

# Ultrazvučna izolacija antioksidansa iz komine masline i razvoj visokovrijednog nutraceutika

---

**Albahari, Petra**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

*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:163:452699>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Petra Albahari

**ULTRAZVUČNA IZOLACIJA  
ANTIOKSIDANSA IZ KOMINE MASLINE I  
RAZVOJ VISOKOVRIJEDNOG  
NUTRACEUTIKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Petra Albahari

**ULTRAZVUČNA IZOLACIJA  
ANTIOKSIDANSA IZ KOMINE MASLINE I  
RAZVOJ VISOKOVRIJEDNOG  
NUTRACEUTIKA**

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo  
prof. dr. sc. Mladen Brnčić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Petra Albahari

**ULTRASOUND ISOLATION OF  
ANTIOXIDANTS FROM OLIVE POMACE  
AND DEVELOPMENT OF HIGHLY  
VALUED NUTRACEUTICAL**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors: Prof. Dubravka Vitali Čepo, PhD  
Prof. Mladen Brnčić, PhD

Zagreb, 2022

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za kemiju prehrane Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Laboratoriju za tehničku termodinamiku Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo i prof. dr. sc. Mladena Brnčića u sklopu poslijediplomskog doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“.

## ZAHVALE

Izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća bez brojnih ljudi u koje sam se mogla pouzdati čineći, za mene dosad, jedan od najvećih životnih koraka.

Prvu i veliku zahvalu želim izraziti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na svim nesebičnim znanstvenim, stručnim i životnim savjetima, poticanju, podršci i pomoći, ali i na iskazanom povjerenju kroz sve faze izrade ovog rada.

Jednakom mjerom želim zahvaliti i svojem mentoru, prof. dr. sc. Mladenu Brnčiću na suradnji, nesebičnoj pomoći i prenesenom znanstveno-istraživačkom iskustvu.

Veliko hvala prof. dr. sc. Mariu Jugu na prenesenom znanju o radu s ciklodekstrinima te na brojnim stručnim i prijateljskim savjetima.

Hvala svim djelatnicima Zavoda za kemiju prehrane Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na prijateljskoj i ugodnoj radnoj atmosferi, pruženim savjetima i podršci.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan i prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić na njihovoj potpori i suradnji.

Najviše od svega hvala mojim najbližima. Hvala mami, tati, Ivi i Luki što ste me uvijek podržavali i vjerovali u mene. Franu i Lari hvala na velikoj strpljivosti i najvećem veselju. Hvala Vedranu što je uz mene i dijeli sve moje radosti i tuge, uspjehe i muke. Ne znam kako bi bez vas ovo bilo moguće.

## SAŽETAK

Proizvodnjom maslinovog ulja zaostaju velike količine nusproizvoda koji se smatraju otpadom, a zbog kompleksnosti sastava i dokazane toksičnosti velika su opasnost za okoliš. Komina masline, jedan od glavnih nusprodukata proizvodnje maslinovog ulja, značajan je izvor prirodnih antioksidansa, od kojih su najznačajniji tirosol, hidroksitirosol i oleuropein. Uzevši u obzir njihove brojne pozitivne učinke na zdravlje, osnovni cilj ovog istraživanja bio je razvoj zelenog postupka dobivanja suhog ekstrakta komine masline bogatog hidroksitirosolom, tirosolom i oleuropeinom primjenom kombinacije ultrazvučne ekstrakcije i uklapanja u ciklodekstrine. S ciljem utvrđivanja potencijala daljnje primjene dobivenih ekstrakata bila je nužna njihova funkcionalna karakterizacija. U prvoj fazi istraživanja optimirani su postupci klasične ekstrakcije, inovativne ultrazvučne ekstrakcije i ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak ciklodekstrina. Zatim je u drugom dijelu istraživanja ispitana primjenjivost postupka liofilizacije te utjecaj korištenih ciklodekstrina na tehnološke i kemijske karakteristike suhog ekstrakta. U završnoj fazi istraživanja provedena je funkcionalna karakterizacija suhog ekstrakta komine masline u naprednim biološkim- i model sustavima hrane te je određena bioraspoloživost glavnih aktivnih polifenolnih sastavnica. Optimiranom klasičnom ekstrakcijom dobiveni su ekstrakti s oleuropeinom kao najzastupljenijim fenolnim spojem ( $115.14 \pm 0.19$  mg/kg svježe komine masline). Primjenom optimalnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije u kombinaciji s uklapanjem u ciklodekstrine, postignuti su značajno veći prinosi oleuropeina (1744 mg/kg komine masline), tirosola (1117 mg/kg komine masline) i hidroksitirosola (887 mg/kg). Uklapanje u ciklodekstrine imalo je pozitivan utjecaj na kemijski sastav i antioksidativnu aktivnost dobivenih ekstrakata. Ekstrakti s dodatkom hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina i nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina pokazali su osobitu antioksidativnu aktivnost, pa su tako u emulzijskom modelu imali značajno višu antioksidativnu aktivnost (1242 mg/g i 1422 mg/g Trolox ekvivalentna) od Troloxa kao referentnog antioksidansa. U ostalim su modelima (primjenjeni u koncentracijskim nivoima 2-3 %) pružili antioksidativnu zaštitu usporedivu s često korištenim sintetskim antioksidansima. Rezultati dobiveni primjenom gastrointestinalnog modela pokazuju visoku biodostupnost polifenola komine masline, a dodatkom ciklodekstrina dodatno je poboljšana gastrointestinalna stabilnost tirosola.

**Ključne riječi:** *komina masline, polifenoli, ekstrakcija, ciklodekstrini, antioksidativna aktivnost*

## SUMMARY

### Introduction

The production of olive oil generates large quantities of waste known as olive pomace and olive mill wastewater. Large quantities of these by-products and the variability of the waste composition are the main problems in the management of the residues (Clemente i sur., 1997). Therefore, an appropriate use of these residues could have a positive impact on the economic situation of olive oil producers and reduce the negative impact on the environment. Olive pomace is a heterogeneous mixture of many chemical compounds such as lignin, cellulose, hemicellulose, olive oil residues, and mineral components. In addition, olive oil production retains significant amounts of polyphenols in olive pomace, which contribute to its antioxidant potential (Herrero et al., 2011). It is well known that dietary antioxidants protect the body from free radicals, which are constantly formed during physiological processes. Epidemiological studies have shown that there is an inverse relationship between the intake of foods rich in antioxidants and the occurrence of numerous diseases in humans. Polyphenols can also be used by the food industry as natural food additives with antioxidant properties to extend the shelf life of foods and reduce nutrient losses and the formation of harmful substances. The development and use of effective but non-toxic antioxidants of natural origin is now the subject of extensive research. Efficient processes for extracting bioactive compounds from biomass and simultaneously producing added value products are important to achieve higher profitability and sustainability in the food industry (Viro et al., 2010). Since the idea of utilizing olive oil by-products is primarily ecological, their further production processes should be based on the principles of sustainability and green chemistry. To achieve these goals, the application of new extraction technologies is usually required (Carbonell Capella et al., 2017; Luque de Castro, 2014). Due to its lower cost compared to other unconventional extraction techniques and the ease of scalability of the ultrasound device, ultrasound-assisted extraction has become established both in laboratories and on an industrial scale. Its efficiency is based on the growth and collapse of microbubbles in the liquid phase (Chemat, Tomao, & Viro, 2008; Ljubić Herceg et al., 2010; Dujmić et al., 2013; Herceg et al., 2009) and the simultaneous formation of extreme temperature and pressure conditions (Herceg et al., 2009; Suslick & Flannigan, 2008), which lead to efficient fragmentation and disaggregation of the analyzed sample. The extraction of polyphenols from complex matrices is generally challenging because many polyphenolic



compounds decompose when exposed to high temperatures or light. In addition, the extracts obtained are usually unstable, hygroscopic, and exhibit unfavorable organoleptic properties. To overcome the above problems, the use of pharmaceutical excipients such as cyclodextrins represents an efficient and simple approach in the formulation of stable and organoleptically acceptable products. Cyclodextrins are organic molecules with an internal hydrophobic cavity and can therefore form inclusion complexes with a variety of organic molecules. The formation of such complexes can affect the physicochemical properties of the target molecule, such as antioxidant activity, water solubility, and stability (López-García *i sur.*, 2010).

An effective search for sources of naturally occurring antioxidants and the sustainable design and validation of novel functional formulations require simple and available, yet reliable, methods to assess antioxidant activity. To date, many chemical-based (*in vitro*) methods have been developed to measure the efficacy of various types of antioxidants, such as the oxygen radical absorbance capacity (ORAC), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), or diphenyl-picryl-hydrazyl radical scavenging (DPPH) assay (Huang *i sur.*, 2005). These methods are inexpensive, useful for screening, have high throughput, and provide an index value that allows comparison between different products, but are not able to show the actual performance of a particular antioxidant in food or biological systems. To further improve the accuracy of *in vitro* assays, new models have been developed that simulate the chemical, physical, and environmental conditions that resemble foods or biological matrices (Decker *i sur.*, 2005). Several types of food models can be used: bulk oil, oil-in-water emulsions, and a muscle food model. Compared with chemical methods, biological models (such as the liposome membrane system or methods using plasmid DNA), which use natural substrates and mimic the physiological environment, can more accurately predict the activity of the tested compounds in biological systems. Therefore, they should be used in combination or instead of chemical-based methods to obtain more accurate information about the tested extracts. The biological effects and nutraceutical potential of olive pomace extracts are primarily limited by the generally low oral bioavailability of the major polyphenols, which can be significantly affected by the olive pomace matrix and the presence of cyclodextrins in the formulation. Strong matrix effects on the bioavailability of biologically active nutraceuticals can be significantly reduced by innovative formulation approaches.

The main objective of this study was to develop an environmentally friendly process for the preparation of olive pomace dry extracts rich in hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein using a

combination of ultrasonic extraction and cyclodextrin encapsulation. In addition, functional characterization of the extracts obtained was required to determine their further application potential. The data obtained will provide new information on the potential applications of processed olive wastes and the mechanisms of their antioxidant activity and highlight the potential benefits of cyclodextrin encapsulation as a simple and cost-effective approach to improve the functionality of complex natural extracts.

## Methods

The research was divided into three carefully designed phases. The main objective of the first phase of research was to develop a new, efficient, and environmentally friendly method for extraction of polyphenolic constituents (mainly hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein) from raw olive pomace. Ethanol, water, and mixtures thereof were used as solvents for the extraction. The extraction process was carried out by classical extraction, innovative ultrasonic extraction technology and ultrasonic extraction with addition of cyclodextrins. The target parameters of characterization of the obtained extracts were the content of total phenols and flavonoids (Folin-Ciocalteu method), the content of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein (HPLC analysis) and antioxidant potential (DPPH method).

In the second part of the study, the applicability of the freeze-drying process and the influence of the cyclodextrins used on the technological and chemical properties of the dry extract were investigated. The polyphenol content of the obtained dry extract was determined by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method (total polyphenols), while the concentrations of tyrosol, hydroxytyrosyl and oleuropein were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Total antioxidant efficiency was determined by a combination of different chemical tests to determine the reducing power and the ability to scavenge radicals: DPPH method, ORAC method and TEAC method. The particle size distribution in the obtained olive pomace dry extract was determined by laser diffraction, and the color was determined with a colorimeter by analyzing the CIE LAB color system. An accelerated stability test for dry olive pomace extracts was performed. Based on the data obtained, a dry product with the best physicochemical properties was selected to be used in the third phase of the research.

In the third and final research phase, the functional characterization of the dry extract of olive pomace was carried out. The main objectives of this phase were to study for the first time the

bioavailability of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein, to determine the antioxidant activity of olive pomace extract in suitable food model systems and to study the biological antioxidant activity using advanced biological models. The activity in food model systems was determined using the oil model system, the  $\beta$ -carotene linolate model, and the meat model system. Some of the most used biological models - the liposome model system and the plasmid DNA model system - were selected to determine biological antioxidant activity. The bioavailability of the main active polyphenolic components was determined using a gastrointestinal in vitro model.

## Results

The variation of classical extraction parameters, such as polarity and pH-value of the solvent, temperature, and extraction time, affected the formation of olive pomace extracts with a significant content of polyphenolic components. Although all extracts obtained showed antioxidant activity, the values of total phenolic content (TPC) and TEAC antioxidant capacity differed significantly depending on the polarity and pH-value of the solvent, duration, and temperature of extraction. The determined optimal conditions for classical extraction were continuous stirring of the extraction mixture at a temperature of 70 °C for 120 minutes using 40 % or 60 % ethanol as solvent. Chromatographic analysis showed that the use of 60 % ethanol resulted in a small but statistically significant increase in the content of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein in olive pomace extracts compared to 40 % ethanol. After establishing the optimal parameters for classical extraction, it was necessary to optimize the ultrasonic extraction process and determine the amount and type of cyclodextrin that would improve the properties of the obtained extract. Optimal ultrasonic extraction conditions were 20 min of pulsed ultrasound applied to the extraction mixture with a 12 mm diameter probe at 100 % amplitude, with 60 % ethanol as solvent and a solvent to solids ratio of 1:40. Ultrasonic extraction resulted in significantly higher yields of oleuropein (1744 mg/kg olive pomace), tyrosol (1117 mg/kg olive pomace) and total bioactive polyphenols compared to conventional extraction and reduced extraction time and solvent consumption. The addition of cyclodextrin to the extractant significantly increased the extractability of all studied constituents. The best results were obtained by using higher concentrations of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, followed by randomly methylated  $\beta$ - or  $\gamma$ -cyclodextrin. Characterization of the dry extracts and determination of their chemical composition revealed that the most abundant polyphenolic components were hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein, whose concentrations ranged from 16.29 to 51.29 mg/100 g. The concentrations of simple phenolic acids (3,4-

dihydroxybenzoic acid, vanillic acid, homovanillic acid and *p*-hydroxybenzoic acid) were significantly lower, ranging from 0.33 to 3.72 mg/100 g.

The chemical composition of olive pomace dry extracts was significantly affected by the addition of different types of cyclodextrins. Randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin increased hydroxytyrosol content, randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin further increased tyrosol yields, and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin oleuropein. The use of  $\gamma$ -cyclodextrin had a positive effect only on oleuropein yields, which can be explained by the larger central cavity of  $\gamma$ -cyclodextrin compared with  $\beta$ -cyclodextrin.

The encapsulation of cyclodextrins also had a positive effect on the stability of the extracts obtained. When olive pomace dry extracts were stored for a period of 45 days, a small increase or decrease in certain phenolic compounds was observed in the extracts analyzed, depending on the type of cyclodextrin used. The best results were again obtained with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and then with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin, regardless of the cyclodextrin concentration used. The addition of cyclodextrin to the extraction solvent significantly changed the appearance of the dry extracts. The native olive pomace extract proved to be highly unstable and hygroscopic, so that it was not possible to perform particle size distribution analysis. Analysis of olive pomace extracts encapsulated with cyclodextrins showed a normal particle size distribution. The values of particle size distribution ranged from 33.36  $\mu\text{m}$  for randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin to 89.26  $\mu\text{m}$  for  $\gamma$ -cyclodextrin. The polydispersity index varied greatly depending on the type of cyclodextrin used, ranging from 3.82 for extracts containing hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin to 6.34 for extracts containing  $\gamma$ -cyclodextrin. When the color parameters of olive pomace extracts were examined, it was found that the encapsulation with cyclodextrins had the greatest effect on the brightness parameter, which differed from the native extract by 28.8 % to 49.6 %. A high perceived color difference of 36.54 - 53.79 was obtained, indicating significant differences between extracts with the addition of cyclodextrin and native olive pomace extracts.

Investigating the effect of dry extracts of olive pomace on reducing the peroxidation of cold-pressed safflower oil by Rancimat method showed that the addition of 0.3 % dry extract of olive pomace has a higher protective effect compared to 0.1 % of dry extract of olive pomace. In addition to the higher concentration applied, incorporation into cyclodextrins significantly increased the antioxidant efficiency of the analyzed olive pomace dry extracts, from 2.3 % in the case of

randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin to 12.7 % in the case of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. Dry extracts of olive pomace incorporated into cyclodextrins at a concentration of 0.3 % showed antioxidant activity equivalent to a concentration of 0.01 % of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole. Incorporation into cyclodextrins significantly increased the efficacy of olive pomace dry extracts in inhibiting lipid peroxidation of meat during storage at 4 °C. Compared to control measurements, inhibition of lipid peroxidation was achieved, and it was 37 % -23 % for native olive pomace dry extract, 59 % -31 % for olive pomace extracts with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, and 59 % for extracts with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin. 67 % -24 %. Olive pomace extracts are effective in preventing lipid peroxidation in meat, but their efficacy is significantly lower compared to the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole. To achieve a similar effect as butylated hydroxyanisole (0.01 %), dry extracts of olive pomace should be used at a concentration of 1 % to 3 %. The positive effect of cyclodextrin is more pronounced in the emulsion system than in the aqueous medium in which the chemical methods take place. Thus, the ability of the analyzed extracts to bind ABTS<sup>+</sup> radicals was 12.86-17.07 mg/g TE compared to the  $\beta$ -carotene emulsion model, where it was 1509-1749 mg/g TE. The IC<sub>50</sub> values obtained in the DPPH assay were 1.03-1.65 g/L, while in the  $\beta$ -carotene emulsion system, a 50 % increase in antioxidant protection was obtained by using olive pomace dry extracts with a concentration of 0.125 g / L. The analyzed dry extracts of olive pomace significantly protected plasmid DNA from oxidative damage caused by exposure to AAPH radicals. The IC<sub>50</sub> value obtained for the dry extract of olive pomace in randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin (53 mg/L) was similar to the value obtained for the dry extract of olive pomace with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (64 mg/L) and significantly lower than the value obtained for the native dry extract of olive pomace (81 mg/L).

In the liposome model system, native olive pomace extracts and those encapsulated with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin showed a significantly higher rate of lipid peroxidation inhibition (13.0 % and 10.9 %, respectively) at lower concentrations compared to olive pomace extracts with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (3.5 %). Olive pomace extracts with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin showed the highest efficacy compared to other antioxidants analyzed, even at higher concentrations, and the inhibition rate obtained (34.2 %) was most similar to the inhibition rate of butylated hydroxyanisole (30.7 %) used as a control antioxidant.

The results of the determination of bioavailability showed relatively high values (from 64 % - 172 %), so it can be concluded that the concentrations of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein are

constant during the process of gastrointestinal digestion. The only significant change in concentration after gastrointestinal digestion was observed for tyrosol, whose bioavailability was 96 %-172 %.

## Conclusion

Cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound-assisted extraction proved to be a useful and sustainable approach for obtaining olive pomace extract rich in bioactive polyphenolic compounds. Compared to conventional solvent extraction, the application of ultrasound-assisted extraction resulted in significantly higher yields of oleuropein, tyrosol, and bioactive polyphenols, shorter extraction time, and lower solvent consumption. The parameters of ultrasound-assisted extraction that had the greatest effect on extraction yield were probe diameter and extraction time. The addition of cyclodextrins to the extraction solvent significantly improved the yields, stability, and appearance of the olive pomace dry extract. Encapsulation with cyclodextrins improved the antioxidant activity of olive pomace extracts by significantly increasing their polyphenol content, especially in the case of hydroxytyrosol derivatives (hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein). Other proposed mechanisms of the beneficial effects of cyclodextrins on antioxidant activity are the change in physical properties and the increase in stability of the active compounds under oxidative conditions. The tested cyclodextrins differed significantly in their ability to enhance the functionality of olive pomace extracts. Encapsulation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin provided comparable and the most significant benefits. The use of food and biological models to test antioxidant activity revealed more significant differences in antioxidant activity between native and cyclodextrin-encapsulated extracts compared with chemical models. Dry olive pomace extracts with addition of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin were particularly effective in oil-in-water emulsion systems and showed higher antioxidant activity than Trolox. Their antioxidant activity in oil and meat models was comparable to that of butylhydroxyanisole when applied at concentrations of 0.1 % and 2-3 %, respectively. Dry olive pomace extracts encapsulated with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin showed significantly higher antioxidant activity in food models (compared to dry olive pomace extracts with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin). In biological models, they showed the ability to inhibit lipid peroxidation through direct radical scavenging and metal chelating properties and successfully protected DNA from AAPH-induced scission. The results of the gastrointestinal model showed

high bioavailability of olive pomace polyphenols, and the addition of cyclodextrins further improved the gastrointestinal stability of tyrosol.

The results obtained make an important contribution to the current knowledge on the antioxidant activity of olive pomace extracts, their potential use as dietary supplements, and the significant benefits that can be obtained through the simple process of cyclodextrin encapsulation.

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	TEORIJSKI DIO .....	3
2.1.	KOMINA MASLINE .....	3
2.1.1.	Dobivanje komine masline.....	3
2.1.2.	Svojstva i kemijski sastav komine masline.....	5
2.1.3.	Fenolni sastav komine masline .....	7
2.1.3.1.	Podjela i svojstva fenolnih spojeva.....	7
2.1.3.2.	Najznačajniji fenolni spojevi u komini masline.....	8
2.1.3.3.	Mehanizam djelovanja fenolnih spojeva komine masline .....	10
2.1.3.4.	Farmakološka svojstva polifenola komine masline .....	12
2.2.	EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA KOMINE MASLINE.....	17
2.2.1.	Klasična ekstrakcija .....	17
2.2.2.	Ultrazvučna ekstrakcija.....	19
2.2.2.1.	Mehanizam i djelovanje ultrazvuka visokog intenziteta.....	20
2.2.2.2.	Utjecaj procesnih parametara na ultrazvučnu ekstrakciju.....	21
2.2.2.3.	Ultrazvučni procesori.....	22
2.2.2.4.	Primjena ultrazvuka u svrhu ekstrakcije bioaktivnih spojeva.....	23
2.2.2.5.	Važnost primjene ultrazvučne ekstrakcije .....	24
2.3.	FORMULACIJA STABILNOG SUHOG EKSTRAKTA .....	25
2.3.1.	Ciklodekstrini.....	25
2.3.1.1.	Kemijska struktura ciklodekstrina .....	26
2.3.1.2.	Dobivanje ciklodekstrina .....	27
2.3.1.3.	Svojstva ciklodekstrina .....	28
2.3.1.4.	Inkluzijski kompleksi.....	30
2.3.1.5.	Primjena ciklodekstrina.....	31
2.3.1.6.	Kompleksacija bioaktivnih spojeva komine masline s ciklodekstrinima .....	33
2.3.2.	Sušenje ekstrakta komine masline .....	34
2.3.2.1.	Liofilizacija .....	34
2.4.	KARAKTERIZACIJA SUHOG EKSTRAKTA .....	37
2.4.1.	Ispitivanje stabilnosti .....	37



2.4.1.1.	Ispitivanje stabilnosti biljnih lijekova i preparata .....	38
2.4.2.	Gastrointestinalna stabilnost ekstrakta komine masline .....	38
2.4.2.1.	Gastrointestinalna stabilnost polifenola .....	39
2.4.2.2.	Bioiskoristivost polifenola masline.....	40
2.4.2.3.	Metode određivanja bioiskoristivosti i biodostupnosti .....	41
3.	CILJ RADA .....	43
4.	MATERIJALI I METODE .....	44
4.1.	MATERIJALI .....	44
4.1.1.	Kemikalije i reagensi .....	44
4.1.2.	Puferi i otopine.....	47
4.1.3.	Instrumenti i uređaji .....	48
4.1.4.	Pribor.....	49
4.1.5.	Programski paketi .....	50
4.1.6.	Uzorci.....	50
4.1.6.1.	Biljni materijal - komina masline.....	50
4.2.	METODE .....	51
4.2.1.	Plan provođenja istraživanja .....	51
4.2.2.	Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz komine masline.....	54
4.2.2.1.	Klasična ekstrakcija .....	54
4.2.2.2.	Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom .....	55
4.2.2.3.	Ekstrakcija potpomognuta s ultrazvukom uz uklapanje u ciklodekstrine.....	57
4.2.3.	Sušenje ekstrakta komine masline .....	58
4.2.3.1.	Sušenje smrzavanjem – liofilizacija.....	58
4.2.4.	Analiza CIE LAB sustavom boja.....	58
4.2.5.	Analiza raspodjele veličine čestica .....	59
4.2.6.	Ispitivanje stabilnosti ekstrakata komine masline.....	61
4.2.7.	Analiza polifenola .....	61
4.2.7.1.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	61
4.2.8.	Određivanje antioksidativne aktivnosti.....	63
4.2.8.1.	Antioksidativna aktivnost u kemijskim model sustavima.....	63
4.2.8.2.	Antioksidativna aktivnost u biološkim model sustavima .....	65
4.2.8.3.	Antioksidativna aktivnost u modelima hrane.....	67
4.2.9.	Određivanje bioraspoloživosti gastrointestinalnim <i>in vitro</i> modelom .....	70

4.2.9.1.	Oralna faza digestije.....	72
4.2.9.2.	Gastrična faza digestije .....	72
4.2.9.3.	Intestinalna faza digestije.....	72
4.2.10.	Statistička obrada podataka.....	73
5.	REZULTATI I RASPRAVA.....	73
5.1.	Optimizacija klasične ekstrakcije.....	74
5.1.1.	Utjecaj različitih parametara ekstrakcije na udio ukupnih fenola i TEAC antioksidativni kapacitet .....	74
5.1.2.	Validacija HPLC-DAD metode za određivanje tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina u ekstraktima komine masline.....	78
5.1.3.	Određivanje hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina u ekstraktima komine masline dobivenih optimiranim procesom.....	80
5.2.	Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije potpomognute ciklodekstrinima .....	82
5.2.1.	Optimizacija omjera ekstrakcijskog sredstva i uzorka tijekom ultrazvučne ekstrakcije .....	83
5.2.2.	Optimizacija procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije.....	85
5.2.3.	Utjecaj ciklodekstrina na prinose ultrazvučne ekstrakcije.....	88
5.3.	Karakterizacija suhih ekstrakata .....	90
5.3.1.	Kemijski sastav suhih ekstrakata komine masline.....	90
5.3.2.	Stabilnost suhih ekstrakata komine masline .....	93
5.3.3.	Utjecaj uklapanja u ciklodekstrine na organoleptička svojstva suhih ekstrakata .....	95
5.3.4.	Antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline u kemijskim modelima.....	99
5.3.5.	Antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline u model sustavima hrane.....	101
5.3.5.1.	Antioksidativna aktivnost u model sustavu ulja .....	101
5.3.5.1.	Antioksidativna aktivnost u model sustavu mesa .....	104
5.3.5.2.	Antioksidativna aktivnost u $\beta$ -karoten emulzijskom modelu .....	107
5.3.6.	Antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline u biološkim model sustavima.....	109
5.3.6.1.	Antioksidativna aktivnost u model sustavu plazmidne DNA .....	109
5.3.6.2.	Antioksidativna aktivnost u model sustavu liposoma.....	113
5.3.7.	Bioraspoloživost polifenola komine masline .....	115
6.	ZAKLJUČAK .....	120

7.	POPIS LITERATURE .....	123
8.	BIOGRAFIJA .....	144

# **1. UVOD**

Proizvodnja maslinovog ulja važna je gospodarska grana te se smatra drugim po važnosti agrosektorom u Europi. Tijekom posljednja dva desetljeća bilježi se postupno povećanje svjetske proizvodnje maslinovog ulja, a u ukupnoj proizvodnji sve veći udio zauzimaju zemlje kao što su Tunis, Alžir i Australija, koje se ne smatraju tradicionalnim proizvođačima. Prema podacima koje izdaje Međunarodno vijeće za masline (IOC, 2022), u cijelom svijetu je u maslinarskoj godini 2020./2021. proizvedeno 3 010 000 tona maslinovog ulja, a od toga je u Europskoj uniji proizvedeno 2 051 200 tona, odnosno 68,15 %. Vodeće zemlje u proizvodnji maslinovog ulja su Španjolska, Grčka, Italija i Portugal.

Za Hrvatsku je maslinarstvo značajna gospodarska grana koja ima dugu tradiciju, budući da je u priobalju kultura masline stara više od 2000 godina. Prema podacima Državnog zavoda za statistiku, u 2020. g. u Hrvatskoj je proizvedeno 33 270 tona maslina, odnosno 40 278 hL maslinovog ulja (DZS, 2020).

Nakon prerade maslina i proizvodnje maslinovog ulja zaostaju velike količine nusproizvoda (lišće, komina masline, otpadna voda), koji se smatraju otpadom. S obzirom na povećanu proizvodnju maslinovog ulja, povećana je i količina dobivenih nusproizvoda, koji se u posljednje vrijeme nakupljaju i uklanjaju u milijardama tona.

Kompleksnost sastava i dokazana toksičnost nusprodukata proizvodnje maslinovog ulja predstavljaju veliku opasnost za sve sastavnice okoliša. Glavni uzrok ekološke štetnosti nusproizvoda maslinovog ulja su fenolni, lipidni i organski spojevi koji zaostaju u komini masline i otpadnoj vodi, jer se razgrađuju do fitotoksičnih spojeva koji imaju negativan učinak na populaciju mikroorganizama u tlu i vodenom ekosustavu (Roig-Juñent i sur., 2006). Hlapljive masne kiseline uzrokuju neugodan miris komine masline te ju čine značajnim čimbenikom onečišćenja neugodnim mirisima, osobito u periodima intenzivne proizvodnje maslinovog ulja (Bhatnagar i sur., 2014; Kapellakis i sur., 2008).

Otpad nastao proizvodnjom maslinovog ulja postaje sve veći ekonomski i ekološki problem današnjice. Procjenjuje se da je opterećenje okoliša nastalo zagađenjem 1 m<sup>3</sup> otpada od maslina ekvivalentno zagađenju koje uzrokuje 100 – 200 m<sup>3</sup> urbanog otpada (otpad koji proizvede 100 000 ljudi) (PROSODOL, 2012). Zbrinjavanje takvog otpada je vrlo specifično i složeno te zahtijeva kombinaciju različitih postupaka obrade, što ima za posljedicu značajan financijski trošak.

Kao odgovor na takvo stanje došlo je do provođenja raznih istraživanja koja se bave mogućim iskorištenjem i primjenom otpada masline u razvoju više kategorija proizvoda s dodanom vrijednošću. Budući da sirovinski potencijal nusprodukata proizvodnje maslinovog ulja, a osobito komine masline, nije u potpunosti prepoznat, još se uvijek istražuju tehnološka rješenja i mogućnosti njenog zbrinjavanja. Dosadašnja primjena komine masline kao sirovine uključuje njeno iskorištavanje u energetske svrhe, za proizvodnju biogoriva, kompostiranje te iskorištavanje u kozmetičkoj industriji i industriji polimera.

Komina masline također se smatra izvrsnim izvorom prirodnih antioksidansa polifenolnog tipa koji se primjenjuju u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, a intenzivno se istražuju kako bi zamijenili sintetske antioksidanse koji se trenutno koriste u prehrambenoj industriji. Najveći problem, koji bitno usporava širu praktičnu primjenu različitih ekstrakata dobivenih od otpada masline, je velika kvantitativna i kvalitativna heterogenost polifenolnih komponenti, nepostojanje općeprihvaćenog i standardiziranog postupka ekstrakcije kao i dobivanja stabilnih suhih ekstrakata zadovoljavajućih fizikalno – kemijskih svojstava (Demerche i sur., 2013.; Zhang i sur., 2012).

Valorizacija otpada masline je kompleksni problem koji još nije adekvatno riješen uglavnom iz socioekonomskih, a u manjoj mjeri i tehnoloških i znanstvenih razloga. Međutim, potrebno je poticati i nastaviti istraživanja jer do sada dobiveni rezultati ukazuju na znatan doprinos kvaliteti upravljanja otpadom iz agro-prehrambenog sektora te veliki potencijal za razvoj mnogih industrija.

Upravo je zato osnovna ideja ovog istraživanja ponuditi mogućnosti iskorištavanja komine masline kao izvora prirodnih antioksidansa te istražiti mogućnost primjene ekstrakta komine u razvoju novih generacija prehrambenih aditiva i nutraceutika. Kako bi se prevladala sva spomenuta ograničenja koja onemogućavaju bolju iskoristivost komine masline i razvio učinkovit i u potpunosti ekološki prihvatljiv proces, istražena je mogućnost primjene nekonvencionalnog, inovativnog procesa ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak različitih vrsta ciklodekstrina, kao potencijalno primjenjivih nosača bioaktivnih sastavnica.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## **2.1. KOMINA MASLINE**

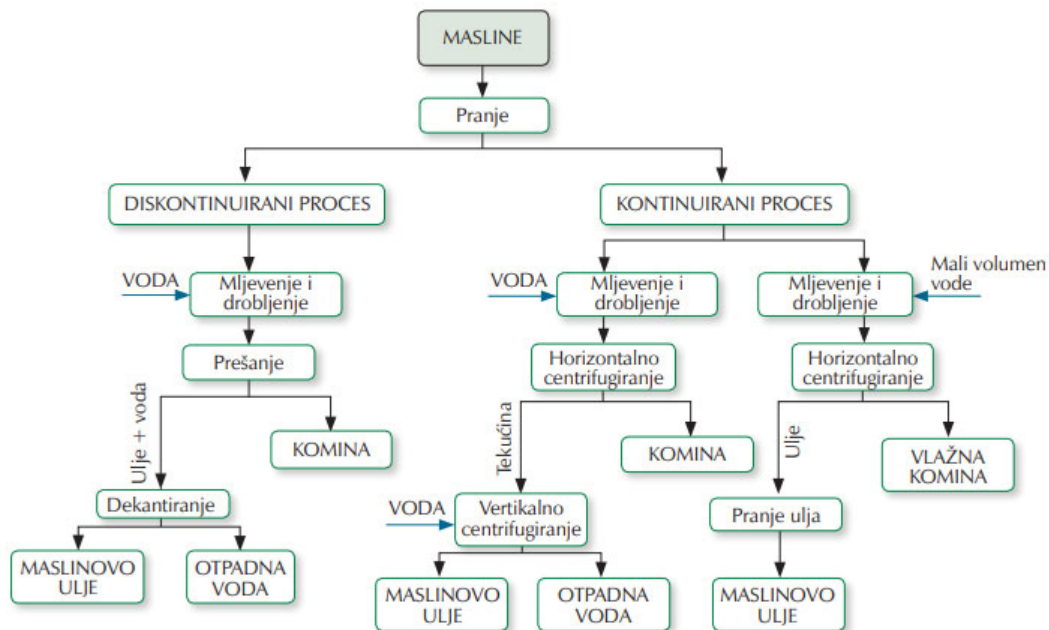
### **2.1.1. Dobivanje komine masline**

Komina masline je, uz lišće i grančice te vegetabilnu (otpadnu) vodu, jedan od glavnih nusprodukata koji zaostaju nakon prerade maslina i proizvodnje maslinovog ulja.

Maslinova ulja različitih kategorija dobivaju se izravno od ploda masline (*Olea europea L.*) i/ili krutog ostatka (komine) koji ostaje nakon dobivanja ulja izravno iz ploda.

U procesu proizvodnje ekstra djevičanskog maslinovog ulja i djevičanskog maslinovog ulja, masline se podvrgavaju isključivo mehaničkim ili drugim fizikalnim postupcima, u uvjetima koji ne dovode do promjena sastojaka ulja te bez dodataka pomoćnih sredstava kemijskog ili biokemijskog djelovanja. U modernom maslinarstvu berba započinje pri optimalnoj zrelosti ploda masline, nakon čega se plodovi maslina dopremaju u uljaru te prolaze kroz proces čišćenja, pranja i mljevenja kako bi se ulje oslobodilo iz vakuola pulpe ploda. Nastala pasta se miješa kako bi se povećao postotak dostupnog ulja i kako bi se aglomerirale male kapljice ulja za lakše razdvajanje uljne i vodene faze. U svrhu ekstrakcije maslinova ulja primjenjuju se diskontinuirani (prešanje) ili kontinuirani procesi (centrifugiranje) (**Slika 1.**) (Kučić Grgić i sur., 2020).





**Slika 1:** Shematski prikaz kontinuiranog i diskontinuiranog procesa ekstrakcije maslinovog ulja (preuzeto iz Kučić Grgić i sur., 2020).

Kod diskontinuiranog procesa se dobivena pasta razmaže po vlaknastim slojnicama, koje se postavljaju jedna na drugu. Zbog postizanja ravnomjerno raspoređenog pritiska tijekom prešanja, između slojnica se ulažu metalni diskovi. Slojnice s diskovima postavljaju se u hidrauličnu prešu te se na njih vrši pritisak, kako bi se čvrsta faza maslinove paste zbita te se emulzija vode i ulja odvojila od krutog ostatka. Postupak prešanja provodi se u tri faze, te se njime dobiva kruti ostatak – komina masline i smjesa ulja i vegetabilne (otpadne) vode (Škevin, 2016). Kako bi se dobilo čisto maslinovo ulje, emulzija maslinovog ulja i zaostale vegetabilne vode se odvaja pomoću uljnog separatora.

U novije vrijeme, tradicionalni diskontinuirani proces prešanja ustupio je mjesto kontinuiranom procesu. Kontinuiranim procesom ekstrakcije maslinova ulja se primjenom centrifuge iz maslinove paste separira maslinovo ulje, voda i komina, a razlikuju se dvofazni i trofazni sustav ekstrakcije. U trofaznom procesu se za odvajanje ulja umjesto primjene tlaka i dekantiranja koriste horizontalno i vertikalno centrifugiranje, tijekom kojeg se dodaje 50-100 % vode na masu tijesta kako bi se dobilo polutekuće tijesto smanjene viskoznosti. Zbog obaveznog dodatka vode tijekom procesa centrifugalne ekstrakcije u tri faze, kao nusprodukt nastaje velika količina otpadnih voda

(Škevin, 2016). Ovim se postupkom generiraju ukupno tri različite frakcije, uz otpadnu vodu nastaju kruti ostatak – komina masline te ulje kao tekuća faza. S ciljem smanjenja volumena otpadne vode razvijen je proces centrifugalne ekstrakcije u dvije faze. Na taj se način iz paste masline dobivaju dvije faze: maslinovo ulje i vlažna komina kao polučvrsti otpad. Vlažna komina masline (**eng.** TPOMW; *two-phase olive-mill waste* ili otpad dvofaznog mlina) sastoji se od krutog ostatka i vegetabilne (otpadne) vode te može biti dodatno prerađena ekstrakcijom ulja kako bi se povećao prinos ulja. Ekstrakcijom vlažne komine masline mogu se proizvesti dva tipa ulja komine: ulje ekstrahirano korištenjem tradicionalnih otapala i ulje dobiveno pomoću ekstrakcije centrifugiranjem. Vlažna komina masline dobivena dvofaznim procesom ekstrakcije sadrži veliku koncentraciju toksičnih tvari i teže se zbrinjava, što se smatra glavnim nedostatkom ovog procesa. Takav način prerađivanja maslina dominantan je u Španjolskoj (McNamara i sur., 2008) a široko je rasprostranjen i u Hrvatskoj.

### 2.1.2. Svojstva i kemijski sastav komine masline

Komina masline je tamna smjesa intenzivnog mirisa koja sadrži dijelove kožice, koštica i pulpu masline te određeni udio ulja i vode zaostale nakon proizvodnje maslinovog ulja. Sastav komine masline razlikuje se ovisno o sorti masline, uvjetima uzgoja i postupku obrade ploda masline. Ovisno o primjenjenom procesu proizvodnje, variraju udjeli pojedinih tvari u sastavu komine masline, a najveće su razlike u udjelima zaostale vode i ulja. Centrifugalnom ekstrakcijom s dvije faze dobiva se vlažna komina s većim sadržajem vode (65-75 % zaostale vode), a manjim sadržajem ulja. Korištenjem centrifugalnih ekstraktora s tri izlaza dobiva se komina bogatija uljem, u kojoj zaostaje manji udio vode (40-45 %), dok udio vode u komini dobivenoj tradicionalnim procesom iznosi 22-25 % (Frankel i sur., 2013). Fizikalno-kemijskom analizom ustanovljeno je da je komina blago kisela (pH-vrijednosti 4,8-6,5), a uz visoki udio vode ima i vrlo visok udio organske tvari. Udio suhe tvari u komini iznosi 87,1-94,4 %. Komina masline sadrži 1,70-4 % pepela, dok vlažna komina masline sadrži 1,42-4 % pepela (Dermeche i sur., 2013). Glavni spojevi koji se nalaze u komini masline su celuloza, hemiceluloza, lignin, a u znatnim količinama zastupljeni su i proteini te organski spojevi kao što su polifenoli, organske kiseline, lipidi i alkoholi (Frankel i sur., 2013). Mineralnom analizom ustanovljeno je da je najzastupljeniji mineral u komini masline kalij, a u visokom udjelu su zastupljeni i kalcij i natrij (Dermeche i sur., 2013). Komina masline siromašna je fosforom i mikronutrijentima (Albuquerque i sur., 2004). Kemijski sastav

vlažne komine masline dobivene dvofaznim postupkom prerade te komine masline dobivene trofaznim i tradicionalnim postupkom prikazan je u **Tablici 1**.

**Tablica 1:** Kemijski sastav komine masline i vlažne komine masline (Dermeche i sur., 2013)

Parametar	Komina masline	Vlažna komina masline
pulpa (%)	12-35	10-15
koštice masline (%)	15-45	12-18
suha tvar (%)	87,1-94,4	
pepeo (%)	1,7-4	1,42-4
pH-vrijednost	/	4,9-6,8
električna provodnost (dS/m)	/	1,78-5,24
ukupni ugljik (%)	29,03-42,9	25,37
organska tvar (%)	85	60,3-98,5
ukupni dušik (%)	0,2-0,3	0,25-1,85
P (%)	0,03-0,06	0,03-0,14
K (%)	0,1-0,2	0,63-2,9
Na (%)	/	0,02-0,1
Ca (%)	/	0,23-1,2
Mg (%)	/	0,05-0,17
Fe (%)	/	0,0526-0,26
Cu (%)	/	0,0013-0,0138
Mn (%)	/	0,0013-0,0067
Zn (%)	/	0,0010-0,0027
lipidi (%)	3,5-8,72	3,76-18,0
ukupni fenoli (%)	0,2-1,146	0,4-2,43
ukupni šećeri (%)	0,99-1,38	0,83-19,3
ukupni proteini (%)	3,43-7,26	2,87-7,2
celuloza (%)	17,37-24,14	14,54
hemiceluloza (%)	7,92-11,0	6,63
lignin (%)	0,21-14,18	8,54

### 2.1.3. Fenolni sastav komine masline

#### 2.1.3.1. Podjela i svojstva fenolnih spojeva

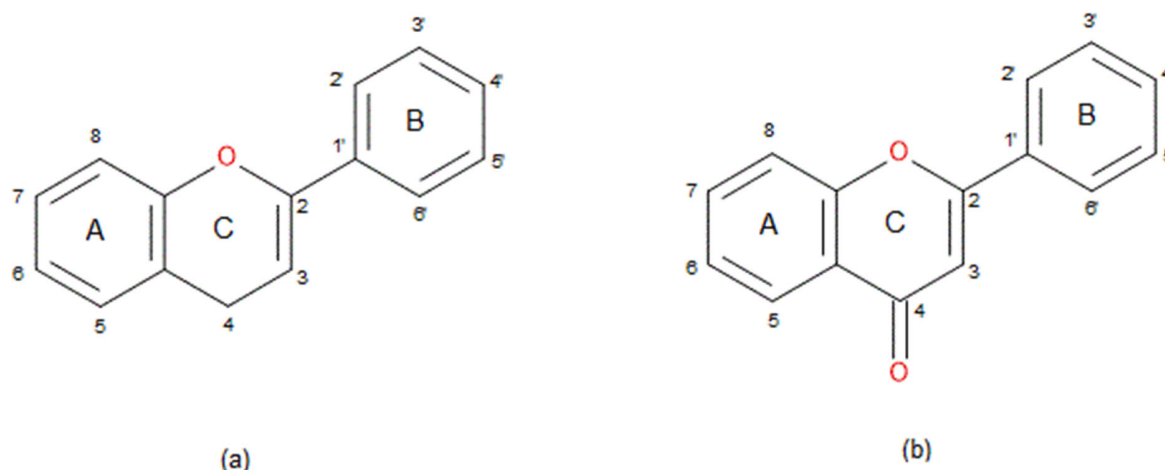
Fenolni spojevi su najbrojnija i najraširenija grupa sekundarnih biljnih metabolita u višim biljkama, a poznato je čak više od 8000 struktura fenolnih spojeva. Slabo su topljivi u vodi, a odlikuje ih visoko vrelište i nisko talište. Zbog učinka aromatskog prstena u svojoj strukturi pokazuju svojstvo kiselosti te u jako lužnatoj okolini daju soli koje nazivamo fenolati.

Fenolni spojevi imaju dobra antioksidativna svojstva, što znači da su protonsko-elektronskim izmjenama sposobni neutralizirati reaktivne slobodne radikale u ljudskom tijelu. U namirnicama sprječavaju reakcije radikala s alkenima te tako usporavaju oksidativna oštećenja hrane (Hart i sur., 2012).

Polifenoli u biljkama imaju fiziološku ulogu; utječu na otpornost biljke prema bolestima i mikroorganizmima, uključeni su u rast i reprodukciju biljke te štite osjetljive stanične dijelove od štetnog UV zračenja. Oni su sastavni dio i ljudske i životinjske prehrane, ali se ne mogu sintetizirati u ljudima niti u životinjama (Keller, 2009).

Prirodni polifenoli obuhvaćaju različite spojeve, od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline, do visoko polimeriziranih spojeva poput tanina. Prvenstveno se nalaze u obliku glikozida, konjugirani s jednom ili više skupina šećera (Bravo, 1998). Osim šećera, supstitucijske grupe koje se nalaze na osnovnoj jezgri su hidroksilna i metoksi grupa, što pridonosi velikoj raznolikosti fenolnih spojeva.

Udio fenolnih spojeva u biljkama ovisi o varijetetu, klimatskim uvjetima, stupnju zrelosti i brojnim drugim faktorima. S obzirom na strukturu, fenolni spojevi se dijele na flavonoide i neflavonoide. Osnovna kemijska struktura flavonoida se sastoji od 15 atoma ugljika koji su povezani u jezgri od tri fenolna prstena: A, B i C (Tapas i sur., 2008). Benzenski prsten A kondenziran je s tročlanim alifatskim nizom koji zajedno s kisikom tvori šesteročlani prsten C, a na poziciji 2 prstena C nalazi se benzenski prsten B (**Slika 2.a**). Za flavonoide koji imaju vezanu karbonilnu grupu na C-4 atomu prstena C često se koristi izraz 4-okso-flavonoidi (**Slika 2.b**) (Davies, 2004).



