomace extracts is a challenging process due to the heterogeneity and complexity of the composition of raw material and very poor technological parameters of obtained raw extract. This thesis examined the influence of incorporating pomace polyphenols in inclusion complexes with different cyclodextrins on different types of antioxidant activity of obtained products. More specificaly, the influence of different concentration levels of β-cyclodextrin, HP-β-cyclodextrin, methyl-β-cyclodextrin and γ-cyclodextrin on the antiradical activity against DPPH and ABTS radicals and reducing activity of obtained extracts was investigated. d. Based on the obtained results, β-cyclodextrin and methyl-β-cyclodextrin can be considered as excipients of choice in the formulationpomace polyphenol extract.

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

Thesis includes: 45 pages, 23 figures, 6 tables and 74 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive pomace, phenols, cyclodextrins, antioxidant activity

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
Mario Jug, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Petra Turčić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2016.