**Slika 2:** Osnovna struktura flavonoida: (a) flavan jezgra, (b) okso-flavonoid jezgra (strukture prikazane pomoću *BIOVIADraw 2022*)

S obzirom na oksidacijsko stanje središnjeg prstena flavonoidi se dijele na flavonole, flavone, flavanone, antocijanidine (katehini i proantocijanidini), flavanole, i izoflavone (Daglia, 2012).

Flavonoidi su pigmenti topljivi u vodi i nalaze se u vakuolama stanice. U višim biljkama imaju ulogu u vezanju dušika, pigmentaciji cvjetova, filtraciji ultraljubičastog zračenja te kao kemijski glasnici, fiziološki regulatori i inhibitori staničnog ciklusa. Povezani su s visokom antioksidativnom aktivnošću određene hrane te sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Kabera i sur., 2014).

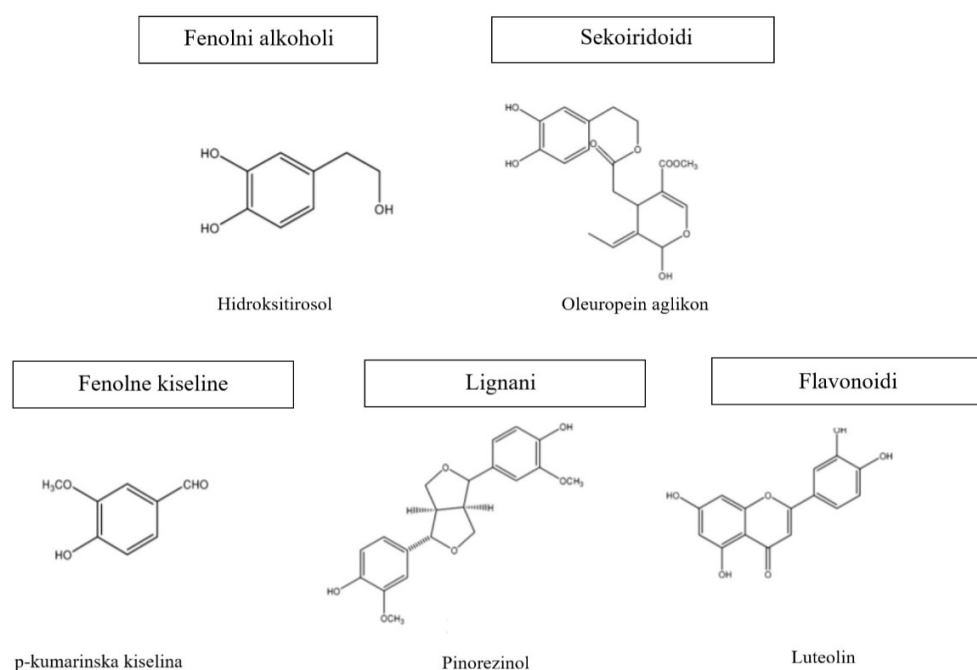
Glavne skupine neflavonoida su fenolne kiseline, stilbeni i lignani. Fenolne kiseline dijele se na derivate benzojeve kiseline (galna kiselina, protokatehinska kiselina) i derivate cimetine kiseline (kumarinska kiselina, katehinska kiselina i ferulinska kiselina). Najznačajniji stilben je resveratrol koji može biti u *cis* i *trans* obliku (Daglia, 2012).

Lignani su građeni od dvije fenilpropanske jedinice. Razlikuju se prema oksidacijskom stanju bočnog lanca i skupinama vezanim za aromatske prstene. Lignani se nalaze u biljkama bogatim vlaknima kao što su zob, pšenica ječam i lan. (Touré i Xueming, 2010).

### 2.1.3.2. Najznačajniji fenolni spojevi u komini masline

Plod masline sadrži visoke koncentracije fenolnih spojeva koji čine 1-3 % ukupne mase svježe pulpe. Fenolni spojevi masline lokalizirani su u pokožici i pulpi ploda, a glavne skupine fenola prisutnih u plodu masline su fenolne kiseline, fenolni alkoholi, flavonoidi, sekoiridoidi, flavonol

glikozidi te antocijani (Servili i Montedoro, 2002; Suárez i sur., 2008). Dok se fenolne kiseline, fenolni alkoholi i flavonoidi mogu pojaviti u mnogim vrstama voća i povrća koje pripadaju različitim botaničkim obiteljima, sekoiridoidi su prisutni isključivo u biljkama koje pripadaju obitelji *Oleaceae* kojoj pripada i maslina (*Olea europaea* L.) (Servili i Montedoro, 2002). Tijekom proizvodnje maslinovog ulja jedan dio fenolnih spojeva iz ploda masline prelazi u ulje, dok većina zaostaje u komini i vegetabilnoj vodi. Komina masline sadrži različite skupine fenolnih spojeva poput fenolnih kiselina, fenolnih alkohola, flavonoida, flavonol glikozida, sekoiridoida i lignana (Servili i Montedoro, 2002). Na **Slici 3** prikazane su strukture glavnih fenolnih komponenti prisutnih u komini masline.



**Slika 3:** Strukturne formule glavnih fenolnih komponenti iz komine masline (strukture prikazane pomoću *BIOVIADraw 2022*)

Fenolne kiseline komine masline su cimetna, *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska, vanilinska, galna, siringinska, sinapinska i homovanilinska kiselina. Luteolin i apigenin pripadaju flavonoidima komine masline, a luteolin 7-*O*-rutinozid, luteolin-7-*O*-glukozid, luteolin 4'-*O*-glukozid, rutin i apigenin-7-*O*-glukozid, njenim flavonol glikozidima. Lignani izolirani iz komine

masline su pinorezinol i 1-acetoksipinorezinol. Fenolne kiseline, flavonoidi i lignani nalaze se u komini masline u manjoj količini, dok većinu fenolnih spojeva u komini masline čine sekoiridoidi i fenolni alkoholi.

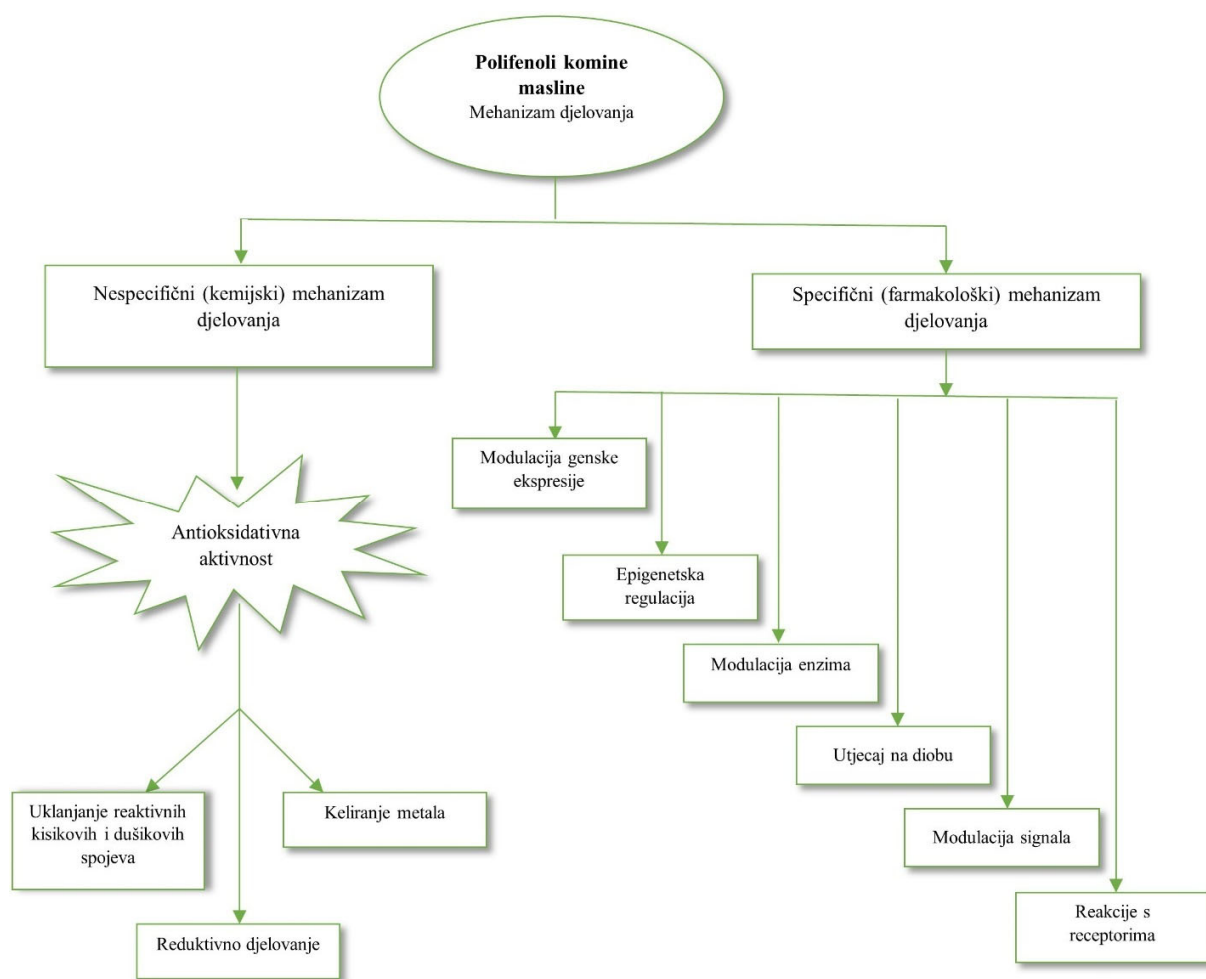
Sekoiridoidi su u komini masline najčešće prisutni u obliku glikozida te su sintetizirani sekundarnim metabolizmom terpena. Građeni su od pentil-etil alkohola (hidroksitirosola i tirosola), elenolne kiseline i često glukozidnog ostatka. Zaslужni su za gorčinu i pikantnost maslinovog ulja (Bendini i sur., 2007). Najznačajniji sekoiridoidi masline su oleozidi, od kojih su najzastupljeniji oleuropein i ligstrozid-esteri elenolne kiseline (Obied i sur., 2005).

Uz navedene sekoiridoide, iz zrelih je maslina izoliran demetiloleuropein, a u plodu masline je u malim količinama pronađen derivat hidroksicimetne kiseline, verbaskozid. Daljnjim istraživanjima prisutnost oleuropeina, demetiloleuropeina i verbaskozida potvrđena je u svim dijelovima ploda masline poput kožice, pulpe i sjemena. Nasuprot tome, sekoiridoid nuzhenid je pronađen samo u sjemenu (Servili i sur., 2002).

Hidroksitirosol i tirosol glavni su fenolni alkoholi u komini masline. Nastaju tijekom drobljenja ploda masline, enzimatskom hidrolizom oleuropeina pomoću enzima  $\beta$ -glukozidaze (Araújo i sur., 2015).

### **2.1.3.3. Mehanizam djelovanja fenolnih spojeva komine masline**

Pozitivni učinci tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina na zdravlje dokazani su brojnim istraživanjima. Neki od važnijih farmakoloških učinaka polifenola iz komine masline su antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, imunomodulatorno, antikancerogeno i kemopreventivno djelovanje te protektivni učinci na kardiovaskularni, gastrointestinalni i središnji živčani sustav (Obied i sur., 2012). U podlozi svih tih učinaka, na staničnoj i substancijskoj razini utvrđena su dva mehanizma djelovanja polifenolnih spojeva: nespecifični (kemijski) i specifični (farmakološki) (**Slika 4.**).



**Slika 4:** Mehanizmi djelovanja polifenola komine masline

Nespecifični mehanizam djelovanja polifenola obuhvaća uklanjanje reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, keliranje metala i reduktivno djelovanje. Odgovoran je za antioksidativni učinak polifenola. Nasuprot tome, specifični (farmakološki) mehanizmi djelovanja obuhvaćaju modulaciju ekspresije gena i aktivnosti enzima, utjecaj na staničnu signalizaciju te vezanje za receptore.



### 2.1.3.4. Farmakološka svojstva polifenola komine masline

Saznanja o farmakološkim učincima polifenola iz masline proizlaze iz velikog broja prekliničkih studija (*in vitro*, *ex vivo* te *in vivo*) i nekoliko kliničkih studija. Provedena istraživanja ukazuju na veliki potencijal polifenolnih spojeva kod prevencije i liječenja bolesti (Obied i sur., 2012). Potencijal polifenola masline prepoznat je i priznat i od strane brojnih nadležnih tijela kao što je EFSA (*European Food Safety Authority*). Ekstrakti ploda masline, kao i oni dobiveni iz otpada, smatraju se sigurnima, a najvažniji farmakološki učinci pojedinih polifenola uključuju antioksidativne, protuupalne, kardioprotektivne, imunomodulatorne, kemoprotektivne i antikancerogene učinke (Obied i sur., 2012).

Budući da većina kroničnih bolesti, poput dijabetesa, ateroskleroze, Alzheimerove bolesti i nekih tipova karcinoma, u patogenezi sadrži upalu i oksidativni stres, polifenoli masline sa svojim protuupalnim i antioksidativnim djelovanjem utječu na prevenciju i liječenje takvih bolesti.

#### 2.1.3.4.1. Antioksidativni učinci

Povećan unos polifenola masline može značajno smanjiti oksidativni stres, koji nastupa kada količina nastalih slobodnih radikala u stanici nadilazi kapacitet endogenog antioksidacijskog sustava.

Slobodni radikali mogu narušiti strukturu i funkciju bioloških makromolekula poput lipida, proteina i nukleinskih kiselina te time izazvati apoptozu ili staničnu smrt. Smatra se da je oksidativni stres povezan s nastankom mnogih akutnih i kroničnih bolesti (kardiovaskularna, neurodegenerativna i tumorska oboljenja) te sa procesom starenja.

Mehanizmi antioksidativnog djelovanja polifenola masline su neutralizacija reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, keliranje metala i reduktivno djelovanje. Antioksidacijska aktivnost polifenola masline temelj je njihovog antidijabetičkog, antiaterogenog, neuroprotektivnog, imunomodulatornog te antikancerogenog i kemopreventivnog učinka.

#### 2.1.3.4.2. Protuupalni učinci

Protuupalni učinci polifenola komine masline temelje se na inhibiciji enzima ciklooksigenaze i lipooksigenaze koji prevode arahidonsku kiselinu u medijatore upale (prostaglandine i leukotriene) te inhibiciji proupalnih citokina (kemokina, interleukina 1, 6 i 8 te faktora nekroze tumora). *In vitro* studijama te studijama na životinjama dokazano je djelovanje polifenola komine masline

u kontroli upalnih procesa (Obied i sur., 2012). Tako su primjerice u više *in vitro* studija hidroksitirosol i tirosol smanjili ekspresiju ciklooksigenaze-2, a tirosol je ujedno i inhibirao oslobađanje arahidonske kiseline (Moreno i sur., 2003.; Maiuri i sur., 2005; Cornwell i sur., 2008; Zhang i sur., 2009). U studiji Poudyala i sur. iz 2010. godine dokazan je utjecaj oleuropeina i hidroksitirosola na smanjenje kronične upale i oksidativnog stresa na modelu štakora kod prehranom inducirane pretilosti i dijabetesa (Poudyal i sur., 2010).

### 2.1.3.4.3. Učinci na kardiovaskularni sustav

Povećan unos polifenola masline smanjuje rizik od hipertenzije, tromboze i ateroskleroze (Obied i sur., 2012). Točan molekularni mehanizam antihiperzitivnog djelovanja polifenola masline nije u potpunosti razjašnjen, međutim, smatra se da je temeljen na vazodilataciji postignutoj inhibicijom kalcijevih kanala i povećanjem sinteze dušikovog oksida. Pretkliničkom studijom na štakorima, Gilani i sur. (2005) dokazali su antihipertenzivna svojstva ploda masline. Prehrana bogata polifenolima masline tijekom četiri tjedna je smanjila sistolički tlak kod starijih dijabetičara i smanjila doze antihipertenziva (Perona i sur., 2009). Antiaterogena aktivnost polifenola obuhvaća smanjenje razine LDL-a, oksidiranog LDL-a, ukupnog kolesterola i triglicerida te povećanje razine zaštitnog HDL-a. Davanje hidroksitirosola dijabetičkim štakorima rezultiralo je smanjenjem razine triglicerida i LDL-kolesterola, a povećanjem zaštitnog HDL kolesterola ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Antiagregacijski (antitrombotski) učinak polifenola masline ispitan je u studijama Dell'Agli i sur. (2008), Correa i sur. (2009), Singh i sur. (2008) i González-Correa i sur. (2008). Hidroksitirosol i oleuropein su inhibirali ekspresiju endotelnih adhezijskih molekula *in vitro* u studiji Dell'Agli-a i sur. (2006) te je time prevenirana agregacija trombocita. U *in vitro* studiji (Correa i sur., 2009) te u studiji na štakorima (González-Correa i sur., 2008) postignut je antitrombotski učinak hidroksitirosola sličan onom acetilsalicilne kiseline, tako što je hidroksitirosol inhibirao sintezu tromboksana, a potaknuo sintezu dušikovog oksida. U kontroliranoj jednostruko slijepoj studiji 180 pacijenata pridržavalo se mediteranske prehrane bogate polifenolima masline, što je rezultiralo poboljšanjem endotelne funkcije i smanjenjem vaskularnih upalnih markera (Esposito i sur., 2004).

### 2.1.3.4.4. Antidijabetički učinci

Istraživanjima je dokazan utjecaj polifenola masline na postizanje euglikemijskih učinaka mehanizmom koji uključuje zaštitu beta stanica gušterače od disfunkcije i apoptoze uzrokovane oksidativnim stresom. Nadalje, polifenoli masline povećavaju sekreciju inzulina i osjetljivost stanica na inzulin (Obied i sur., 2012). Stanični i molekularni mehanizmi takvog djelovanja još uvijek nisu razjašnjeni.

Polifenoli masline mogu inhibirati probavne enzime koji sudjeluju u razgradnji ugljikohidrata, poput alfa amilaze i alfa glukozidaze te time doprinose kontroli postprandijalne glukoze u krvi (Obied i sur. 2012). Također je dokazano da je oleuropein utjecao na smanjenje nekroze i apoptoze beta stanica i poboljšanje sekrecije inzulina u stanicama izloženim vodikovom peroksidu (Cumaoglu i sur., 2011). Hipoglikemijska aktivnost oleuropeina i hidroksitirosola pokazana je na različitim životinjskim modelima dijabetesa tip 1 (Jemai i sur., 2009).

### 2.1.3.4.5. Antikancerogeni i kemopreventivni učinci

Antikancerogeni i kemopreventivni učinci polifenola masline temelje se na smanjenju oštećenja uzrokovanih oksidativnim stresom i regulaciji staničnog ciklusa inhibicijom proliferacije stanice ili indukcijom apoptoze. Konzumacija prehrane bogate djevičanskim maslinovim uljem, povezana je sa smanjenjem rizika od nastanka više tipova neoplazmi, uključujući one respiratornog i gornjeg gastrointestinalnog trakta, raka dojke te debelog crijeva (Pelluchi i sur., 2011; Psaltopolou i sur., 2011).

U istraživanjima antitumorskog djelovanja polifenola masline, glavne komponente koje su u fokusu su hidroksitirosol i oleuropein. U studiji Sirianni-ja i sur. (2010) hidroksitirosol i oleuropein su inhibirali signalizaciju ovisnu o estrogenu u stanicama raka dojke. Hidroksitirosol je na stanicama promijelocitne leukemije i adenokarcinoma kolona izazvao apoptozu i utjecao na ostanak nekih stanica u G0/G1 fazi, dok na zdravim limfocitima nije zabilježen takav učinak (Fabiani i sur., 2002). U životinjskom modelu raka kolona, hidroksitirosol je izazvao antiangiogenetski učinak (Terzuoli i sur., 2010), dok je na modelu raka dojke kod štakora stimulirao ekspresiju gena za apoptozu (Granados-Principal i sur., 2011). Oleuropein je *in vitro* inhibirao proliferaciju vaskularnih glatkih mišića (Abe i sur., 2011) te izazvao potpuno povlačenje spontanih tumora pri oralnoj primjeni kod miša (Hamdi i Castellon, 2005). Kod humanog

karcinoma kolona, tirosol je pokazao antiproliferativni učinak te je inducirao apoptozu na staničnoj liniji raka dojke (Obied i sur., 2012).

### **2.1.3.4.6. Neuroprotektivni učinci**

Polifenoli masline, zbog svog protuupalnog i antioksidativnog djelovanja imaju potencijal u prevenciji i usporavanju progresije neurodegenerativnih bolesti. Na mišjem modelu Alzheimerove bolesti, polifenoli masline su smanjili znakove oksidativnog stresa te povećali sposobnosti učenja i pamćenja, dok su hidroksitirosol i oleuropein, *in vitro*, spriječili nakupljanje amiloid beta i tau proteina, glavnih markera Alzheimerove bolesti koji dodatno potiču oksidativni stres (Obied i sur., 2012).

### **2.1.3.4.7. Imunomodulatorni učinci**

U mnogim je istraživanjima ispitivan utjecaj fenolnih spojeva na imunološki sustav. U studiji na miševima je prehrana bogata polifenolima masline utjecala na poboljšanje funkcije stanica imunološkog sustava (Álvarez i sur., 2006). Tako primjerice, hidroksitirosol i tirosol poboljšavaju signalizaciju i ekscitabilnost monocita povećanjem razine kalcija u citosolu (Palmerini i sur., 2005). *In vitro*, u studiji Drissa i sur. iz 2004. godine hidroksitirosol je utjecao na zaštitu neutrofila uklanjanjem vodikovog peroksida. Ekstrakt komine masline je utjecao na poboljšanje mobilnosti te smanjenje bolova i razine serumskog homocisteina kod pacijenata s reumatoidnim artritisom (Obied i sur., 2012).

### **2.1.3.4.8. Učinci na gastrointestinalni sustav**

Hidroksitirosol i oleuropein posjeduju baktericidnu aktivnost prema *Helicobacter pylori*, glavnom uzročniku ulkusa želuca (Romero i sur., 2007; Sudjana i sur., 2009). Prehrana bogata polifenolima masline utjecala je na smanjenje oštećenja želučane stijenke izazvanih nesteroidnim protuupalnim lijekovima povećanjem aktivnosti glutacion peroksidaze i smanjenjem apoptoze. Smanjenjem sinteze upalnih enzima suprimiran je razvoj kolorektalnog karcinoma, na mišjem modelu ulcerativnog kolitisa (Sánchez-Fidalgo i sur., 2010). Polifenoli masline inhibirali su nuklearni faktor kapa B (NF- $\kappa$ B) u stanicama humanog želučanog adenokarcinoma (Obied i sur., 2012).

### 2.1.3.4.9. Osteoprotektivni učinci

Polifenoli masline (hidroksitirosol, tirosol i oleuropein), *in vitro* i *in vivo*, smanjuju rizik od osteoporoze inhibicijom lučenja upalnih citokina (interleukina 1 i 6 te faktora nekroze tumora), koji potiču resorpciju kostiju, te povećanjem diferencijacije osteoblasta (Pfeilschifter i sur., 1989.; Greenfield i sur., 1999). Na osteoprotektivne učinke polifenola masline upućuju i podaci epidemioloških studija o manjoj zastupljenosti osteoporoze u područjima s mediteranskom prehranom, odnosno većim unosom polifenola masline (Obied i sur., 2012).

### 2.1.3.4.10. Respiratorni učinci

Rahman i sur. su 2006. godine u svojoj studiji kod plućnih bolesnika ispitivali ulogu te protuupalni i antioksidativni učinak biofenola unesenih u organizam hranom. U zaključku svoje studije istaknuli su važnost terapijske primjene antioksidansa kod kronične opstruktivne bolesti pluća. U studijama na životinjama, ekstrakt komine masline bogat hidroksitirosolom prevenirao je posljedice oksidativnog stresa induciranog pasivnim pušenjem kod štakora (Visioli i sur., 2000).

### 2.1.3.4.11. Antimikrobni učinak

#### 2.1.3.4.11.1. Antibakterijski učinak

Polifenoli masline (hidroksitirosol, tirosol i oleuropein ) pokazuju baktericidnu aktivnost širokog spektra prema brojnim Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, aerobnim i anaerobnim te intracelularnim i ekstracelularnim bakterijama. (Romero i sur, 2007; Karaosmanoglu i sur, 2010; Medina i sur., 2006). U provedenim studijama najširu antibakterijsku aktivnost pokazao je hidroksitirosol, zatim oleuropein, a najužu tirosol (Zampa i sur., 2006; Saavedra i sur., 2010; Didry i sur., 1999; De Souza i sur., 2010). Neke od bakterija prema kojima hidroksitirosol *in vitro* pokazuje antibakterijsku aktivnost su *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholera*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* te *Clostridium perfringens*. Do sada nisu provedene *in vivo* kliničke studije ispitivanja antibakterijskog djelovanja fenola iz masline. Iako antibakterijski mehanizam djelovanja fenolnih spojeva iz masline nije u potpunosti istražen, smatra se da fenolni spojevi iz masline uzrokuju strukturalna oštećenja na staničnoj membrani te na peptidoglikanima u staničnoj stijenci bakterija (Zampa i sur., 2006; Tranter i sur., 1993). Ekstrakti dobiveni iz maslinovog ulja, masline ili komine masline koje čini smjesa fenolnih spojeva, pokazali su jače antibakterijsko djelovanje od

individualno ekstrahiranih polifenola. Dokazano je i njihovo sinergističko djelovanje s drugim antibioticima. (Karaosmanoglu i sur., 2010; Saavedra i sur., 2010).

### **2.1.3.4.11.2. Antivirusni učinak**

Mehanizam antivirusnog djelovanja polifenola masline temelji se na sprječavanju ulaska virusa u stanicu, ometanju proizvodnje virusnih proteina, inhibiciji replikacije i širenja virusa te stimuliranju njihove fagocitoze; kod retrovirusa ujedno inhibiraju reverznu transkriptazu i proteazu. Zabilježena je *in vitro* antivirusna aktivnost hidroksitirosola i oleuropeina prema HIV-1 virusu (Lee-Huang i sur., 2007) te virusu gripe (Yamada i Ogawa, 2009). Oleuropein je također pokazao *in vitro* antivirusnu aktivnost prema virusu hemoragične septikemije te prema virusu hepatitisa B, čiju je replikaciju prevenirao i *in vivo* (Micol i sur., 2005; Zhao i sur., 2009; Lee-Huang i sur., 2007).

## **2.2. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA KOMINE MASLINE**

### **2.2.1. Klasična ekstrakcija**

Ekstrakcija je definirana kao tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja tvari iz homogenih smjesa, temeljeno na njihovoj različitoj topljivosti u otapalima koja se međusobno ne miješaju. Kod klasične ekstrakcije se prethodno pripremljen (oprani, osušen i sl.) biljni materijal tretira raznim otapalima, čime je omogućeno izdvajanje molekula od interesa (Suwal i Marciniak, 2018). Otapala koja se najčešće upotrebljavaju su voda, aceton, metanol, etanol, heksan, kloroform, dietil eter, etil acetat, diklormetan, dimetilsulfoksid i tetrahidrofuran, a mogu se upotrebljavati u obliku čistih otapala, vodenih otopina ili u kombinaciji s drugim otapalima (Amorim-Carrilho i sur., 2014; Saini i Keum, 2018; Ventura i sur., 2017). Voda i etanol se smatraju sigurnijima za okoliš i zdravlje, pa se stoga potiče njihovo korištenje umjesto heksana, dietil etera, diklormetana i kloroforma (Saini i Keum, 2018).

Iskorištenje ekstrakcije ovisi o vrsti otapala s obzirom na polarnost, vremenu ekstrakcije, temperaturi te kemijskim i fizikalnim svojstvima samog uzorka (Conde i sur., 2010). Iz tog je razloga kod odabira prikladne metode ekstrakcije potrebno uzeti u obzir svojstvo spoja (veličina, naboj, polarnost, stabilnost) koji se želi izolirati, brzinu procesa, ponovljivost, iskorištenje i trošak samog postupka te zaštitu ekstrahiranih molekula od transformacije i

degradacije (Pasquet i sur., 2011). Otapalo kojim se vrši ekstrakcija mora biti selektivno za spojeve koji se žele ekstrahirati, sadržavati veliki ekstrakcijski kapacitet, biti nereaktivno s biljnim sastavnicama, neškodljivo za ljude i opremu, potpuno hlapljivo te ekonomski isplativo (Albu i sur., 2004).

Pregledom literature dobiven je uvid u različite metode klasične ekstrakcije fenolnih spojeva iz otpada masline. Razvijene metode ekstrakcije fenolnih spojeva proizlaze iz njihove strukture i oblika u kojem se nalaze u prirodnom supstratu. Fenolni spojevi nalaze se u staničnoj stijenci, vakuoli ili su vezani za jezgru biljnih stanica. Većina fenolnih spojeva iz biljnih izvora vezana je za biljni materijal kovalentnom vezom, te je pravi izazov izdvojiti ih u oblik koji je moguće ekstrahirati (Suwal i Marciniak, 2018).

Cioffi i sur. (2010) su u svojoj studiji određivali fenole u ekstraktima dobivenim iz komine masline maceracijom s kloroformom i metanolom, dok su Aliakbarian i suradnici (2011) analizirali metanolne ekstrakte otpada masline tretiranog parom u visokotlačnom reaktoru. Rubio-Senent i suradnici (2012) analizirali su etilacetatne ekstrakte komine, a Lafka i suradnici (2013) uspoređivali su konvencionalnu ekstrakciju otapalom sa superkričnom ekstrakcijom različitim otapalima i CO<sub>2</sub>. Iako su farmakološki aktivni polifenoli visoko zastupljeni u različitim vrstama otpada koji zaostaje nakon prerade maslina, na točan kvalitativan i kvantitativni sastav dobivenih ekstrakata bitno je utjecala ekstrakcijska tehnika (Japon – Lujan i sur., 2006; Aliakbarian i sur., 2011) i uvjeti ekstrakcije (trajanje, temperatura, tlak, otapalo). Ekstrakti dobiveni u navedenim istraživanjima su se značajno razlikovali po svom kvantitativnom i kvalitativnom sastavu. Najveći prinosi polifenola ostvareni su korištenjem toksičnih organskih otapala (etil acetata i metanola) kao ekstrakcijskog sredstva.

Upravo je postizanje velikog prinosa bez upotrebe sofisticiranih i skupih instrumenata glavni razlog najčešće primjene konvencionalnih metoda ekstrakcije otapalom. Isto tako, njihova je upotreba prilagodljiva za industrijsku primjenu i imaju nisku cijenu što predstavlja veliku prednost (Gong i Bassi, 2016). Ipak, konvencionalne metode imaju brojne nedostatke: produljeno vrijeme ekstrakcije, korištenje toksičnih organskih otapala visokog stupnja čistoće, isparavanje velikih količina otapala tijekom postupka ekstrakcije i niska selektivnost ekstrakcije. Tijekom konvencionalnih metoda ekstrakcije ciljane skupine bioaktivnih spojeva često su izložene višim

temperaturama, svjetlosti i kisiku potičući tako potencijalnu izomerizaciju i oksidaciju (Denery i sur., 2004).

Nedostaci konvencionalnih metoda ekstrakcije utjecali su na razvoj naprednih alternativnih postupaka ekstrakcije u koje se ubrajaju: ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, ekstrakcija superkritičnim plinovima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija primjenom visokog tlaka, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija pomoću enzima i ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem (Saini i Keum, 2018). Primjenom alternativnih postupaka ekstrakcije moguće je ostvariti veće prinose, poboljšati selektivnost te smanjiti vrijeme trajanja procesa, troškove i upotrebu otapala, što je ekološki prihvatljivije i svakako čini veliku prednost u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije (Kadam i sur., 2013).

### **2.2.2. Ultrazvučna ekstrakcija**

Glavni izazov kod ekstrakcije biokomponenti iz biljnog materijala je prevladati ograničenja karakteristična za klasičnu ekstrakciju te razviti učinkovitiji i ekološki prihvatljiviji postupak ekstrakcije. U želji očuvanja globalnih resursa i poboljšanja energetske učinkovitosti, istražena je primjena ultrazvuka za ekstrakciju aktivnih tvari iz bioloških materijala sa ciljem primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj industriji i medicini.

Ultrazvuk je definiran kao zvučni val s frekvencijama od 20 kHz do 10 MHz, što je više od praga osjetljivosti ljudskog sluha, ali ispod mikrovalnih frekvencija (Chemat, 2011).

Zvučni valovi se s obzirom na proizvedenu energiju, snagu zvuka, intenzitet snage i frekvenciju mogu podijeliti u više područja koja određuju njihovu potencijalnu primjenu. Ukoliko je primjenjena frekvencija visoka, a snaga slabija, radi se o dijagnostičkom ultrazvuku niske energije, a ako je frekvencija niska, a snaga jača, primijenjen je ultrazvuk visoke energije.

Dijagnostički ultrazvuk, tj. ultrazvuk niske snage ima intenzitet manji od  $1 \text{ W cm}^{-2}$  gledano na promjer ultrazvučne sonde, a frekvencije više od 2 MHz. Ne uzrokuje fizičke niti kemijske promjene u svojstvima medija na koji je primijenjen te se zato smatra neinvazivnom tehnikom, a koristi se kao analitička tehnika za kontrolu obrade hrane, mjerenja teksture, sastava (Povey i Mason, 1998; Režek Jambrak i sur., 2010), viskoznosti, brzine protjecanja, kontrolu pakiranja, određivanja razine kapljevine u bačvama ili tankovima, koncentracije tvari u hrani itd.



Ultrazvuk visoke snage sa rasponom frekvencija od 20 do 100 kHz (Povey i Mason, 1998, Villamiel i de Jong, 2000, Marić i sur., 2018) te visokim intenzitetom (u rasponu od 1 do 1000 W cm<sup>-2</sup>), uzrokuje fizičke promjene materijala te određene kemijske reakcije u materijalima na kojima je primijenjen. Koristi se za čišćenje, otplinjavanje i homogenizaciju tekućina (Villamiel i de Jong, 2000), sušenje, omekšavanje mesa, ekstrakciju, emulgiranje (Povey i Mason, 1998), destilaciju, kristalizaciju (Mason i Luche, 1996), sterilizaciju i sl.

### **2.2.2.1. Mehanizam i djelovanje ultrazvuka visokog intenziteta**

Ultrazvuk visokog intenziteta može nastati pokretanjem tekućine, mlazom plina ili pomoću električne snage. Napon istosmjerne struje se pomoću generatora pretvara u visoke frekvencije od približno 25 kHz električne energije. Energija zvuka se zatim dobiva iz električne ili mehaničke energije uz pomoć ultrazvučnih pretvarača.

Postoje tri tipa pretvarača u uobičajenoj upotrebi, koji uključuju pretvarač s tekućinom, magnetostriktivni pretvarač i piezoelektrični pretvarač. Najčešće su korišteni piezoelektrični elektroakustični sustavi (Mason, 1998).

Piezoelektrični materijali kao što je barijev titanat ili olovov metaniobat se šire i kontrahiraju u promjenjivom električnom polju, te time stvaraju ultrazvučne valove. Ultrazvučni se valovi sondom emitiraju u medij, te njihovim prolaskom nastaju longitudinalni valovi. Time se u mediju stvaraju područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995, Povey i Mason, 1998). Dolazi do pojave kavitacije, tako da se se formiraju milijuni mikroskopskih mjehurića (šupljina), koji se šire pod utjecajem negativnog tlaka, a potom naglo implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka.

Zbog prolaska ultrazvuka visokog intenziteta (frekvencije 20 – 100 kHz) te visoke razine snage kroz tekući medij, veličina mjehurića snažno oscilira. U fazi ekspanzije nastali kavitacijski mjehurići uvijek malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije (Suslick, 1990). Tijekom uzastopnih ekspanzija i kompresija, dodirna površina mjehurića je sve veća, što poboljšava difuziju plina. Nakon brojnih ciklusa kompresije i ekspanzije, mjehurići dostižu kritičnu veličinu te se u sljedećem ciklusu kompresije para iznenada kondenzira, a mjehurići implodiraju.

Molekule oko mjehurića snažno se sudaraju jedna s drugom, stvarajući mikropodručja s ekstremno visokom temperaturom (5500 °C) i visokim tlakom (104 – 105 kPa). Taj je fenomen poznat kao „kratkotrajna ili prijelazna kavitacija“. Nastali udarni valovi dovode do mijenjanja fizikalno-kemijskih svojstava lokalnih molekula. (Leighton, 2007, Suslick, 1990).

Uz navedene učinke, pojava kavitacije može uzrokovati i nastajanje raznih vrsta slobodnih radikala. Uslijed ekstremnih uvjeta nastajanja kavitacije, molekule otapala i otopljenih tvari unutar mjehurića se razlažu te stvaraju visoko reaktivne radikale.

Slobodni radikali su visoko reaktivne prirode, difundiraju od kavitacijskog mjehurića kroz medij za sonifikaciju i ulaze u reakcije sa supstancama koje se sonificiraju. Mogu utjecati na promjenu kemijskih procesa u sustavu, povećanje brzine reakcije ili pokretanje nove kemijske reakcije (Kondo i Kano, 1988). Takvo djelovanje slobodnih radikala može dovesti do degradacije polimera i oksidacije lipida.

### **2.2.2.2. Utjecaj procesnih parametara na ultrazvučnu ekstrakciju**

Na proces ultrazvučne ekstrakcije utječu procesni parametri kao što je vrsta ultrazvučnog reaktora, frekvencija i snaga ultrazvučnog zračenja, temperatura, vrijeme ekstrakcije te svojstva uzorka i odabranog otapala za ekstrakciju. Promjena svakog od navedenih parametara te njihova međusobna interakcija imaju utjecaj na konačni rezultat ultrazvučne ekstrakcije.

Povišena snaga ultrazvučnog zračenja utječe na veći intenzitet miješanja, ali može dovesti i do degradacije određenih komponenti, dok se niže frekvencije povezuju s većim prinosima procesa.

Povišena temperatura povećava interakcije između uzorka i odabranog otapala, kao i difuzivnost otapala, dok snižena temperatura pospješuje akustičnu kavitaciju. Međutim, više temperature mogu dovesti i do različitih kemijskih promjena u ekstraktu kao što je degradacija određenih komponenti. Isto tako, iako dulje trajanje procesa može osigurati veće prinose željenih komponenti, može utjecati i na kemijske promjene u dobivenom ekstraktu. Iz tog je razloga temperaturu i trajanje procesa potrebno optimirati s ciljem dobivanja maksimalnog prinosa željenih komponenti, a ne ukupnog prinosa ekstrakcije (Pavlić, 2017).

Glavne karakteristike uzorka koje utječu na proces ultrazvučne ekstrakcije su veličina čestica i omjer tekuće/kruto, vrsta otapala, viskozitet, površinska napetost, tlak para iznad otapala i

dielektrična konstanta. Navedene fizikalne karakteristike izravno utječu na selektivnost ekstrakcije i na konačni kemijski sastav ekstrakta (Chemat i sur., 2017).

Učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije ovisi o velikom broju procesnih parametara i njihovoj interakciji, pa je optimizacija procesa neophodna kako bi se postigao željeni rezultat ekstrakcije (Šic Žlabur i sur., 2022).

### **2.2.2.3. Ultrazvučni procesori**

Ultrazvuk se može primjeniti na više načina, pa i hibridnim tehnikama kombinacija ultrazvuka s raznim konvencionalnim metodama. Više je stotina tipova ultrazvučnih sustava koji se trenutno upotrebljavaju, a razlikuju se prema dizajnu pretvarača, tipovima pretvarača te načinom na koji se ultrazvuk predaje procesu. Za procesno-prehrambenu te farmaceutsku industriju od posebnog su značaja ultrazvučna kupelj i sustav ultrazvučne sonde (Herceg i sur., 2009).

#### **2.2.2.3.1. Ultrazvučna kupelj**

Ultrazvučne kupelji se vrlo često koriste u laboratorijima zbog pristupačne cijene te lake dostupnosti (Fernandes i Rodrigues, 2007; Fernandes i sur., 2008). U ultrazvučnoj kupelji emitiraju se zvučni valovi niskih frekvencija unutar ultrazvučnog područja u posudi ispunjenoj tekućinom, koja je najčešće voda. Intenziteti ultrazvuka u ultrazvučnim kupeljima iznose od 1-10 W/cm<sup>2</sup>. Ultrazvučne kupelji djeluju pri nižem intenzitetu kako bi se izbjeglo oštećenje stijenki spremnika koje uzrokuje kavitacija. Zbog velikih volumena tekućine koja se tretira u spremniku, ultrazvučne kupelji rade pri manjim akustičnim snagama (Brnčić i sur., 2009).

#### **2.2.2.3.2. Sustav s direktno uronjenom sondom**

Ultrazvučni sustav s direktno uronjenom sondom je uređaj za dobivanje ultrazvuka visokog intenziteta, koji u usporedbi s ultrazvučnom kupelji ima višestruko veće intenzitete. Temelji se na elektroakustičnim sustavima, tj. piezoelektričnom ili magnetostriktivnom pretvorniku. Svrha pretvornika je dostavljanje energije ultrazvuka tekućem sustavu koji se tretira te pretvaranje visoke frekvencije izmjenične struje u mehaničke vibracije koje stvaraju kavitacije (Barbosa-Canovas i sur., 2005).

Uz pretvornik, osnovni dio uobičajenog ultrazvučnog sustava visokog intenziteta je generator koji pretvara električnu energiju u zahtjevanu visoku frekvenciju izmjenične struje.

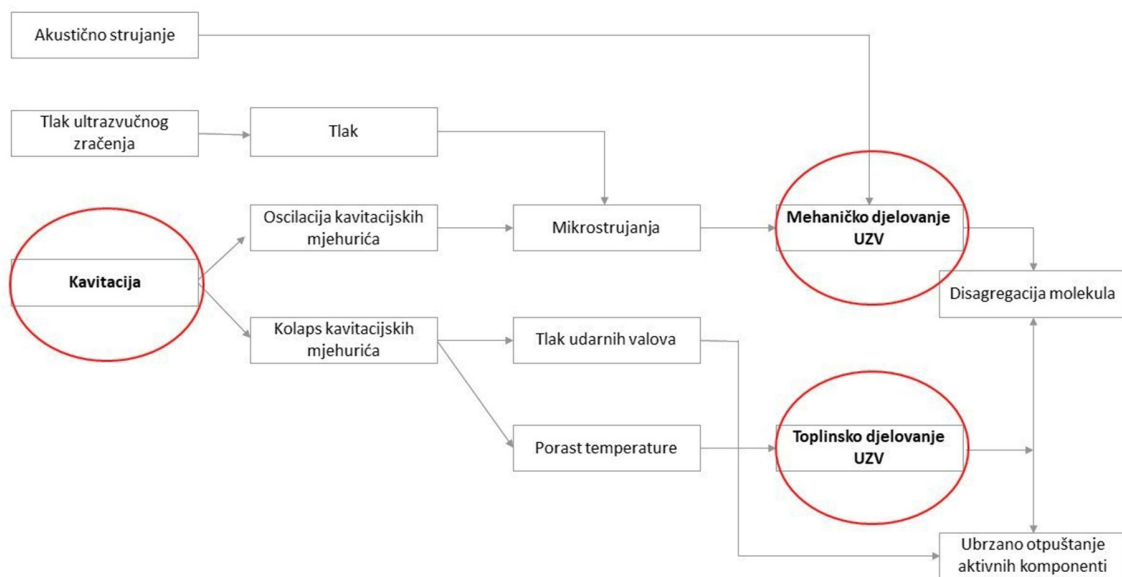
Ultrazvučna sonda se pokazala kao moćan alat za ekstrakciju tvari iz čvrstih uzoraka pomoću otapala. Postoji nekoliko izvedbi sonde različitih duljina, promjera i geometrije vrha, a prikladna sonda se odabire ovisno o primjeni i volumenu uzorka koji se sonificira.

Ultrazvučna sonda se primjenjuje direktnim uranjanjem u otopinu, a oblikovana je tako da je snop sonde u jednom dijelu sužen. Suženi dio snopa naziva se fokus, a zvučni tlak u njemu je do dva puta veći nego na površini sonde (Krstelj, 2003). Budući da se ultrazvučni intenzitet isporučuje samo kroz malu površinu vrha sonde, sustav sonde je puno snažniji od ultrazvučne kupelji.

Ultrazvučni sustavi s direktno uronjenom sondom izvedeni su najčešće sa fiksnim frekvencijama od 20, 24, 30, pa sve do 100 kHz te omogućavaju izravnu isporuku ultrazvuka u ekstrakcijski medij. Na taj je način osiguran minimalni gubitak energije ultrazvuka.

#### **2.2.2.4. Primjena ultrazvuka u svrhu ekstrakcije bioaktivnih spojeva**

Saznanja o učincima ultrazvuka visokog intenziteta, kao što su pojava kavitacije, te razne vibracije, drobljenje i miješanje medija na koji djeluje, potaknula su mnoga istraživanja o primjeni i djelovanju ultrazvuka na ekstrakciju bioaktivnih spojeva. (Ruiz-Jiménez i sur., 2004; Cravotto i sur., 2008). U raznim su studijama promatrani fizikalni mehanizmi koji nastaju djelovanjem ultrazvučne ekstrakcije, a njihova pojava ovisila je o parametrima ekstrakcije i prirodi biljnog materijala (Pingret i sur., 2013; Vinatoru i sur., 2017.; Vinatoru, 2001). Najčešće pojave uzrokovane djelovanjem ultrazvuka obuhvaćale su fragmentaciju, eroziju, sonokapilarni učinak i sonoporaciju (Chemat i sur., 2017.; Khadhraoui i sur., 2018), a sve su direktno ili indirektno povezane s kavitacijskim fenomenom. Ustanovljeno je da djelovanjem ultrazvuka na površinu materijala, pojavom kavitacije i nastajanjem udarnih valova dolazi do erozije, pucanja staničnih stijenki i eksudacije, što omogućuje ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala (Picó, 2013.; Awad i sur., 2012). Pucanjem stanične stijenke tretiranog materijala, omogućeno je veće prodiranje otapala u materijal čime je povećan prijenos mase. Struktura i funkcija ekstrakta pri tome ostaju nepromijenjene (Toma i sur., 2001.; Ayim i sur., 2018). Na **Slici 5** prikazan je mehanizam djelovanja ultrazvučne ekstrakcije, te je vidljiv značajan utjecaj kavitacije i nastalih toplinskih i mehaničkih reakcija.



**Slika 5:** Mehanizam djelovanja ultrazvučne ekstrakcije na biljni materijal

Khadhraoui i sur. (2018) su u svojoj studiji naglasili da ultrazvuk utječe na biljni materijal nizom reakcija koje se odvijaju lančanim redoslijedom. Zajedničkim utjecajem nastalih reakcija fragmentacije, erozije, sonoporacije te sonokapilarnim učinkom dolazi do uspješne ekstrakcije bioaktivnih molekula iz biljnog materijala. Na taj je način ultrazvučnom ekstrakcijom povećan prinos bioaktivnih komponenti u dobivenom ekstraktu te skraćeno vrijeme ekstrakcije.

Primjenom ultrazvučne ekstrakcije uspješno je povećan prinos komponenti, kao što su polifenoli (Dujmić i sur., 2020; Springett, 2001), antocijani (Springett, 2001), aromatske tvari (Vinatoru, 2001), polisaharidi (Ebringerova i Hromadkova, 1997), ulja (Chemat i sur., 2004) i funkcionalni spojevi (Balachandran i sur., 2006).

#### 2.2.2.5. Važnost primjene ultrazvučne ekstrakcije

Zbog opće zabrinutosti oko štetnog utjecaja kemikalija na okoliš, sve je jači utjecaj novije razvijenog pristupa tzv. “zelene kemije”, kojoj je cilj smanjenje ili uklanjanje upotrebe štetnih kemikalija i stvaranje opasnog otpada (Pérez-Serrano i sur. 2020).

Budući da se u procesima klasične ekstrakcije koriste velike količine izrazito štetnih organskih otapala, primjena principa zelene kemije u postupcima ekstrakcije značajno bi doprinjela očuvanju

okoliša. Iz tog su razloga Chemat i sur. (2012) definirali osnovne principe zelene ekstrakcije prirodnih proizvoda koji uključuju upotrebu alternativnih otapala, uglavnom vode i otapala iz prirodnih izvora, smanjenje potrošene energije ponovnom upotrebom energije i primjenom inovativnih tehnologija, smanjenje broja operacija i provođenje sigurnih i kontroliranih procesa te proizvodnju biorazgradivog i stabilnog ekstrakta bez kontaminanata.

Proces ultrazvučne ekstrakcije svojim karakteristikama u potpunosti zadovoljava navedene principe zelene ekstrakcije. Kao visoko učinkoviti proces može osigurati velike prinose i to bez opasnih kemijskih supstanci. Korištenjem alternativnih otapala kao što je voda, uz manju potrošnju energije omogućava dobivanje stabilnih ekstrakata bez kontaminanata.

Ultrazvučna ekstrakcija se zato smatra ključnom tehnologijom u postizanju cilja održive zelene kemije, a zbog jednostavnog povezivanja s postojećim industrijskim procesima ima veliki potencijal za široku primjenu u industriji. Industrijska primjena ultrazvučne ekstrakcije je ekonomična alternativa za tradicionalne procese ekstrakcije što je zahtjev industrije za njen održivi razvoj.

Novije razvijeni ultrazvučni sustavi ukazuju na brojne prednosti ultrazvučne ekstrakcije kao što su povećan prinos ekstrakta, bolja selektivnost, kraće trajanje ekstrakcije, manji utrošak energije te očuvanje termolabilnih spojeva (Šic Žlabur i sur, 2020).

Postupci ultrazvučne ekstrakcije se zbog načina izvedbe mogu kombinirati s drugim metodama ekstrakcije ili koristiti kao predtretman (Grumezescu i Holban, 2017).

Tijekom provođenja procesa ekstrakcije, moguća je i istovremena modifikacija biljnog materijala kako bi se poboljšala bioraspodivnost mikronutrijenata (Vilkhu i sur., 2008). Primjenom ultrazvučne ekstrakcije moguće je istovremeno provoditi ekstrakciju i uklapanje mikronutrijenata. Takva je mogućnost je osobito važna kako bi se spriječila degradacija bioaktivnih sastojaka, te povećao prinos, čistoća i stabilnost dobivenog ekstrakta.

### **2.3. FORMULACIJA STABILNOG SUHOG EKSTRAKTA**

#### **2.3.1. Ciklodekstrini**

Za oblikovanje terapijskih sustava koriste se različite pomoćne tvari (nosači) koje omogućuju dostavu potrebne količine lijeka na mjesto djelovanja u predviđenom vremenu i trajanju. Pomoćne tvari imaju različite funkcionalne uloge u određenom farmaceutskom obliku, kao što su poboljšanje

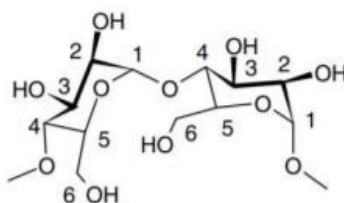
topivosti djelatne tvari, kontroliranje oslobađanja djelatne tvari, osiguravanje stabilnosti, sprječavanje sekundarnih kontaminacija mikroorganizama te poboljšanje senzornih značajki pripravka.

U farmaceutskoj i prehrambenoj industriji tijekom praktične primjene neprocesuiranih biljnih ekstrakata, velika je zapreka njihova ljepljiva konzistencija, slaba topljivost, prodoran miris i neugodan okus (Sansone i sur., 2011). Osim toga, hidrofilnost, gubitak aktivnih sastojaka zbog degradacije/evaporacije/oksidativne razgradnje koji se događaju tijekom skladištenja mogu bitno smanjiti nutritivnu kvalitetu ili terapijsku učinkovitost ekstrakta (Mourtzinis i sur., 2008). Kao rješenje navedenog problema javila se ideja za primjenom odgovarajućih nosača tijekom formulacije ekstrakta, koji mogu utjecati na otpuštanje aktivnih tvari iz preparata, poboljšati bioraspoloživost te posljedično farmakokinetičke parametre i terapijske učinke gotovog proizvoda (Braithwaite i sur., 2013). U svojim radovima Kurkov i Loftsson (2013) te Loftsson i Brewster (2012) ističu i opisuju ciklodekstrine kao skupinu strukturalno sličnih oligosaharida, koji mogu modulirati neželjena biofarmaceutska svojstva različitih bioaktivnih molekula stvaranjem tzv. inkluzijskih kompleksa.

### 2.3.1.1. Kemijska struktura ciklodekstrina

Ciklodekstrini su makrociklički spojevi iz skupine nereducirajućih oligosaharida. Prstenastu strukturu ciklodekstrina međusobno zatvaraju glukopiranozne jedinice, čiji broj varira ovisno o vrsti ciklodekstrina. S obzirom na broj glukopiranoznih jedinica najvažniji su  $\alpha$  ( $n=6$ ),  $\beta$  ( $n=7$ ) i  $\gamma$  ( $n=8$ )-ciklodekstrini.

Sukladno povećanju broja glukopiranoznih jedinica dolazi i do povećanja promjera ciklodekstrinskog prstena. Ciklodekstrini s manje od 6 glukopiranoznih jedinica ne mogu biti stvoreni iz steričkih razloga, dok su ciklodekstrini s više od 8 glukopiranoznih jedinica teški za pročišćavanje i grade vrlo labilne komplekse s malom vrijednošću konstante stabilnosti (Loftsson i Brewster, 1996). Glukopiranozne jedinice su međusobno povezane  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama (**Slika 6.**).



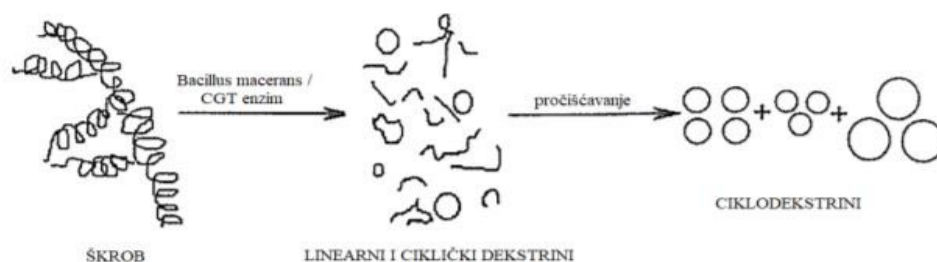
**Slika 6:** Prikaz  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze između D-glukopiranoznih jedinica u konformaciji stolice

Iz steričkih razloga slobodna rotacija oko te vrste veze nije moguća, stoga ciklodekstrini ne mogu tvoriti cilindrične strukture. Najstabilnija konfiguracija ovih cikličkih oligosaharida je krnji stožac s centralnom šupljinom. Takva je konformacija rezultat slobodne rotacije primarnih hidroksilnih skupina. Gradivne glukopiranozne jedinice postavljene su simetrično obzirom na imaginarnu os koja prolazi kroz središte ciklodekstrinskog prstena. Unutrašnjost stošca je omeđena C-C, C-H i C-O-C vezama te je iz tog razloga hidrofobna, dok je vanjski obod hidrofilan zahvaljujući hidroksilnim skupinama  $\alpha$ -D-glukopiranoze koje ga izgrađuju (Qi and Sikorski, 2001).

### 2.3.1.2. Dobivanje ciklodekstrina

Kao početna supstanca u dobivanju ciklodekstrina koristi se škrob, koji je građen je od dvije vrste glukoznih polimera: amiloze i amilopektina (Steed i Atwood, 2009). Hidrolitičkom razgradnjom škroba kataliziranom različitim enzimima dobivaju se dekstrini, a razgradnju dekstrina, zatim, katalizira bakterijski enzim ciklodekstrin glukoziltransferaza. Kao primarni produkt razgradnje dekstrina nastaje linearni oligosaharid, koji podliježe intramolekularnoj ciklizaciji u odsustvu vode, pri čemu nastaju ciklodekstrini (**Slika 7.**).





**Slika 7:** Shematski prikaz dobivanja ciklodekstrina iz škroba

Razgradnjom škroba uz enzim nastaje smjesa s podjednakim udjelom  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina. Izolacija samo jedne od navedenih vrsta ciklodekstrina može se postići kontrolom parametara poput temperature i pH-vrijednosti reakcijske smjese, te dodatkom određenih organskih supstanci koje će simulirati nastanak pojedinog derivata ciklodekstrina.

Dodatkom toluena u reakcijsku smjesu pospješuje se nastanak  $\beta$ -ciklodekstrina, dok se dodatkom dekana potencira nastajanje  $\alpha$ -ciklodekstrina. Formiranje  $\gamma$ -ciklodekstrina omogućava se dodatkom  $\alpha$ -naftola i metilketona (Fröming i Szejtli, 1994).

### 2.3.1.3. Svojstva ciklodekstrina

Ciklodekstrini pripadaju skupini biorazgradivih molekula, a u čvrstom agregacijskom stanju nalaze se u obliku sitnih bijelih kristalića. Molekule ciklodekstrina mogu kristalizirati s različitim brojem molekula vode ovisno o uvjetima kristalizacije i broju gradivnih glukopiranoznih jedinica, odnosno o molekulskoj masi.

Gustoća ciklodekstrina iznosi 1,42 – 1,45 g/mL, ovisno o količini vezane vode. Pri potpunoj dehidraciji ciklodekstrini prelaze u amorfnu formu. Tališta  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina iznose između 240 °C i 265 °C. Relativno visoka tališta su posljedica stabilne kristalne strukture ciklodekstrina (Đorđević i sur., 2006).

Ciklodekstrini se otapaju u vodi i određenim organskim otapalima, kao što su dimetilformamid, dimetil-sulfoksid, piridin, te etilen-glikol (Đorđević i sur., 2006). Topljivost prirodnih ciklodekstrina je ovisna o vrsti i nije proporcionalna broju hidroksilnih skupina gradivnih jedinica  $\alpha$ -D-glukopiranoze. Tako je topljivost  $\beta$ -ciklodekstrina znatno manja u usporedbi s topljivošću  $\alpha$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina. Razlog relativno slabe topljivosti  $\beta$ -ciklodekstrina u vodi je jačina intramolekulskih vodikovih veza između sekundarnih hidroksilnih skupina smještenih na široj

strani stošca, jer u značajnoj mjeri onemogućuju interakcije s otapalom. Također, slaba topljivost  $\beta$ -ciklodekstrina u vodi može biti i posljedica neparnog broja donora i akceptora vodika potrebnih za nastanak nekovalentne, vodikove veze (Steed i Atwood, 2009).

Topljivost  $\beta$ -ciklodekstrina u vodi moguće je povećati metilacijom sekundarnih hidroksilnih skupina uz odgovarajući katalizator. Na taj se način kidaju jake intramolekulske vodikove veze i pospješuje se topljivost nastalih derivata  $\beta$ -ciklodekstrina. U molekuli  $\alpha$ -ciklodekstrina iz steričkih razloga nastaje samo 5 od mogućih 6 vodikovih veza, pa je stoga topljiviji od  $\beta$ -ciklodekstrina koji posjeduje 7 intramolekulskih vodikovih veza. Najtopljiviji od prirodnih ciklodekstrina je  $\gamma$ -ciklodekstrin (232 g/L, 25 °C). Razlog vrlo dobre topljivosti  $\gamma$ -ciklodekstrina u vodi je njegova neplanarna građa i manje rigidna struktura zbog čega je u mogućnosti ostvariti veći broj vodikovih veza s molekulama otapala. Veliki volumen šupljine koju zatvaraju glukopiranozne jedinice  $\gamma$ -ciklodekstrina daje dodatnu fleksibilnost strukturi što je također razlog njegove veće topljivosti u odnosu na  $\alpha$  i  $\beta$ -ciklodekstrin.

Parametar koji znatno utječe na topljivost ciklodekstrina je temperatura. Povećanjem temperature značajno se povećava i topljivost ciklodekstrina, međutim u usporedbi s analognim linearnim dekstrinima, ona je i dalje slaba. Opisana svojstva pojedinih vrsta ciklodekstrina prikazana su u **Tablici 2**.

**Tablica 2:** Fizikalno - kemijska svojstva  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina (prema Steed i Atwood, 2009)

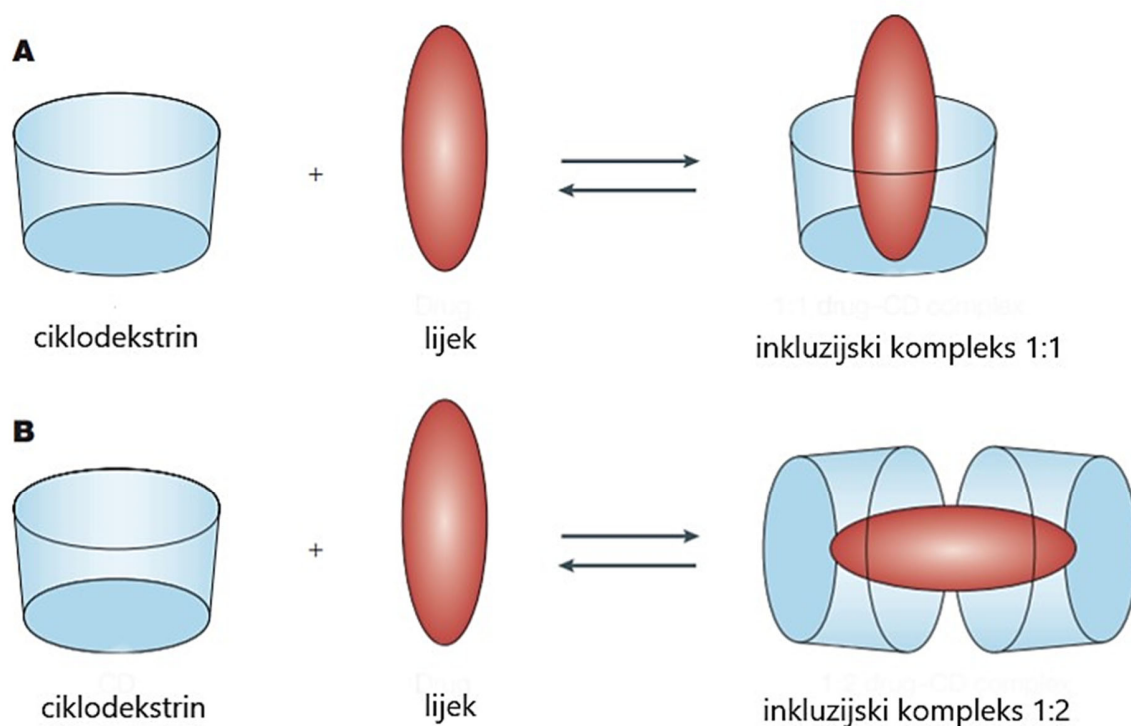
Svojstvo	$\alpha$ -ciklodekstrin	$\beta$ -ciklodekstrin	$\gamma$ -ciklodekstrin
Broj glukopiranoznih jedinica	6	7	8
Molarna masa (g/mol)	972	1135	1297
Topljivost u vodi (g/L, 25 °C)	145	18,5	232
Količina kristalno vezane vode (w/%)	10,2	13,2-14,5	8,13 – 17,7
Volumen kaveza (Å <sup>3</sup> )	174	262	427

Ciklodekstrini imaju povoljne biološke karakteristike od kojih je posebno istaknuta relativno niska toksičnost, pa se stoga koriste u farmakološkim pripravcima. Čisti preparati ciklodekstrina ne postaju štetni ni nakon dugotrajnog oralnog unošenja. Nakon peroralnog unosa lijeka koji kao aktivnu supstancu sadrži ciklodekstrin, dalje se metabolizira u debelom crijevu u maltodekstrin, maltozu i glukozu koji se uključuju u metabolizam ugljikohidrata i u konačnici izlučuje u obliku ugljikovog dioksida i vode (Frömming i Szejtli, 1994).

### 2.3.1.4. Inkluzijski kompleksi

Važno obilježje molekula ciklodekstrina je mogućnost tvorbe inkluzijskih, domaćin-gost kompleksa reakcijama molekulskog kompleksiranja. Kod takvih se reakcija ciklodekstrini smatraju praznim kapsulama molekularne veličine (“domaćin”) koje mogu u svoju lipofilnu šupljinu uklopiti slabo polarnu molekulu lijeka ili neki njezin dio (Davis i Brewster, 2004). Zahvaljujući atomima vodika i glikozidnim atomima kisika koji su sastavni dio unutrašnje šupljine, molekula ciklodekstrina ima djelomično hidrofoban karakter te je stvaranje inkluzijskih kompleksa moguće s raznim molekulama gosta.

Veliki broj lijekova različite kemijske strukture i agregatnog stanja može tvoriti inkluzijske komplekse s ciklodekstrinima. U ciklodekstrinsku šupljinu se mogu smjestiti molekule iz skupine aldehida, ketona, alifatskih ugljikovodika i amina te različite aminokiseline, masne kiseline i aromatski spojevi. Parametri koji imaju najveći utjecaj na nastajanje inkluzijskih kompleksa su lipofilnost i geometrija molekule lijeka (“gosta”). Molekule gosta moraju biti odgovarajućih veličina s obzirom na promjer šupljine ciklodekstrina. Stabilan supramolekulski kompleks stvara se kada je veličina molekule gosta manjih dimenzija od promjera ciklodekstrinskog prstena. Moguće je i stvaranje kompleksa s molekulama znatno većim od centralne šupljine. U tom se slučaju u šupljinu ciklodekstrina uklapaju samo dijelovi molekula ili njeni pokrajnji lanci, a tako velika molekula može se uklopiti i u dvije centralne šupljine ciklodekstrina. Najjednostavniji inkluzijski kompleksi nalaze se u stehiometrijskom omjeru 1:1, no mogući su i odnosi 2:1 ili 1:2, ovisno o molekularnoj masi molekule gosta i steričkim razlozima (Loffson i Brewster, 1997). Nastajanje inkluzijskih kompleksa u omjerima 1:1 i 1:2 prikazano je na **Slici 8**.



**Slika 8:** Shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa u stehiometrijskom omjeru 1:1 (A) te kompleksa višeg reda (B)

Glavna pokretačka sila koja vodi do nastajanja kompleksa je oslobađanje entalpijom bogatih molekula vode iz centralne šupljine molekule ciklodekstrina. Molekule vode se zamjenjuju lipofilnim ostatkom molekula lijeka prisutnog u otopini.

Prilikom tvorbe inkluzijskih kompleksa ne dolazi do nastanka kovalentnih veza, niti do kidanja istih u molekuli gosta i domaćina. Sile odgovorne za formiranje kompleksa su elektrostatske interakcije, Van der Waalove veze, vodikove veze, otpuštanje konformacijskog naprežanja te interakcije prijenosa naboja (Brewster i Loftsson, 2007).

### 2.3.1.5. Primjena ciklodekstrina

Ciklodekstrini imaju široku primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj, kozmetičkoj i tekstilnoj industriji. Takva je primjena moguća zahvaljujući njihovoj specifičnoj prstenastoj strukturi i stvaranju inkluzijskih kompleksa s različitim vrstama molekula gosta.

Smještanjem molekule gosta u šupljinu molekule domaćina, molekula gosta postaje podložna nizu pozitivnih modifikacija od strane molekule domaćina, te dolazi do promjene njenih kemijskih, fizikalnih i bioloških svojstava.

Molekula domaćina tako može povećati njezinu topljivost ukoliko se radi o slabo topljivoj molekuli, stabilizira ju ukoliko je molekula podložna oksidaciji i raspadu pod utjecajem topline i UV-zračenja, sprječava enzimatsku razgradnju, kontrolira sublimaciju, utječe na okus lijeka te omogućava njegovo kontrolirano otpuštanje u organizam (Del Valle, 2003).

Kompleksacijom s ciklodekstrinima moguće je prevesti tekuće, lako hlapljive i plinovite lijekove u čvrsto stanje (Marques, 2010), kao i spriječiti inkompatibilnosti lijekova s drugim pomoćnim tvarima u formulaciji (Loftsson i Brewster, 2010).

### **2.3.1.5.1. Utjecaj ciklodekstrina na povećanje topljivosti**

Formiranjem inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima, moguće je netopljive kristalinične tvari prevesti u amorfne, lako topljive produkte, čime se povećava bioraspoloživost tih lijekova u rasponu od 1,1 do 46 puta (Brewster i Loftsson, 2007). Potencijal solubilizacije ciklodekstrina se može dodatno poboljšati dodatkom odgovarajuće ternarne komponente, kao što su metalni ioni, organski ioni, polimeri i neke druge tvari, a na porast topljivosti utječe i svojstvo aglomeracije.

Pri relativno niskim koncentracijama ciklodekstrina, udio agregata je relativno nizak (manje od 0,01 %), ali pri koncentracijama ciklodekstrina od 5 do 10 % agregati su dominantan oblik u sustavu. Nastajanje takvih agregata utječe na solubilizacijski potencijal ciklodekstrina, te je uklapanjem molekule lijeka u strukture slične micelama dodatno povećana njegova topljivost (Messner i sur., 2010).

### **2.3.1.5.2. Utjecaj ciklodekstrina na poboljšanje stabilnosti**

Kompleksacija s ciklodekstrinima može utjecati i na kemijsku stabilnost lijekova. Uklapanjem u centralnu šupljinu ciklodekstrina lijek je najčešće zaštićen od vanjskih utjecaja, što pridonosi njegovoj kemijskoj stabilnosti (Pinho i sur., 2014). Promjene u konformaciji molekule lijeka nastale uslijed stvaranja inkluzijskog kompleksa mogu smanjiti njezinu kemijsku reaktivnost, a nastajanje inkluzijskih kompleksa može štititi lijek od enzimske razgradnje u probavnom sustavu. Povećanje topljivosti i kemijske stabilnosti lijekova uslijed kompleksacije s ciklodekstrinima

rezultira značajnim povećanjem bioraspodivnosti lijekova (Kawabata i sur., 2011; Carrier i sur., 2007).

### **2.3.1.5.3. Utjecaj ciklodekstrina na permeabilnost**

Ciklodekstrini mogu povećati permeabilnost lijekova kroz biološke membrane interakcijom s lipofilnim komponentama bioloških membrana. Djeluju kao nosači lipofilnih lijekova kroz hidrofilni medij organizma do staničnih membrana, osiguravajući tako visoki kemijski potencijal lijeka na membrani, što značajno pridonosi njegovoj apsorpciji (Loftsson i Brewster, 2011).

### **2.3.1.5.4. Ciklodekstrini u sustavima s kontroliranim oslobađanjem ljekovite tvari**

Primjena ciklodekstrina osigurava preciznu kontrolu brzine oslobađanja lijeka te njenu prilagodbu terapijskim potrebama, neovisno o topljivosti lijeka u vodi. Primjenom hidrofilnih derivata moguće je postići trenutno oslobađanje u vodi teško topljivih lijekova te tako osigurati brzo djelovanje lijekova kao što su analgetici, antimigrenici i koronarni vazodilatatori. Pripremom inkluzijskog kompleksa hidrofilnog lijeka s netopljivim derivatima ciklodekstrina moguće je postići produljeno oslobađanje lijeka iz takvog sustava. U tu se svrhu najčešće koriste hidrofobni, alkilirani i acetilirani derivati  $\beta$ -ciklodekstrina te peracetilirani ciklodekstrini s alkilnim lancem srednje duljine (4-6 ugljikovih atoma). Zbog svojih svojstava ciklodekstrini imaju veliki potencijal u razvoju oralnih oblika s modificiranim oslobađanjem lijeka (Salustio i sur., 2011).

### **2.3.1.5.5. Modifikacije neugodnog okusa ili mirisa**

Stvaranjem inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima moguće je ublažiti ili u potpunosti ukloniti neugodan okus lijeka (Szejtli i Szente, 2005). Uklapanjem molekule lijeka u kompleks s ciklodekstrinima, onemogućen je izravni kontakt molekule i receptora okusnih pupoljaka jezika (Fröming, Szejtli, 1994).

### **2.3.1.6. Kompleksacija bioaktivnih spojeva komine masline s ciklodekstrinima**

S obzirom na svoju široku primjenu, ciklodekstrini se smatraju multifunkcionalnim ekscipijensima koji omogućuju modificiranje nepovoljnih biofarmaceutskih svojstava lijekova te razvoj suvremenih ljekovitih oblika. Iz tog se razloga ispituje i njihova primjena u kompleksaciji bioaktivnih spojeva u otpadu masline te se istražuju interakcije fenolnih spojeva masline s prirodnim ciklodekstrinima.

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da je  $\beta$ -ciklodekstrin sa promjerom centralne šupljine od 8 Å najpogodniji za inkluziju antioksidanasa iz maslinovog ulja (Efmooropoulou i Rodis, 2004). NMR studije su pokazale da  $\beta$ -ciklodekstrin najbolje kompleksira s molekulama bifenolnog tipa u stehiometrijskom omjeru 1:1 te smanjuje gorak okus i štiti biofenole od razgradnje tijekom skladištenja (Rescifina i sur., 2010). Tirosol također stvara stabilne inkluzijske komplekse s nativnim  $\beta$ -ciklodekstrinom i njegovim hidroksipropil- i metiliranim derivatima. Kompleksacija hidroksitirosola s  $\beta$ -ciklodekstrinom i hidroksipropil -  $\beta$ -ciklodekstrinom rezultirala je povećanom antiradikalnom učinkovitošću hidroksitirosola (Lopez-Garcia i sur., 2010). Oleuropein također formira stabilne komplekse s  $\beta$ -ciklodekstrinom, povećava njegovu topljivost u vodi za 50 % i štiti ga od oksidacije (Mourtzinis i sur., 2007). Rezultati navedenih studija jasno ukazuju na mogućnost primjene ciklodekstrina kao pogodnih nosača za transformaciju tekućih ekstrakata u visokokvalitetne čvrste formulacije.

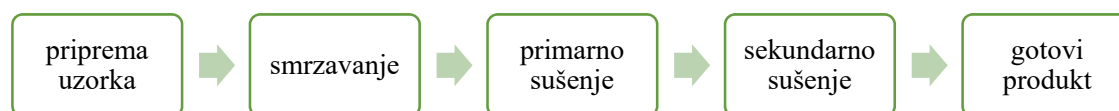
### 2.3.2. Sušenje ekstrakta komine masline

Proces sušenja je kritičan korak dobivanja biljnih ekstrakata u čvrstom obliku budući da može rezultirati pojavom različitih polimorfnih oblika tvari te utjecati na stabilnost ekstrakta. Presudnu ulogu u definiranju svojstava konačnog produkta i ukupnog troška pripreme produkta imaju tip uređaja za sušenje i uvjeti pri kojima se provodi sušenje tekućeg ekstrakta (Souza i sur., 2008). Zbog brojnih čimbenika koji utječu na proces sušenja, razvoj formulacije koja sadrži aktivne komponente iz bilja, smatra se vrlo kompleksnim.

#### 2.3.2.1. Liofilizacija

Liofilizacija je postupak sušenja materijala u zamrznutom stanju. U postupku liofilizacije je otapalo (najčešće voda) kristalizirano pri niskoj temperaturi nakon čega se ono uklanja iz materijala sublimacijom iz čvrste faze u plinovitu. Postupak je primjenjiv kod sušenja uzoraka koji sadrže veliku količinu vode, kod termolabilnih tvari i tvari podložnih hidrolizi, kod kojih se voda ne može ukloniti konvencionalnim metodama (Muzzio i Dini, 2011). Uklanjanjem vode iz uzorka mogu se poboljšati fizička i kemijska stabilnost uzorka (Abdelwahed i sur., 2006), što omogućava njegovo skladištenje pri sobnoj temperaturi i/ili kroz dulji vremenski period. Sam proces liofilizacije može biti vrlo stresan za uzorak te je stoga potrebno optimirati formulacijske i procesne parametre, kako bi se dobio liofilizat željenih svojstava. Proces liofilizacije provodi se u tri faze: smrzavanje materijala, primarno sušenje (sublimacija) i sekundarno sušenje (desorpcija) (**Slika 9.**)

## Ciklus liofilizacije



**Slika 9:** Shematski prikaz liofilizacijskog ciklusa

Smrzavanje uzorka provodi se pri atmosferskom tlaku te najčešće pri temperaturi nižoj od  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , jer temperatura smrzavanja treba biti jednaka ili niža od eutektične točke uzorka (Abdelwahed i sur., 2006). Snižavanjem temperature tekući uzorak prelazi u kruto stanje, bilo kristalno, amorfno ili kombinaciju kristalnog i amornog stanja, a voda iz uzorka prelazi u led (Abdelwahed i sur., 2006; Kasper i Friess, 2011). Tijekom hlađenja vode pri atmosferskom tlaku ne dolazi do spontanog smrzavanja pri ravnotežnoj temperaturi ledišta ( $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Zadržava se tekuće stanje vode ispod temperature ledišta, što se naziva superhlađenje. Nakon superhlađenja otopine slijedi nukleacija – nastajanje nestabilnih i kratkoživućih klastera molekula vode, a zatim kristalizacija – egzoterman proces uslijed kojeg temperatura uzorka malo poraste, te uz daljnje hlađenje dolazi do smrzavanja uzorka. Tijekom faze smrzavanja uzorka dio vode se ne zaledi te zaostaje u porama uzorka (Rey i May, 2010). Primjenjena metoda i brzina smrzavanja utječu na veličinu nastalih kristala leda, pa se tako bržim smrzavanjem formiraju manji kristali leda. Mali kristali leda imaju veću specifičnu površinu, te kasnije utječu na bržu sublimaciju. Iz tog razloga, o uspješnosti provođenja prvog koraka liofilizacije ovisi i učinkovitost faze sušenja (Abdelwahed, 2006).

Drugi korak je primarno sušenje zamrznutog uzorka koje se temelji na sublimaciji – prelasku leda u vodenu paru pri uvjetima sniženog tlaka i temperature, čime zaostaje amorfna struktura otopljene tvari visoke poroznosti. Primarno sušenje odvija se pod vakuumom, pa sublimacija započinje kada se tlak komore smanji ispod tlaka para leda u proizvodu uz dovođenje određene količine topline. Led najprije sublimira s površine uzorka, a zatim i iz dubljih dijelova pri čemu vodena para prolazi kroz uzorak do njegove površine, odvodi se do kondenzora i odlaže na zavojnice ili ploče koje



kontinuirano hlade. U kondenzatoru se vodena para kondenzira natrag u vodu (Abdelwahed i sur., 2006). Vrlo je bitno odvođenje vodene pare iz sustava jer bi u suprotnom došlo do porasta tlaka u komori. U ovoj fazi procesa iz uzorka se može ukloniti samo voda koja je zaleđena. Smrznuti produkt se suši bez znatnije promjene volumena i oblika, a na mjestima gdje su se nalazili kristali leda, nakon sušenja ostaju pore. Potrebno je dobro izbalansirati prijenos mase (sublimaciju leda) i prijenos topline (povećavanje temperature) kako ne bi došlo do neželjenih promjena smrznutog uzorka, kao što je taljenje, ekspanzija ili urušavanje (Rey i May, 2010).

Posljednji korak procesa liofilizacije je sekundarno sušenje, tj. desorpcija zaostale vode koja u prvoj fazi, tijekom smrzavanja nije prešla u led. Udio vezane vlage, koja zaostaje u produktu nakon primarnog sušenja, može iznositi 7-8 %. Sekundarno sušenje provodi se pod visokim vakuumom, pri sobnoj ili povišenim temperaturama (20-50 °C), dok se ne dobije produkt s prihvatljivim sadržajem ostatne vlage (Muzzio i Dini, 2011).

Proces liofilizacije jedan je od najskupljih i najdugotrajnijih tehnoloških postupaka, no široko je upotrebljavan u farmaceutskoj industriji. Najznačajniji nedostaci liofilizacije su dugo vrijeme trajanja procesa (par dana), visok utrošak energije, potreba za optimiranjem većeg broja parametara – temperature i tlaka tijekom svakog koraka procesa i mogućnost uklanjanja hlapljivih komponenti vakuumskom pumpom (Nireesha i sur., 2013).

Međutim, značaj i prednosti ovog procesa nadmašuju njegove nedostatke. Kao produkt liofilizacije nastaje uzorak produljene stabilnosti, čime je omogućeno dulje vrijeme skladištenja proizvoda te transport i skladištenje na sobnoj temperaturi. Procesom liofilizacije je očuvana točnost i ujednačenost sadržaja uzorka, te je moguće postići sterilan produkt. Zbog svojih pozitivnih karakteristika, liofilizacija se primjenjuje u različitim granama industrije od kemijske, biotehnološke i prehrambene, pa sve do farmaceutske industrije. Proces liofilizacije nalazi široku primjenu pri proizvodnji/oblikovanju farmaceutika kao što su cjepiva, proteini, peptidi, virusi i koloidni nosači (Abdelwahed i sur., 2006).

## 2.4. KARAKTERIZACIJA SUHOG EKSTRAKTA

### 2.4.1. Ispitivanje stabilnosti

Stabilnost gotovog farmaceutskog proizvoda je ključan čimbenik njegove kvalitete, sigurnosti i djelotvornosti (Gokani i Desai, 2012). Prema američkoj farmakopeji (USP), stabilnost je definirana kao mjera do koje proizvod zadržava karakteristike koje je imao u vrijeme proizvodnje unutar specifikacijskih granica, do isteka roka valjanosti. Osnovni cilj ispitivanja stabilnosti je mogućnost pružanja jamstva da će proizvod zadržati prihvatljivu razinu kvalitete u određenom razdoblju.

Studije ispitivanja stabilnosti se provode u svim fazama životnog ciklusa gotovog farmaceutskog proizvoda. Prema Markensu (2009) stabilitetne studije dijele se u 6 kategorija te obuhvaćaju: stres ispitivanja i ubrzane studije na djelatnim tvarima, ispitivanje stabilnosti na predformulacijskim serijama, stres ispitivanja na *scale-up* serijama; ubrzane i dugoročne studije ispitivanja stabilnosti za registracijske svrhe, *on-going* ispitivanje stabilnosti i potvrdu da će proizvod ostati unutar specifikacija kada se čuva pri deklariranim uvjetima čuvanja i *follow-up* ispitivanje stabilnosti. Studije ispitivanja stabilnosti u ranoj fazi razvoja proizvoda određuju uvjete čuvanja djelatnih tvari prije procesiranja s pomoćnim tvarima i retest period za djelatne tvari. Djelatnoj tvari određuje se profil čistoće određivanjem prisutnih onečišćenja. Zatim se provode studije prisilne razgradnje, kako bi se razjasnili potencijalni razgradni produkti, odredila njihova sigurnost i razvili analitički postupci za kvantitativno određivanje takvih kemijskih spojeva. U slijedećoj fazi razvoja lijeka, djelatnoj tvari se dodaju pomoćne tvari te se određuju njihove međusobne interakcije. Podaci dobiveni u provedenim stabilitetnim studijama utječu na formulaciju gotovog proizvoda. Formulirani gotovi proizvod se u razvoju također podvrgava studijama prisilne razgradnje, kako bi se odredili putevi razgradnje pri normalnim uvjetima čuvanja (Markens, 2009). Rezultati dobiveni provođenjem studija stabilnosti koriste se u predviđanju roka valjanosti, određivanju uvjeta skladištenja i informacija o proizvodu, te su nužni za registraciju novog lijeka. Nakon dobivanja odobrenja za puštanje novog lijeka u promet provode se daljnja ispitivanja stabilnosti kao podrška proizvodima koji se nalaze na tržištu.

Ovisno o fazi ispitivanja stabilnosti, vrsti proizvoda i dozirnom obliku, ispitivani uzorci se testiraju u unaprijed određenim intervalima na različite analitičke parametre, koji uključuju određivanje kemijskih, fizikalnih, mikrobioloških, terapijskih i toksikoloških karakteristika proizvoda

(Velagaleti, 2010). Uspješno provedene studije ispitivanja stabilnosti u konačnici osiguravaju da pacijent dobije kvalitetan i siguran lijek (Markens, 2009).

### 2.4.1.1. Ispitivanje stabilnosti biljnih lijekova i preparata

Biljni lijekovi i preparati su u svojoj cijelosti klasificirani kao aktivne farmaceutske sastavnice (engl. *active pharmaceutical ingredient*, API). Sa kemijskog i analitičkog stajališta su vrlo kompleksnog sastava jer sadrže veliki broj sastavnica, pa se za njihovu identifikaciju koristi kromatografski *fingerprint* (prevedeno s engl. otisak prsta) te se određuju koncentracije karakterističnih sastavnica-markera. Kemijski (kromatografski) *fingerprint* određenog biljnog preparata predstavlja kromatografski uzorak (obrazac) ekstrakta s karakterističnim sastavnicama koje su nositelji farmakološke aktivnosti i/ili su samo analitički biljezi.

Za određivanje kemijskog sastava biljnih preparata i lijekova primjenjuju se najčešće spektroskopske i kromatografske tehnike: plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), spektroskopija u ultraljubičastom području (UV), infracrvena spektroskopija (IR), Raman spektroskopija, NMR spektroskopija, masena spektroskopija (MS), difrakcija X-zraka. Dobiveni rezultati koncentracija "marker" komponenti i karakteristični kromatografski *fingerprint* omogućuju praćenje stabilnosti biljnih lijekova i preparata. (Kruse, 2010).

Za različite oblike lijekova provode se i dodatna ispitivanja, primjerice, za tablete i kapsule se ispituje izgled, boja, tvrdoća, raspadljivost, sastav, oksidacija masti, sadržaj vlage, mikrobiološka čistoća, gubitak sušenjem, a za tekućine i gelove se dodatno određuje i pH-vrijednost, viskoznost i sadržaj konzervansa. Za praškaste uzorke se dodatno određuju izgled, boja, miris, okus, sadržaj vlage, mikrobiološka čistoća, oksidacija masti, raspadanje pojedinih sastavnica, higroskopnost te gubitak sušenjem ([www.nsf.org](http://www.nsf.org)).

### 2.4.2. Gastrointestinalna stabilnost ekstrakta komine masline

Proučavanjem uloge bioaktivnih komponenti u ljudskom zdravlju, utvrđeno je da njihova bioiskoristivost nije uvijek dobro poznata. Kako bi bioaktivne komponente bile bioiskoristive, hranjiva komponenta se mora osloboditi iz hranjivog matriksa i apsorbirati u tankom crijevu. Budući da se tijekom probave određene komponente mogu razgraditi, vrlo je važno analizirati utječe li proces probave na stabilnost bioaktivne komponente te posljedično na njezinu

bioiskoristivost. Bioiskoristivost se može opisati kao frakcija koja se oslobađa iz hranjive matrice i postaje dostupna za apsorpciju, metabolizam i tkivnu distribuciju, a uključuje i njenu bioaktivnost. Koncept bioaktivnosti podrazumijeva događaje vezane uz način na koji se bioaktivni spoj transportira i dostiže u željeno tkivo, kako ostvaruje interakciju s biomolekulama, njegov metabolizam, biotransformaciju koju pritom prolazi i fiziološki odgovor koji uzrokuje. Kako bi se ispravno odredila potencijalna korist bioaktivne komponente, nužno je ispitati razne modifikacije kojima ona može biti podvrgnuta tijekom gastrične i intestinalne digestije te tijekom prvog prolaska kroz jetru. Iz tog razloga studije biodostupnosti danas predstavljaju ključan faktor u razvoju nutraceutika i funkcionalne hrane (Fernandez-Garcia i sur. 2009).

### 2.4.2.1. Gastrointestinalna stabilnost polifenola

Polifenoli su u biljkama, biljnim pripravcima i hrani uglavnom vezani za ugljikohidrate, organske kiseline ili su međusobno vezani. Jednostavni fenoli poput benzojeve kiseline ili benzaldehida su kovalentno vezani za polisaharide prisutne u staničnoj stijenci biljaka; antocijani i proantocijani se akumuliraju u vakuoli, dok su flavonoidi u slobodnom obliku, prisutni u citosolu i endoplazmatskom retikulumu. Za postizanje njihove bioiskoristivosti, nužna je degradacija stanične stijence i drugih staničnih odjeljaka te razgradnja ugljikohidrata.

Probava započinje u usnoj šupljini uz djelovanje enzima amilaze. Budući da se hrana u ustima zadržava kratko, otpuštanje polifenola iz matriksa hrane nije značajno. Međutim, usitnjavanjem hrane u ustima, dolazi do smanjenja veličine čestica hrane i povećanja njihove površine čime je olakšan pristup enzimima u narednim koracima probave. Većina polifenola se otpušta tijekom gastrične faze probave. Zajedničkim djelovanjem pepsina, niske pH-vrijednosti i peristaltičkih pokreta nastaju fino mljevene čestice malog promjera (500  $\mu\text{m}$ ). Niska pH-vrijednost također pogoduje prisutnosti polifenola u nedisociranom obliku te oni tada, zbog smanjenja ionskih interakcija, difundiraju iz matriksa u vodenu fazu.

U tankom crijevu dolazi do postepenog povišenja pH-vrijednosti s otprilike 2-4 na 7. Time se aktiviraju enzimi koje izlučuju gušterača i žuč (fosfolipaze, sterol esteraze, amilaze, karboksipeptidaze, tripsinogen, kimotripsin, lipaze i žučne soli). Lipaze i žučne soli su značajne za probavu nepolarnih spojeva kao što su lipidi, nepolarni mikronutrijenti i karotenoidi, što rezultira tvorbom vodotopivih miješanih micela. Antocijani se porastom pH-vrijednosti u tankom crijevu raspadaju te samo 1 % frakcije prelazi u sistemsku cirkulaciju. Polifenoli vezani za ugljikohidrate

apsorbiraju se također u u tankom crijevu, uz predhodno odvajanje od šećerne jedinice. Reakcija se odvija katalitičkim djelovanjem enzima laktaza-florizin hidrolaze prisutnim u sluznici tankoga crijeva. Nakon cijepanja šećera, aglikoni polifenola prenose se u enterocite tankog (ili debelog) crijeva gdje djelovanjem esteraza dolazi do cijepanja estera fenolnih kiselina čime se njihova bioiskoristivost povećava i do 100 puta. Međutim, kapacitet enzima je poprilično nizak, pa većinu estera polifenola cijepaju enzimi mikroflora u debelom crijevu. U debelom crijevu posredstvom bakterija metaboliziraju se polifenoli i konjugati I i II faze metabolizma izlučeni enterohepatičkom recirkulacijom. Najčešće reakcije su deglikozilacija, dehidroksilacija, demetilacija, dekonjugacija, epimerizacija, cijepanje prstena, hidroliza ili skraćivanje postranog lanca. Polarni polifenoli se izlučuju većinom renalno, dok je nepolarnim polifenolima bilijarna ekskrecija glavni put izlučivanja. Postotak polifenola i njihovih konjugata izlučenih u urinu jako varira. Budući da se u urinu može detektirati samo određen broj metabolita, moguće je da je bioiskoristivost polifenola veća od zasada procijenjene (Bohn, 2014).

### 2.4.2.2. Bioiskoristivost polifenola masline

Bogati polifenolni sastav masline dobro je poznat, te su provedena istraživanja utjecaja probavnih enzima na njene najznačajnije fenolne spojeve. Kao što je u prijašnjim poglavljima detaljnije opisano, najznačajniji polifenoli masline su fenolni alkoholi (tirosol, hidroksitirosol, hidroksitirosol acetat), kompleksni fenoli (oleuropein, ligstrozid) i njihovi aglikoni. Provedenim studijama pokazano je da u uvjetima sličnim onima u želucu dolazi do neenzimatske hidrolize konjugiranih formi polifenola masline. Enzimatskim djelovanjem pepsina također dolazi do raspadanja konjugata. Kao rezultat toga povećava se količina tirosola (3,75 puta) i hidroksitirosola (4,25 puta) u želucu. Time je povećana njihova dostupnost za apsorpciju u jejunumu i ileumu (Corona i sur., 2006). Hidroksitirosol i tirosol su stabilni u kiselim uvjetima, međutim kada su izloženi uvjetima prisutnim u tankom crijevu, u velikoj se mjeri raspadaju. Neraspadnuti hidroksitirosol i tirosol procesom pasivne difuzije prelaze u enterocite i dalje u krvotok (Soler i sur., 2010). Oleuropein se ne raspada u kiselim uvjetima želuca te se ne apsorbira u crijevu. Najvjerojatnije podliježe brzom razgradnji u debelom crijevu pod utjecajem enzima crijevne mikroflora. Jedan od tri identificirana metabolita oleuropeina je hidroksitirosol. Hidroksitirosol nastao razgradnjom oleuropeina može se apsorbirati u debelom crijevu čime se povećava njegova biodostupnost i omogućava postizanje većeg biološkog učinka *in vivo* (Corona i sur., 2006).

### 2.4.2.3. Metode određivanja bioiskoristivosti i biodostupnosti

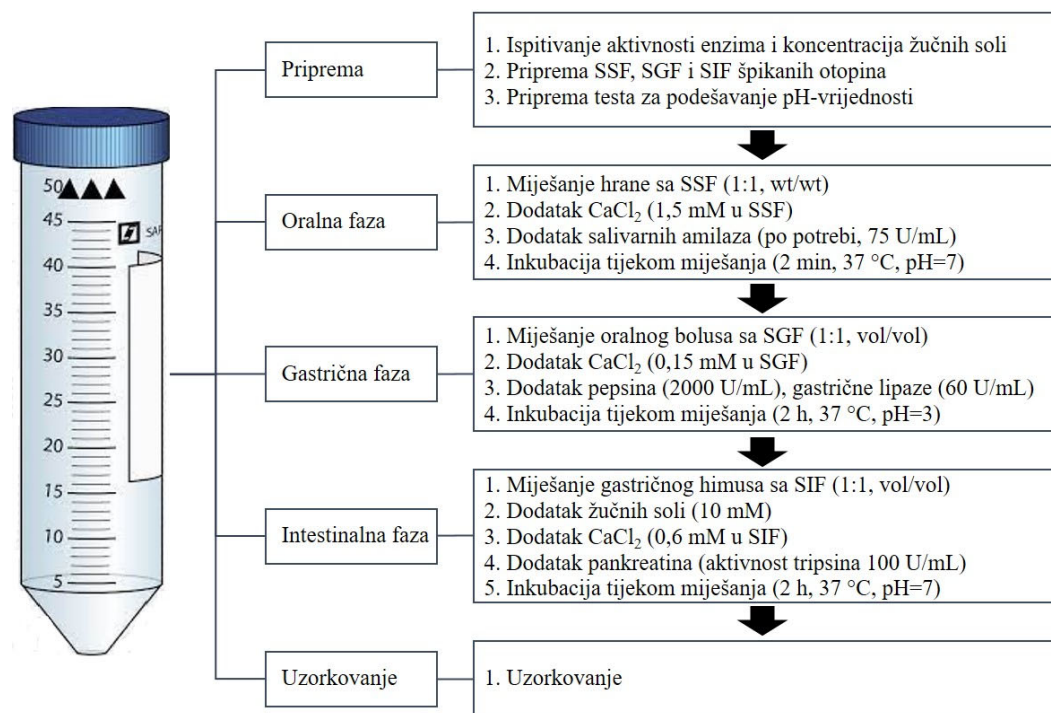
Za određivanje bioiskoristivosti (frakcija dostupna za apsorpciju u probavnom traktu) i biodostupnosti (metabolički iskoristiva frakcija) mogu se koristiti različite *in vitro* metode, kao što su metoda topljivosti, metoda dijalizabilnosti, gastrointestinalni modeli i Caco-2 stanični modeli (Etcheverry i sur., 2012). Sve navedene metode započinju simulacijom probave hrane, budući da je ona neophodna za mjerenje bioiskoristivosti aktivne komponente. *In vitro* digestija se provodi u dva (ponekad tri) koraka koji uključuju gastričnu i intestinalnu digestiju. U procesu gastrične digestije, ključan je enzim pepsin, koji se dodaje prije zakiseljavanja uzoraka na pH=2 (za oponašanje gastričnog pH odrasle osobe) ili pH=4 (za oponašanje gastrične digestije djeteta). Zakiseljavanje uzoraka na pH-vrijednostima 2 ili 4 je nužan korak jer kod pH >5 pepsin denaturira i gubi svoju aktivnost. U slijedećem se koraku uzorci neutraliziraju do pH 5,5-6. Nakon toga se pH-vrijednost podešava na 6,5-7, te se dodaju enzimi intestinalne faze digestije (pankreatin) i žučne soli (emulgatori). Treći korak digestije je samo ponekad uključen te prethodi gastričnoj fazi i uključuje digestiju posredstvom  $\alpha$ -amilaze. Na taj se način enzimatski cijepaju glikozidne veze škroba na amilozu i amilopektin. Jednom kad je hrana probavljena, pristupa se mjerenju bioiskoristivosti. U ovom je radu bioiskoristivost polifenolnih komponenti ekstrakta komine masline određivana *in vitro* gastrointestinalnim modelim.

#### 2.4.2.3.1. Gastrointestinalni modeli

*In vitro* metode simulacije probave uključuju statičke i dinamičke modele kojima se simulira probava hrane i farmaceutika u gornjem dijelu gastro intestinalnog trakta (usta, želudac, tanko crijevo). Dinamički *in vitro* modeli simuliraju dinamičke procese probave, mehaničke sile te dinamiku fluida tijekom procesa (Li i sur., 2020). Zbog svoje kompleksnosti te visoke cijene postavljanja i održavanja nisu dostupni većini istraživača. Za razliku od dinamičkih, statički modeli su jednostavniji, rašireniji i koriste konstantan omjer hrane, enzima i elektrolita te konstantnu pH-vrijednost za svaku fazu digestije (Brodkorb i sur., 2019). Glavni nedostatak statičkih modela simulacije probave je preveliko pojednostavljivanje procesa probave. Također, usporedbom različitih statičkih modela primjećene su značajne varijacije parametara digestije kao što su pH-vrijednost, trajanje svakog koraka digestije, količina i tip korištenih probavnih enzima, brzina miješanja/mučkanja i količina uzorka hrane. Varijabilnost navedenih parametara može dovesti do velikih razlika u istraživanjima i tako utjecati na usporedbu rezultata i zaključke istraživanja (Li i

sur., 2020). Zbog velikog broja protokola koji se razlikuju u eksperimentalnim uvjetima postignut je internacionalni konsenzus na temelju kojega su određeni parametri za statičku *in vitro* digestiju hrane u odraslih osoba, a metoda je prozvana INFOGEST (Brodkorb i sur., 2019).

INFOGEST metoda shematski je prikazana na **Slici 10** te obuhvaća pripremu, digestiju i obradu uzorka s naknadnom analizom. Tijekom pripreme eksperimentalno se ispituje aktivnost svih probavnih enzima i koncentracija žučnih soli korištenjem preporučenih standardiziranih testova. Hrana se zatim tijekom digestije izlaže oralnoj, gastričnoj i intestinalnoj fazi probave. U statičkoj *in vitro* digestiji eksperimentalni uvjeti su konstantni za svaku fazu probave. Posljednji korak INFOGEST metode uključuje uzorkovanje, obradu uzorka, skladištenje i naknadnu analizu uzorka (Brodkorb i sur., 2019).



**Slika 10:** Statička *in vitro* digestija prema INFOGEST metodi

### **3. CILJ RADA**



Preradom maslina nastaje otpad koji se najčešće iskorištava kao biomasa, gnojivo, aditiv u stočnoj hrani ili u svrhu dobivanja energije. Iako je postojeće iskorištavanje takvog otpada ekonomski isplativo, trenutno se iskorištava njegov vrlo mali dio. Komina masline mogla bi se dodatno iskoristiti izolacijom bioaktivnih komponenti prije spaljivanja u svrhu dobivanja energije.

Glavni cilj ovog istraživanja je razvoj zelenog postupka dobivanja suhog ekstrakta komine masline bogatog hidroksitirosolom, tirosolom i oleuropeinom primjenom kombinacije ultrazvučne ekstrakcije i uklapanja u ciklodekstrine te provedba funkcionalne karakterizacije kako bi se utvrdio potencijal daljnje primjene.

Istraživanje je podijeljeno u tri faze koje obuhvaćaju optimizaciju ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine; razvoj postupka formulacije stabilnog suhog ekstrakta te karakterizaciju dobivenog ekstrakta.

Jasno su razrađeni ciljevi za svaku fazu istraživanja. U prvoj je fazi cilj bio po prvi puta istražiti mogućnost primjene ultrazvuka u kombinaciji s procesima uklapanja za razvoj održivog procesa ekstrakcije polifenola iz komine masline. U razvoju navedenog procesa istražena je mogućnost primjene koncepata zelene kemije korištenjem netoksičnih otapala, smanjenjem količine otapala, skraćivanjem vremena ekstrakcije kako bi se smanjio broj koraka potrebnih za optimizaciju procesa. Tijekom faze formulacije stabilnog suhog ekstrakta, cilj je bio istražiti utjecaj metode sušenja te količine i vrste ekscipijensa na tehnološke karakteristike i kemijski sastav krutog ekstrakta komine. Glavni cilj posljednje faze bila je funkcionalna karakterizacija dobivenih suhih ekstrakata što je uključivalo određivanje gastrointestinalne stabilnosti i intestinalne raspoloživosti polifenola te njihove antioksidacijske aktivnosti, a s obzirom na veličinu čestica ekstrakta; vrstu i količinu ekscipijensa te kemijski sastav.

Budući da očekivani rezultati istraživanja imaju velik potencijal praktične primjene u različitim industrijskim granama, ono može doprinijeti pronalasku inovativnih rješenja za ponovno korištenje otpada masline i njegovu revalorizaciju što bi rezultiralo ekonomskom i ekološkom koristi u budućnosti.

## **4. MATERIJALI I METODE**

## 4.1. MATERIJALI

### 4.1.1. Kemikalije i reagensi

- ∞ 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamid, dihidroklorid (AAPH) čistoće 97 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) čistoće 98 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ); HPLC stupnja čistoće,  $\geq 99,93$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Amonijev acetat ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ ) p.a., Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ∞ Amonijev karbonat ( $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ) p.a., Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ∞ Bakrov(II)sulfat pentahidrat, p.a., Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ∞ Borna kiselina čistoće  $\geq 99,8$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Butil-hidroksi anisol (BHA) čistoće  $\geq 98,5$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞  $\beta$ -karoten čistoće 99,5 % Pharmaceutical Secondary Standard, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Ciklodekstrini:
- ∞  $\beta$ -ciklodekstrin ( $\beta$ -CD) čistoće  $\geq 97$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Nasumično metilirani derivat  $\beta$ -ciklodekstrina (RAMEB-CD) čistoće 98,7 % Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Hidroksipropilirani derivat  $\beta$ -ciklodekstrina (HP- $\beta$ -CD) čistoće 99,5 % Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞  $\gamma$ -ciklodekstrin ( $\gamma$ -CD) čistoće  $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) čistoće 98,5 % Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Etanol, p.a., čistoća 96 %, Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska

- ∞ Fluorescein (3',6'-dihidroksispiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-ksanten]-3-one) čistoće 95 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Folin Ciocalteu reagens koncentracije 2 mol/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Fosfatno puferirani salin (PBS), pH= 7,2, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Galna kiselina čistoće  $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ GelRed bojilo za elektroforezu, Biotium, Fremont, SAD
- ∞ Glacijalna octena kiselina, p.a., čistoća 99,5 %, Alkaloid Skopje
- ∞ Hidroksitirozol, standard čistoće  $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Humani LDL (u PBS, pH=7,4 s 0.01 % EDTA), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Kalcijev klorid čistoće  $\geq 95$  %, Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ∞ Kalcijev klorid dihidrat ( $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ ) čistoće  $\geq 99$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Kalijev hidrogenfosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) čistoće  $\geq 98$  % Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ∞ Kalijev klorid (KCl), čistoće  $\geq 99,5$  %, Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ∞ Klorovodična kiselina p.a., Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ∞ Kloroform, za analizu, stabiliziran etanolom čistoće  $\geq 99,95$  %, Carlo Erba Reagents GmbH, Emmendingen, Njemačka
- ∞ Linolna kiselina prikladna za stanične kulture čistoće  $\geq 99$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Magnezijev klorid ( $\text{MgCl}_2$ ) čistoće  $\geq 99$  %, Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ∞ Malondialdehid (MDA) tetrabutilamonijeva sol čistoće  $\geq 96$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ); HPLC stupnja čistoće  $\geq 99,9$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) p.a., Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska

- ∞ Na-dodecil sulfat (SDS) čistoće  $\geq 99$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Natrijev hidrogen karbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) p.a., Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka
- ∞ Natrijev hidroksid čistoće  $\geq 98$  %, Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Natrijev karbonat čistoće  $\geq 99,5$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ) čistoće  $\geq 99,5$  %, Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ∞ N-butanol čistoće  $\geq 99,9$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Octena kiselina čistoće  $\geq 99$  %, Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ∞ Oleuropein, standard čistoće  $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Ortofosforna kiselina, min. 85 %, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- ∞ Pankreatin (iz svinjskog pankreasa), 4×USP, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- ∞ pBR322 plazmid DNA iz Escherichia coli RRI, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Pepsin (iz svinjske gastične mukoze),  $\geq 500$  U mg-1 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- ∞ Petroleter, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- ∞ Sojin lecitin čistoće  $\geq 99$  %, Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- ∞ 2-tiobarbiturna kiselina čistoće  $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Tirosol((2-(4-hidroksifenil) etanol), standard čistoće  $>99.5$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Trikloroctena kiselina čistoće  $\geq 99$  %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Trolox, ( $\pm$ )-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, stupanj čistoće 97 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Tween 40, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ∞ Žučne soli, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

#### 4.1.2. Puferi i otopine

- ∞ Acetatni pufer ( $c = 0,05 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ ): 3,854 g amonijevog acetata preneseno je u volumetrijsku tikvicu od 1000 mL i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake. pH-vrijednost otopine podešena je na 5,0 s glacijalnom octenom kiselinom.
- ∞ Britton puffer ( $c = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 6,5$ ): Odvagano je 2,48 g borne kiseline u tikvicu od 1000 mL, zatim je dodano 2,3 mL ledene octene kiseline i 2,73 mL fosfatne kiseline ( $w = 85 \%$ ). pH-vrijednost je podešena s 0,2 M NaOH.
- ∞ Otopine soli za pripremu simulirane salivarne tekućine (SSF), simulirane gastrične tekućine (SGF) i simulirane intestinalne tekućine (SIF)
  - $\text{NaHCO}_3$  ( $c = 1 \text{ M}$ ): 8,4 g čvrstog  $\text{NaHCO}_3$  preneseno je u preciznu odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.
  - $\text{NaCl}$  ( $c = 2 \text{ M}$ ): 5,85 g čvrstog  $\text{NaCl}$  preneseno je u preciznu odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.
  - $\text{KCl}$  ( $c = 0,5 \text{ M}$ ): 1,865 g čvrstog  $\text{KCl}$  preneseno je u preciznu odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.
  - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $c = 0,5 \text{ M}$ ): 1,36 g čvrstog  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  preneseno je u preciznu odmjernu tikvicu od 20 mL nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.
  - $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  ( $c = 0,3 \text{ M}$ ): 0,882 g čvrstog  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  preneseno je u preciznu odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.
  - $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$  ( $c = 0,15 \text{ M}$ ): 0,61 g čvrstog  $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$  preneseno je u preciznu odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.
  - $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  ( $c = 0,5 \text{ M}$ ): 0,9609 g čvrstog  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  preneseno je u preciznu odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.
  - Priprema HCl ( $c = 6 \text{ M}$ ): 9,9368 mL 37 % HCl-a razrijeđeno je ultračistom vodom do 20 mL u preciznoj odmjernoj tikvici te nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.
  - Priprema NaOH ( $c = 1 \text{ M}$ ): 4,0 g čvrstog NaOH preneseno je u preciznu odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjeno ultračistom vodom do oznake.

Priprema 400 mL (x1,25 koncentrata) simulirane tekućine (SSF), simulirane gastrične tekućine (SGF) i simulirane intestinalne tekućine (SIF) prikazana je u **Tablici 3**.

**Tablica 3:** Priprema 1,25 x koncentrata SSF, SGF i SIF

Stock otopina	SSF pH = 7	SGF pH = 3	SIF pH = 7
	V, mL	V, mL	V, mL
KCl	15,100	6,900	6,800
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,700	0,900	0,800
NaHCO <sub>3</sub>	6,800	12,500	42,500
NaCl	-	11,800	9,600
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,500	0,400	1,100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,060	0,500	-
HCl (6 M)	0,090	1,300	0,700
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	0,025	0,005	0,040

Navedene količine temeljnih standardnih otopina soli dodane su u odmjernu tikvicu od 500 mL. Dobivene otopine su homogenizirane te im je podešena pH-vrijednost pomoću lužine (1 M NaOH) ili kiseline (1 M HCl). Odmjerne tikvice s otopinama su zatim nadopunjene ultračistom vodom do oznake. Pripremljene otopine prenesene su u Falcon kivete od 50 mL te su do provođenja pokusa pohranjene na temperaturi od -20 °C.

#### 4.1.3. Instrumenti i uređaji

- ∞ Analitička vaga AB265S, Mettler Toledo, Ohio, SAD
- ∞ Čitač mikrotitarskih pločica, Multimode Plate Reader – Victor X3, Perkin Elmer, Velika Britanija
- ∞ HPLC sustav Agilent 1200, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, SAD
- ∞ Kolorimetar CM-3500d, Konica Minolta, Japan
- ∞ Laboratorijska centrifuga Centric 322A, Tehnica, Železniki, Slovenija
- ∞ Laboratorijska peć, Over industrijska elektronika, Sv. Nedjelja, Hrvatska
- ∞ Liofilizator Alpha 1-4 LOC-1, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka
- ∞ Mixer Uzusio Harmony VTX – 3000L, LMS CO., Ltd., Tokyo, Japan
- ∞ Metalna sita, Prüfsieb DIN 4188, Haver & Boecker, Oelde, Njemačka

- ∞ Multikanalna pipeta Rainin Crux, Mettler Toledo, Ohio, SAD
- ∞ pH metar, SM Titrino 702, Metrohm Swiss Made, Herisau, Švicarska
- ∞ Polipropilenska ploča ravnog dna s 96 jažica kapaciteta 330 µL, Thermo Scientific, 130188 BioLite, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, SAD
- ∞ Rancimat 743, Metrohm, Herisau, Švicarska
- ∞ Rotacijski uparivač, Rotavapor R-200, Buchi, Švicarska
- ∞ Soxhlet aparatura, Behr Labortechnik, Düsseldorf, Njemačka
- ∞ Sustav za određivanje raspodjele veličine čestica Malvern Masterseizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija
- ∞ Sustav za pročišćavanje vode Millipore – MilliQ, Merck, New Jersey, SAD
- ∞ Termostatirana kupelj s mućkalicom, tip 1086, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Njemačka
- ∞ Ultrazvučni processor Q Sonica, Q Sonica Sonicators, Newtown, Connecticut, SAD
- ∞ Uređaj za kvantificiranje DNA bendova Image Quant LAS 500 –GE, Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA
- ∞ UV/VIS spektrometar UV4-100, ATI Unicam, Velika Britanija
- ∞ Vakuumski sušionik, Kambič d.o.o., Semič, Slovenija
- ∞ Vodena kupelj GFL1086, Helago, Češka
- ∞ Vortex miješalica, tip VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan

### 4.1.4. Pribor

- ∞ Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 kolona dimenzije 250x4,6 mm i veličine čestica 5 µm
- ∞ Eppendorf epruvete od 2 mL za uzorke
- ∞ Erlenmeyerove tikvice
- ∞ Falcon epruvete, 50 mL
- ∞ Filteri od celuloze-acetata; promjer pora: 0,45 µm (Whatman)
- ∞ Filteri za pripremu uzoraka (LLG-PTFE syringe filter, promjer pora: 0,45 µm)
- ∞ Odmjerna tikvica, 100 mL
- ∞ Petrijeve zdjelice
- ∞ Šprice (6 mL)
- ∞ Tikvice okruglog dna



- ∞ Viale 1,5 mL (LLG Labware)

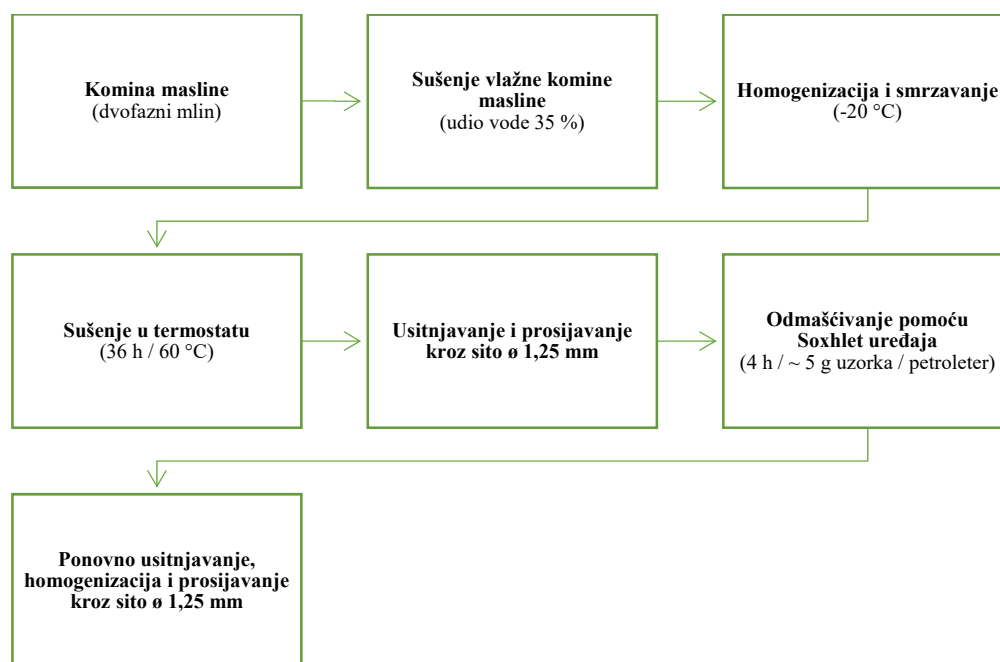
#### 4.1.5. Programski paketi

- ∞ GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, SAD
- ∞ SpectraMagic NX software, Konica Minolta

#### 4.1.6. Uzorci

##### 4.1.6.1. Biljni materijal - komina masline

U ovom radu je kao uzorak korištena mješavina komina masline prikupljena u jesen 2017. godine iz više hrvatskih uljara. Komina masline je dobivena kao nusprodukt proizvodnje maslinovog ulja dvofaznim kontinuiranim centrifugacijskim procesom. Primjenom ovog sustava prerade maslina, pasta zdrobljenih maslina razdvojena je u dvije faze: maslinovo ulje i vlažnu kominu masline. Na **Slici 11** shematski je prikazana priprema komine masline za buduće analize.



**Slika 11:** Shematski prikaz pripreme komine masline

S obzirom da je vlažna komina masline smjesa čvrste komine i otpadne vode, udio vode u svježoj komini iznosio je približno 85 %. Vlažna komina masline je sakupljana neposredno nakon procesa mljevenja, skladištena u hladno i dostavljena u laboratorij. Zatim je sušena u vakuumskom

sušioniku kako bi se udio vode smanjio na približno 35 %. Dobiveni produkt (komina) je homogeniziran, podijeljen u alikvote i pakiran u obliku tankih ploča prosječne mase oko 100 g u PVC spremnike. Tako pakirana komina brzo je smrznuta i pohranjena na temperaturu od -20 °C. Na taj je način onemogućena razgradnja njenih aktivnih sastavnica. Neposredno prije provođenja analiza, komina je prebačena u velike Petrijeve zdjelice i sušena na 60 °C tijekom 36 sati, kako bi se uklonila preostala voda. Konačni udio vode iznosio je 20 %. Time je prevenirana moguća mikrobiološka i enzimatska razgradnja bioaktivnih komponenti. Dobivena osušena masa usitnjena je u tarioniku i pomoću mlina, nakon čega je prosijana kroz sito veličine pora 1,25 mm. Uklonjeni su ostaci koštica, a uzorak je homogeniziran. U tako dobivenom uzorku bilo je potrebno ukloniti i preostalu uljnu komponentu koja bi ometala daljnje analize. Komina masline odmašćivana je metodom po Soxhletu u trajanju od 4 h za 5 g uzorka, a kao ekstrakcijsko otapalo korišten je petroleter. Odmašćena komina ponovno je usitnjena, homogenizirana i prosijana kroz sito poroziteta 1,25 mm. U konačnici je dobiven sitan, sivkasto-smeđi prah odmašćene komine masline korišten u daljnjem istraživanju.

### 4.2. METODE

#### 4.2.1. Plan provođenja istraživanja

Istraživanje je podijeljeno na tri faze, a tijek istraživanja s primjenjenim metodama shematski je prikazan na **Slici 12**.

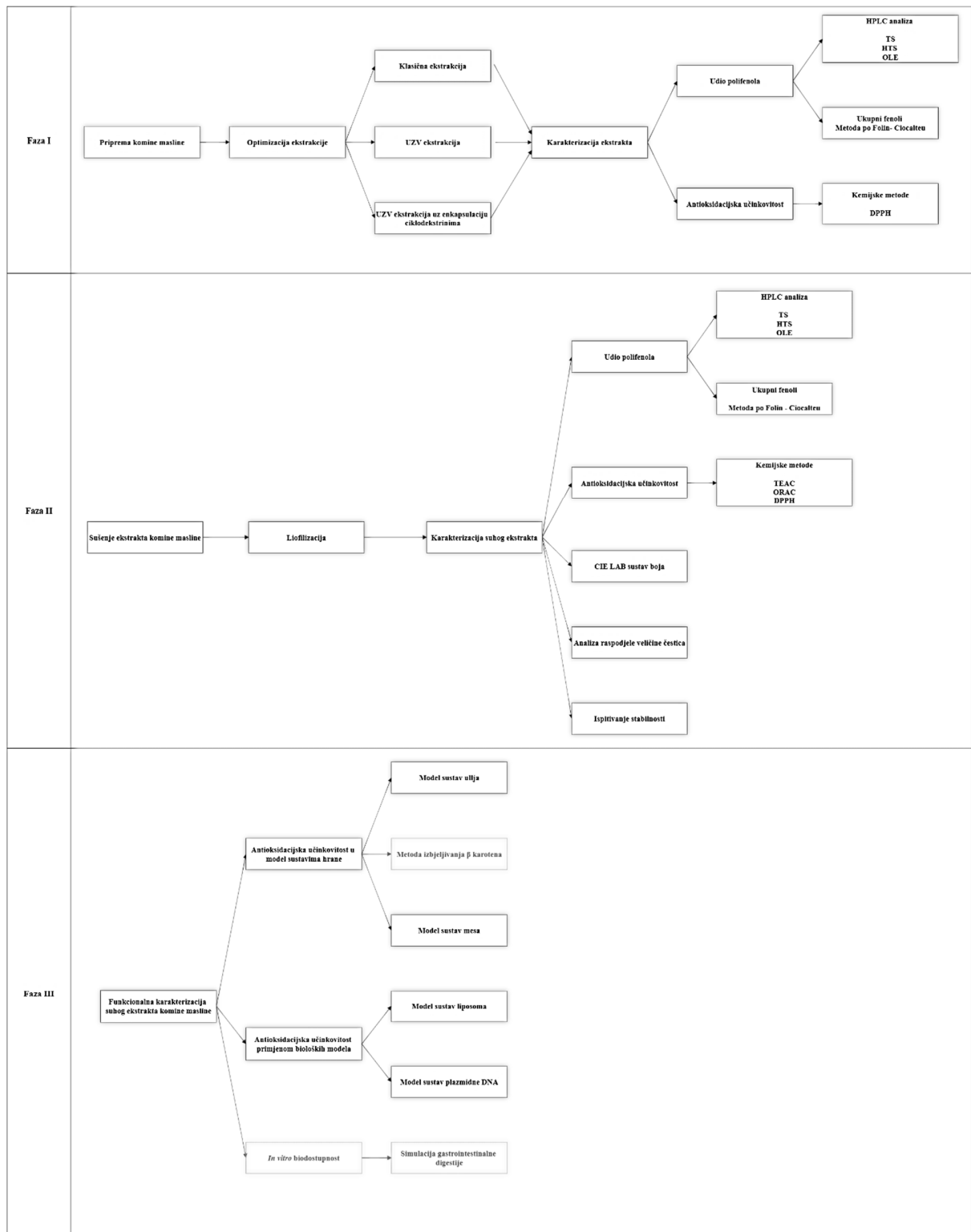
Glavni cilj prve faze istraživanja bio je razviti novi, učinkovit i ekološki prihvatljiv postupak ekstrakcije polifenolnih komponenti (primarno hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina) iz sirove komine masline. Otapala korištena za ekstrakciju bila su: etanol, voda i njihove smjese. Postupak ekstrakcije proveden je klasičnom ekstrakcijom, inovativnom tehnologijom ultrazvučne ekstrakcije i ultrazvučnom ekstrakcijom uz dodatak ciklodekstrina. Kao ciljni parametri karakterizacije dobivenih ekstrakata određeni su udio ukupnih fenola i flavonoida (metoda po Folin-Ciocalteu), udio hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina (HPLC analiza) te antioksidacijski potencijal (DPPH metoda).

U drugom dijelu istraživanja ispitana je primjenjivost postupka liofilizacije te utjecaj korištenih ciklodekstrina na tehnološke i kemijske karakteristike suhog ekstrakta. Udio polifenola u dobivenom suhom ekstraktu određen je spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu

(ukupni polifenoli), dok su koncentracije tirosola, hidroksitirosila i oleuropeina određivane tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Ukupna antioksidacijska učinkovitost određena je kombinacijom više kemijskih testova za određivanje redukcijske sposobnosti i sposobnosti hvatanja radikala: DPPH metodom, ORAC metodom i TEAC metodom. Raspodjela veličine čestica u dobivenom suhom ekstraktu komine masline određena je laserskom difrakcijom, a boja je određena na kolorimetru analizom CIE LAB sustava boja. Provedeno je ubrzano ispitivanje stabilnosti suhih ekstrakata komine masline. Na temelju dobivenih podataka odabran je suhi produkt najboljih fizikalno-kemijskih karakteristika koji se koristio u trećoj fazi istraživanja.

U trećoj, završnoj fazi istraživanja provedena je funkcionalna karakterizacija suhog ekstrakta komine masline. Najvažniji ciljevi ove faze bili su istražiti po prvi puta bioraspoloživost hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina, odrediti antioksidacijsku učinkovitost ekstrakta komine masline u odgovarajućim model sustavima hrane te istražiti biološku antioksidacijsku učinkovitost primjenom naprednih bioloških modela. Aktivnost u model sustavima hrane određena je korištenjem model sustava ulja,  $\beta$ -karoten-linoleat modela i mesnog model sustava. Za određivanje biološke antioksidacijske učinkovitosti odabrani su neki od najčešće korištenih bioloških modela - model sustav liposoma i model sustav plazmidne DNA. Primjenom gastrointestinalnog *in vitro* modela određena je bioraspoloživost glavnih aktivnih polifenolnih sastavnica.

## 4. MATERIJALI I METODE



Slika 12: Shematski prikaz istraživanja

## 4.2.2. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz komine masline

### 4.2.2.1. Klasična ekstrakcija

#### 4.2.2.1.1. Optimizacija klasične ekstrakcije

U svrhu optimizacije procesa klasične ekstrakcije, u ovom je istraživanju korišten prah odmašćene komine masline. Zavisne varijable optimizacije bile su: vrsta otapala (različite koncentracije etanola), temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije i pH-vrijednost otapala.

Eksperimenti optimizacije procesa ekstrakcije provedeni su prema uvjetima navedenim u **Tablici 4**.

**Tablica 4:** Varijacije parametara klasične ekstrakcije

Parametar ekstrakcije	Varijacija
Vrsta otapala (koncentracija EtOH)	0 % EtOH
	60 % EtOH
	80 % EtOH
	96 % EtOH
Trajanje ekstrakcije	30 min
	60 min
	120 min
	300 min
	24 h
Temperatura ekstrakcije	20 °C
	25 °C
	50 °C
	70 °C
	90 °C
pH-vrijednost otapala	2
	6
	8,5
	10,3

Proces optimiranja klasične ekstrakcije započeo je vaganjem praa odmašćene komine u Erlenmeyerovu tikvicu, u koju je zatim dodano 200 mL ekstrakcijskog sredstva (korištene su različite koncentracije etanola), a tikvica je pokrivena. Reakcijska smjesa inkubirana je u vodenoj kupelji pri različitim temperaturama kroz različite vremenske intervale uz konstantno miješanje na 110 rpm. Dobiveni ekstrakti su zatim filtrirani kroz celulozni filter papir i korišteni u daljnjim analizama.

### 4.2.2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

#### 4.2.2.2.1. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provedena je pomoću sustava s direktno uronjenom sondom. Primjenjeni ultrazvučni procesor sastoji se od transduktora za pretvaranje električnih signala u ultrazvučne valove i sonde različitih promjera. U ovom je istraživanju korišten model Q Sonica, proizvođač Q Sonica Sonicators, Newtown, Connecticut, SAD. Značajke korištenog procesora su: 400 W maksimalne izlazne snage, 100-120 V strujnog napona, 50-60 Hz, frekvencija ultrazvuka od 20 kHz. Uzorci su tretirani ultrazvučnim sondama promjera 12,5 mm i 25 mm.

Kako bi bila razvijena učinkovita metoda ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ispitivan je optimalni sastav otapala, omjer otapala i materijala koji se ekstrahira te su optimirani procesni parametri provođenja ultrazvučne ekstrakcije.

Analize kojima je optimiran sastav otapala i omjer otapala i materijala koji se ekstrahira provedene su pri konstantnim uvjetima ultrazvučne ekstrakcije. Primjenjen je pulsni način rada, a snaga amplitude ultrazvučnih valova iznosila je 50 %. Korištena je sonda promjera 25 mm, a ekstrakcija je trajala 3 min. Varirani parametri u cilju optimizacije sastava otapala te omjera otapala i materijala koji se ekstrahira prikazani su u **Tablici 5**.

**Tablica 5:** Varijacije otapala i omjera otapala i materijala koji se ekstrahira

Parametar ekstrakcije	Varijacija
Vrsta otapala ( % EtOH)	0 % EtOH
	20 % EtOH
	40 % EtOH
	60 % EtOH
	85 % EtOH
	96 % EtOH
Omjer otapala i materijala koji se ekstrahira (SSR, <i>solvent to solid ratio</i> ) (ml:g)	20
	30
	40
	50
	60

Tijekom optimizacije procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije ispitivano je optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije, promjer sonde, snaga amplitude ultrazvučnih valova te korištenje pulsnog ili kontinuiranog načina rada. U **Tablici 6** prikazani su procesni parametri ultrazvučne ekstrakcije, provedeni u svrhu optimizacije.

**Tablica 6:** Optimizacija procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije

Parametar ekstrakcije	Varijacija
Trajanje ekstrakcije	3 min
	6 min
	9 min
	20 min
	25 min
Promjer sonde	12,5 mm
	25 mm
Snaga amplitude	50 %
	75 %
	100 %

Tijek provođenja analiza kod svih ispitanih varijacija ultrazvučne ekstrakcije započeo je vaganjem osušene komine masline u laboratorijsku čašu od 250 mL s točnošću  $\pm 0,01$  g. Neposredno prije izlaganja ultrazvuku uzorku je dodano 200 mL otapala. Tijekom trajanja procesa ekstrakcije, ultrazvučna sonda bila je uronjena u otopinu 1 cm, a posuda s uzorkom bila je prekrivena aluminijskom folijom kako bi se prevenirala moguća svjetlom uzrokovana razgradnja pojedinih komponenti. Svakih 30 s očitavana je temperatura uzorka. Sve analize provedene su u duplikatu.

### **4.2.2.3. Ekstrakcija potpomognuta s ultrazvukom uz uklapanje u ciklodekstrine**

#### **4.2.2.3.1. Optimizacija postupka ultrazvučne ekstrakcije**

U svrhu daljnjeg optimiranja procesa ekstrakcije, a s ciljem povećanja udjela polifenola u dobivenim ekstraktima, u ekstrakcijsko sredstvo su dodavane i različite koncentracije ciklodekstrina. S obzirom na dostupne literaturne podatke o afinitetu ciklodekstrina prema polifenolima masline, primjenjivani su derivati  $\beta$ - i  $\gamma$ - ciklodekstrina, kao što su prirodni  $\beta$ -CD, hidroksi propil  $\beta$ -CD, nasumično metilirani  $\beta$ -CD i prirodni  $\gamma$ -CD. Sastav i uvjeti pripreme uzoraka podvrgnutih optimiranoj ultrazvučnoj ekstrakciji prikazani su u **Tablici 7**.

Kod uzoraka s dodatkom ciklodekstrina, pojedini ciklodekstrin je dodavan ekstrakcijskom sredstvu prije ekstrakcije. Ultrazvučna ekstrakcija je zatim provedena istim postupkom kao i za nativni uzorak (N), primjenjujući prethodno određene optimalne uvjete.



**Tablica 7:** Priprema ekstrakta komine masline bez te uz dodatak različitih vrsta i količina ekscipijensa

Oznaka uzorka	Vrsta ciklodekstrina	Volumen ekstrakcijskog sredstva (mL)	Odvaga komine (g)	Masena koncentracija komine (gL <sup>-1</sup> )	Odvaga ciklodekstrina (g)	Masena koncentracija ciklodekstrina (gL <sup>-1</sup> )
N	-	200	4	20	-	-
β	β				1,6	8
HPB	Hidroksi propil β				1,6	8
HPB*	Hidroksi propil β				3,2	16
RAMEB	Nasumično metilirani β				1,6	8
RAMEB*	Nasumično metilirani β				3,2	16
γ	γ				1,6	8
γ*	γ				3,2	16

### 4.2.3. Sušenje ekstrakta komine masline

#### 4.2.3.1. Sušenje smrzavanjem – liofilizacija

Upareni nativni ekstrakt komine masline te ekstrakti komine masline uklopljeni u ciklodekstrine su zamrznuti te podvrgnuti liofilizaciji. Liofilizacija je provedena u trajanju od 48 h na temperaturi od -55 °C. Nakon primarnog i sekundarnog sušenja u procesu liofilizacije dobiven je konačni osušeni produkt uz željeni sadržaj vlage.

Uz nativni uzorak, pripremljeni su i uzorci s dodatkom β-ciklodekstrina, metiliranog-β-ciklodekstrina, γ-ciklodekstrina i hidroksipropil-β-ciklodekstrina.

#### 4.2.4. Analiza CIE LAB sustavom boja

Mjerenje boje svježih liofiliziranih ekstrakata komine masline provedeno je na kolorimetru CM-3500d (Konica Minolta, Japan). Analiziran je nativni ekstrakt komine masline, kao referentni uzorak te ekstrakti komine masline uklopljeni u ciklodekstrinima.

Podaci kolorimetrijske analize su obrađeni pomoću SpectraMagic NX softwera po tzv. CIE LAB sustavu boja .

Prema CIE LAB sustavu, boja je prikazana  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednostima, gdje  $L^*$  vrijednost određuje svjetlinu uzorka,  $a^*$  vrijednost određuje udio crvene, odnosno zelene komponente, a  $b^*$  vrijednost određuje udio žute, odnosno plave komponente.

Prema dobivenim podacima, ukupna promjena boje u odnosu na referentni uzorak, izračunata je tzv. Euklidovom udaljenošću između boja izraženih kao  $L$ ,  $a$  i  $b$ :

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

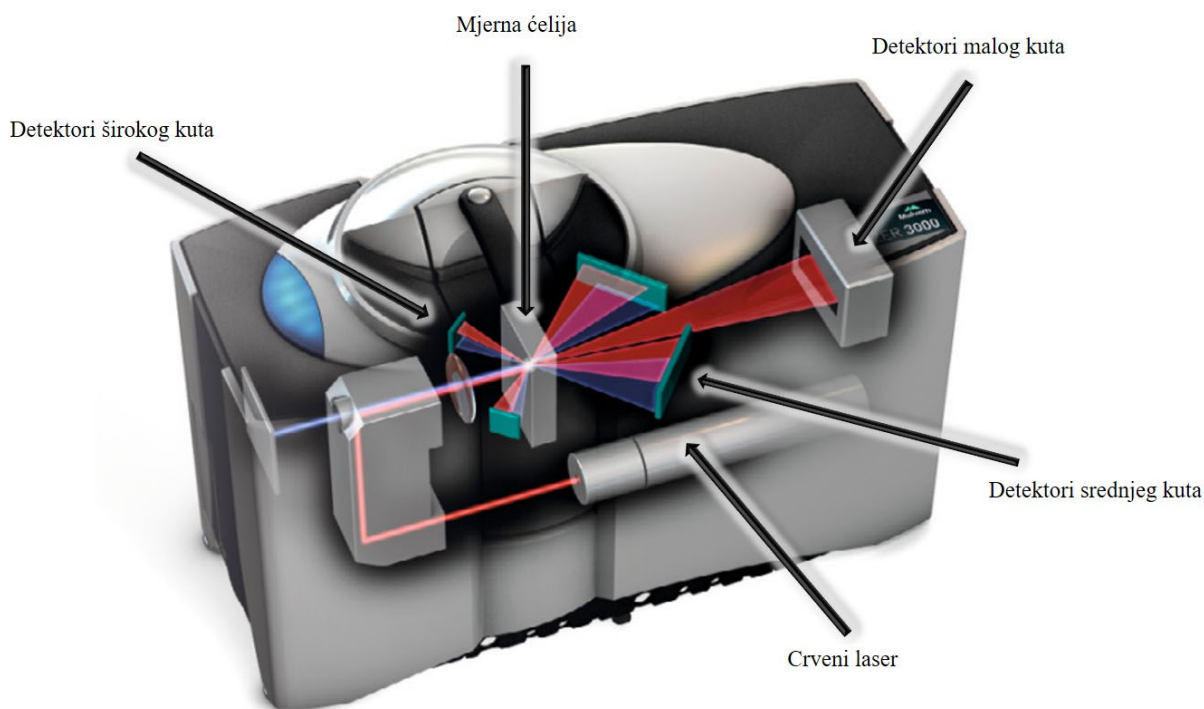
Parametar  $\Delta E$  je pokazatelj odstupanja boje uzorka od referente boje, kako je prikazano u **Tablici 8**.

**Tablica 8:** Značenje razlike izmjerene i referentne  $\Delta E$  vrijednosti

$\Delta E$	Značenje
0-0,5	Razlike u tragovima
0,5-1,5	Mala razlika
1,5-3,0	Primjetna razlika
3,0-6,0	Značajna razlika
6,0-12,0	Velika razlika
>12,0	Vrlo velika razlika

#### 4.2.5. Analiza raspodjele veličine čestica

Raspodjela veličine čestica uzorka ekstrakta komine masline određena je primjenom laserske difrakcije na uređaju Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). Uređaj za određivanje veličine čestica sastoji se od lasera kao izvora svjetlosti točno definirane valne duljine, detektora koji mjeri intenzitet raspršene svjetlosti pod raznim kutevima te dobavne jedinice koja je odgovorna za raspršenje i ravnomjernu raspodjelu čestica u mjernoj ćeliji (**Slika 13.**).



**Slika 13:** Raspored optičkih dijelova Malvernovog instrumenta za lasersku difrakciju (preuzeto s [www.malvern.com](http://www.malvern.com))

Mjerenje je provedeno uz upotrebu SCIROCCO jedinice za suhu disperziju tako da je praškasti materijal stavljen u kadicu za uzorak. Nastale vibracije uzrokovale su kretanje uzorka do sita opremljenog kuglicama radi razbijanja aglomerata. Nakon prolaska kroz sito, čestice su kroz zračnu ćeliju ulazile u optičku jedinicu u kojoj se provodilo mjerenje. Tijekom mjerenja, na mjernu ćeliju s uzorkom bila je usmjerena laserska zraka duljine snopa 2,4 mm. Korištene su leće 3000RF. Sva mjerenja provedena su u duplikatu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost promjera ( $d$ ) i indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, *PDI*).

Indeks polidisperznosti računat je prema jednadžbi:

$$PDI = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}}$$

Gdje je:

$d_{10}$  – promjer čestice na 10. percentilu

$d_{50}$  – promjer čestice na 50. percentilu

$d_{90}$  – promjer čestice na 90. percentilu

#### 4.2.6. Ispitivanje stabilnosti ekstrakata komine masline

Stabilnost suhих ekstrakata komine masline ispitana je u uvjetima ubrzane razgradnje. U svrhu stabilitetnog ispitivanja, uzorci su tijekom vremenskog intervala od 45 dana ostavljeni na uvjetima 75 % relativne vlažnosti i temperaturi od 60 °C.

Praškasti uzorci pakirani su u polipropilenske spremnike i pohranjeni u eksikatoru sa zasićenom otopinom natrijevog-klorida. Zatvoreni eksikator pohranjeni su u termostat i čuvani 45 dana na 60 °C. Na taj su način osigurani kontrolirani uvjeti relativne vlažnosti i konstantne temperature. Uzorkovanja su provedena 0.-ti, 15.-ti, 30.-ti, i 45.-ti dan trajanja stabilitetne studije. Kao parametri stabilnosti praćeni su udio ukupnih fenola, antioksidacijski potencijal uzorka te udio hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina. Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom, kao i antioksidacijski potencijal uzorka koji je određen DPPH testom. Udjeli tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina određeni su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

#### 4.2.7. Analiza polifenola

Sadržaj glavnih fenolnih komponenti komine masline – tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina određivan je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (**eng.** *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

##### 4.2.7.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

##### 4.2.7.1.1. Određivanje sadržaja tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina kromatografskom analizom

Identifikacija i određivanje sadržaja tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina u ekstraktima komine masline provedena je prema metodi Tsarbopoulos i sur. (2003) uz određene modifikacije.

Uzorci su analizirani na Agilent 1200 kromatografskom sustavu s binarnom pumpom, automatskim uzorkivačem (**eng.** *autosampler*), temperiranim odjeljkom za kolonu, VWD (**eng.** *variable wavelength detector*) i DAD (**eng.** *diode array detector*) detektorima. DAD detektorom je omogućeno snimanje cijelog spektra eluiranih analita u UV/Vis području. Separacija je provedena na C18 koloni obrnute faze dimenzija 4,6 x 250 mm i veličine čestica 5 µm (Agilent Zorbax Eclipse plus). Kromatografska metoda temeljena je na gradijentnoj separaciji kako je prikazano u **Tablici**

9. Kao pokretna faza korišteni su kao vodena faza A acetatni pufer ( $c(\text{amonijev acetat}) = 0,05 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=5,0$ ), te kao organska faza B 100 % acetonitril. Protok pokretne faze podešen je na 1 mL/min. Temperatura kolone iznosila je 40 °C, a volumen injektiranja je bio 20  $\mu\text{l}$ . Neposredno prije analize, pokretna faza bila je degazirana i filtrirana pomoću vakuum pumpe kroz membranski filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ .

**Tablica 9:** Program gradijentne separacije aktivnih komponenti

Vrijeme (min)	A (%)	B (%)	Protok (mL/min)
0	90	10	1
4	80	20	1
8	40	60	1
11	30	70	1
15	90	10	1

Detekcija analita od interesa provođena je na dvije valne duljine. Oleuropein je detektiran na valnoj duljini od 240 nm, dok su tirosol i hidrokstirosol određivani na valnoj duljini od 280 nm. Za obradu podataka korišten je softver Agilent Chem Station s OpenLAB CDS 3D UV nadogradnjom.

#### 4.2.7.1.2. Validacija HPLC metode za određivanje tirosola, hidrokstirosola i oleuropeina

Validacija metode provedena je prema ICH (**eng.** *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) smjernicama. Validirane su slijedeće izvedbene značajke: točnost, preciznost, specifičnost, granica detekcije i granica određivanja, linearnost i radno područje metode.

Selektivnost metode je dokazana detekcijom 3 odvojene kromatografske krivulje – tirosola, hidrokstirosola i oleuropeina. Linearnost je ispitana injektiranjem 5 koncentracijskih nivoa otopina standarda tirosola, hidrokstirosola i oleuropeina u rasponu od 3 do 243 mg/L. Izračun je proveden linearnom regresijom, metodom najmanjih kvadrata. Parametar točnosti provođen je trostrukim injektiranjem otopine uzorka špikanog sa standardom na 3 koncentracijska nivoa, odnosno primjenom metode standardnog dodatka: 3, 27 i 243 mg/L te izračunom iskorištenja. Na temelju dobivenih rezultata za parametre linearnosti i točnosti, određeno je radno područje metode. Ponovljivost metode je provjerena injektiranjem 6 individualno pripremljenih otopina uzorka. Granica detekcije i određivanja metode određeni su injektiranjem otopina standarda poznatih

koncentracija tirosoila, hidroksitirosoila i oleuropeina te provjerom odnosa signala i šuma. Postavljeni kriterij odnosa signala i šuma za LOQ (**eng.** *Limit of Quantification*) je bio 10, a za LOD (**eng.** *Limit of Detection*) 3.

### 4.2.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Tijekom ovog istraživanja antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline određena je primjenom suvremenih kemijskih *in vitro* metodoloških pristupa te primjenom bioloških- i model sustava hrane.

#### 4.2.8.1. Antioksidativna aktivnost u kemijskim model sustavima

##### 4.2.8.1.1. Određivanje ukupnog redukcijskog kapaciteta (ukupnog udjela fenola)

Ukupni fenoli određivani su spektrofotometrijski na UV4 Spektrofotometru (Unicam, UK) Folin-Ciocalteu metodom prema Singleton i Rossi (1965) uz određene modifikacije.

Nakon provedenih postupka ekstrakcije komine masline, dobiveni ekstrakti su filtrirani kroz plava vrpca ili gusti filter papir. Mjerne otopine pripravljene su miješanjem 200  $\mu$ L razrijeđenog ekstrakta, 1,35 mL destilirane vode te 150  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa. Reakcijske smjese dobro su promućkane te je nakon 5 minuta dodano 1,5 mL 6 % (w/v) natrijevog karbonata. Boja je razvijana na 50 °C 30 minuta. Uzorci su zatim ohlađeni pod mlazom tekuće vode, a apsorbancija svake otopine mjerena je na valnoj duljini od 725 nm. Kao slijepa proba korištena je mjerna otopina pripravljena s dodatkom ekstrakcijskog sredstva umjesto uzorka.

Umjerni pravac izrađen je s galnom kiselinom te je ukupni redukcijski kapacitet (**eng.** *Total Reducing Capacity*, TRC) odnosno ukupni udio fenola (**eng.** *Total Phenolic Content*, TPC) analiziranih uzoraka izražen kao gram ekvivalenata galne kiseline (GAE) po kilogramu komine masline (mg GAE / kg).

##### 4.2.8.1.2. Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH testom

Određivanje antioksidacijskog potencijala ekstrakata komine masline provedeno je DPPH testom prema metodi Kirigaya i sur. (1971) te Shimada i sur. (1992). Metoda se temelji na redukciji ljubičastog kromogena 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH<sup>•</sup>) s antioksidansima. Kao produkt reakcije nastaje blijedožuti hidrazin (DPPH-H). Sposobnost hvatanja radikala određena je

spektrofotometrijski mjerenjem metanolnih otopina uzoraka na valnoj duljini od 528 nm. Praćeno je smanjenje apsorbancije sve do postizanja konstantnih vrijednosti.

Reakcijska smjesa sastojala se od 600 µL adekvatno razrijeđenog ekstrakta komine masline u metanolu, 1,4 mL metanola i 1,5 mL otopine DPPH<sup>·</sup>. Nakon inkubacije od 30 minuta mjerena je apsorbancija na 528 nm ( $A_{30min}$ ). Otopina kojom je mjerena inicijalna apsorbancija ( $A_{0min}$ ), umjesto uzorka sadržavala je odgovarajuću količinu metanola.

Svaki je uzorak analiziran na 4-5 koncentracijska nivoa, te je pad apsorbancije varirao između 10 % i 90 %. Rezultati su izračunati iz linearne ovisnosti pada apsorbancije ( %) o koncentraciji analiziranih uzoraka, te izraženi kao  $EC_{50}$ . Vrijednost  $EC_{50}$  označava koncentraciju ekstrakta koja uzrokuje 50 %-tno smanjenje početne apsorbancije.

#### 4.2.8.1.3. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

Sposobnost ekstrakta komine masline za vezanjem ABTS<sup>+</sup> radikala određena je kolorimetrijskom metodom opisanom u radu Re i sur. (1999). Otopina ABTS<sup>+</sup> radikala pripravljena je reakcijom otopine kalijevog persulfata ( $c = 2,45$  mmol/L) s ABTS otopinom ( $c = 7$  mmol/L) u mraku, na temperaturi od 4 °C, u trajanju od 12 sati. Dobivena otopina ABTS<sup>+</sup> radikala razrijeđena je s destiliranom vodom u odgovarajućem omjeru, kako bi apsorbancija na 732 nm iznosila  $0,70 \pm 0,02$ .

Reakcijska smjesa pripravljena je miješanjem 300 µL otopine adekvatno razrijeđenog ekstrakta komine masline ili destilirane vode ( $A_{0min}$ ) i 2,5 mL otopine ABTS<sup>+</sup> radikala. Apsorbancija je mjerena na 732 nm 3 minute nakon početka reakcije ( $A_{3min}$ ). Iz razlike početnog obojenja ( $A_{0min}$ ) i obojenja nakon tri minute ( $A_{3min}$ ) izračunat je postotak redukcije boje ispitivane otopine (% redukcije):

$$\text{postotak redukcije (\%)} = \frac{A(0 \text{ min}) - A(3 \text{ min})}{A(0 \text{ min})} \times 100$$

Gdje je :

$A(0 \text{ min})$  – apsorbancija slijepe probe, maksimalna količina ABTS,

$A(3 \text{ min})$  – apsorbancija radne otopine nakon 3 minute.

Postotak redukcije boje odnosno sposobost vezanja ABTS<sup>+</sup> radikala je mjera antioksidativne aktivnosti ispitivane otopine. Baždarni dijagram izrađen je s otopinama Trolox<sup>®</sup>-a različitih

koncentracija. Rezultati mjerenja uzorka su preko jednadžbe pravca baždarnog dijagrama izraženi kao mg ekvivalenta Trolox<sup>®</sup>-a (TE) na 1 g uzorka (mg/g TE).

### 4.2.8.1.4. Određivanje sposobnosti apsorpcije kisikovih radikala ORAC metodom

ORAC (*eng. Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metodom mjerena je sposobnost antioksidansa da inhibira oksidaciju uzrokovanu peroksilnim radikalom. Tijekom provođenja analize slobodni radikali reagirali su s fluorescentnom probom, čime je došlo do promjene intenziteta fluorescencije. Kao fluorescentna proba korištena je fotostabilna ciljna molekula, fluorescin. Analiza je provedena na mikrotitarskoj ploči sa 96 jažica, a rezultati su očitani pomoću Victor X3 čitača mikrotitarskih ploča (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Na početku analize je u svaku jažicu mikrotitarske ploče dodano 150  $\mu$ L fluoresceina ( $c = 5 \mu\text{M}$ ) te pomiješano s 25  $\mu$ L fosfatnog pufera ( $c = 75 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7$ ; blank), Trolox standarda (6,25-100  $\mu\text{mol/L}$ ) ili adekvatno razrijeđenog uzorka. Reakcijska smjesa inkubirana je na 37 °C 10 minuta, a reakcija oksidacije inicirana je dodatkom 25  $\mu$ L AAPH ( $c = 150 \text{ mM}$  u fosfatnom puferu). Uređaj za mjerenje fluorescencije je podešen na pokretanje fluorescentnog kinetičkog očitavanja uz eksitacijsku valnu duljinu od 485 nm i emisijsku valnu duljinu od 530 nm. Izmjerene vrijednosti fluorescencije reakcijskih smjesa grafički su prikazane u ovisnosti o vremenu mjerenja. Površina ispod krivulje pada fluorescencije (AUC) izračunata je za slijepu probu, uzorke i standard (Trolox). Za svaki uzorak i svaku koncentraciju standarda konačna površina ispod krivulje (netAUC) izračunata je oduzimanjem vrijednosti površine ispod krivulje slijepe probe (AUC<sub>blank</sub>) od dobivene površine ispod krivulje svakog uzorka ili standarda (AUC<sub>sample/Trolox</sub>). Umjerni pravac izrađen je grafički, s otopinama Troloxa različitih koncentracija, kao ovisnost analiziranih koncentracija o odgovarajućoj konačnoj površini ispod krivulje (netAUC). Rezultati mjerenja uzorka su preko jednadžbe pravca baždarnog dijagrama izraženi kao mg ekvivalenta Trolox<sup>®</sup>-a (TE) na 1 g uzorka (mg/g TE). Dobivenim rezultatima određena je antioksidativna aktivnost uzorka.

### 4.2.8.2. Antioksidativna aktivnost u biološkim model sustavima

#### 4.2.8.2.1. Antioksidativna aktivnost u model sustavu liposoma

Antioksidacijska aktivnost u modelu liposoma određena je prema metodi Liu i sur. (2010) uz određene modifikacije.



Za pripremu ishodne otopine liposoma ( $c = 8 \text{ mg/mL}$ ), suspendirano je 2,4 g sojinog lecitina u 300 mL deionizirane vode. Suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici i sonicirana 15 minuta u UZV kupelji. U tikvice koje su sadržavale 50 mL ishodne otopine liposoma, dodan je 1 mL etanolnih otopina antioksidansa (BHA ili ekstrakata komine masline) ili etanola (kontrolni uzorak). Dobivena otopina sonicirana je 5 minuta, a zatim joj je dodano 20  $\mu\text{L}$  bakrovog (II) acetata ( $c = 30 \text{ mM}$ ). Reakcijska smjesa je dobro promiješana. Antioksidativna aktivnost ekstrakata komine masline određivana je na 2 koncentracijska nivoa, 0,28 % i 0,57 %. Pripremljene otopine liposoma zagrijavane su u vodenoj kupelji na temperaturi od 37 °C sat vremena. Nakon hlađenja otopine uzet je alikvot od 1 mL, koji je zatim pomiješan s 1,5 mL 20 %-tne octene kiseline i 1,5 mL 0,8 % TBA otopljene u 1,1 % SDS. Reakcijska smjesa je homogenizirana 30 sekundi i ostavljena u vodenoj kupelji 60 minuta na temperaturi od 100 °C. Nakon hlađenja je reakcijskoj smjesi dodano 5,0 mL *n*-butanola te je homogenizirana 30 sekundi. Uzorci su zatim centrifugirani 3 minute na 4000 rpm. Dobiveni gornji sloj korišten je za spektrofotometrijsko određivanje na valnoj duljini od 540 nm, a butan-1-ol je analiziran kao slijepa proba. Antioksidacijska aktivnost analiziranih uzoraka izražena je kao postotak inhibicije nastajanja TBARS u odnosu na kontrolni uzorak.

#### 4.2.8.2.2. Antioksidacijska aktivnost u model sustavu plazmidne DNA

Antioksidativni učinak na cijepanje DNA lanca inducirano hidroksilnim i peroksilnim radikalima, određen je u superzavijenom plazmidnom pBR322 DNA modelnom sustavu prema modificiranoj metodi Kitts i Wijewickreme (2000).

Reakcijska smjesa pripremljena je miješanjem 4  $\mu\text{L}$  otopine pBR322 DNA ( $c = 50 \text{ }\mu\text{g/L}$ ) s 2  $\mu\text{L}$  otopine ekstrakta komine masline (različite koncentracije; uzorak), PBS – a (10 mmol/L; pH = 7,4; blank) ili Trolox (različite koncentracije; kontrola) i 2  $\mu\text{L}$  otopine AAPH (50 mmol/L) ili PBS (kontrola). Sve su reakcijske smjese nadopunjene s PBS-om do volumena od 10  $\mu\text{L}$ .

Slijedila je inkubacija otopina na 37 °C u trajanju od 120 min uz miješanje na 350 rpm.

Uzorci su pripremljeni miješanjem 10  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese sa 4  $\mu\text{L}$  boje (2,5 g/L bromofenol plavila, 40 g/L saharoze, 10 ml/L GelRed bojila). Uzorci pomiješani s bojom nanoseni su u jažice na agaroznom gelu ( $c = 7 \text{ g/L}$ ) te je provedena elektroforeza pri naponu od 120 V u trajanju od 45 min. Nakon elektroforeze DNA vrpce su vizualizirane i kvantificirane pomoću uređaja Image Quant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, UK). Antioksidativna aktivnost ekstrakata komine

masline određena je na temelju postotka DNA koja je nakon inkubacije s AAPH radikalom ostala u svom nativnom superkoloidnom obliku.

Baždarni dijagram izrađen je grafički kao odnos koncentracija analiziranih uzoraka i postotka intaktne DNA. Na temelju regresijske jednadžbe kreirane iz navedenog odnosa, za svaki je uzorak određen  $IC_{50}$ .

### **4.2.8.3. Antioksidativna aktivnost u modelima hrane**

#### **4.2.8.3.1. Antioksidativna aktivnost u model sustavu ulja**

##### **4.2.8.3.1.1. Rancimat metoda**

Oksidacijska stabilnost uzoraka određena je testom ubrzane oksidacije ulja, Rancimat testom. Ovaj se test temelji na ubrzanom kvarenju biljnih ulja pri višim temperaturama uz konstantan dovod zraka određene brzine protoka u uzorak ulja.

Za određivanje indukcijskog perioda (*IP*) korišten je automatski uređaj za određivanje oksidacijske stabilnosti ulja Rancimat model 743 (Metrohm, Herisau, Švicarska), kod uvjeta rada: masa uzorka ulja 3,0 g, temperatura 110 °C, protok zraka 20 L/h. Indukcijski period (*IP*) oksidacije ulja određen je na osnovi količine izdvojenih kratkolančanih hlapljivih organskih kiselina uvedenih u demineraliziranu vodu. Mjerenjem porasta vodljivosti indirektno je praćen tijek oksidacijskog kvarenja ulja. Analizirani su uzorci ulja šafranike s dodatkom različitih udjela sintetskog antioksidansa te krutog ekstrakta komine masline kao antioksidansa. Dobiveni rezultat je izražen kao indukcijski period (*IP*) u satima. Određivanje oksidacijske stabilnosti svakog uzorka provedeno je u triplikatu.

##### **4.2.8.3.1.2. Schaal Oven test**

Schaal Oven test je jedna od najstarijih metoda za određivanje oksidacijske stabilnosti i održivosti biljnih ulja. Primjenom ove metode uzorci ulja su zagrijavani u termostatu pri temperaturi od 63 °C u trajanju od 4 dana te je praćen porast vrijednosti peroksidnog broja (*PB*) uslijed oksidacijskog kvarenja ulja. Peroksidni broj, kao marker oksidativne stabilnosti, određen je u svježim, tek pripremljenim uzorcima te nakon 1, 2, 3 i 4 dana. Sve su analize provedene u duplikatu.

**4.2.8.3.2. Antioksidacijska aktivnost u  $\beta$ -karoten emulzijskom model sustavu**

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata komine masline u  $\beta$ -karoten emulzijskom model sustavu određena je metodom Prieto i sur. (2012) s određenim modifikacijama. Provedena je na mikrotitarskoj ploči primjenom kinetičkog pristupa.

Za pripremu emulzije  $\beta$ -karoten linoleinske kiseline, u tikvicu okruglog dna vagano je 4,0 mg  $\beta$ -karotena i 4,0 g Tween 40 te je pipetirano 0,5 mL linolne kiseline i 20,0 mL kloroforma. Dobivena suspenzija je snažno miješana, nakon čega je kloroform uparen na rotacijskom uparivaču na temperaturi od 40 °C u trajanju od 15 minuta. Primjenjena je niska temperatura i kratko vrijeme uparavanja kako bi se spriječila moguća oksidacija lipida.

Kako bi se pripremila emulzija, 1 mL uljne suspenzije je pomiješan s 30 mL Britton pufera ( $c = 100$  mM; pH = 6) prethodno zagrijanog na 45 °C.

Metoda izbjeljivanja  $\beta$ -karotena provedena je na polipropilenskoj ploči ravnog dna s 96 jažica kapaciteta 330  $\mu$ L. Reakcijske smjese nanošene na mikrotitarsku ploču pripremljene su miješanjem 250  $\mu$ L emulzije s 50  $\mu$ L ekstrakta komine masline ( $c = 0,125$  g/L, uzorak), pufera (slijepa proba) ili Trolox – a ( $c = 0,125$  mM, standard). Uređaj za očitavanje podešen je na temperaturu od 45 °C uz mućkanje (660 sekcijs/min, amplituda 2 mm). Apsorbancija uzoraka u mikrotitarskim pločicama mjerena je na čitaču mikrotitarskih pločica - uređaju Multimode Plate Reader – Victor X3 (Perkin Elmer, Velika Britanija).

Mjerenje apsorbancije provedeno je na valnoj duljini od 470 nm, simultano za sve ispunjene mikrotitarske pločice. U svakoj pločici apsorbancija je mjerena 200 minuta u razmacima od 1 minute. Omjer inhibicije apsorbancije izračunat je prema formuli:

$$R = 1 - \frac{A_0}{A_t}$$

Gdje je:

$R$  – omjer inhibicije apsorbancije

$A_0$  – maksimalna apsorbancija reakcije dobivena u vremenu  $t = 0$

$A_t$  – apsorbancija reakcije dobivena u vremenu  $t$  (1-200 min)

Umjerni pravac izrađen je grafički, kao ovisnost izračunatih vrijednosti omjera inhibicije apsorbancije ( $R$ ) o vremenu. Dobivene vrijednosti korištene su za izračun površine ispod krivulje

(AUC) za svaki analizirani uzorak odnosno otopinu Troloxa. Krivulja linearne regresije dobivena je iz ovisnosti površina ispod krivulje o odgovarajućoj koncentraciji Trolox – a (0,125-1 mM). Jednadžba pravca korištena je za izračun antioksidativne aktivnosti analiziranih uzoraka. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta Trolox<sup>®</sup>-a (TE) na 1 g uzorka (mg/g TE).

### 4.2.8.3.3. Antioksidacijska aktivnost u model sustavu mesa

Antioksidacijska aktivnost u model sustavu mesa određena je prema modificiranoj metodi Fasseas i sur. (2008). Metoda se temelji na mjerenju lipidne peroksidacije monoenoalnog oblika MDA u reakciji s tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Nastaje spoj crvene boje s apsorpcijskim maksimumom na 532 nm. Intenzitet boje nastalog spoja je mjera koncentracije MDA. Za pripremu umjerne krivulje korištena je otopina MDA tetrabutylamonijeve soli različitih koncentracija.

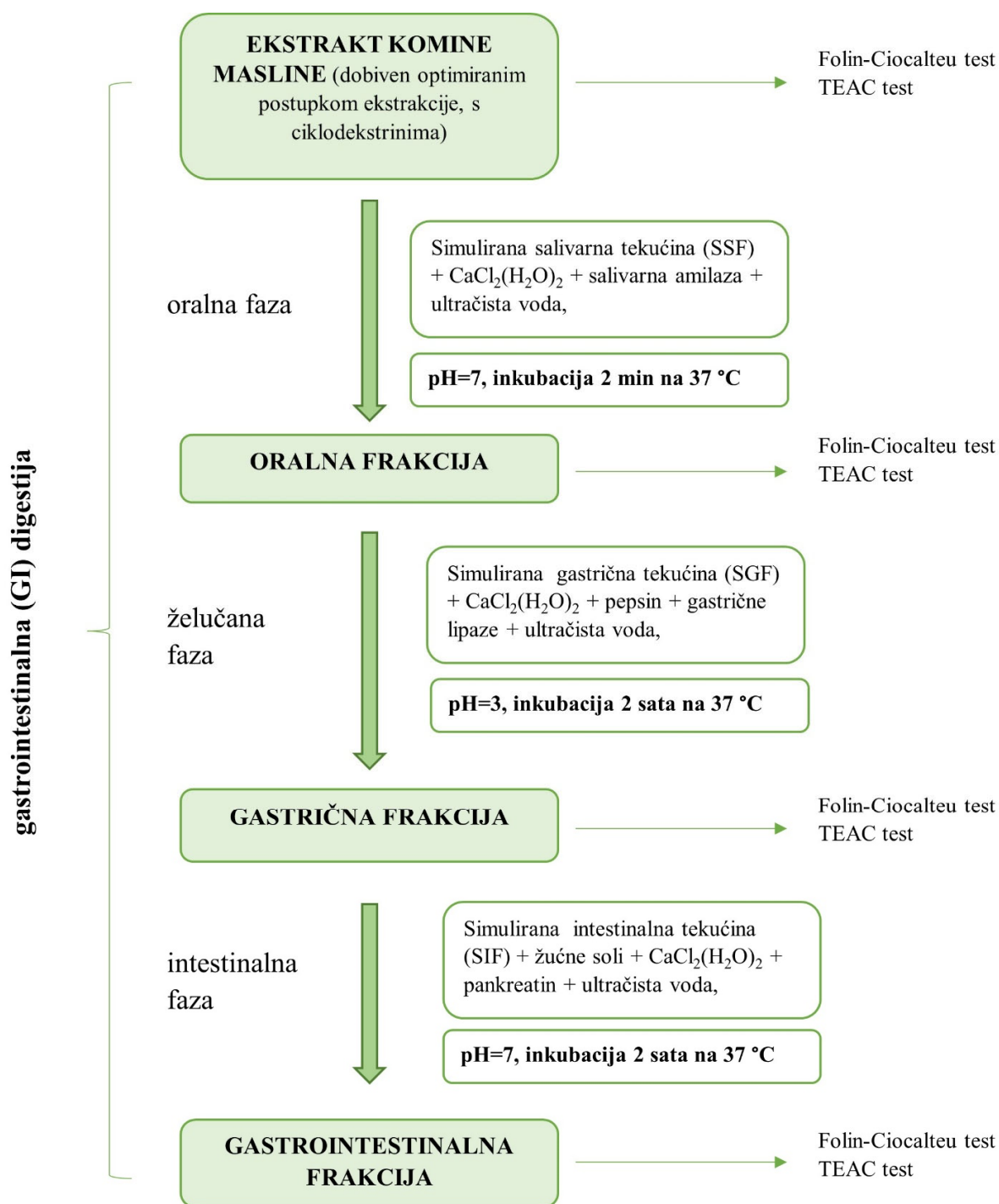
Meso je odvojeno od vidljivih dijelova masti, mljeveno i dodatno homogenizirano u svrhu dobivanja jednolike paste. Uzorci mesa s ili bez (kontrola) dodatka ekstrakta komine masline/BHA podvrgnuti su toplinskom tretmanu ili su čuvani na temperaturi od 4 °C. Za mjerenje produkata lipidne peroksidacije, uzorci su pomiješani s 1,0 mL deionizirane vode, 1,5 mL 20 %-tne octene kiseline i 1,5 mL 0,8 %-tne TBA otopljene u 1,1 %tnom SDS-u (pH-vrijednost reakcijske smjese iznosila je 2). Reakcijska smjesa je homogenizirana 30 s i zagrijavana 1 sat na temperaturi od 100 °C. Nakon hlađenja, u reakcijsku smjesu dodano je 5,0 mL *n*-butanola, smjesa je homogenizirana 60 sekundi i centrifugirana 3 minute na 4000 rpm. Gornji, butanolski sloj dobiven nakon centrifugiranja korišten je za spektrofotometrijsko određivanje TBA reaktivnih produkata na 532 nm. Butan-1-ol korišten je kao slijepa proba.

Za ubrzano ispitivanje stabilnosti, uzorci mesa bez dodanih antioksidansa te s dodanim različitim koncentracijama ekstrakta komine masline ili BHA miješani su na 100 rpm u vodenoj kupelji na temperaturi od 85 °C u trajanju od 120 minuta. Inhibicija nastajanja produkata MDA (%) grafički je izražena u ovisnosti o koncentraciji dodanog antioksidansa (komina masline (0,25-0,75 %) ili BHA (0,005-0,1 %) te su rezultati izraženi kao  $IC_{50}$  vrijednost.

Stabilnost tijekom skladištenja određena je uzorkovanjem mesa čuvanog na 4 °C u mraku tijekom 6 uzastopnih dana. Vagano je 3 mg ekstrakta komine masline ili 1 mg BHA te pomiješano sa 100 mg mesa. Meso skladišteno bez dodatka antioksidansa korišteno je kao kontrola. Dobiveni rezultati izraženi su kao postotak inhibicije nastajanja slobodnih radikala lipidne peroksidacije (kvantificirani kao MDA) u odnosu na kontrolu.

**4.2.9. Određivanje bioraspoloživosti gastrointestinalnim *in vitro* modelom**

*In vitro* simulacija gastrointestinalne digestije provedena je prema modificiranoj INFOGEST metodi Brodkorb-a i suradnika (2019). Postupak je podijeljen u tri faze, oralnu, gastičnu i intestinalnu koje su se provodile inkubacijom na 37 °C. Sve kemikalije i reagensi su zagrijani na 37 °C prije uporabe. Shematski prikaz gastroinmtestinalnog pokusa prikazan je na **Slici 14**.



**Slika 14:** Shematski prikaz pokusa gastrointestinalne digestije

### 4.2.9.1. Oralna faza digestije

Uzorci komine masline razrijeđeni su sa simuliranom salivarnom tekućinom (SSF) u omjeru 1:1 kako bi se dobila smjesa konzistencije paste. U smjesu je zatim dodan odgovarajući volumen  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  čija je konačna koncentracija iznosila 1,5 mM. Dodana je i salivarna amilaza, a njezina aktivnost u konačnim otopinama iznosila je 75 U/mL. Svim je uzorcima zatim dodana preostala ultračista voda kako bi se postigla 1 x koncentracija SSF otopine. Inkubacija je provedena 2 min na 37 °C te je dobivena frakcija koja se naziva oralni bolus.

### 4.2.9.2. Gastrična faza digestije

U staklenim epruvetama pomiješan je dobiveni oralni bolus sa SGF otopinom u omjeru 1:1 te je podešena pH-vrijednost s pripremljenom HCl (6 M) na 3. Dodan je odgovarajući volumen  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  (0,3M) otopine, kako bi njena konačna koncentracija iznosila 0,15 mM. U sve su uzorke zatim dodane otoine pepsina i gastričnih lipaza te je, po potrebi, pH-vrijednost ponovno podešena na 3. Aktivnost pepsina u konačnoj smjesi iznosila je 2000 U/mL, a gastričnih lipaza 60 U/mL. Svim je uzorcima zatim dodana preostala ultračista voda kako bi se postigla 1 x koncentracija SGF otopine

Epruvete su nakon toga zatvorene s ubrušenim čepom, zaštićene parafilmom i stavljene na multi-rotator (recipročno miješanje 90°, okomito usmjerenje epruvete). Nakon miješanja, svi su uzorci stavljani u inkubator na 37 °C u trajanju od 2 sata. Uz ispitivane uzorke, na inkubaciju su stavljani i nedigerirani uzorci koji sadrže uzorak i odgovarajuću količinu ultračiste vode koja predstavlja volumen svih sastavnica gastrične faze dodanih digeriranim uzorcima.

### 4.2.9.3. Intestinalna faza digestije

Nakon 2 sata inkubacije uzorci su izvađeni iz inkubatora te su im dodane sastavnice intestinalne faze. Svaka reakcijska smjesa nakon gastrične digestije pomiješana je sa SIF otopinom u omjeru 1:1, a pH-vrijednosti reakcijskih smjesa podešene su na 7 s prethodno pripremljenom NaOH (1 M). U reakcijske smjese dodana je otopina žučnih soli, te je njena konačna koncentracija iznosila 10 mM. Otopine su inkubirane uz miješanje na 37 °C u trajanju od 30 min. Nakon završene inkubacije dodan je odgovarajući volumen  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  (0,3 M) otopine kako bi se postigla koncentracija 0,6 mM. Intestinalna faza digestije se zatim provodila dodatkom pankreatina u svaku reakcijsku smjesu. Aktivnost tripsina u konačnim otopinama iznosila je 100 U/mL. Svim je uzorcima

naposljetku dodana preostala ultračista voda kako bi se postigla 1 x koncentracija SIF otopine. Epruvete su zatvorene ubrušenim čepom, zaštićene parafilmom te stavljene na multi-rotator (recipročno miješanje 90°, okomito usmjerenje epruvete). Svi su uzorci inkubirani na 37 °C u trajanju od 2 sata. Paralelno s prethodno pripremljenim uzorcima, inkubirani su i nedigerirani uzorci, koji sadrže odgovarajuću količinu ultračiste vode, koja predstavlja ukupni volumen svih sastavnica intestinalne faze.

Frakcije dobivene nakon gastrične i intestinalne faze digestije primjereno su skladištene u zamrzivaču. Dobivenim frakcijama određivan je antioksidativni potencijal TEAC i Folin-Ciocateu metodama.

### 4.2.10. Statistička obrada podataka

Istraživanjem su obuhvaćene tri serije uzoraka u svrhu dobivanja reprezentativnih rezultata. Unutar svake serije analize su provedene u triplikatu, a krajnji rezultati iskazani su kao srednje vrijednosti tri analizirane serije uzoraka.

Za analizu i interpretaciju rezultata istraživanja korišteni su standardni parametarski testovi obzirom da je prethodno utvrđeno da dobiveni rezultati pripadaju normalnoj razdiobi. Rezultati su prikazivani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija paralelnih analiza, a međusobno su uspoređivani korištenjem studentovog t-testa. Za utvrđivanje korelacije korištena je Pearsonova korelacija koja je interpretirana kao značajna ukoliko je koeficijent smjera  $r \geq 0.600$ , a Pearsonov koeficijent korelacije  $p \leq 0,05$ .



## **5. REZULTATI I RASPRAVA**

### **5.1. Optimizacija klasične ekstrakcije**

Otpad koji zaostaje nakon procesa prerade maslina bogat je farmakološki aktivnim fenolnim spojevima. Zbog svojih se pozitivnih svojstava fenolni spojevi ekstrahiraju iz nusprodukata proizvodnje maslinovog ulja, a kvalitativni i kvantitativni sastav dobivenih ekstrakata se uvelike razlikuje ovisno o primjenjenom postupku ekstrakcije te uvjetima provođenja ekstrakcije (trajanje, temperatura, tlak, otapalo) (Kumar i sur., 2006, Aliakbarian i sur., 2011).

Bioaktivni spojevi se iz biljnih materijala mogu ekstrahirati različitim konvencionalnim metodama ekstrakcije. Većina metoda klasične ekstrakcije temelji se na ekstrakcijskom kapacitetu različitih otapala, koja se primjenjuju uz povišenu temperaturu ili miješanje. Najveći izazovi klasičnih tehnika ekstrakcije su dugo trajanje procesa, upotreba i isparavanje velikih količina otapala, slaba selektivnost te razgradnja pojedinih termolabilnih komponenti (Luque de Castro i Garcia-Ayuso, 1998). Zbog navedenih nedostataka postoji konstantna potreba za optimizacijom konvencionalnih tehnika ekstrakcije u cilju povećanja učinkovitosti, selektivnosti i održivosti. U prvoj fazi ovog istraživanja optimiran je proces klasične ekstrakcije fenolnih spojeva komine masline upotrebom netoksičnih otapala, temeljenih na principima zelene kemije.

Tijekom optimizacije procesa varirana je vrsta ekstrakcijskog otapala promjenom omjera vode i etanola, pH-vrijednost otapala, temperatura i trajanje ekstrakcije.

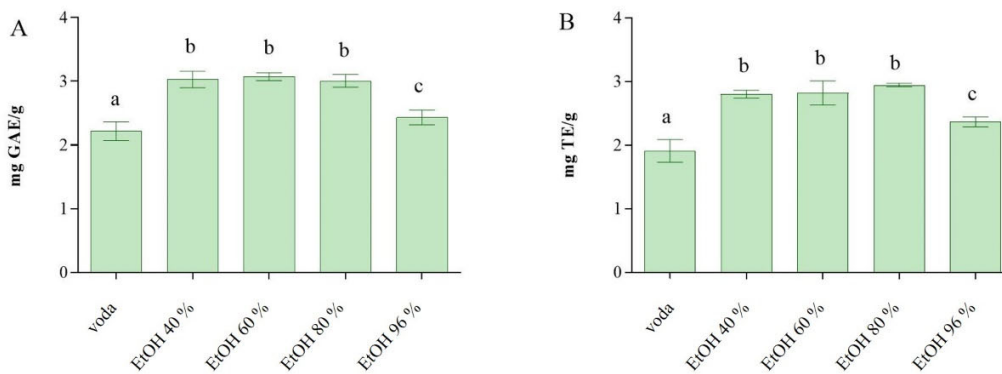
Kao parametri uspješnosti ekstrakcije, u dobivenim ekstraktima su određivani udio ukupnih fenola (eng. Total phenolic content, TPC) i TEAC (eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) antioksidativni kapacitet. Na temelju dobivenih rezultata odabrani su uvjeti ekstrakcije kojima su postignuti najveći prinosi. U svrhu konačne optimizacije, odabranim ekstraktima s najvećim prinosima određivan je i udio glavnih bioaktivnih polifenola masline, tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina.

#### **5.1.1. Utjecaj različitih parametara ekstrakcije na udio ukupnih fenola i TEAC antioksidativni kapacitet**

Varijacijom parametara klasične ekstrakcije kao što su polarnost i pH-vrijednost otapala, temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije, dobiveni su ekstrakti komine masline sa značajnim udjelom polifenolnih komponenti. Svi dobiveni ekstrakti pokazali su antioksidativnu aktivnost. Međutim, vrijednosti udjela ukupnih fenola (TPC) i TEAC antioksidativnog kapaciteta značajno

su se razlikovale ovisno o polarnosti i pH-vrijednosti otapala, trajanju i temperaturi provođenja ekstrakcije.

Utjecaj primjenjenog otapala na dobivene TPC i TEAC vrijednosti prikazan je na **Slici 15**.

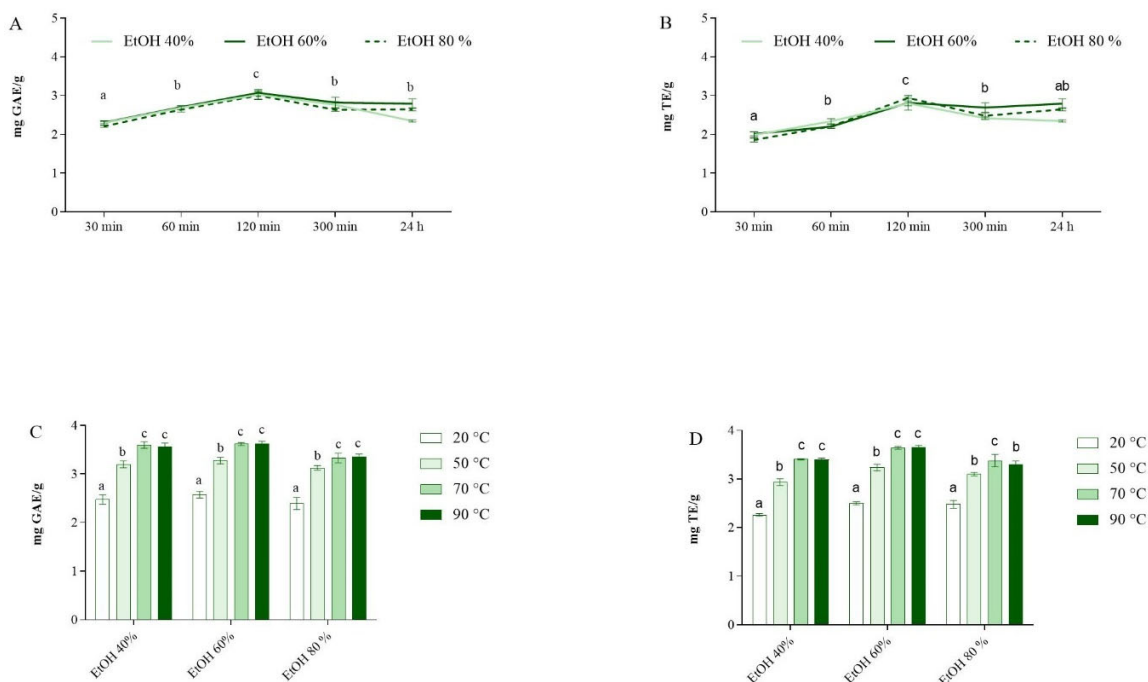


a, b, c-stupci označeni istim slovom pripadaju istoj statističkoj skupini ( $p > 0,05$ ). GAE-ekvivalenti galne kiseline; TE-Trolox ekvivalenti. Ekstrakcije su provedene kod pH=6, miješanjem smjesa na temperaturi od 70 °C (100 rpm) u trajanju od 120 min. Omjer uzorka i otapala iznosio je 1:4.

**Slika 15:** Utjecaj vrste otapala na TPC (udio ukupnih fenola; A) i TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) antioksidativni kapacitet (B) ekstrakta komine masline.

Udio ukupnih fenola i TEAC antioksidativni kapacitet bili su značajno veći primjenom mješavina vode i etanola u različitim omjerima u odnosu na ekstrakciju čistom vodom ili 96 %-tni etanolom ( $p < 0,05$ ). Rezultati udjela ukupnih fenola i TEAC antioksidativnog kapaciteta dobiveni kod ekstrakcije s 40 %, 60 % i 80 %-tnim etanolom nisu se statistički značajno razlikovali ( $p > 0,05$ ).

Za daljnju optimizaciju ekstrakcije, kao otapala su primjenjivane otopine različitih udjela vode i etanola. Tako je optimizacija duljine trajanja procesa ekstrakcije te primjenjene temperature provedena korištenjem 40 %, 60 % i 80 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog sredstva. Dobiveni rezultati prikazani su na **Slici 16**.



a, b, c-podaci označeni s istim slovom pripadaju istoj statističkoj skupini ( $p > 0,05$ ). GAE-ekvivalenti galne kiseline; TE- Trolox ekvivalenti. Ekstrakcije su provođene kod pH=6, miješanjem smjesa na temperaturi od 70 °C (100 rpm) u trajanju od 120 min. Omjer uzorka i otapala iznosio je 1:4.

**Slika 16:** Utjecaj duljine trajanja ekstrakcije (A, B) i temperature (C, D) na TPC (udio ukupnih fenola) i TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) antioksidativni kapacitet ekstrakata komine masline

Produljenje trajanja procesa ekstrakcije sa 30 minuta na 120 minuta rezultiralo je značajnim porastom udjela ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima komine masline te povećanjem njihove antioksidativne aktivnosti. Jednak je trend dobiven za sva primjenjena ekstrakcijska otapala (40 %, 60 % i 80 %-tni etanol). Trajanje ekstrakcijskog procesa zatim je dodatno produljeno do 300 minuta, međutim navedena varijacija nije pridonijela daljnjem povećanju učinkovitost procesa. Štoviše, kod procesa ekstrakcije provedenog u trajanju od 24 sata primjećen je pad TEAC i TPC vrijednosti. Zabilježeni pad ekstrakcijskog prinosa može se objasniti mogućom degradacijom polifenolnih komponenti uslijed reakcija hidrolize, redoks reakcija ili polimerizacije (Alonso-Salchez i sur., 2001). Kod istih uvjeta ekstrakcije dobivene TPC i TEAC vrijednosti su usporedive za sva korištena otapala - 40 %, 60 % i 80 %-tni etanol.

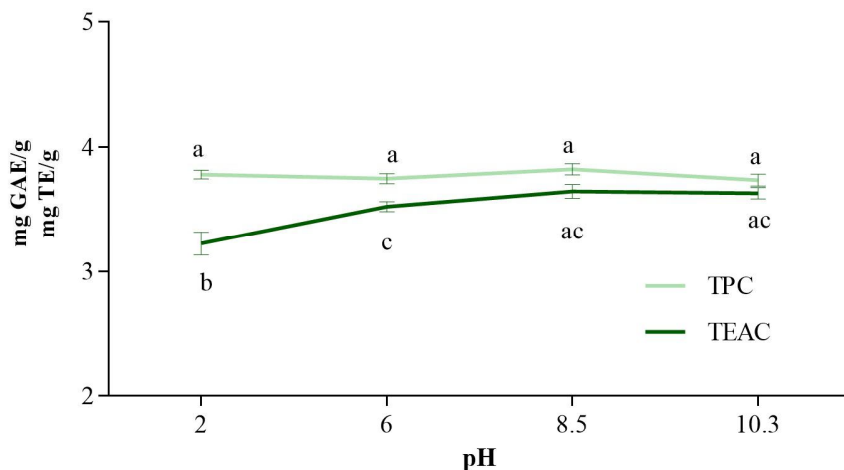
Dobiveni rezultati su u skladu s trendom prikazanim u radu Aliakbarian i sur. (2011), gdje je produljenje trajanja ekstrakcije s 15 min na 90 minuta značajno poboljšalo ekstrakciju polifenolnih komponenti iz komine masline u reaktoru pri uvjetima visokog tlaka i temperature. Prema zaključku autora, daljnje produljenje trajanja ekstrakcije utjecalo je na degradaciju polifenolnih komponenti, čime su smanjeni ukupni prinosi ekstrakcije. Slične trendove uočili su i Jerman i sur. (2010), koji su optimirali ultrazvučnu ekstrakciju polifenola iz ploda masline.

Temperatura ekstrakcije se prema dobivenim rezultatima također pokazala značajnim čimbenikom koji utječe na udio ukupnih fenola i TEAC antioksidacijski kapacitet dobivenih ekstrakata (**Slika 16.C, Slika 16.D**). Pri temperaturi od 70 °C i višoj, postignuti su veći ekstrakcijski prinosi. Budući da temperature iznad 70 °C nisu značajno doprinijele daljnjem povećanju prinosa, optimalnom temperaturom ekstrakcije polifenola iz komine masline smatra se 70 °C. Tijekom provođenja eksperimentalnog dijela ispitivanja utjecaja temperature na učinkovitost ekstrakcije, uočene su značajne razlike u prinosima tijekom variranja vrste otapala pri istoj temperaturi. Učinkovitost ekstrakcije provedene pri 70 °C s 80 %-tnim etanolom znatno je niža od one postignute ekstrakcijom s 40 % i 60 % - tnm etanolom pri istoj temperaturi.

Dobiveni rezultati upućuju na termalnu stabilnost glavnih polifenolnih komponenti komine masline. Ukoliko pak pod utjecajem povišene temperature dolazi do razgradnje polifenola, pretpostavlja se da nastali polifenolni produkti također pokazuju antioksidativnu aktivnost. Prikazani rezultati i dana obrazloženja su u skladu s rezultatima studije Herrero i sur. (2011), koji su optimirali ekstrakciju polifenola iz komine masline pod povišenim tlakom. U navedenoj studiji najveći ekstrakcijski prinosi su dobiveni pri temperaturama 150 °C i 200 °C za oba korištena otapala, vodu i etanol. Aliakbarian i sur. (2011) su u svojoj studiji ispitivali ekstrakciju polifenola iz komine masline u reaktoru pod visokim tlakom i temperaturom. Najveći ekstrakcijski prinosi su postignuti pri visokim temperaturama, a kao optimalna je određena temperatura od 180 °C.

Biljni polifenoli su vrlo često dio kompleksa velikih molekularnih masa, koji se mogu djelomično razgraditi u kiselim ili alkalnim uvjetima. Navedeno svojstvo može povoljno utjecati na ekstrakciju polifenola iz biljnih materijala. Međutim, u nekim slučajevima ekstremne pH-vrijednosti uzrokuju razgradnju polifenola, te uzrokuju smanjene ekstrakcijske prinose. Konačni utjecaj pH-vrijednosti na ekstrakciju fenolnih komponenti iz biljnog materijala ovisi o svojstvima biljnog materijala i fizikalno-kemijskim karakteristikama određenih polifenola. U ovom istraživanju promjena pH-

vrijednosti ekstrakcijskog sredstva nije značajno utjecala na udio ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima. Međutim, ekstrakti dobiveni u kiselom mediju pokazali su znatno niži TEAC antioksidativni kapacitet (**Slika 17.**).



a, b, c-podaci ozačeni s istim slovom pripadaju istoj statističkoj skupini ( $p > 0,05$ ). GAE-ekvivalenti galne kiseline; TE- Trolox ekvivalenti; TPC-udio ukupnih fenola; TEAC-antioksidativni kapacitet izražen kao Trolox ekvivalent. Ekstrakcije su provođene kod pH=6, miješanjem smjesa na temperaturi od 70 °C (100 rpm) u trajanju od 120 min. Omjer uzorka i otapala iznosio je 1:4.

**Slika 17:** Utjecaj pH vrijednosti na TPC (udio ukupnih fenola) i TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) antioksidativni kapacitet ekstrakata komine masline

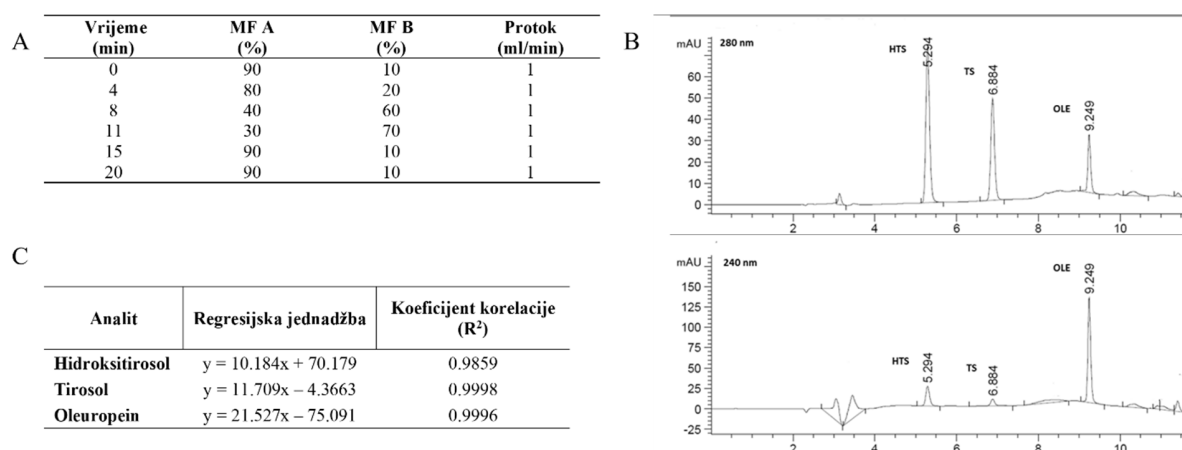
Na temelju rezultata analiza ekstrakata komine masline dobivenih variranjem vrste otapala, temperature, vremenskog intervala i pH-vrijednosti kao parametara klasične ekstrakcije, utvrđeni su optimalni uvjeti ekstrakcije: kontinuirano miješanje ekstrakcijske smjese na temperaturi od 70 °C u trajanju od 120 minuta uz korištenje 40 % ili 60 %-tnog etanola kao otapala.

### 5.1.2. Validacija HPLC-DAD metode za određivanje tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina u ekstraktima komine masline

U svrhu daljnje optimizacije procesa klasične ekstrakcije glavne fenolne komponente komine masline analizirane su u dobivenim ekstraktima metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti prema radu Tsarbopoulos i sur. (2003) uz određene modifikacije. Prije provođenja analiza metoda je validirana kako bi se dokazala njena prikladnost za određivanje tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina u ekstraktima komine masline. Provedenom validacijom ispitivana je specifičnost, linearnost, točnost i preciznost metode. Specifičnost je dokazana nedvosmislenim

određivanjem analita u složenom matriksu uzorka tako da su UV spektri tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina snimani detektorom s nizom dioda (**eng. Diode Array Detector, DAD**). Identifikacija navedenih analita u uzorcima je zatim provedena usporedbom vremena zadržavanja i snimljenih spektara s odgovarajućim spektrima i vremenima zadržavanja standarda.

Validacijski parametar linearnosti osigurava linearnu ovisnost odziva detektora o koncentraciji analita u ispitivanom uzorku unutar radnog područja metode. Potvrđena je linearnom regresijskom analizom rezultata dobivenih injektiranjem otopina standarda tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina u pet koncentracijskih nivoa. Dobivene jednadžbe pravca i koeficijenti korelacije prikazani su na **Slici 18**.



**Slika 18:** HPLC-DAD Metoda određivanja tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina u ekstraktima komine masline: gradijentni program elucije (A), kromatogrami standardnih otopina (B), jednadžbe pravca i koeficijenti korelacije dobiveni validacijskim parametrom linearnosti

Točnost metode je za svaki analit procjenjivana u triplikatu, na tri koncentracijska nivoa: 27 mg/L, 81 mg/L i 243 mg/L. Dobiveni rezultati izraženi su kao relativna standardna devijacija, a iznosili su 1,33-4,04 % za hidroksitirozol, 1,99-3,42 % za tirosol i 0,64-2,35 % za oleuropein. Preciznost metode potvrđena je injektiranjem šest pripremljenih uzorka špikanih s tirosolom, hidroksitirozolom i oleuropeinom. Vrijednosti relativne standardne devijacije iznosile su 0,84-2,99 % za hidroksitirozol, 0,04–0,13 % za tirosol i 0,86–3,45 % oleuropein. Intermedijarna preciznost provedena je na isti način drugi radni dan, a dobivene vrijednosti standardne devijacije iznosile su 1,12-2,60 % za hidroksitirozol, 1,47-2,79 % za tirosol i 0,67-2,38 % za oleuropein. Dobivene

vrijednosti iskorištenja za špikane uzorke iznosile su 100,9-102,4 % za hidroksitirozol, 99,3-1012,3 % za tirosol i 99,9-100,5 % za oleuropein.

Osjetljivost metode procijenjena je određivanjem limita detekcije (LOD vrijednost), koji je za hidroksitirozol iznosio 1,5 mg/L, za tirosol 1,0 mg/L, a za oleuropein 2,0 mg/L.

Provedenom validacijom je zaključeno da je primjenjena metoda prikladna za određivanje tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina u ekstraktima komine masline. Validirana metoda smatra se specifičnom, linearnom, točnom i preciznom.

### **5.1.3. Određivanje hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina u ekstraktima komine masline dobivenih optimiranim procesom**

Fenolni spojevi hidroksitirozol, tirosol i oleuropein smatraju se glavnim nositeljima pozitivnih zdravstvenih učinaka maslinovog ulja. Njihov učinak potvrđen je jedinom odobrenom zdravstvenom tvrdnjom za maslinovo ulje izdanom u Uredbi Komisije br. 432/2012 (EC, 2012). Prema zdravstvenoj tvrdnji fenoli maslinovog ulja standardizirani na udio hidroksitirosola i njegovih derivata štite čestice lipoproteina male gustoće (LDL) od oksidativnog stresa. Tvrdnja se smije koristiti samo za maslinovo ulje koje sadrži najmanje 5 mg hidroksitirosola i njegovih derivata (npr. kompleks oleuropeina i tirosol) u 20 mg maslinovog ulja, a pozitivan učinak postiže se dnevnim unosom 20 g maslinovog ulja. Iz tog su razloga tijekom ovog istraživanja određivani udjeli hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina u dobivenim ekstraktima komine masline kao vrlo važan izlazni parametar za određivanje i potvrdu optimalnih uvjeta ekstrakcije

Varijacijom parametara ekstrakcije određena je optimalna temperatura i trajanje ekstrakcije, ali ne i optimalno ekstrakcijsko sredstvo (otapalo) budući da su prinosi dobiveni korištenjem 40 % i 60 %-tnog etanola kao otapala bili podjednaki.

Kako bi se preciznije odredilo optimalno otapalo, ali i udjeli fenolnih spojeva kojima se pripisuju pozitivni zdravstveni učinci, ekstraktima za koje su dobivene najveće vrijednosti udjela ukupnih fenola i TEAC antioksidativnog kapaciteta, analiziran je udio tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

Rezultati udjela ukupnih fenola, TEAC antioksidacijskog kapaciteta i kromatografske analize ekstrakata komine masline dobivenih optimiranim procesom ekstrakcije prikazani su u **Tablici 10**.



**Tablica 10:** Udio ukupnih fenola, TEAC antioksidacijski kapacitet i udjeli hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina u etanolnim ekstraktima komine masline

Parametar analize *	40 % EtOH	60 % EtOH
TPC ( <i>mg GAE/g</i> )	3,59±0,07 <sup>a</sup>	3,62±0,03 <sup>a</sup>
TEAC ( <i>mg TE/g</i> )	3,41±0,01 <sup>a</sup>	3,64±0,03 <sup>a</sup>
HTS ( <i>mg/kg</i> )	75,46±0,33 <sup>a</sup>	81,8±0,41 <sup>b</sup>
TS ( <i>mg/kg</i> )	82,08 ±0,13 <sup>a</sup>	86,05±0,34 <sup>b</sup>
OLE ( <i>mg/kg</i> )	110,37±0,07 <sup>a</sup>	115,14±0,19 <sup>b</sup>

Rezultati su izraženi po g svježe komine masline.

a, b-podaci označeni s istim slovom pripadaju istoj statističkoj skupini ( $p>0,05$ ). GAE-ekvivalenti galne kiseline; TE- Trolox ekvivalenti; TPC-udio ukupnih fenola; TEAC- antioksidativni kapacitet izražen kao Trolox. HTS – hidroksitirosol; TS – tirosol; OLE - oleuropein

Udio ukupnih fenola i TEAC antioksidacijski kapacitet nisu se statistički značajno razlikovali kod ekstrakata dobivenih sa 40 %-tnim i 60 %-tnim etanolom.

Nasuprot tome, primjena 60 %-tnog etanola u odnosu na 40 %-tni etanol rezultirala je malim, ali statistički značajnim povećanjem udjela hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina u ekstraktima komine masline. Neovisno o primjenjenom otapalu, prema dobivenim rezultatima najzastupljeniji polifenol u analiziranim ekstraktima je oleuropein.

Za pravilnu interpretaciju rezultata i usporedbu s drugim istraživanjima važna je činjenica da je udio bioaktivnih komponenti u komini masline varijabilan te ovisi o sorti masline, procesu ekstrakcije maslinovog ulja, i vrsti komine masline koja se razlikuje obzirom na proces proizvodnje maslinovog ulja (Demerche, 2013). Usprkos tome, trend dobivenih rezultata te postignuti udjeli tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina usporedivi su s vrijednostima dobivenim u istraživanjima drugih autora. Dobivenim najvećim udjelom oleuropeina u fenolnom sastavu ekstrakata komine masline, potvrđeni su rezultati studija Cioffi i suradnika (2010) i Rubio-Senet i suradnika (2013) u kojima su polifenoli iz komine masline ekstrahirani suvremenim ekstrakcijskim tehnikama pod visokim temperaturama i tlakovima te uz upotrebu raznih organskih otapala.

Nažalost ne postoji uniforman način izražavanja rezultata udjela polifenola u ekstraktima komine masline, pa apsolutne vrijednosti prinosa tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina dobivene u ovom

istraživanju nije bilo moguće usporediti s rezultatima drugih istraživanja. Različiti autori izražavaju apsolutne prinose hidrokstitirosola, tirosola i oleuropeina po gramu suhog ekstrakta, po gramu suhe komine ili po gramu svježeg komine masline, te najčešće bez dodatnih podataka koji bi omogućili preračun i usporedbu rezultata više studija.

### **5.2. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije potpomognute ciklodekstrinima**

Osnovna ideja ovog istraživanja je primarno ekološka jer se temelji na iskorištavanju otpada koji zaostaje nakon prerade maslina za dobivanje inovativnih proizvoda s dodanom vrijednošću. Kako bi cijeli proces, od ideje, preko izvedbe, do krajnjeg produkta bio u potpunosti ekološki prihvatljiv, bilo je izrazito važno tijekom istraživanja koristiti metode procesuiranja i prerade otpada temeljene na ekološkim principima. Zato je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio razviti održivi proces ekstrakcije i daljnje postupake obrade dobivenog produkta.

Tijekom odabira prikladnog procesa ekstrakcije, u obzir su uzeti osnovni principi zelene kemije kao što su upotreba netoksičnih ekstrakcijskih otapala te smanjenje volumena otapala i trajanja ekstrakcije, a čime je povećana i produktivnost procesa. Novije moderne tehnologije ekstrakcije kao što su ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija mikrovalovima, ili ekstrakcija pod viskim tlakom i temperaturom omogućavaju provođenje procesa u skladu s navedenim principima (Carbonell-Capella i sur., 2017; Luque de Castro, 2014). U ovom je istraživanju za ekstrakciju fenolnih komponenti iz komine masline odabrana ultrazvučna ekstrakcija, koja je zbog niže cijene u usporedbi s ostalim modernim ekstrakcijskim tehnikama te jednostavnog skaliranja na industrijske razmjere često primjenjivana u laboratorijima, ali i industrijskim pogonima.

Jedan od osnovnih zahtjeva uspješnog procesa ekstrakcije je dobivanje visokokvalitetnog ekstrakta zadovoljavajuće konzistencije, topljivosti te organoleptičkih svojstava. Glavni problemi koji se vežu uz prirodne (biljne) ekstrakte su loša formulacija i nedostatak standardizacije, tako da su za razvoj visokokvalitetnih nutraceutika i prirodnih prehrambenih aditiva nužne napredne tehnike formulacije.

Ekstrakcija polifenola iz kompleksnih, biljnih matriksa, vrlo je izazovna zbog osjetljivosti fenolnih spojeva na visoke temperature i svjetlo, te dobivanja ekstrakata koji su vrlo često higroskopni, nestabilni i organoleptički neprihvatljivi. Moguće rješenje koje bi omogućilo formulaciju stabilnih ekstrakata s povoljnim organoleptičkim spojevima, je upotreba farmaceutskih ekscipijensa kao što

su cikodekstrini. Iz tog je razloga tijekom formulacije ekstrakta komine masline bogatog oleuropeinom, tirosolom i hidroksitirosolom ideja bila iskoristiti prednosti procesa ultrazvučne ekstrakcije i uklapanja u ciklodekstrinima.

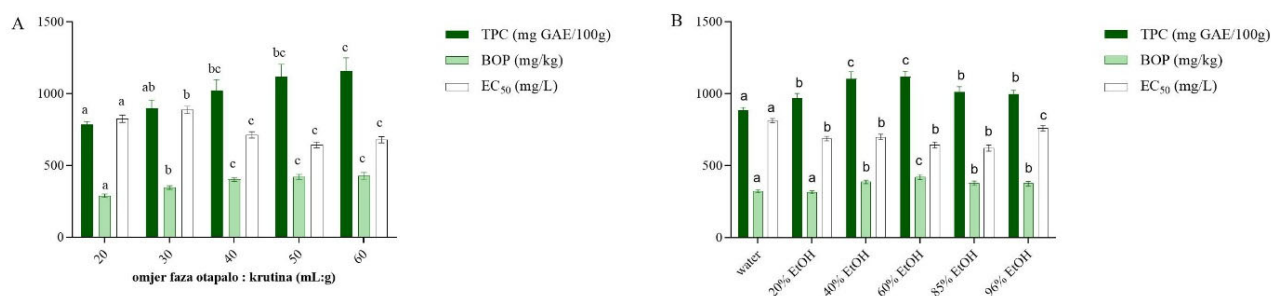
Nakon definiranja optimalnih parametara klasične ekstrakcije, kojima je u prvoj fazi, između ostalog, određeno i optimalno otapalo, u drugoj je fazi istraživanja bilo potrebno optimirati proces ultrazvučne ekstrakcije i definirati količinu i tip ciklodekstrina koji će poboljšati svojstva dobivenog ekstrakta. Na početku druge faze istraživanja je utjecaj otapala i omjera otapala i krutine na udio ukupnih fenola i TEAC antioksidativnu aktivnost ekstrakata dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom. Parametri ultrazvučne ekstrakcije bili su nasumično odabrani, tako da je korištena sonda promjera 25 mm, ekstrakcija je trajala 6 minuta, a provedana je pulsni načinom na 50 % amplitude. Nakon određivanja optimalnog omjera otapala i krutine optimirani su parametri ultrazvučne ekstrakcije, trajanje ekstrakcije, promjer sonde i snaga ultrazvuka. U zadnjem dijelu druge faze istraživanja kombiniran je optimirani proces ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak različitih tipova i količina ciklodekstrina kako bi se dodatno poboljšali prinosi, tehnološka svojstva i stabilnost dobivenih rezultata. Kao izlazni parametri određivani su udio ukupnih polifenola, TEAC antioksidativni kapacitet i udio bioaktivnih polifenola masline koji je dobiven kao suma kromatografski određene koncentracije tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina. Prinosi dobiveni optimiranom ultrazvučnom ekstrakcijom potpomognutu ciklodekstrinima uspoređeni su s prinosima dobivenim klasičnom ekstrakcijom tijekom prve faze istraživanja.

### 5.2.1. Optimizacija omjera ekstrakcijskog sredstva i uzorka tijekom ultrazvučne ekstrakcije

Jedan od ključnih parametara koji utječu na učinkovitost ekstrakcije i kvalitetu dobivenih ekstrakata je maseni/volumni omjer ekstrakcijskog sredstva i uzorka. Iako općenito veća vrijednost omjera povećava ekstrakcijske prinose, iznad određene kritične vrijednosti daljnje povećanje navedenog omjera nema značajnijeg utjecaja na prinos ekstrakcije te rezultira prerazrijeđenim ekstraktima koji zahtjevaju daljnju obradu, čime je onemogućena ekonomska održivost procesa.

U ovom su istraživanju ispitivani omjeri ekstrakcijsko sredstvo-uzorak, koji su iznosili 20 do 60. Svi eksperimenti provedeni su sa 60 %-tnim etanolom, budući da se to otapalo u prvoj fazi istraživanja pokazalo kao optimalno. Kod rezultata prikazanih na **Slici 19A** vidljivi su poboljšani prinosi polifenola u ekstraktima s većom vrijednošću omjera faza. Međutim, takav je utjecaj

primijećen samo kod procesa ekstrakcije u kojima je omjer faza iznosio 40 i manje. Povećanje omjera ekstrakcijsko sredstvo:uzorak iznad 40 nije doprinjelo daljnjem povećanju ekstrakcijskih prinosa. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima drugih autora koji su razvijali metode i optimirali parametre ultrazvučne ekstrakcije polifenola iz raznih vrsta agro- i industrijskog otpada. Vrijednosti omjera faza otapalo:krutina u tim su istraživanjima iznosili 20-50 (Tabaraki i sur., 2012; Sahin i Samli, 2013; Tabarki i Nateghi, 2011).



a, b, c-podaci ozačeni s istim slovom pripadaju istoj statističkoj skupini ( $p>0,05$ ). TPC-udio ukupnih fenola; GAE-ekvivalenti galne kiseline; BOP-bioaktivni polifenoli masline koje čini suma koncentracija hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina.  $EC_{50}$  - koncentracija ekstrakta koja uzrokuje 50 %-tno smanjenje početne apsorbancije.

**Slika 19:** Utjecaj volumnog omjera ekstrakcijskog sredstva i uzorka (A) i vrste ekstrakcijskog sredstva (B) na udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata komine masline

Odabir odgovarajućeg otapala od velike je važnosti za optimizaciju parametara ekstrakcije polifenolnih spojeva, jer ono ne utječe samo na ekstrakcijski prinos nego i na polifenolni sastav dobivenih ekstrakata. Mnoga organska otapala pokazala su se prikladnima za ekstrakciju polifenola masline (Xynos i sur., 2012; Lee i sur., 2009), međutim kod optimizacije „zelene“ ekstrakcije izbor otapala sužen je na tzv. „food grade“ otapala kao što su voda, etanol, metanol, aceton i slično (Bartnik i sur., 2006). Iako se u prvoj fazi istraživanja tijekom optimizacije klasične ekstrakcije kao optimalno otapalo pokazao 60 %-tni etanol, i u drugoj fazi su tijekom optimizacije ultrazvučne ekstrakcije kao otapala ispitivani različiti omjeri vode i etanola. Kao otapala su korištene različite koncentracije etanola, od 0 % do 96 %.

Rezultati su prikazani na **Slici 19B**, a najviši udjeli ukupnih fenola i TEAC antioksidacijskog kapaciteta dobiveni su primjenom 40 % i 60 %-tnog etanola kao otapala. Pri tome su dobivene vrijednosti vrlo slične za oba otapala. Za razliku od udjela ukupnih fenola i TEAC

antioksidacijskog kapaciteta, prinosi bioaktivnih polifenola masline, koje čini suma udjela tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina, bili su značajno viši kod ekstrakata dobivenih sa 60 %-tnim etanolom kao otapalom. Dobivenim rezultatima potvrđeni su rezultati optimizacije klasične ekstrakcije, tijekom koje su najveći prinosi također dobiveni primjenom 60 %-tnog etanola. Za daljnju optimizaciju parametara ultrazvučne ekstrakcije iz tog je razloga izabrano otapalo 60 %-tni etanol.

### 5.2.2. Optimizacija procesnih parametara ultrazvučne ekstrakcije

Ultrazvučna ekstrakcija prikladna je za dobivanje ekstrakata s visokim udjelom bioaktivnih spojeva koji imaju potencijalnu primjenu bilo u izvornom obliku ili pročišćeni. Zbog dobro poznatih prednosti ultrazvučne ekstrakcije svrha ovog istraživanja bila je ispitati mogućnost primjene ultrazvuka za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz komine masline. Iako su neke suvremene tehnike kao što je ekstrakcija superkritičnim CO<sub>2</sub> i ekstrakcija pod visokim tlakom i temperaturom uspješno primjenjene za ekstrakciju fenolnih spojeva iz komine masline (Temelli, 2009; Herrero i sur., 2011; Aliakbarian i sur., 2011), primjena ultrazvučne ekstrakcije za sada nije ispitivana na navedenom matriksu.

Ekstrakcijski kapacitet ultrazvučne ekstrakcije izražen kao antioksidativna aktivnost, udio ukupnih fenola, hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina te ukupni udio bioaktivnih polifenola u ovisnosti o primjenjenim različitim uvjetima ekstrakcije prikazani su u **Tablici 11**. Dobivene vrijednosti uspoređene su s rezultatima dobivenim klasičnom ekstrakcijom.

**Tablica 11:** Udio ukupnih fenola (TFC), udio bioaktivnih biofenola (BAP) i antioksidativna aktivnost ekstrakata komine masline dobivenih tijekom optimizacije ultrazvučne ekstrakcije

SONDA (mm)	SNAGA (%)	VRIJEME (min)	EC <sub>50</sub> (g/L)	TPC (g GAE/kg)	OLE (mg/kg)	HTS (mg/kg)	TS (mg/kg)	BOP (mg/kg)
12	50	3	1,06 ± 0,04A	7,86 ± 0,32A	227,24 ± 2,25A	177,07 ± 3,01A	177,01 ± 1,34A	581,31 ± 4,13A
		6	0,97 ± 0,02A	8,96 ± 0,15B	232,23 ± 0,69AC	193,11 ± 9,37B	174,87 ± 5,88A	600,21 ± 4,18B
		9	<b>0,72 ± 0,20B</b>	10,44 ± 0,42C	<b>252,02 ± 7,38B</b>	<b>192,12 ± 5,22B</b>	184,16 ± 9,05A	628,29 ± 6,90C
	75	3	1,17 ± 0,25A	9,36 ± 0,08B	224,65 ± 1,84A	148,31 ± 1,66C	162,37 ± 1,26B	535,32 ± 1,08E
		6	0,99 ± 0,04A	7,54 ± 0,08A	233,84 ± 5,85AC	182,92 ± 2,58A	176,31 ± 5,10A	593,06 ± 1,82B
		9	<b>0,80 ± 0,03B</b>	11,18 ± 0,17CD	<b>247,01 ± 1,47B</b>	<b>189,81 ± 5,46B</b>	184,88 ± 8,83A	621,70 ± 4,84C
	100	3	1,18 ± 0,07A	8,85 ± 0,38B	221,73 ± 3,88A	146,59 ± 0,24C	154,22 ± 13,75C	522,54 ± 9,62F
		6	1,12 ± 0,04A	10,72 ± 0,02CD	238,49 ± 0,86C	161,48 ± 6,09D	180,39 ± 2,58A	580,36 ± 5,11A
		9	<b>0,76 ± 0,11B</b>	11,45 ± 0,32D	<b>247,80 ± 4,37B</b>	<b>191,48 ± 5,77B</b>	199,20 ± 0,77D	<b>638,48 ± 9,38D</b>
		20	<b>0,73 ± 0,00B</b>	<b>16,31 ± 1,01E</b>	237,62 ± 4,43C	<b>189,25 ± 1,58B</b>	<b>218,23 ± 2,63E</b>	<b>645,10 ± 5,48D</b>
		25	<b>0,74 ± 0,06B</b>	<b>15,97 ± 0,45E</b>	230,73 ± 6,67C	<b>185,13 ± 4,43B</b>	<b>220,17 ± 5,16E</b>	<b>640,15 ± 2,73D</b>
	25	50	3	1,51 ± 0,10a	9,89 ± 0,40a	191,06 ± 0,56a	116,56 ± 0,73a	140,56 ± 7,71a
6			1,56 ± 0,05b	11,3 5 ± 1,25b	190,18 ± 0,43a	102,80 ± 2,28b	117,01 ± 2,32b	409,99 ± 0,33bd
9			0,99 ± 0,02c	7,85 ± 0,14c	200,34 ± 1,56b	108,24 ± 1,04b	117,41 ± 6,68b	426,00 ± 7,20a
75		3	1,76 ± 0,03d	14,66 ± 1,53d	199,71 ± 0,89b	116,74 ± 0,05a	117,30 ± 1,45b	448,18 ± 1,26c
		6	1,16 ± 0,10e	9,77 ± 0,19a	190,27 ± 1,25a	102,71 ± 1,25b	108,62 ± 1,41b	401,59 ± 3,92b
		9	0,89 ± 0,07c	11,15 ± 0,89a	208,77 ± 2,98c	109,88 ± 1,63b	101,28 ± 1,48c	419,93 ± 3,13d
100		3	0,98 ± 0,11c	10,59 ± 0,21a	212,14 ± 0,67c	117,82 ± 6,25a	134,58 ± 6,69a	464,54 ± 6,26e
		6	0,84 ± 0,11c	10,17 ± 0,38a	197,15 ± 3,85b	110,97 ± 12,12b	107,31 ± 6,99c	415,43 ± 2,95d
		9	0,84 ± 0,08c	12,55 ± 0,66e	209,38 ± 2,31c	114,20 ± 6,14ab	98,63 ± 2,06c	422,21 ± 6,39d
Klasična ekstrakcija			<b>0,81 ± 0,09Bc</b>	<b>16,92 ± 1,78Ef</b>	224,57 ± 8,89Ad	<b>187,40 ± 7,11Bc</b>	164,87 ± 1,91Bd	576,85 ± 11,54Af

EC<sub>50</sub> - koncentracija ekstrakta koja uzrokuje 50 %-tno smanjenje početne apsorbancije; TPC-udio ukupnih fenola; GAE-ekvivalenti galne kiseline; BOP-bioaktivni polifenoli masline koje čini suma koncentracija hidroksitirosola (HTS), tirosola (TS) i oleuropeina (OLE).

Podaci označeni s istim slovom pripadaju istoj statističkoj skupini ( $p > 0,05$ ). Rezultati dobiveni klasičnom ekstrakcijom statistički su analizirani s rezultatima dobivenim korištenjem 12 mm sonde (velika tiskana slova) i 25 mm sonde (mala slova). Debelo otisnuti font označava maksimalne prinose postignute u svakoj kategoriji.

Rezultati pokazuju da su najveći prinosi dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom sa sondom promjera 12 mm, i to za sve izlazne parametre. Značajan utjecaj promjera sonde na učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije može se objasniti utjecajem na temperaturu reakcijske smjese. Temperatura koja se razvija tijekom procesa ultrazvučne ekstrakcije je važan parametar koji utječe na proces ekstrakcije povećavajući ili smanjujući njegovu učinkovitost. Ovisno o termalnoj stabilnosti ciljnih komponenti, porast temperature imat će pozitivan ili negativan utjecaj na ekstrakcijski prinos (Šic Žlabur i sur., 2015, Martínez-Patiño i sur., 2018).

Primjenom sonde manjeg promjera (12 mm), temperatura ekstrakcijske smjese se postupno povećavala, a najveća temperatura izmjerena tijekom ekstrakcijskog procesa iznosila je 55 °C. Ultrazvučnom ekstrakcijom sa sondom većeg promjera, 25 mm, temperatura ekstrakcijske smjese je naglo porasla, a najviša izmjerena temperature bila je 82 °C. Visoke temperature nastale primjenom sonde većeg promjera utjecale su na isparavanje otapala, što je bilo osobito izraženo kod duljeg trajanja procesa ekstrakcije (9 min). Na taj je način viša temperatura procesa ekstrakcije utjecala na smanjenje omjera faza otapalo:krutina. Visoke temperature također umanjuju učinak kavitacije te induciraju degradaciju termolabilnih komponenti, čime se smanjuju ekstrakcijski prinosi. Slična opažanja objavljena su u radu Šic Žlabur i suradnika (2015), koji su zaključili da je za ekstrakciju funkcionalnih komponenti iz biljke *Stevia rebaudiana*, sonda promjera 7 mm učinkovitija od sonde promjera 22 mm.

Uz promjer sonde, parametar ultrazvučne ekstrakcije koji je pokazao najizraženiji učinak na ekstrakcijski prinos je vrijeme trajanja ekstrakcije, dok je utjecaj amplitude sonde bio manje izražen. Promatrajući rezultate antioksidativne aktivnosti te udjela oleuropeina i hidrokšitirosole, maksimalni prinosi dobiveni su nakon 9 minutnog procesa, neovisno o primjenjenoj amplitudi sonde. Kod rezultata udjela ukupnih fenola, tirosole i ukupnog udjela bioaktivnih polifenola vidljiv je isti trend, međutim dodatni učinak postignut je povećanjem snage ultrazvuka, pa su maksimalni ekstrakcijski prinosi dobiveni kod 100 %-tne amplitude.

Obzirom na značajnu linearnu korelaciju vremena trajanja ekstrakcije (3 -9 min) i ekstrakcijskih prinosa, ispitivan je i utjecaj produljenog trajanja ekstrakcije (20 min i 25 min) uz 100 %-tnu amplitudu sonde. Trajanje procesa ekstrakcije od 20 minuta utjecalo je na znatno više vrijednosti udjela ukupnih fenola i udjela tirosole te smanjene prinose oleuropeina u dobivenim ekstraktima, dok na ostale parametre nije imalo dodatnog utjecaja. Temeljem dobivenih rezultata i iznesenih

zapažanja, optimalnim uvjetima ultrazvučne ekstrakcije smatraju se: 20 minutni pulsirajući ultrazvuk primjenjen na ekstrakcijsku smjesu sondom promjera 12 mm uz 100 %-tnu amplitudu, uz 60 %-tni etanol kao otapalo te omjer faza otapala i krutine 1:40. Vrlo je važno naglasiti da se pri navedenim uvjetima oleuropein može djelomično razgraditi. Maksimalni prinosi oleuropeina postignuti su pri navedenim uvjetima, ali uz razliku trajanja ekstrakcije od 9 minuta.

Prinosi dobiveni optimiranom ultrazvučnom ekstrakcijom usporedivi su s rezultatima dobivenim klasičnom ekstrakcijom za parametre antioksidativne aktivnosti, udjela ukupnih fenola te udjela hidrokisitirosola. Međutim, primjenom ultrazvučne ekstrakcije dobiveni su značajno viši prinosi oleuropeina, tirosola i ukupnih bioaktivnih polifenola. Osim povećanja prinosa, ultrazvučnom ekstrakcijom značajno je smanjeno vrijeme ekstrakcije i utrošak otapala u odnosu na konvencionalni proces ekstrakcije.

Optimalni procesni parametri dobiveni ovim istraživanjem su u skladu s optimalnim uvjetima objavljenim u studiji Japon-Lujan i suradnika (2006). U navedenom istraživanju je za ekstrakciju biofenola iz lišća masline primjenjena ultrazvučna ekstrakcija sa 59 %-tnim etanolom kao ekstrakcijskim otapalom, sondom promjera 12 mm te u trajanju od 25 minuta. Ipak, optimalni parametri navedene studije kao što su kontinuirani način ekstrakcije, niže temperature i 30 %-tna amplituda, razlikuju se u odnosu na ovo istraživanje, što se može objasniti korištenjem različitog matriksa (lišća masline) tijekom optimizacije procesa.

### **5.2.3. Utjecaj ciklodekstrina na prinose ultrazvučne ekstrakcije**

Ciklodekstrini su skupina cikličkih oligosaharida koji stupaju u interakcije sa različitim bioaktivnim spojevima formirajući inkluzijske komplekse, te na taj način povećavaju njihovu topljivost u vodi, aktivnost, stabilnost i biodostupnost (Pinho i sur., 2014). Zbog njihovih karakterističnih svojstava, u ovom je istraživanju ispitan zajednički utjecaj ciklodekstrina i ultrazvučne ekstrakcije na ekstrakcijske prinose, stabilnost, te raspodjelu veličine čestica i boju dobivenih ekstrakata.

Rezultati utjecaja ciklodekstrina i ultrazvučne ekstrakcije na ekstrakcijske prinose prikazani su u **Tablici 12.**



**Tablica 12:** Utjecaj vrste i količine ciklodekstrina na prinose polifenola i antioksidativnu aktivnost ekstrakata komine masline

PRINOSI <sup>a</sup>	TPC (mg GAE/kg)	HTS (mg/kg)	TS(mg/kg)	OLE(mg/kg)	TEAC(mgTE/kg)
NATIVNI	41,90 ± 0,14	533,49 ± 5,90	709,70 ± 4,23	1090,31 ± 12,78	31,50 ± 0,56
BCD	43,49 ± 1,39b	523,35 ± 5,96	720,74 ± 8,13	1160,83 ± 8,91	32,48 ± 1,64
RAMEB	45,85 ± 1,27b	566,06 ± 33,51	752,38 ± 2,65b	1118,87 ± 41,28	34,29 ± 0,14
RAMEB*	48,65 ± 0,64b	601,10 ± 5,59b	766,25 ± 4,25b	1183,21 ± 9,85b	37,96 ± 3,92b
HPB	45,65 ± 0,41b	588,18 ± 21,90b	789,93 ± 7,86b	1273,26 ± 60,32b	31,57 ± 0,60
HPB*	69,62 ± 1,37b	886,46 ± 12,61b	1117,02 ± 5,81b	1744,37 ± 4,64b	52,21 ± 3,02b
G	40,65 ± 1,17	571,31 ± 14,98	771,76 ± 8,90b	1271,08 ± 10,40b	32,87 ± 0,60
G*	50,37 ± 1,35b	681,54 ± 0,11b	918,63 ± 7,77b	1459,02 ± 31,92b	36,15 ± 1,93

<sup>a</sup>Rezultati utjecaja ekscipijensa na prinose polifenolnih komponenti u dobivenim ekstraktima, izraženi su kao mg analita po kg komine masline uzimajući u obzir različite koncentracije primjenjenih ciklodekstrina

<sup>b</sup>vrijednosti se statistički značajno razlikuju u odnosu na nativni uzorak ( $p < 0,05$ )

\*označava primjenjenu veću koncentraciju ciklodekstrina

TPC-udio ukupnih fenola; GAE-ekvivalenti galne kiseline; HTS -hidroksitirozol; TS – tirozol;OLE – oleuropein; TEAC – antioksidacijski kapacitet izražen kao ekvivalenti Troloxa; TE – Trolox ekvivalenti; BCD-β-ciklodekstrin; RAMEB-nasumično metilirani β-ciklodekstrin; HPB-hidroksipropil β-ciklodekstrin; G-gama ciklodekstrin

Dodatkom ciklodekstrina u ekstrakcijsko sredstvo značajno je povećana ekstraktibilnost svih istraživanih komponenti. Najbolji rezultati postignuti su primjenom većih koncentracija hidroksipropil-β-ciklodekstrina, a zatim i nasumično metiliranog β ili γ-ciklodekstrina, ovisno o komponenti od interesa. Postignuta veća učinkovitost derivata ciklodekstrina kao što su hidroksipropil-β-ciklodekstrin i nasumično metilirani-β-ciklodekstrin u odnosu na β-ciklodekstrin, u skladu je s provedenim istraživanjima Pinho i suradnika (2014) te Lopez-Nicolas i suradnika (2014).

Pozitivni učinci uklapanja u ciklodekstrine na poboljšanu ekstraktibilnost polifenola iz komine masline može se objasniti mogućim nastankom inkluzijskih kompleksa, čije je nastajanje potvrđeno u studijama više autora. Oleuropein stvara stabilne inkluzijske komplekse s β-ciklodekstrinom (Efmorfopoulou i Rodis, 2004; Mourtzinos i sur., 2007; Barao i sur., 2013), a stabilni inkluzijski kompleksi potvrđeni su i kod tirozola koji ih može formirati s β-ciklodekstrinom, hidroksipropil-β-ciklodekstrinom i metil-β-ciklodekstrinom (Garcia-Padial i sur,

2013). Nastajanjem inkluzijskih kompleksa omogućen je željeni utjecaj ciklodekstrina na povećanu topljivost polifenola masline u vodi i njihovu kemijsku stabilnost tijekom procesa ultrazvučne ekstrakcije. Navedena svojstva su osobito značajna za ovo istraživanje obzirom na saznanja da ultrazvuk može potaknuti degradaciju i/ili oksidaciju pojedinih fenolnih komponenti.

### 5.3. Karakterizacija suhih ekstrakata

#### 5.3.1. Kemijski sastav suhih ekstrakata komine masline

Ekstrakti komine masline analizirani u ovom dijelu istraživanja, dobiveni su optimiranim procesom ultrazvučne ekstrakcije korištenjem netoksičnih otapala, mješavine vode i etanola, kako je opisano u prethodnim poglavljima. Dobivenim ekstraktima određivan je kemijski sastav. Kao što je prikazano u **Tablici 13**, najzastupljenije polifenolne komponente u analiziranim ekstraktima bili su derivati hidroksitirosola: hidroksitirosol, tirosol i oleuropein, čije su koncentracije bile u rasponu od 16,29 do 51,29 mg/100g. Koncentracije jednostavnih fenolnih kiselina (3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, homovanilinska kiselina i *p*-hidroksibenzojeva kiselina) bile su znatno niže, u rasponu od 0,33 do 3,72 mg/100g.

**Tablica 13:** Sadržaj glavnih fenolnih komponenti u suhom ekstraktu komine masline

Derivati hidroksitirosola (mg/100g)		Fenolne kiseline (mg/100g)	
Hidroksitirosol	51,26 ± 0,40 <sup>A</sup>	3,4-dihidroksibenzojeva kiselina	3,72 ± 0,47 <sup>A</sup>
Tirosol	88,67 ± 1,17 <sup>B</sup>	Vanilinska kiselina	2,16 ± 0,13 <sup>B</sup>
Oleuropein	16,29 ± 0,39 <sup>C</sup>	Homovanilinska kiselina	1,25 ± 0,12 <sup>C</sup>
		<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	0,33 ± 0,058 <sup>D</sup>

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija 3 paralelna mjerenja (n=3).

Za svaku grupu spojeva, srednje vrijednosti označene različitim slovom (od A do D) značajno se razlikuju ( $p=0,05$ )

Općenito su dobiveni rezultati u skladu s dostupnim podacima o sastavu komine masline objavljenim u drugim studijama, prema kojima su hidroksitirosol, tirosol i oleuropein istaknuti kao glavne polifenolne komponente komine masline (Aliakbarian i sur., 2011; Cioffi i sur., 2010; Herrero i sur., 2011). Međutim, zastupljenost pojedinih polifenolnih komponenti u analiziranim suhim ekstraktima komine masline nije podudarna s podacima objavljenim u navedenim

studijama. Prema literaturnim podacima, oleuropein je istaknut kao najzastupljenija fenolna komponenta, što nije u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Cioffi i sur. (2010) su u svom radu istaknuli znatno niže koncentracije hidroksitirosola i tirosola u ekstraktima komine masline dva različita kultivara (8,4-10,4 mg/kg i 20,7-21,6 mg/kg) u odnosu na dobivenu koncentraciju oleuropeina (81,7-83,0 mg/kg). Aliakbarian i sur. (2011) određivali su kemijski sastav ekstrakata komine masline dobivenih u reaktoru pod visokom temperaturom i visokim tlakom i dobili rezultate koji ukazuju na relativno niski udio hidroksitirosola i tirosola (21,9 i 21,2 mg/100 g suhe komine) i visoki udio oleuropeina (203,1 mg/100 g suhe tvari). Navedene studije potvrđuje i prijašnja faza ovog istraživanja, u kojoj je, tijekom optimizacije ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak ciklodekstrina, dobivena koncentracija oleuropeina u nativnim ekstraktima bila znatno viša (1090 mg/kg, **Tablica 12.**).

Dobivene nepodudarnosti u rezultatima mogu se objasniti činjenicom da udio oleuropeina u maslinovom ulju i nusproduktima njegove proizvodnje može jako varirati ovisno o sorti masline, fazi sazrijevanja, uvjetima prerade i sl. (Ryan i sur., 1999). S obzirom na kompleksnost i trajanje triju faza ovog istraživanja, komina masline je iz mlinova dobivana kroz dulji vremenski period te je za treću fazu prikupljena tijekom veljače. U to je doba godine plod masline u tzv. crnoj fazi dozrijevanja, tijekom koje je izražena hidroliza spojeva velike molekulske mase kao što je oleuropein, a kao produkti nastaju tirosol i hidroksitirosol (Cimato, 1990). Korištenje komine masline sa izraženim stupnjem hidrolize oleuropeina smatra se glavnim razlogom dobivanja ekstrakata bogatijih tirosolom i hidroksitirosolom, a sa smanjenim udjelom oleuropeina.

Poznato je, da neovisno o karakteristikama i sastavu sirovine, na kemijski sastav suhih ekstrakata komine masline uz vrstu ekstrakcije i proces sušenja, značajno utječe dodatak pomoćnih sredstava kao što su ciklodekstrini. Utjecaj primjene različitih vrsta ciklodekstrina tijekom formulacije suhih ekstrakata komine masline na sastav i udio polifenola, prikazan je u **Tablici 14.**

**Tablica 14:** Utjecaj ciklodekstrina na udio derivata hidroksitirosola i kemijsku antioksidativnu aktivnost suhих ekstrakata komine masline

Parametar	nDOPE	hpDOPE	ramDOPE	bDOPE	gDOPE
Hydroxytyrosol (mg/kg)	513,1±4,77 <sup>A</sup>	716,8±16,97 <sup>B</sup>	663,6±39,03 <sup>B</sup>	497,4±5,67 <sup>A</sup>	527,1±12,87 <sup>A</sup>
Tyrosol (mg/kg)	870,1±35,07 <sup>A</sup>	715,7±19,92 <sup>B</sup>	950,9±7,61 <sup>C</sup>	804,9±0,33 <sup>AC</sup>	777,7±7,65 <sup>BC</sup>
Oleuropein (mg/kg)	166,0±7,45 <sup>A</sup>	249,4±5,93 <sup>B</sup>	157,6±12,96 <sup>A</sup>	171,4±1,00 <sup>A</sup>	226,8±10,19 <sup>B</sup>
HTD (mg/kg)	1549,2±22,9 <sup>A</sup>	1682±8,9 <sup>B</sup>	1772,1±44,4 <sup>B</sup>	1473±4,3 <sup>A</sup>	1531±30,7 <sup>A</sup>
TRC (mg/g GAE)	39,24±0,042 <sup>A</sup>	50,97±0,516 <sup>B</sup>	53,16±0,164 <sup>C</sup>	44,21±0,878 <sup>D</sup>	42,71±0,45 <sup>D</sup>
IC <sub>50</sub> against DPPH (g/L)	1,65±0,129 <sup>A</sup>	1,039±0,129 <sup>B</sup>	1,032±0,094 <sup>B</sup>	1,175±0,007 <sup>B</sup>	1,429±0,083 <sup>A</sup>
TEAC (mg/g TE)	12,86±0,419 <sup>A</sup>	15,44±0,133 <sup>B</sup>	17,07±0,51 <sup>C</sup>	14,00±0,33 <sup>A</sup>	12,71±0,24 <sup>A</sup>
ORAC (mg/kg TE)	152,8±5,06 <sup>AB</sup>	166,5±7,51 <sup>A</sup>	165,8±6,34 <sup>A</sup>	142,7±10,21 <sup>B</sup>	162,8±10,24 <sup>A</sup>

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija 4 paralelna mjerenja (n=4).

Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku između rezultata ( $p < 0,05$ )

HTD-derivati hidroksitirosola (zbroj vrijednosti dobivenih za hidroksitirosol, tirosol i oleuropein); GAE-ekvivalenti galne kiseline; TRC- ukupni redukcijski kapacitet; DPPH-2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; TE – Trolox ekvivalenti; TEAC – antioksidacijski kapacitet izražen kao ekvivalenti Troloxa; ORAC-sposobnost apsorpcije kisikovih radikala, nDOPE-nativni suhi ekstrakt komine masline; hpDOPE-suhi ekstrakt komine masline s dodatkom hidroksipropil β-ciklodekstrina; ramDOPE-suhi ekstrakt komine masline pripremljen s nasumično metiliranim β-ciklodekstrinom; bDOPE- suhi ekstrakt komine masline pripremljen s β-ciklodekstrinom; gDOPE- suhi ekstrakt komine masline pripremljen s γ-ciklodekstrinom.

Prisutnost ciklodekstrina u ekstrakcijskom otapalu značajno je utjecala na udio hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina u suhim ekstraktima komine masline. Nasumično metilirani β-ciklodekstrin i hidroksipropil β-ciklodekstrin utjecali su na povećanje udjela hidroksitirosola, nasumično metilirani β-ciklodekstrin dodatno je povećao i prinose tirosola, a hidroksipropil-β-ciklodekstrin oleuropeina. Ukoliko se promatraju prinosi ukupnih derivata hidroksitirosola, najučinkovitijim ciklodekstrinima pokazali su se također nasumično metilirani β-ciklodekstrin i hidroksipropil-β-ciklodekstrin.

Dobiveni rezultati podkrijepljuju prijašnja saznanja, prema kojima je β-ciklodekstrin sa promjerom centralne šupljine od 8 Å najprikladniji za uklapanje polifenolnih komponenti maslinovog ulja (Efmorfopoulou i Rodis., 2004; Efmorfopoulou i Rodis., 2005). Tako tirosol stvara stabilne inkluzijske komplekse s nativnim β-ciklodekstrinom te njegovim 2-hidroksipropil i metiliranim derivatima (García-Padial i sur., 2013). Kompleksacija hidroksitirosola s β-

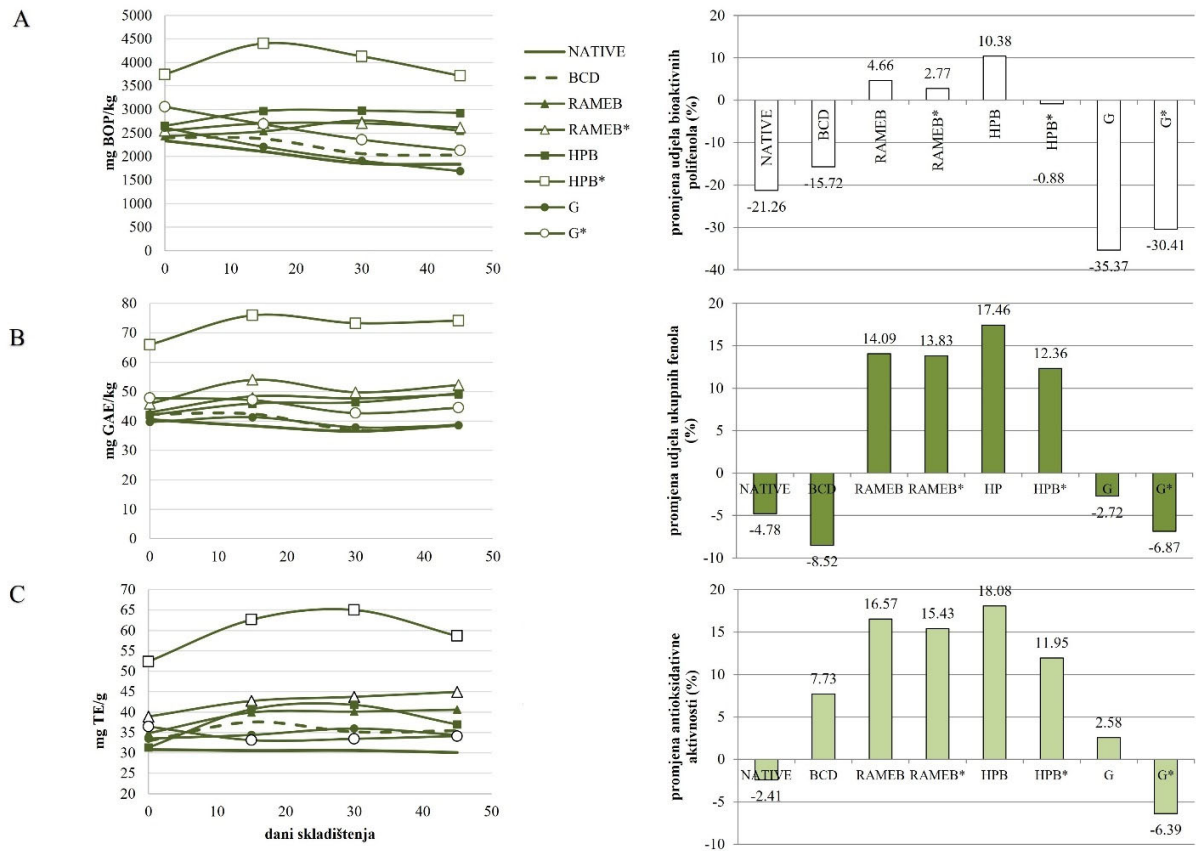
ciklodekstrinom utjecala je na jaku foto-zaštitu polifenolnih komponenti prilikom izlaganja UV zračenju ( $\lambda=254$  nm). Oleuropein tvori stabilne inkluzijske komplekse s  $\beta$ -ciklodekstrinom koji imaju pozitivan učinak štiteći ga od oksidacije i povećavajući mu topljivost za 50 % (Mourtzinou i sur., 2008).

Analizirajući rezultate dobivene za  $\gamma$ -ciklodekstrin, vidljivo je da je njegova je primjena tijekom ovog istraživanja imala pozitivan učinak jedino na prinose oleuropeina, što se može objasniti većom centralnom šupljinom  $\gamma$ -ciklodekstrina u odnosu na  $\beta$ -ciklodekstrin. Veći promjer centralne šupljine  $\gamma$ -ciklodekstrina prikladan je za uklapanje većih molekula kao što je oleuropein, međutim ne odgovara manjim molekulama tirosole i hidroksitirosole.

U svakom slučaju, na temelju provedenih ispitivanja, može se zaključiti da formiranje inkluzijskih kompleksa povećava topljivost uklopljenih komponenti od interesa u vodenim otopinama (kao što su vodenno-etanolne otopine primjenjene u ovom istraživanju), štiti ih prilikom procesa sušenja, te u konačnici rezultira njihovim većim prinosima u finalnom proizvodu.

### 5.3.2. Stabilnost suhih ekstrakta komine masline

Uklapanje u ciklodekstrine može pozitivno utjecati i na stabilnost dobivenih ekstrakata. Utjecaj analiziranih ciklodekstrina na 45-dnevnu stabilnost ekstrakata komine masline prikazan je na **Slici 20**.



\*označava primjenjenu veću koncentraciju ciklodekstrina

BOP-bioaktivni polifenoli masline koje čini suma koncentracija hidroksitirosola (HTS), tirosola (TS) i oleuropeina (OLE); GAE-ekvivalenti galne kiseline; TE – Trolox ekvivalenti; NATIVE – ekstrakt komine masline bez dodatka ciklodekstrina; BCD – beta ciklodekstrin; RAMEB – nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin; HPB - hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin; G –  $\gamma$ -ciklodekstrin

**Slika 20:** Utjecaj vrste i koncentracije ciklodekstrina na udio bioaktivnih polifenola (A), udio ukupnih fenolnih spojeva (B) i antioksidacijsku aktivnost (C) komine masline tijekom ispitivanja stabilnosti u trajanju od 45 dana

Provedeno je ubrzano ispitivanje stabilnosti suhih ekstrakata komine masline bez i s dodatkom ciklodekstrina. Tijekom skladištenja suhih ekstrakata komine masline u periodu od 45 dana utvrđeno je malo povećanje ili smanjenje udjela pojedinih fenolnih spojeva u analiziranim ekstraktima, ovisno o primjenjenoj vrsti ciklodekstrina. Najbolji rezultati postignuti su ponovno s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom, a zatim s nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom, neovisno o primjenjenoj koncentraciji ciklodekstrina. Kod uzoraka s kompleksiranim  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrinima nije zabilježen protektivni učinak tijekom ispitivanja stabilnosti. Dobiveni rezultati mogu se objasniti različitim učincima koje inkluzijski kompleksi mogu imati na stabilnost i degradaciju

uklopljene molekule (Tønnesen i sur., 2002; Kayaci i Uyar, 2011; Pinho i sur., 2014). Utjecaj ciklodekstrina na određena svojstva uklopljene molekule ovisi o strukturi formiranih inkluzijskih kompleksa. Ukoliko se reaktivni dio uklopljene molekule nalazi unutar centralne šupljine ciklodekstrina, smanjuje se degradacija molekule, međutim u slučaju smještaja njenog reaktivnog dijela izvan ciklodekstrinske šupljine, zaštitni mehanizam ciklodekstrina ne dolazi do izražaja. Štoviše, interakcije između reaktivnih grupa i uklopljene molekule i substituenata vezanih za molekulu ciklodekstrina, mogu uzrokovati dodatnu destabilizaciju i degradaciju uklopljene molekule (Loftsson i Brewster, 2010; Cugovčan i sur., 2017). Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da je kompleksacijom sa hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom i nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom omogućeno najpovoljnije mikrookruženje za uklopljene polifenole komine masline. Stvaranje inkluzijskih kompleksa s tako supstituiranim ciklodekstrinima zaštitilo je fenolne spojeve od degradacije prilikom skladištenja na povišenoj temperaturi (45 °C). Rast antioksidativne aktivnosti, udjela ukupnih fenola i ukupnih bioaktivnih polifenola kao posljedice interakcije s ciklodekstrinima primjećen tijekom ovog istraživanja, zabilježen je i u studijama drugih autora. Povećanje udjela polifenolnih komponenti objašnjeno je mogućim mikrobiološkim rastom ili reakcijama između oksidiranih polifenola kojima su formirane nove komponente s izraženom antioksidativnom aktivnošću (Kallithraka i sur., 2009; Martinez-Flores i sur., 2015). Nedostatak protektivnog učinka  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina može se objasniti strukturalnim inkoptibilnostima s bioaktivnim polifenolima komine masline. Navedena pretpostavka nažalost se ne može potvrditi dobivenim eksperimentalnim ni dostupnim literaturnim podacima.

### 5.3.3. Utjecaj uklapanja u ciklodekstrine na organoleptička svojstva suhih ekstrakata

Raspodjela veličine čestica je vrlo važna karakteristika praškastih proizvoda, kojom se utvrđuju njihova svojstva i kvaliteta. Reološka svojstva te otpuštanje aktivne tvari kod uklopljenih bioaktivnih komponenti ovisi o veličini čestica praha (Zabot i Meireles, 2016). Iz tog su razloga liofilizirani ekstrakti komine masline uklopljeni u različite vrste ciklodekstrina pri različitim koncentrijama analizirani primjenom laserske difrakcije te im je određena srednja vrijednost promjera čestica ( $d_{[4,3]}$ ), indeks polidisperznosti (*eng. polydispersity index*, PDI) (**Tablica 15.**) i raspodjela veličine čestica (**Slika 21.A**).

**Tablica 15:** Utjecaj primjenjenog tipa i koncentracije ciklodekstrina na parametre boje i veličinu čestica ekstrakta komine masline

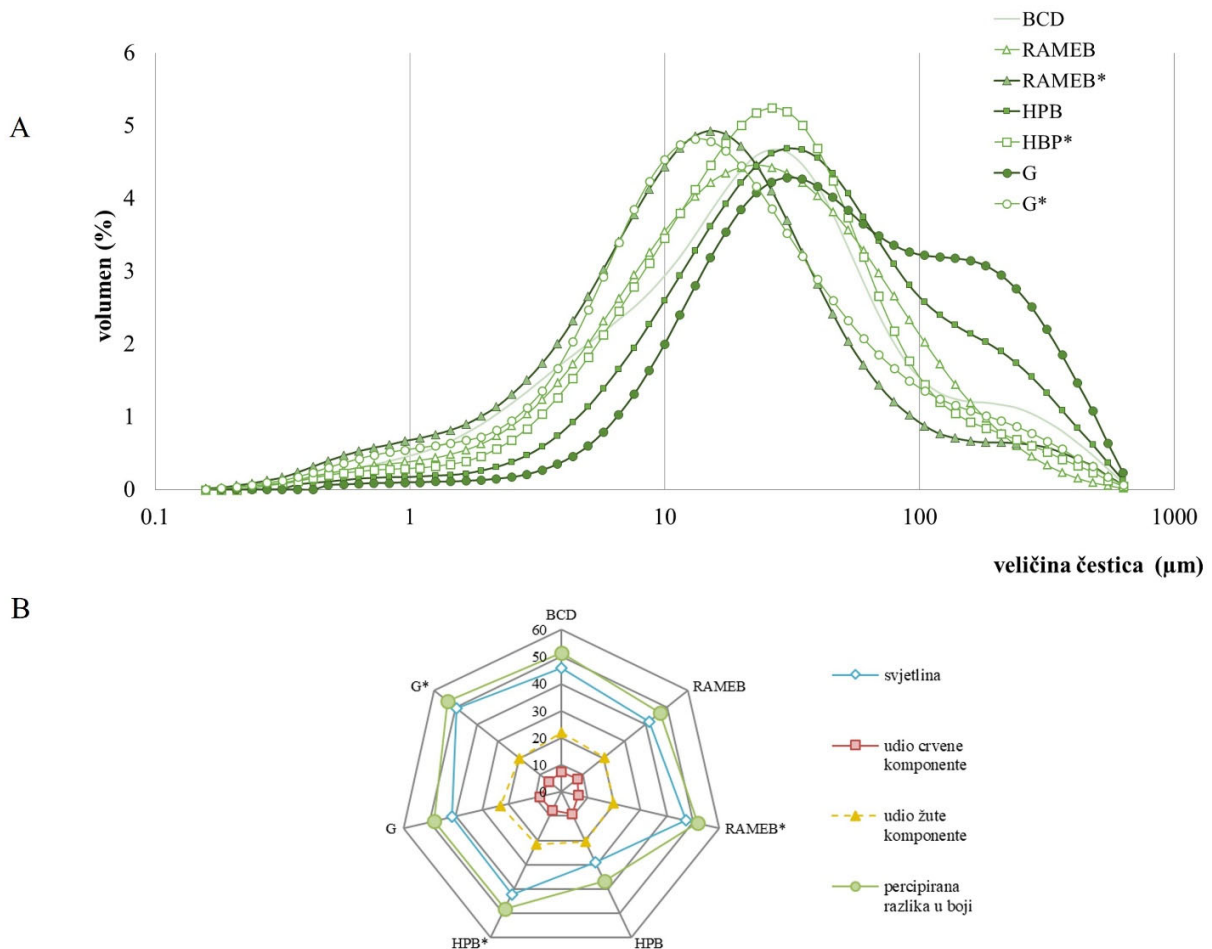
Ekstrakt komine masline	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	D <sub>[3,4]</sub>	PDI
NATIVE	16,05±0,09a	1,48±0,02a	1,73±0,06a	-	-
BCD	62,13±0,25b	8,93±0,11b	23,49±0,15b	48,34±0,29a	5,73±0,03a
RAMEB	58,47±1,39c	9,15±0,11b	21,87±0,17c	38,01±0,35bf	4,38±0,00b
RAMEB*	63,77±0,40b	7,89±0,15c	21,39±0,04c	33,36±0,28c	5,01±0,05c
HPB	44,54±0,59d	10,54±0,25d	22,14±0,01d	66,19±0,74d	5,36±0,02d
HPB*	58,70±0,47c	9,16±0,16b	23,14±0,16b	40,13±0,19b	3,82±0,00e
G	57,55±0,28c	9,80±0,33b	24,79±0,15e	89,26±0,14e	5,16±0,02f
G*	65,34±0,59b	7,43±0,16c	21,41±0,12c	39,04±0,11f	6,34±0,01g

Podaci označeni s istim slovom pripadaju istoj statističkoj skupini ( $p>0,05$ ).

\*označava primjenjenu veću koncentraciju ciklodekstrina.

L-svjetlina; a-udio crvene komponente; b-udio žute komponente; d[4,3]-srednja vrijednost promjera; PDI-indeks polidisperznosti; BCD-β-ciklodekstrin; RAMEB-nasumično metilirani β-ciklodekstrin; HPB-hidroksipropil β-ciklodekstrin; G-gama ciklodekstrin





\*označava primjenjenu veću koncentraciju ciklodekstrina. BCD- $\beta$ -ciklodekstrin; RAMEB-nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin; HPB-hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrin; G-gama ciklodekstrin

**Slika 21:** Utjecaj primjenjenog tipa i koncentracije ciklodekstrina na raspodjelu veličine čestica (A) i percipiranu razliku u boji (B) ekstrakata komine masline

Suhi ekstrakti komine masline dobiveni su liofilizacijom ekstrakata komine masline pripremljenih optimiranom ultrazvučnom ekstrakcijom s dodatkom različitih tipova i količina ciklodekstrina. Kao što je vidljivo iz prikazanih podataka, dodatak ciklodekstrina u ekstrakcijsko otapalo značajno je promijenio izgled suhih ekstrakata. Nativni ekstrakt komine masline pokazao se izuzetno nestabilnim i higroskopskim. U vrlo kratkom vremenskom periodu nakon izlaganja atmosferskim uvjetima nativni su ekstrakti postali ljepljive i gumene konzistencije, te nije bilo moguće provesti analizu raspodjele veličine čestica.

Ekstrakti komine masline uklopljeni u ciklodekstrine su nakon liofilizacije bili u obliku voluminoznih pahuljica te ih je prije analize raspodjele veličina čestica bilo potrebno samljeti u fini prah i prosijati. Analizom je dobivena normalna raspodjela veličine čestica, a srednja vrijednost veličine čestica prikazana kao volumna distribucija čestica značajno se razlikovala ovisno o primjenjenoj količini i tipu ciklodekstrina ( $p < 0,05$ ). Vrijednosti  $d_{[3,4]}$  bile su u rasponu od 33,36  $\mu\text{m}$  za nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin do 89,26  $\mu\text{m}$  za  $\gamma$ -ciklodekstrin. Srednji promjer veličine čestica jako se razlikovao i u ovisnosti o primjenjenoj koncentraciji ciklodekstrina, tako da su značajno niže  $d_{[3,4]}$  vrijednosti dobivene kod ekstrakata sa višim koncentracijama ciklodekstrina. Indeks polidisperznosti značajno se razlikovao obzirom na primjenjenu vrstu ciklodekstrina, pa su dobivene vrijednosti u rasponu od 3,82 za ekstrakte s hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrinom do 6,34 za ekstrakte s  $\gamma$ -ciklodekstrinom. Rezultati indeksa polidisperznosti upućuju na ujednačeniju raspodjelu veličine čestica kod ekstrakata s hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrinom.

Boja proizvoda smatra se vrlo važnim svojstvom jer je njena promjena ključna u mnogim procesima proizvodnje, u fazi istraživanja i razvoja proizvoda te tijekom kontrole kvalitete. Budući da različiti promatrači mogu različito percipirati boju istog uzorka, potrebno je eliminirati utjecaj promatrača kako bi se ispravno opisala boja. To je omogućeno kolorimetrima kojima se uspoređuje jakost boje uzoraka poznate i nepoznate koncentracije, a dobiveni rezultati matematički opisuju izmjerenu boju. Tijekom ovog istraživanja su ispitivani parametri boje ekstrakata komine masline uklopljenih u različite ciklodekstrine te su uspoređivani s nativnim ekstraktom komine masline. Dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 15** i na **Slici 21B**, iz kojih je vidljiv značajan utjecaj tipa i količine primjenjenog ciklodekstrina na boju dobivenog ekstrakta.

Uklapanje u ciklodekstrine najviše je utjecalo na parametar svjetline koji se razlikovao u odnosu na nativni ekstrakt 28,8-49,6 %. Parametri promjene udjela crvene i žute komponente također su značajno porasli kod ekstrakata s ciklodekstrinima u odnosu na nativni ekstrakt (6,08-9,26 % za udio crvene komponente i 19,67-22,99 % za udio žute komponente). Dobivena je visoka percipirana razlika u boji koja je iznosila 36,54-53,79, što upućuje na očigledne razlike između ekstrakata s dodatkom ciklodekstrina i nativnog ekstrakta komine masline (**Slika 21.B**).

Uspoređujući međusobno ekstrakte uklopljene u ciklodekstrine, najizraženija razlika u boji vidljiva je na istim koncentracijskim nivoima  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina. Više koncentracije primjenjenog

pojedinih ciklodekstrina (od 0,8 do 1,6 g/100 mL) utjecale su na povećanje svjetline, međutim nisu imale značajan utjecaj na udio crvene i žute komponente u analiziranim uzorcima.

Uz važnost praćenja promjene boje tijekom razvojnih i proizvodnih procesa, vrlo je bitna i dobivena konačna boja proizvoda, jer je to parametar koji jako utječe na preferencije potrošača, osobito ako se radi o hrani ili dodatku prehrani. Kod potencijalne primjene ekstrakata komine masline kao dodatka prehrani, parametar svjetline uzorka može se smatrati poželjnom karakteristikom jer doprinosi postizanju boje što sličnije boji izvorne namirnice. Prema tome se može zaključiti da ciklodekstrini pokazuju pozitivan učinak na boju ekstrakata komine masline, povećavajući njihovu svjetlinu, a najizraženiji efekt postignut je primjenom  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina.

### 5.3.4. Antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline u kemijskim modelima

Antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline koje se međusobno razlikuju po dodanom tipu ciklodekstrina određivana je uobičajenim kemijskim modelima, a dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 14**.

Ukupni redukcijski kapacitet svih ekstrakata komine masline uklopljenih u ciklodekstrine bio je značajno viši u odnosu na nativni ekstrakt komine masline. Razlika je osobito izražena kod rezultata dobivenih primjenom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina i nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina, za koji je određen i najviši ukupni redukcijski kapacitet (53.16 mg/g GAE). Sposobnost hvatanja slobodnih radikala određivana je primjenom ABTS<sup>+</sup> (TEAC metoda) i DPPH<sup>•</sup> radikala. Značajno povećanje sposobnosti vezanja ABTS<sup>+</sup> radikala postignuto je kod uzoraka komine masline uklopljenih u hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin i nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin, a DPPH<sup>•</sup> radikala dodatno i interakcijom s  $\gamma$ -ciklodekstrinom. Poboľjšana antioksidativna aktivnost može se objasniti većim udjelom derivata hidroksitirosola, prisutnih kod ekstrakata s dodatkom ciklodekstrina. Naime, poznato je da su hidroksitirosol, tirosol i oleuropein najznačajniji antioksidansi komine masline (Clemente i sur., 1997; Suárez i sur., 2009), a njihova antioksidativna aktivnost može se dodatno povećati uklapanjem u komplekse s ciklodekstrinima jer su unutar kompleksa zaštićeni od oksidacije uzrokovane slobodnim radikalima (Mercader-Ros i sur., 2010).

Sposobnost antioksidansa komine masline da inhibira oksidaciju uzrokovanu peroksilnim radikalom određivana je ORAC metodom, koja ima uvjete za standardizaciju kao AOAC (**eng.** *Association of Official Analytical Chemists*) metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta hrane i dodataka prehrani. Karakteriziraju je brojne prednosti poput jednostavnosti, ponovljivosti, primjene biološki relevantnog izvora slobodnih radikala, primjenjivosti za hidrofilne i lipofilne antioksidanse, te se lako koristi u rutinskim analizama kontrole kvalitete (Prior i sur., 2005). Provođenjem ORAC metode obuhvaćena su različita kinetička ponašanja antioksidanasa čime se dobiva točniji uvid u njihova svojstva (Terpinc i sur., 2009). Iz tog je razloga unatoč nekim kritikama i izazovima (Amorati i Valgimigli, 2015; Pincemail i sur., 2015) i dalje jedna od najprimjenjivijih metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta hrane. Antioksidacijska aktivnost uzoraka izračunata je preko površine ispod krivulje (**eng.** *net Area Under Curve*, nAUC), dobivene mjerenjem fluorescencije uzoraka (i blanka) tijekom 45 minuta. Baždarni dijagram dobiven je grafički, iz ovisnosti dobivene nAUC o odgovarajućoj koncentraciji Troloxa. Kao što je vidljivo iz rezultata prikazanih u **Tablici 14**, ORAC antioksidativna aktivnost bila je viša kod ekstrakata sa enkapsuliranim hidroksipropil- $\beta$  i nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom, što je u skladu s rezultatima dobivenim drugim metodama određivanja antioksidativne aktivnosti.

Dobiveni rezultati generalno potvrđuju prednosti primjene ciklodekstrina tijekom ekstrakcije komine masline i liofilizacije dobivenih ekstrakata. Kao što je i u prethodnom poglavlju zaključeno, dodatak ciklodekstrina može utjecati na povećanje ekstraktibilnosti polifenolnih komponenti (vjerojatno formiranjem inkluzijskih kompleksa koji povećavaju topljivost željene komponente u hidrofilnom otapalu te njenu stabilnost tijekom procesa ekstrakcije). Stvaranjem inkluzijskih kompleksa (García-Padial i sur., 2013; Barão i sur., 2014) te uklapanjem molekule polifenola masline u centralnu šupljinu ciklodekstrina, dodatno je povećana njena stabilnost tijekom procesa ekstrakcije i liofilizacije. U konačnici su dobiveni suhi ekstrakti komine masline karakterizirani većom antioksidativnom aktivnošću.

Prema rezultatima dobivenim ispitivanjem antioksidativne aktivnosti u kemijskim modelima, vidljive su prednosti hidroksipropil- $\beta$  i nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina u odnosu na ostale primjenjene vrste ciklodekstrina. Glavni razlog može biti sterička kompatibilnost i veća stabilnost kompleksa glavnih fenolnih komponenti masline s hidroksipropil- $\beta$  i nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom. Stoga su suhi ekstrakti komine masline kompleksirani s hidroksipropil- $\beta$  i nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom odabrani za daljnje analize u različitim biološkim i

model sustavima hrane, a njihova antioksidativna aktivnost uspoređivana je s aktivnošću nativnog ekstrakta komine masline te sa najčešće korištenim sintetskim antioksidansima (BHA ili Trolox).

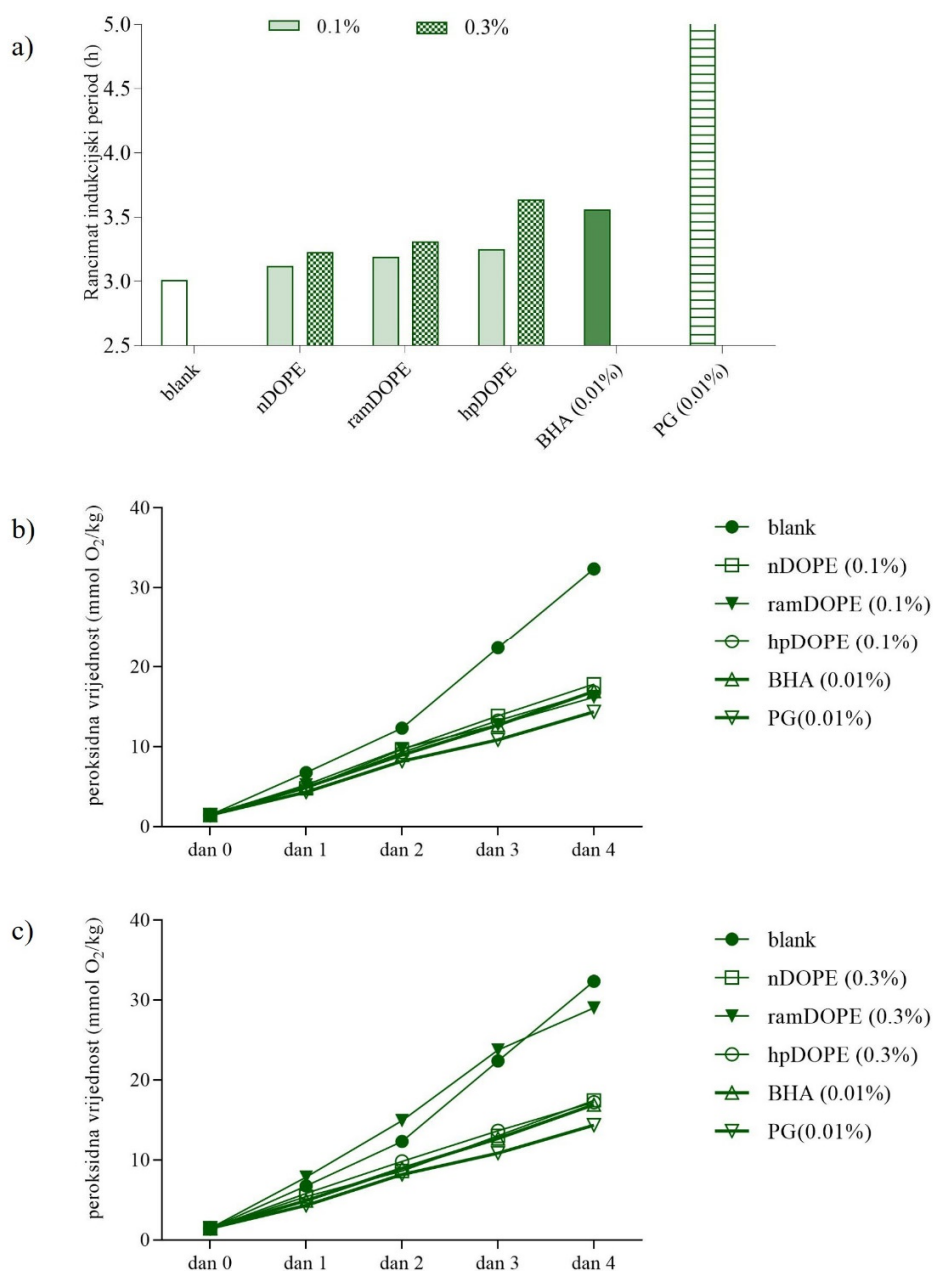
### **5.3.5. Antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline u model sustavima hrane**

#### **5.3.5.1. Antioksidativna aktivnost u model sustavu ulja**

Oksidacija lipida smatra se glavnim uzrokom smanjenja kvalitete ulja, te može uzrokovati formiranje toksičnih komponenti i nepoželjni okus ulja. Oksidativna stabilnost ulja primarno ovisi o sastavu masnih kiselina, prisutnosti antioksidativnih i prooksidativnih komponenti te njihovim interakcijama (Shahidi i Zhong, 2010). Procesi oksidacije u uljima mogu biti zaustavljeni različitim metodama kao što je smanjanje udjela zraka u pakiranju, uvođenje inertnih plinova kao što su dušik i ugljikov dioksid i eliminacija kisika iz pakiranja. Općeprihvaćeni i široko korišteni postupak zaštite ulja od oksidacije je i dodatak sintetskih antioksidanasa kao što su butilhidroksitoluen (BHT) ili propil galat (PG). Međutim, sve su češće rasprave o sigurnosti njihove primjene te mogućem utjecaju na ljudsko zdravlje kod dugotrajne izloženosti, što je dovelo do izraženog zahtjeva potrošača za primjenom antioksidansa iz prirodnih izvora. Jedna od glavnih mana primjene prirodnih antioksidansa je njihova visoka cijena. Naime, potrebno ih je koristiti u višim koncentracijama od sintetskih antioksidansa, a za njihovu proizvodnju potrebna je velika količina biljnog materijala. Moguće rješenje navedenog problema bila bi izolacija prirodnih antioksidansa iz otpada prehrambene industrije kao dostupnog izvora biljnog materijala, a postupak njihovog dobivanja bio bi održiv i isplativ.

Osnovna tema i ideja ovog rada bila je izolacija prirodnih antioksidansa iz komine masline, nusprodukta proizvodnje maslinovog ulja, pa je kao odgovor na navedeni izazov ispitana mogućnost njihove primjene u zaštiti ulja od oksidacije.

Pregledom literature uočeno je da su Mohammadi i sur. (2016) pokazali da se antioksidativna zaštita sojinog ulja ne može postići primjenom prirodnih antioksidansa ekstrakta lista masline, međutim koncentracije uzorka u navedenom istraživanju bile su vrlo niske, pa su u eksperimentalnom dijelu ovog rada primjenjene 3 do 10 puta više koncentracije. Ispitivan je utjecaj suhih ekstrakata komine masline na smanjenje peroksidacije hladno prešanog ulja šafranike, a primjenjivana su dva pristupa ubrzane oksidacije ulja: Rancimat metoda na 110 °C i Schaal Oven test koji se provodio na 65 °C (**Slika 22.**).



nDOPE-nativni suhi ekstrakt komine masline; hpDOPE-suhi ekstrakt komine masline s dodatkom hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina; ramDOPE-suhi ekstrakt komine masline pripremljen s nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom; BHA-butlhidroksianisol; PG-propil galat

**Slika 22:** Antioksidativna aktivnost suhих ekstrakata komine masline u ulju. (a) Rancimat indukcijski period; (b) peroksidna vrijednost ulja šafranike tijekom skladištenja s 0,1 % -tnim suhim ekstraktima komine masline; (c) peroksidna vrijednost ulja šafranike tijekom skladištenja s 0,3 %-tnim suhim ekstraktima komine masline

Kod Rancimat testa dodatak suhих ekstrakata komine masline utjecao je na povećanje indukcijskog perioda, a utjecaj je ovisio o primjenjenoj koncentraciji. Dodatak 0,3 % suhog ekstrakta komine masline pokazao je viši zaštitni učinak u odnosu na primjenu 0,1 % suhog ekstrakta komine masline (**Slika 22.a**). Osim primjenjene više koncentracije, uklapanje u ciklodekstrine značajno je povećalo antioksidativnu učinkovitost analiziranih suhих ekstrakata komine masline, i to od 2,3 % u slučaju dodatka nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina, do 12,7 % kod dodatka hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina. Suhi ekstrakti komine masline uklopljeni u ciklodekstrine u koncentraciji od 0,3 % pokazali su antioksidativnu učinkovitost ekvivalentnu koncentraciji 0,01 % sintetskog antioksidansa butilhidroksianisola. Sintetski antioksidans propil galat utjecao je na najbolju antioksidativnu stabilnost tijekom Rancimat testa, a njegova učinkovitost na koncentracijskom nivou od 0,01 % bila je približno 60 % viša u odnosu na 0,1 %-tni koncentracijski nivo suhих ekstrakata komine masline.

Glavni nedostatak Rancimat testa kod određivanja oksidativne stabilnosti biljnih ulja je primjena visokih temperatura koje su nužne kako bi se postigla zadovoljavajuća osjetljivost i selektivnost metode. Na visokim temperaturama se oksidacijski procesi u uljima mijenjaju te se mogu jako razlikovati od oksidacijskih procesa koji se odvijaju pri normalnim uvjetima skladištenja. Puno češće dolazi do sekundarnih reakcija oksidacije, a formiranje peroksida postaje ovisno o koncentraciji kisika. Iz tog je razloga određivanje peroksidne vrijednosti pri blažim uvjetima (65 °C tijekom Schaal Oven testa) pouzdaniji indikator oksidacijskih procesa koji se odvijaju pri normalnim uvjetima skladištenja (**Slika 22.b** i **Slika 22.c**).

Kao što je vidljivo iz rezultata dobivenih Schaal Oven testom, učinkovitost sintetskog antioksidansa butilhidroksianisola (BHA) u koncentraciji 0,01 % je niža od antioksidativne učinkovitosti suhих ekstrakata komine masline kompleksiranih s hidroksipropil- $\beta$  i nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom koncentracije 0,1 % (4.-ti dan skladištenja). Propil galat se i u ovom testu pokazao najsnažnijim antioksidansom, ali je njegova superiornost u odnosu na suhe ekstrakte komine masline manje izražena nego u Rancimat testu. Kod dobivenih rezultata uočeno je da je tijekom Schaal Oven testa, primjenom viših koncentracija suhих ekstrakata komine masline (0,3 %), došlo do povećanog formiranja peroksida u ulju šafranike, što upućuje na mogućí prooksidativni utjecaj. Budući da je ta pojava uočena samo kod ekstrakata komine masline uklopljenih u ciklodekstrine, a ne kod nativnih ekstrakata komine masline, može se zaključiti da ciklodekstrini (osobito nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin) mogu utjecati na povećanje lipidnih

peroksida u ulju. Ta pretpostavka nije u skladu s rezultatima dobivenim Rancimat metodom, prema kojima je viša koncentracija nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina utjecala na bolju antioksidativnu zaštitu. Nesklad dobivenih rezultata može se objasniti različitim metodologijama Rancimat i Schal Oven testa. Glavna razlika primjenjenih testova je u tome što se Schal Oven testom mjeri peroksidna vrijednost ulja, koja obuhvaća primarne reakcijske produkte, a Rancimat metodom se detektira udio sekundarnih reakcijskih produkata koji se formiraju tijekom kasnijih stadija lipidne peroksidacije.

Na temelju aktivnosti ovisne o koncentraciji kod Rancimat testa, može se zaključiti da suhi ekstrakti komine masline pružaju antioksidativnu zaštitu ulja primarno inhibirajući formiranje sekundarnih reakcijskih produkata lipidne peroksidacije. Taj je zaključak u skladu s rezultatima studije López-Nicolás i sur. (2014), prema kojima se ciklodekstrini mogu primjeniti kao snažni inhibitori sekundarnih oksidacijskih reakcija u hrani (reakcije smeđenja).

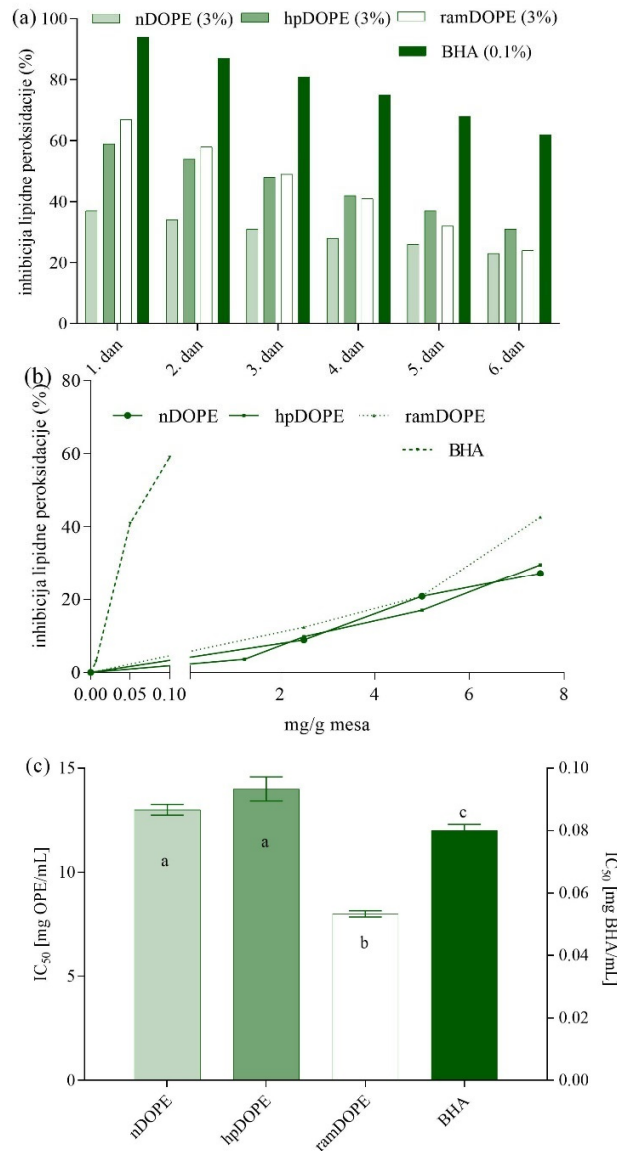
### 5.3.5.1. Antioksidativna aktivnost u model sustavu mesa

Tijekom skladištenja mesa najznačajniji faktor koji utječe na smanjenje njegove kvalitete je proces lipidne peroksidacije, koji dovodi do stvaranja aldehida odgovornih za užegli okus i specifične promjene boje mesa (Fasseas i sur., 2008). U mesnoj industriji se kao i u industriji ulja za sprječavanje lipidne peroksidacije primjenjuju sintetski antioksidansi kao što su butil hidroksianisol i butilhidroksi toluen. Obzirom na brojne prednosti i sve veći interes za primjenom prirodnih antioksidansa, sve se češće istražuje potencijal primjene biljnih ekstrakata bogatih antioksidansima kao aditiva u mesnoj industriji.

Nakon što je antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline dobivenih u ovom istraživanju ispitana u model sustavu ulja, željela se ispitati njihova primjena i antioksidativni utjecaj i u mesnim model sustavima.

Antioksidativna učinkovitost suhih ekstrakata komine masline procjenjivana je u sustavu mljevenog mesa primjenom dva pristupa, stabilitetnim ispitivanjem tijekom skladištenja na 4 °C te ubrzanim stabilitetnim ispitivanjem, a dobiveni rezultati uspoređivani su s aktivnošću sintetskog antioksidansa butil hidroksianisola (**Slika 23.**).





nDOPE-nativni suhi ekstrakt komine masline; hpDOPE-suhi ekstrakt komine masline s dodatkom hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina; ramDOPE-suhi ekstrakt komine masline pripremljen s nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom; BHA-butlhidroksianisol;  $IC_{50}$ -koncentracija koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju. Različita slova iznad stupaca označavaju značajnu razliku između rezultata ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 23:** Oksidativna stabilnost mljevenog mesa tijekom skladištenja na 4 °C te tijekom ubrzanog stabilitetnog ispitivanja. (a) oksidativna stabilnost tijekom skladištenja na 4 °C; (b) inhibicija lipidne peroksidacije mesa tijekom ubrzanog stabilitetnog ispitivanja u odnosu na koncentraciju antioksidansa; (c) antioksidativna stabilnost prema lipidnoj peroksidaciji tijekom ubrzanog stabilitetnog ispitivanja izražena kao  $IC_{50}$ .

Uklapanjem u ciklodekstrine značajno je povećana učinkovitost suhih ekstrakata komine masline kod inhibicije lipidne peroksidacije mesa tijekom skladištenja na 4 °C. U usporedbi s kontrolnim mjerenjem, tijekom šestodnevnog stajanja, postignuta je inhibicija lipidne peroksidacije koja je za nativni suhi ekstrakt komine masline iznosila 37-23 %, za ekstrakte komine masline s dodatkom hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina 59-31 %, a za ekstrakte s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina 67-24 %.

Poboljšana antioksidativna učinkovitost ekstrakata komine masline uklopljenih u ciklodekstrine vidljiva je i kod ubrzanog ispitivanja stabilnosti. Ispitivane su različite koncentracije suhih ekstrakata komine masline, a dobiveni podaci korišteni su za izračun koncentracije koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju ( $IC_{50}$  vrijednost). Niske  $IC_{50}$  vrijednosti dobivene su tijekom primjene suhih ekstrakata komine masline uklopljenih u nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin (**Slika 23.b**, **Slika 23.c**), čime je dokazano da je interakcija s nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom djelomično učinkovita kod povećanja antioksidativne učinkovitosti ekstrakata komine masline. Slični rezultati dobiveni su i tijekom primjene hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina te nativne komine masline.

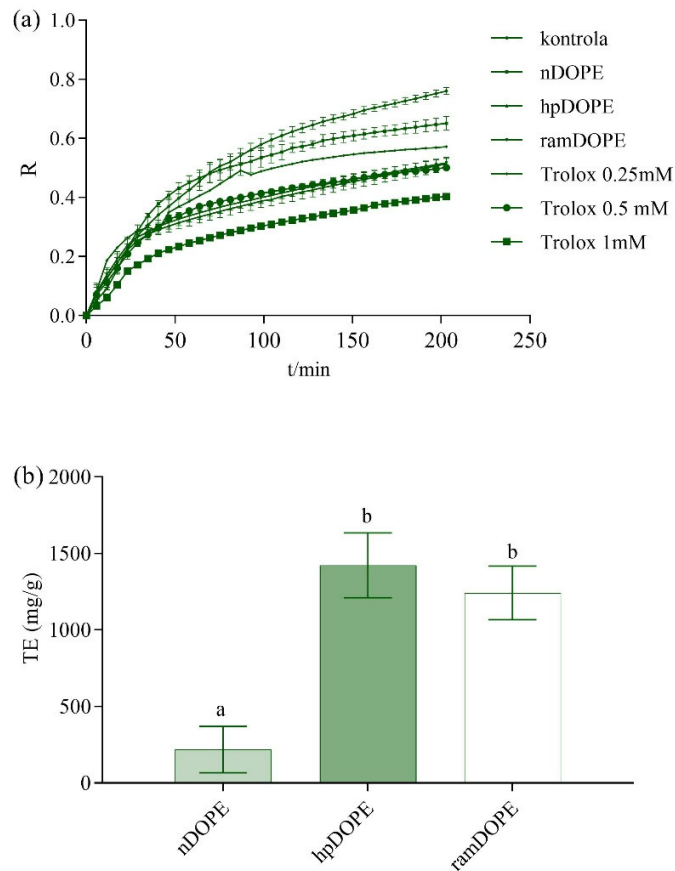
Razlike u rezultatima dobivenim primjenom dva pristupa stabilitetnog ispitivanja mogu se objasniti visokim temperaturama koje se primjenjuju tijekom ubrzanog ispitivanja stabilnosti (80 °C). Visoke temperature vjerojatno utječu na stabilnost kompleksa ciklodekstrina i polifenola masline ili mijenjaju kinetiku i kemiju reakcija lipidne oksidacije koje se prirodno odvijaju u mesu tijekom stajanja.

Oba su pristupa pokazala da su ekstrakti komine masline djelotvorni u prevenciji lipidne peroksidacije u mesu (u usporedbi s kontrolnim mjerenjem), međutim njihova je učinkovitost značajno manja u odnosu na sintetski antioksidans butilhidroksianisol. Kako bi se postigli učinci sličniji butil hidroksianisolu (0,01 %), suhi ekstrakti komine masline trebali bi se primjenjivati u koncentraciji 1-3 %. Navedene više koncentracije su u skladu s drugim objavljenim podacima. Tanabe i suradnici (2002) dokazali su antioksidativnu učinkovitost 22 biljna ekstrakta kao što su origano, kadulja, timijan i sl. u mesnim modelima, a primjenjivani su u koncentracijama 0.5-2.5 %, što je usporedivo s podacima dobivenim tijekom ovog istraživanja. I drugi su autori primjenjivali svježe pripremljene ekstrakte ljekovitog bilja za prevenciju lipidne peroksidacije u mesnim modelima (Fasseas i sur., 2008). U odnosu na ostale studije, pristup primjenjen tijekom ovog istraživanja ima mnoge prednosti, a najznačajnije su iskorištenje visoko dostupne sirovine

(otpada prehrambene industrije) za pripremu ekstrakata, upotreba ekoloških ekstrakcijskih tehnika i formulacija stabilnog suhog ekstrakta koji je jednostavan za manipulaciju i skladištenje. Primjena suhih ekstrakata komine masline kao prirodna alternativa konvencionalnim antioksidansima koji se koriste u mesnoj industriji smatra se ekonomski isplativim, jednostavnim i održivim procesom.

### **5.3.5.2. Antioksidativna aktivnost u $\beta$ -karoten emulzijskom modelu**

Metodama i testovima za određivanje antioksidativne aktivnosti najčešće se dobivaju rezultati izmjereni u određenoj vremenskoj točki u vodenom mediju. Određivanje antioksidativne aktivnosti u jednoj, unaprijed određenoj vremenskoj točki ne uzima u obzir kinetiku procesa i nepotrebno ga pojednostavljuje, što može utjecati na dobivanje netočnih rezultata ili pogrešnu interpretaciju dobivenih rezultata. Važnost kinetike antioksidacijskih procesa osobito je izražena kod istraživanja prirodnih ekstrakata koje čine kompleksne mješavine pro- i antioksidansa (Prieto i sur., 2012). Kako bi se ekstraktima komine masline dobivenim u ovom istraživanju, što točnije odredila antioksidativna aktivnost, analizirani su u  $\beta$ -karoten emulzijskom modelu koji u obzir uzima i kinetiku antioksidacijskih procesa te ispituje primjenjivost ekstrakta u modelu. Antioksidativna aktivnost u sustavu  $\beta$ -karoten-linoleatne emulzije mjerena je kinetičkim modelom praćanja omjera inhibicije absorbancije tijekom inkubacije od 200 min (**Slika 24**).



nDOPE-nativni suhi ekstrakt komine masline; hpDOPE-suhi ekstrakt komine masline s dodatkom hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina; ramDOPE-suhi ekstrakt komine masline pripremljen s nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom; BHA-butlhidroksianisol;  $IC_{50}$ -koncentracija koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju. Različita slova iznad stupaca označavaju značajnu razliku između rezultata ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 24:** Antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline u  $\beta$ -karoten emulzijskom modelu. (a)  $\beta$ -karoten inhibicijski omjer tijekom inkubacije od 120 minuta; (b) antioksidacijska aktivnost izražena kao  $IC_{50}$ .

Prema prikazanim rezultatima vidljivo je da je kod ekstrakata uklopljenih u ciklodekstrine značajno povećana inhibicija izbjeljivanja  $\beta$ -karotena uzrokovana hidroksiperoksidnim radikalima linolenske kiseline. Dobiveni je trend rezultata u skladu s rezultatima provedenih kemijskih testova određivanja antioksidativne aktivnosti. Pritom je pozitivan učinak ciklodekstrina još izraženiji u sustavu emulzije u odnosu na vodeni medij, u kojemu se odvijaju kemijske metode. Tako je sposobnost analiziranih ekstrakata za vezanjem  $ABTS^+$  radikala iznosila 12,86-17,07 mg/gTE u usporedbi sa  $\beta$ -karoten emulzijskim modelom gdje je ona iznosila 1509-1749 mg/g TE.

$IC_{50}$  vrijednosti dobivene u DPPH testu iznosile su 1,03-1,65 g/L, dok je u  $\beta$ -karoten emulzijskom sustavu postignuto 50 %-tno povećanje antioksidativne zaštite primjenom suhih ekstrakata komine masline koncentracije 0,125 g/L. Primjećene razlike mogu se djelomično objasniti slabijom učinkovitošću Troloxa u emulziji tipa ulje u vodi, obzirom da se radi o u vodi topljivom obliku vitamina E, ali u svakom slučaju dobiveni rezultati upućuju na primjenjivost suhih ekstrakata komine masline kao antioksidansa u emulzijskim sustavima. Također, rezultati ukazuju na ograničenja kemijskih testova u procjeni primjenjivosti prirodnih ekstrakata kao antioksidansa u hrani. Naime, u modelima hrane stvoreni su uvjeti koji preciznije i točnije opisuju realne uvjete oksidacije hrane te iz tog razloga osiguravaju dobivanje pouzdanijih rezultata. Mnogi se lipidi u hrani nalaze u emulzijama tipa ulje u vodi (mlijeko, majoneza, razni umaci i pića), a takvi su sustavi osobito osjetljivi na oksidaciju zbog velikih specifičnih površina koje potiču interakciju ulja s prooksidansima u vodenoj fazi (Zhong i Shahidi, 2015). Iz tog je razloga ispitivanje antioksidativne aktivnosti u emulzijama toga tipa osobito važno.

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju u skladu su s rezultatima Singh i suradnika (2002) koji su utvrdili da ekstrakti sjemenki i kožice nara povećavaju antioksidativnu zaštitu u  $\beta$ -karoten-linoleatnom modelu za 20-40 %. Slični su rezultati dobiveni i za različite ekstrakte *Centaurea* vrste (1 g/L) (Zengin i sur., 2010).

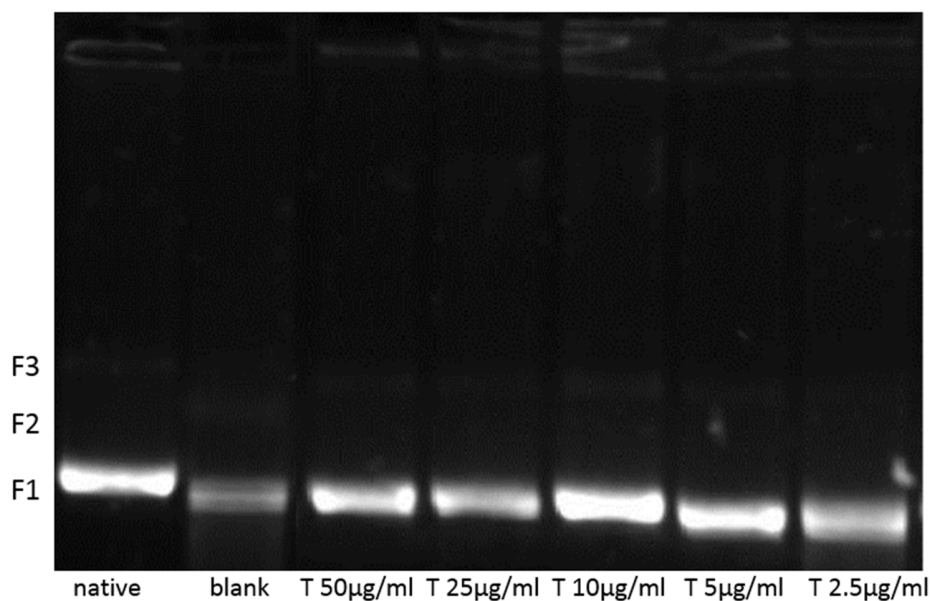
### **5.3.6. Antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline u biološkim model sustavima**

#### **5.3.6.1. Antioksidativna aktivnost u model sustavu plazmidne DNA**

Slobodni radikali koji nastaju u staničnom metabolizmu ili pod utjecajem egzogenih tvari mogu reagirati s biomolekulama stanice, pa tako i sa DNA. Oksidativna oštećenja DNA nastala djelovanjem slobodnih radikala imaju utjecaj na mnoge biološke procese kao što je starenje, mutagenaza i karcinogeneza (Dizdaroglu i sur., 2002). Zato je izrazito važno ispitati mogući učinak antioksidansa na smanjenje ili inhibiciju oksidativnih oštećenja DNA. Primjena plazmidne DNA kao biološkog supstrata smatra se napretkom u razvoju nestaničnih bioloških modela za određivanje antioksidativne aktivnosti. Model sustav plazmidne DNA primjenjivalo je više autora tijekom evaluacije biološke aktivnosti kompleksnih prirodnih ekstrakata (Chatti i sur., 2011; Suksomtip i sur, 2008).

Nativna konformacija plazmidne DNA u *in vivo* sustavima je superkoloidna uzvojnica, a tijekom izolacije cilj ju je zadržati u navedenom nativnom obliku. Međutim, različiti vanjski čimbenici, kao što su slobodni radikali mogu uzrokovati promjenu oblika DNA u opušteni kružni plazmid, linearni plazmid (oba lanca dvostruke uzvojnice su odrezana na istom mjestu) ili otvoreni kružni plazmid s jednim lancem (nastaje kidanjem vodikovih veza). Svaka od navedenih konformacija plazmidne DNA pokazuje različitu mobilnost u agaroznom gelu tijekom elektroforeze. Otvoreni kružni plazmid s jednim lancem najbrže migrira u agaroznom gelu, a slijede ga superkoloidna uzvojnica, linearni plazmid te opušteni kružni plazmid.

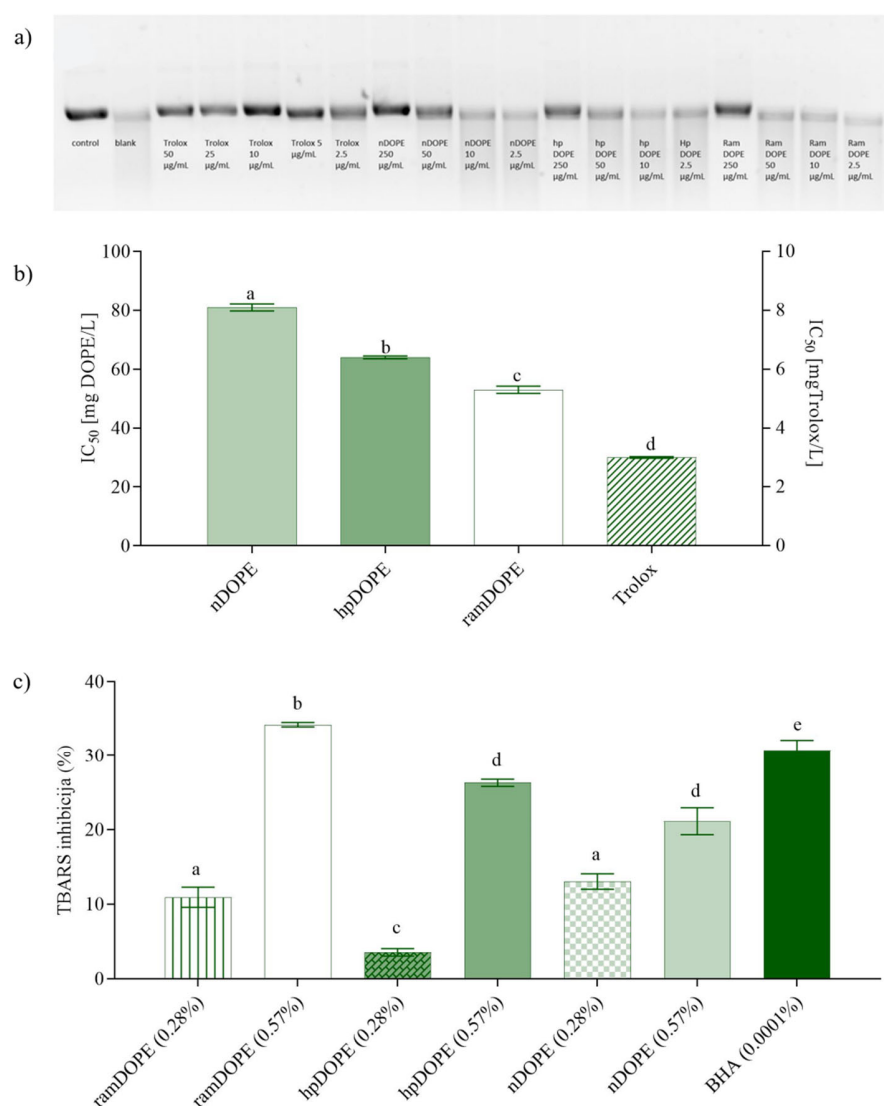
U model sustavu plazmidne DNA primjenjen je 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid radikal (AAPH<sup>•</sup>) kako bi inducirao oštećenje nativne superkoloidne plazmidne DNA, a nastale promjene praćene su u agaroznom gelu. U kontrolnom uzorku DNA je bila prisutna u superkoloidnom obliku te u manjoj mjeri kao opušteni kružni plazmid. Dodatkom AAPH<sup>•</sup> radikala značajno je smanjen udio superkoloidnog i opuštenog kružnog plazmida, a povećan je udio linearne DNA, što upućuje na znatna oksidativna oštećenja. Dodatkom antioksidansa uvelike je smanjen štetni utjecaj AAPH<sup>•</sup> radikala, a protektivni učinak ovisio je o primjenjenoj dozi antioksidansa (**Slika 25.**).



Native - nativni uzorak, DNA u fosfatnom puferu; blank - DNA+AAPH, bez antioksidansa; T - DNA+AAPH+Trolox; F1: nativni, superkoloidni oblik; F2: linearni plazmid; F3: opušteni kružni plazmid

**Slika 25:** Oblici plazmidne pBR322 DNA vidljivi nakon elektroforeze u agaroznom gelu u prisutnosti/odsutnosti slobodnih radikala (AAPH) i/ili antioksidansa (Trolox)

Analizirani suhi ekstrakti komine masline značajno su štitili plazmidnu DNA od oksidativnih oštećenja uzrokovanih djelovanjem AAPH<sup>\*</sup> radikala. Aktivnost ispitivanih ekstrakata ovisila je o primjenjenoj dozi (**Slika 26.**). Koncentracije analiziranih ekstrakata iznosile su od 2,5mg/L do 250 mg/L (**Slika 26.a**) te su stavljene u korelaciju s dobivenim retencijama superkoloidne DNA kako bi se izračunale  $IC_{50}$  vrijednosti za svaki uzorak (**Slika 26.b**).



nDOPE-nativni suhi ekstrakt komine masline; hpDOPE-suhi ekstrakt komine masline s dodatkom hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina; ramDOPE-suhi ekstrakt komine masline pripremljen s nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom; BHA-butilhidroksianisol;  $IC_{50}$ -koncentracija koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju. Različita slova iznad stupaca označavaju značajnu razliku između rezultata ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 26:** Inhibicija cijepanja plazmidne DNA i antioksidacijska aktivnost suhih ekstrakata komine masline u model sustavu liposoma. (a) superkoloidni (nativni) oblik plazmidne pBR322 DNA u gelu za elektroforezu nakon inkubacije s AAPH, bez ili uz dodatak antioksidansa; (b) antioksidacijsko djelovanje na cijepanje plazmidne DNA, izraženo kao  $IC_{50}$ . (c) antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline u model sustavu liposoma.



$IC_{50}$  vrijednost dobivena za suhi ekstrakt komine masline uklopljene u nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrinom (53 mg/L) slična je vrijednosti dobivenoj za suhi ekstrakt komine masline s hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrinom (64 mg/L), a znatno niža od vrijednosti dobivene za nativni suhi ekstrakt komine masline (81 mg/L). Mehanizam kojim bi se mogao objasniti protektivni učinak analiziranih ekstrakata je njihova sposobnost hvatanja reaktivnih kisikovih spojeva. Navedena teorija potvrđena je i rezultatima dobivenim mjerenjem antioksidativne aktivnosti suhih ekstrakata komine masline u kemijskim modelima (ORAC, ABTS, DPPH) (**Tablica 14.**).

Primjena ciklodekstrina u formulaciji suhih ekstrakata komine masline značajno je povećala antioksidativnu aktivnost finalnog proizvoda, najvjerojatnije utječući na povećanje udjela derivata hidroksitirosola, glavnih antioksidativnih spojeva u suhim ekstraktima komine masline. Iako su dobivene  $IC_{50}$  vrijednosti visoke u odnosu na referentni antioksidans (Trolox,  $IC_{50}=3$  mg/L), njihove efektivne koncentracije su usporedive s aktivnošću različitih biljnih ekstrakata dobivenom u studijama drugih aurora (Chatti i sur., 2011; Suksomtip i Pongsamart, 2008). Dobiveni rezultati i navedene spoznaje upućuju na veliki potencijal suhih ekstrakata komine masline uklopljenih u ciklodekstrine u daljnjim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima.

### 5.3.6.2. Antioksidativna aktivnost u model sustavu liposoma

Liposomi su građeni kao sferični fosfolipidni dvosloji, a budući da mogu oponašati stanične strukture, koriste se kao modelni membranski sustavi. Često se koriste kao sustavi prijenosa ksenobiotika jer ciljano usporavaju njihovo otpuštanje, povećavaju dostupnost aktivne komponente i imaju protektivna svojstva (Yuan i sur., 2017). Zbog takvih svojstava je potencijalna primjena liposoma vrlo široka te obuhvaća različita područja, od medicine, kozmetičke industrije, prehrambene industrije do poljoprivrede. U istraživanju i razvoju koriste se kao model sustavi za ispitivanje interakcija lijeka s membranama u smislu učinkovitosti, toksičnosti i farmakokinetike (Knobloch i sur., 2015). Budući da osiguravaju prirodno okruženje za proučavanje mehanizma djelovanja aktivnih tvari, mogu se koristiti za procjenu mogućih interakcija prirodnih antioksidansa sa biološkim membranama, a štite ih i od oksidativne degradacije. Balducci i suradnici (2018) su u svom radu naglasili važnost model sustava liposoma kao izvanstaničnih modela u istraživanju antioksidativne aktivnosti. Iznimno su korisni i kod istraživanja vezanih za prehrambenu industriju, jer se mogu primjeniti za mjerenje sposobnosti određenog antioksidansa

da tijekom skladištenja ili toplinskog tretmana inhibira reakciju lipidne peroksidacije i formiranje reaktivnih spojeva tiobarbiturine kiseline (TBARS).

U ovom su radu liposomi pripremljeni soniciranjem lipidne disperzije te su primjenjeni za praćenje učinkovitosti suhih ekstrakata komine masline kod inhibicije lipidne peroksidacije. Reakcija lipidne peroksidacije inducirana je bakrovim ionima tijekom inkubacije na 37 °C. Dobiveni rezultati (**Slika 26.c**) generalno ukazuju na sposobnost komine masline da značajno inhibira lipidnu peroksidaciju u modelu liposoma kod obje primjenjene koncentracije (0,28 i 0,57 %). Budući da je vidljivo da je stopa inhibicije nastajanja malondialdehida (MDA) ovisna o primjenjenoj dozi, mehanizam bi mogao biti povezan s povećanom koncentracijom suhih ekstrakata komine masline na liposomima, koja je omogućila bolju antioksidativnu zaštitu.

Antioksidativna aktivnost analiziranih ekstrakata razlikovala se ovisno o primjenjenom tipu ciklodekstrina na oba koncentracijska nivoa.

Kod nižih koncentracija, nativni ekstrakti komine masline i oni uklopljeni u nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin pokazuju znatno veću stopu inhibicije lipidne peroksidacije (13,0 % i 10,9 %) u odnosu na ekstrakte komine masline s hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrinom (3,5 %). Tako je najbolja antioksidativna aktivnost na nižim koncentracijskim nivoima postignuta kod nativnog ekstrakta komine masline i ekstrakta komine masline s nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom.

Ekstrakti komine masline s nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom su i tijekom primjene u višim koncentracijama pokazali najveću učinkovitost u usporedbi s ostalim analiziranim antioksidansima te je dobivena stopa inhibicije (34,2 %) bila najbližnja stopi inhibicije butilhidroksianisola (30,7 %), koji je korišten kao kontrolni antioksidans.

Dobiveni rezultati mogu se objasniti udjelom tirosola u analiziranim suhim ekstraktima komine masline (**Tablica 14.**). Naime, sadržaj hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina kao najzastupljenijih fenolnih spojeva komine masline (**Tablica 13.**) pokazuje dobru korelaciju s antioksidativnom aktivnošću određivanom kemijskim modelima: ukupnim redukcijskim kapacitetom (**eng.** *Total Reducing Capacity*, TRC), ABTS antiradikalnom aktivnošću i ORAC rezultatima (koeficijenti korelacije iznosili su: 0,8556, 0,8764 i 0,7838). Udio tirosola se u model sustavu liposoma smatra osobito važnim jer je tirosol karakteriziran značajno većom  $\log P$  vrijednošću ( $\log P = 0,4$ ) u usporedbi s hidroksitirosolom ( $\log P = -0,7$ ) i oleuropeinom ( $\log P = -0,4$ ), pa se može lakše uklopiti u hidrofobnu šupljinu liposoma i inhibirati lipidnu peroksidaciju. U suhom ekstraktu komine

masline s nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom je udio tirosola bio je značajno viši ( $950,9 \pm 7,61$  mg/100 g) u odnosu na nativni ekstrakt komine masline (870,1 mg/100 g) ili onaj s hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrinom (715,7 mg/100 g). Smatra se da je navedeni viši udio tirosola rezultirao značajno većom stopom inhibicije dobivenom za ekstrakt komine masline s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina.

Ipak, važno je napomenuti da i hidrofilni antioksidansi koji se ne ugrađuju u unutrašnjost liposoma također mogu prevenirati oksidaciju kelacijom metala. Keliranjem bakrovih iona u otopini, hidrofilni antioksidansi inhibiraju početak procesa oksidacije (Generalić Mekinić i sur., 2014).

Opažanja u ovom radu mogu se usporediti sa zaključcima studije Kong i suradnika (2010), koji su primjenjivali model liposoma za procjenu antioksidativne aktivnosti različitih ekstrakata začinskog bilja. Dokazali su da inhibicija TBARS u liposomima korelira s ukupnim udjelom fenola i kelirajućom aktivnosti analiziranih ekstrakata, ali ne i sa sposobnošću hvatanja DPPH• radikala, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Uz antiradikalna svojstva antioksidansa, njihovo samoudruživanje te interakcije s liposomima, također doprinose pružanju zaštite u biološkim sustavima. Navedeno je istaknuto u studiji Balducci i suradnika (2018), prema kojoj primjerice duljina lanca sintetiziranih estera hidroksitirosola znatno utječe na antioksidativnu aktivnost u modelu liposoma.

### **5.3.7. Bioraspoloživost polifenola komine masline**

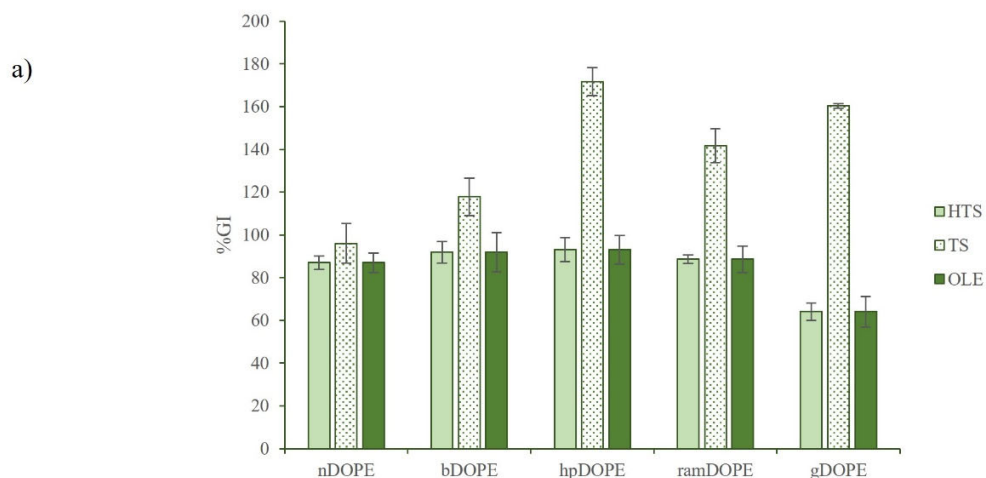
Biološki učinci ekstrakta komine masline te veliki potencijal u prevenciji, liječenju bolesti i promicanju ljudskog zdravlja, ovisе o kemijskom sastavu ekstrakata, ali i o bioraspoloživosti njihovih najznačajnijih polifenolnih komponenti. Naime, poznato je da u nekim slučajevima fenolni spojevi, koji iako su u hrani prisutni u visokim koncentracijama, imaju smanjeni učinak na ljudsko zdravlje, upravo zbog lošeg profila bioraspoloživosti. Kod biljnih ekstrakata na bioraspoloživost aktivnih komponenti značajno utječe gastrointestinalna biodostupnost. Kako bi bioaktivna komponenta postala bioiskoristiva, mora se osloboditi iz matriksa hrane i modificirati u gastrointestinalnom sustavu. Frakcija lijeka, dodatka prehrani ili nutrijenta koja nakon procesa probave dospije do mjesta apsorpcije smatra se biodostupnom. U cilju donošenja ispravnih zaključaka o potencijalnim učincima na zdravlje, nužno je utvrditi kako proces probave utječe na stabilnost bioaktivne komponente te na njenu bioiskoristivost.

Poznato je da bioraspoloživost primarno ovisi o fizikalno – kemijskim svojstvima biološki aktivnih komponenti, međutim značajan utjecaj imaju i matriks u kojem se bioaktivna komponenta nalazi, primjena farmaceutskih ekscipijensa te prisutstvo hrane u gastrointestinalnom traktu. Farmaceutski ekscipijensi ciklodekstrini, stvaranjem inkluzijskih kompleksa s hidroksitirosolom, tirosolom i oleuropeinom mogu bitno utjecati na njihovu biodostupnost. Kako je pokazano u prethodnim poglavljima ovog istraživanja, ciklodekstrini utječu na stabilnost inkapsuliranih molekula, a smatra se da u uvjetima probave mogu smanjiti stupanj hidrolize, oksidacije, steričke promjene, enzimatsku razgradnju te modificirati interakcije s drugim komponentama matriksa.

Iz tog je razloga tijekom ovog istraživanja, osim određivanja biodostupnosti najznačajnijih polifenola komine masline hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina, ispitivan i utjecaj matriksa komine masline te dodatka različitih tipova ciklodekstrina na njihovu biodostupnost.

Intestinalna biodostupnost tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina ispitana je standardiziranim statičkim *in vitro* modelom probave (Brodkorb i sur., 2019).

Dobiveni rezultati biodostupnosti glavnih polifenola komine masline, tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina, prisutnih u suhim ekstraktima bez i s dodatkom različitih ciklodekstrina prikazani su na **Slici 27**.



b)

Parametar		nDOPE	bDOPE	hpDOPE	ramDOPE	gDOPE
HTS	Frakcija prije probave (mg/100 g)	84,1	50,2	39,4	41,9	37,8
	Biodostupna frakcija (mg/100 g)	73,2	46,1	36,7	37,1	24,2
	<b>Biodostupnost (%)</b>	<b>87,0</b>	<b>91,9</b>	<b>93,1</b>	<b>88,7</b>	<b>64,1</b>
TS	Frakcija prije probave (mg/100 g)	31,2	11,6	8,3	9,1	8,9
	Biodostupna frakcija (mg/100 g)	30,0	13,7	14,2	12,9	14,2
	<b>Biodostupnost (%)</b>	<b>96,1</b>	<b>117,9</b>	<b>171,7</b>	<b>141,8</b>	<b>160,4</b>
OLE	Frakcija prije probave (mg/100 g)	35,6	14,6	15,2	16,2	16,9
	Biodostupna frakcija (mg/100 g)	28,9	14,0	12,3	14,9	11,4
	<b>Biodostupnost (%)</b>	<b>87,0</b>	<b>91,9</b>	<b>93,1</b>	<b>88,7</b>	<b>64,1</b>

nDOPE-nativni suhi ekstrakt komine masline; bDOPE- suhi ekstrakt komine masline s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina; hpDOPE-suhi ekstrakt komine masline s dodatkom hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina; ramDOPE-suhi ekstrakt komine masline pripremljen s nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom; gDOPE- suhi ekstrakt komine masline s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina; HTS-hidroksitirozol; TS-tirozol; OLE-oleuropein

**Slika 27:** Biodostupnost glavnih polifenola prisutnih u suhim ekstraktima komine masline. a) Relativna promjena koncentracije svake komponente izražena je kao postotak zaostao nakon in vitro simulirane GI digestije. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. b) Apsolutne vrijednosti koncentracija frakcija prije probave, biodostupnih frakcija polifenola te vrijednosti biodostupnosti dobivene za glavne polifenole masline.

Mjerenjem sadržaja glavnih polifenolnih komponenti komine masline u frakciji prije i nakon probave dobivene su vrijednosti za biodostupnost svake od analiziranih komponenti. Rezultati pokazuju relativno visoke vrijednosti biodostupnosti (od 64-172 %), pa se može zaključiti da su koncentracije tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina konstantne tijekom procesa gastrointestinalne digestije. Jedina značajna promjena koncentracije nakon gastrointestinalne digestije primjećena je kod tirosola. Naime, gastrointestinalnom digestijom koncentracija tirosola se značajno povećala u dobivenoj frakciji, te je biodostupnost za tirosol iznosila 96-172 %. Slični rezultati dobiveni su u radu Radić i suradnika (2020), koji su takve rezultate objasnili mogućim raspadom složenih polifenola kao što su sekoiridoidi i verbaskozidi prisutni u komini masline na jednostavnije, tirosol i hidroksitirosol. Na konačnu količinu biodostupnog tirosola bitno je utjecao i dodatak različitih vrsta ciklodekstrina. Biodostupnost tirosola bila je značajno veća u uzorcima s dodanim hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrinom, nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom i  $\gamma$ -ciklodekstrinom, u odnosu na uzorak nativnog ekstrakta komine masline.

Prema radu Radić i suradnika (2020) takvi se rezultati mogu objasniti snažnim kapacitetom vezanja žučnih soli s fenolnom hidroksilnom skupinom, stvarajući tako vodikove/ionske veze. U slučaju stvaranja inkluzijskih kompleksa tirosola s dodanim ciklodekstrinima može se spriječiti vezanje sa žučnim solima, što onda rezultira povećanom biodostupnošću.

Udjeli hidroksitirosola i oleuropeina nakon simulacije probave ostali su konzistentni u odnosu na količine određene u ekstraktima komine masline prije probave, te je njihova biodostupnost iznosila 64-93 %. Pri tome su primjenom  $\beta$ -ciklodekstrina, hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina i nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina dobivene vrlo slične vrijednosti biodostupnosti (87-93 %), dok je biodostupnost kod uzoraka enkapsuliranih s  $\gamma$ -ciklodekstrinom bila niža te je iznosila 64 %.

Dobiveni rezultati ukazuju da glavni polifenoli komine masline ne degradiraju u uvjetima gastrointestinalne digestije, a prisutnost ciklodekstrina u formulaciji značajno je povećala biodostupnost tirosola.

Prema dostupnoj literaturi češće je istraživana biodostupnost polifenola iz maslinovog ulja u odnosu na polifenole komine masline, pa su tako Seiquer i suradnici (2015) analizom maslinovog ulja kao matriksa polifenolnih spojeva dobili rezultate usporedive s rezultatima ovog istraživanja. Dokazali su visoku biodostupnost polifenola nakon gastrointestinalne digestije i njihovu veliku stabilnost na uvjete u organizmu. Daljnjom usporedbom rezultata ovog rada s drugim studijama

(Dinella i sur., 2007; Soler i sur. 2010), utvrđena je čak i veća biodostupnost tirosole, hidroksitirosole i oleuropeina iz komine masline u odnosu na polifenole maslinovog ulja, što potvrđuje i dodatno ističe potencijal komine masline kao vrijedne sirovine u razvoju novih generacija prirodnih aditiva i nutraceutika.

## **6. ZAKLJUČAK**



- ∞ Tijekom procesa optimizacije klasične ekstrakcije dobiveni su ekstrakti komine masline različite antioksidativne aktivnosti i sadržaja polifenolnih komponenti. Kao optimalno „*food grade*“ otapalo za ekstrakciju fenolnih komponenti iz komine masline odabran je 60 %-tni etanol, a najbolji prinosi postignuti su kontinuiranim miješanjem ekstrakcijske smjese na temperaturi od 70 °C u trajanju od 120 minuta.
- ∞ Za identifikaciju i određivanje sadržaja glavnih polifenolnih komponenti komine masline u ekstraktima komine masline validirana je i primjenjena metoda tekućiske kromatografije visoke djelotvornosti. Provedenom validacijom je zaključeno da je navedena HPLC-DAD metoda prikladna za određivanje tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina u ekstraktima komine masline te se smatra specifičnom, linearnom, točnom i preciznom.
- ∞ Postignuti zadovoljavajući antioksidativni prinosi upućuju na kominu masline kao jeftin, obnovljiv i bogat izvor fenolnih spojeva, čija je uspješna ekstrakcija moguća i jednostavnim, klasičnim postupkom uz primjenu „*food-grade*“ otapala.
- ∞ Primjena suvremenog postupka ultrazvučne ekstrakcije rezultirala je još većim prinosima oleuropeina, tirosola i bioaktivnih komponenti u usporedbi s klasičnim postupkom ekstrakcije. Ova inovativna metoda ekstrakcije karakterizirana je brojnim prednostima od kojih su najznačajnije smanjeno vrijeme ekstrakcije i manja potrošnja otapala. Parametri ultrazvučne ekstrakcije koji su pokazali najveći utjecaj na dobivene prinose su promjer ultrazvučne sonde i trajanje ekstrakcije.
- ∞ Daljnje povećanje prinosa omogućeno je dodatkom ciklodekstrina u ekstrakcijsko sredstvo, primjenjujući na taj način suvremenu tehniku ultrazvučne ekstrakcije u kombinaciji s uklapanjem u ciklodekstrine. Prisutnost ciklodekstrina u ekstrakcijskom sredstvu povoljno je utjecala i na fizikalne karakteristike dobivenih suhih ekstrakata komine masline kao što je njihov izgled i stabilnost.
- ∞ Stvaranje inkluzijskih kompleksa s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom i nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom omogućilo je najpovoljnije mikrookruženje za uklopljene polifenole komine masline te ih je zaštitilo od degradacije prilikom skladištenja na povišenoj temperaturi (45 °C).

- ∞ Primjenjeni ciklodekstrini pokazali su pozitivan učinak na boju ekstrakata komine masline, povećavajući njihovu svjetlinu, a najizraženiji efekt postignut je primjenom  $\beta$  i  $\gamma$ -ciklodekstrina. Dobivena je normalna raspodjela veličine čestica suhih ekstrakata komine masline uklopljenih u ciklodekstrine, a srednja vrijednost veličine čestica, srednji promjer i indeks polidisperznosti značajno su se razlikovali ovisno o primjenjenoj količini i tipu ciklodekstrina ( $p < 0,05$ ). Rezultati indeksa polidisperznosti upućuju na ujednačeniju raspodjelu veličine čestica kod ekstrakata s hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrinom.
- ∞ Karakterizacijom suhih ekstrakata komine masline dokazan je pozitivan utjecaj dodatka ciklodekstrina na antioksidativnu aktivnost dobivenih formulacija. Uklapanje u ciklodekstrine utjecalo je na povećanje antioksidativne aktivnosti značajno povećavajući sadržaj glavnih polifenolnih komponenti komine masline: tirosola, hidoksitirosola i oleuropeina.
- ∞ Primjenjivani tipovi ciklodekstrina različito su utjecali na funkcionalnost ekstrakata komine masline, a interakcije s hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrinom i nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom rezultirale su najznačajnijim te međusobno usporedivim pozitivnim učincima.
- ∞ Primjenom bioloških i model sustava hrane za određivanje antioksidativne aktivnosti dobivenih ekstrakata primjećene su još izraženije razlike u antioksidativnoj aktivnosti između nativnih ekstrakata i ekstrakata stabiliziranih ciklodekstrinima. Takvi rezultati ističu prednosti primjene bioloških model sustava i model sustava hrane u ispitivanju antioksidativne aktivnosti u odnosu na kemijske model sustave, jer omogućuju odvijanje reakcija u prirodnom okruženju uz interakcije s biološkim substratima.
- ∞ Suhi ekstrakti komine masline uklopljeni u hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrin i nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin pokazali su izrazito djelovanje u emulziji tipa ulje u vodi, tako da je njihova antioksidativna aktivnost bila viša čak i od aktivnosti Troloxa. Isto tako, u model sustavima ulja (primjenjen koncentracijski nivo oznosio je 0,1 %) i mesa (koncentracijski nivo je iznosio 1-3 %) antioksidativno djelovanje ekstrakata komine masline s dodatkom hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina i nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina bilo je usporedivo s aktivnošću konvencionalno korištenog sintetskog antioksidansa butilhidroksi anisola. Iako su primjenom oba tipa ciklodekstrina u modelima hrane postignuti odlični rezultati,

uklapanjem u nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin postignita je veća antioksidativna aktivnost suhih ekstrakata komine masline u odnosu na hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrin.

- ∞ U biološkim model sustavima su suhi ekstrakti komine masline uklopljeni u ciklodekstrine pokazali sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije mehanizmima vezanja slobodnih radikala te kelacijom metala, a uspješno su zaštitili i molekulu DNA od cijepanja inducirano AAPH• radikalima.
- ∞ Dobivenim relativno visokim vrijednosti ma biodostupnosti (od 64-172 %) zaključeno je da glavni polifenoli komine masline, tirosol, hidroksitirosol i oleurioein ne degradiraju u uvjetima gastrointestinalne digestije, a prisutnošću ciklodekstrina u formulaciji značajno je povećana biodostupnost tirosola.
- ∞ Rezultati dobiveni u ovom radu uvelike doprinose trenutnim saznanjima o antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata komine masline. Također dobiveni rezultati doprinose razvoju novih mogućnosti upravljanja otpadom dobivenim tijekom proizvodnje maslinovog ulja, kao i potencijalnoj primjeni polifenola masline kao aditiva u prehrambenoj i nutraceutika farmaceutskoj industriji. Mogućnost povezivanja razvijenog zelenog procesa ekstrakcije i formulacije visokovrijednog proizvoda u jedinstvenu cjelinu s drugim načinima obrade i primjene komine masline omogućuje iskorištavanje njenog potencijala u potpunosti.

## **7. POPIS LITERATURE**

Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H. (2006) Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Ad. Drug. Deliver. Rev.* 58: 1688-1713.

Abe, R., Beckett, J., Nixon, A., Rochier, A., Yamashita, N., Sumpio, B. (2011) Olive oil polyphenol oleuropein inhibits smooth muscle cell proliferation, *Eur. J. Vasc. Endo-vasc. Surg.* 41: 814–820.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.* 11: 261-265.

Albuquerque, J.A., J. Gonzalvez, J., Garcia, D., Cegarra, J. (2004) Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction, *Bioresour. Technol.* 91:195–200.

Aliakbarian, B.; Casazza, A.A.; Perego P. (2011) Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor. *Food Chem.*, 128: 704–710

Álvarez, P., Alvarado, C., Puerto, M., Schlumberger, A., Jiménez, L., De la Fuente, M. (2006) Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals, *Nutrition* 22: 913–921.

Amorati, R.; Valgimigli, L. (2015) Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Res.*, 49: 633–649.

Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., Regal, P. (2014) Review of methods for analysis of carotenoids. *Trend. Anal. Chem.* 56: 49-73.

Araújo M, Pimentel F.B., Alves R.C. Oliveira M.B.P.P. (2015) Phenolic compounds from olive mill wastes: health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends Food Sci Technol* 45:200–211.

Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilkh, K., Versteeg, C. (2008) Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system, *Innovat. Food. Sci. Emerg. Tech.* 9: 155–160.

Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., Youssef, M. M. (2012) Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Res. Int.* 48: 410-427.

Ayim, I., Ma, H., Alenyorege, E.A., Ali, Z., Donkor, P.O. (2018) Influence of ultrasound pretreatment on enzymolysis kinetics and thermodynamics of sodium hydroxide extracted proteins from tea residue, *J. Food Sci. Technol.* 55: 1037–1046

Balachandran, S., Kentish, S.E., Mawson, R., Ashokkumar, M. (2006): Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger, *Ultrason. Sonochem.* 13: 471-479.

Balducci, V.; Incerpi, S.; Stano, P.; Tofani, D. (2018) Antioxidant activity of hydroxytyrosyl esters studied in liposome models. *BBA-Biomembr.* 1860: 600–610.

Bartnik, D. D., Mohler, C. M., Houlihan, M..(2006).US Patent application 20060088627.

Barão, C., Paiva-Martins, F., Zanin, G. M., Moraes, F. (2014). Determination of the inclusion complex constant between oleuropein and cyclodextrins by complexation theory. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 78: 1–4.

Bhatnagar, A., Kaczala, F., Hogland, W., Marques, M., Paraskeva, C. A., Papadakis, V. G., Sillanpää, M. (2014). Valorization of solid waste products from olive oil industry as potential adsorbents for water pollution control-a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(1): 268-298.

Bohn T. (2014) Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr Res*, 72: 429-452.

Braithwaite, M.C., Tyagi, C., Tomar, L.K., Kumar, P., Choonara, Y.E., Pillay, V. (2014) Nutraceutical-based therapeutic and formulation strategies augmenting their efficiency to complement modern medicine: An overview. *J Funct Food* 6: 82-99.

Brewster, M.E., Loftsson, T. (2007) Cyclodextrins as Pharmaceutical Solubilizers. *Adv. Drug Del.* 59: 645-666.

Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4(2):32-37.

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhuss, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann,

R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I. (2019) INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*, 14(4): 991-1014.

Carbonell-Capella, J.M., Šic Žlabur, J., Rimac Brnčić, S., Barba, F.J., Grimi, N., Koubaa, M., Brnčić, M., Vorobiev, E. (2017) Electrotechnologies, microwaves, and ultrasounds combined with binary mixtures of ethanol and water to extract steviol glycosides and antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* leaves. *J. Food Process. Preserv.* 41 (5), 00: e13179. doi:10.1111/jfpp.13179.

Carrier, R.L., Miller, L.A., Ahmed I. (2007) The Utility of Cyclodextrins for Enhancing Oral Bioavailability. *J. Control. Release* 123: 78-99.

Chatti, I.B.; Boubaker, J.; Skandrani, I.; Bhourri, W.; Ghedira, K.; Ghedira, L.C. (2011) Antioxidant and antigenotoxic activities in *Acacia salicina* extracts and its protective role against DNA strand scission induced by hydroxyl radical. *Food Chem. Toxicol.* 49: 1753–1758.

Chemat F., Grondin I., Shum Cheong Sing A., Smadja J. (2004): Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound, *Ultrason. Sonochem.* 11: 13–15.

Chemat, F., Tomao, V., Viot, M. (2008): Ultrasound assisted extraction in food analysis. In: *Handbook of food analysis instruments*, Boca Raton, Florida, USA, Semih Ötleş, str. 85- 103.

Chemat F., Zill, E.H., Khan, M.K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 18 (4): 813-835.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrason. Sonochem.* 34: 540–560.

Cimato, A.; Mattei, A.; Osti, (1990) M. Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Hort.* 286: 453–456.

Cioffi, G., Pesca, M.S., De Caprariis, P., Braca, A., Severino, L. De Tommasi, N. (2010) Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food. Chem.* 121:105–111.

Clemente, A.; Sánchez-Viquore, R.; Viquore, J.; Bautista, J.; Millán, F. (1997) Chemical composition of extracted dried pomaces containing two and three phases. *Food Biotechnol.* 11, 273–291.

Conde, E., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2010) Extraction of natural antioxidants from plant foods. U: *Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries* (Syed S.H. Rizvi, ured.), str. 506-594.

Cornwell, D.G., Ma, J. (2008) Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts, *J. Agric. Food Chem.* 56: 8774–8786.

Corona, G., Tzounis, X., Assunta Dessi, M., Deiana, M., Debnam, E.S., Visioli, F., Spencer, J.P.E. (2006) The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: Implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic. Res.* 40: 647-658.

Correa, J., López-Villodres, J.A., Asensi, R., Espartero, J.L., Rodriguez-Gutierrez, G., De La Cruz, J.P. (2009) Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid, *Br. J. Nutr.* 101: 1157–1164.

Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P. (2008) Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrason. Sonochem.* 15: 898–902.

Cugovčan, M., Jablan, J., Lovrić, J., Cinčić, D., Galić, N., Jug, M. (2017). Biopharmaceutical characterization of praziquantel cocrystals and cyclodextrin complexes prepared by grinding. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 137: 42–53.

Cumaoglu, A., Rackova, L., Stefek, M., Kartal, M., Maechler, P., Karasu, C. (2011) Effects of olive leaf polyphenols against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in insulin secreting beta-cells, *Acta Biochim. Pol.* 58: 45–50.

Davies, K. (2004): *Plant Pigments and Their Manipulation*, CRC Press, Blackwell Publishing Ltd. *Annual Plant Reviews* 14: 93-95.

Davis, M.E.; Brewster, M.E. (2004) Cyclodextrin-based Pharmaceuticals: Past, Present and Future. *Nature Rev. Drug Dis.* 3: 1023-1035.



Dell'Agli, M., Fagnani, R., Mitro, N., Scurati, S., Masciadri, M., Mussoni, L., Galli, G.V., Bosisio, E., Crestani, M., De Fabiani, E. (2006) Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation, *J. Agric. FoodChem.* 54: 3259–3264.

Dell'Agli, M., Maschi, O., Galli, G.V., Fagnani, R., Dal Cero, E., Caruso, D., Bosisio, E. (2008) Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase, *Br. J. Nutr.* 99: 945–951.

Del Valle, E. M. M. (2003) Cyclodextrins and their uses: a review, Department of Chemical Engineering, University of Salamanca.

Demerche, S., Nadour, A., Larroche, M. C., Moulti-Mati, F., Michaud, P. (2013) Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies, *Process Biochem.* 48: 1532–1552.

Denery, J.R., Dragull, K., Tang, C.S., X. Li, Q. X. (2004) Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal. Chim. Acta*, 501: 175-181.

De Souza, P.A., Silva, C.G., Machado, B.R.P., De Lucas, N.C., Leitão, G.G., Eleutherio, E.C.A., Ortiz, G.M.D., Benchetrit, L.C. (2010) Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, *Rev. Bras. Farmacogn.* 20: 922–928.

Didry, N., Seidel, V., Dubreuil, L., Tillequin, F., Bailleul, F. (1999) Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*, *J. Ethnopharmacol.* 67: 197–202.

Dinnella, C., Minichino, P., D'Andrea, A.M., Monteleone, E. (2007) Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during *in vitro* digestion. *J. Agric. Food. Chem.* 55, 8423-8429.

Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M.; Rodriguez, H. (2002) Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biol. Med.* 32: 1102–1115.

Dodziuk, H. (2002) Introduction to Supramolecular Chemistry, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, str. 104–105, 207–215, 252.

Driss, F., Dang, P.M.C., Elbim, C., Gougerot-Pocidallo, M.A., Pasquier, C., El-Benna, J. (2004) Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils, *Biochem. Pharmacol.* 68: 2003–2008.

Dujmić, F., Ganić Kovačević, K., Ćurić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T., Ježek, D., Vidrih, R., Hribar, J., Zlatić, E., Prusina, T., Khubber, S., Barba, J. F., Brnčić, M. (2020) Non-Thermal Ultrasonic Extraction of Polyphenolic Compounds from Red Wine Lees. *Foods* 9 472, 21.

DZS, [https://www.dzs.hr/Hrv\\_Eng/publication/2020/01-01-28\\_01\\_2020.htm](https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2020/01-01-28_01_2020.htm) Pristupljeno 28.02.2022.

Đorđević, D., Novaković, M., Konstantinović, S. (2006) Primena ciklodekstrina u oblasti tekstila, *Stručni rad, Tehnološki fakultet, Leskovac.*

Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., Giugliano, F., Giugliano, G., D'Armiento, M., D'Andrea, F., Giugliano, D. (2004) Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome, *JAMA* 292: 1440.

Ebringerova, A., Hromadkova, Z. (1997): The effect of ultrasound on the structure and properties of the watersoluble corn hull heteroxylan, *Ultrason. Sonochem.* 4: 305-309.

EC (2012): Regulation No 432/2012, OJ L 136/25-5-2012. EFSA J no 2011; 94:2033. [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/2033.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2033.pdf) Pristupljeno 30.01.2022.

Efmorfopoulou, E., Rodis, P. (2004). Complexation of oleuropein and trans-cinnamic acid with cyclodextrins. *Chem. Nat. Compd.* 40: 362–366.

Efmorfopoulou, E., Rodis, P. (2005) Application of cyclodextrins to the extraction of antioxidant compounds from olive oil. *Chem. Nat. Compd.* 41: 22-26.

Etcheverry, P., Grusak M.A., Fleige L.E. (2012) Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Front Physiol.* 3: 1-22.

Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G., Morozzi, G. (2002) Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1cell cycle arrest and apoptosis, *Eur. J. Cancer Prev.* 11 (4): 351-358.

Fasseas, M.K.; Mountzouris, K.C.; Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.; Zervas, G. (2008) Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chem.* 106 (3): 1188–1194.

Fernandez, J., Perez-Alvarez, J.A., Fernandez-Lopez, J.A. (1997) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food. Chem.* 59: 345-353.

Fernandez-Garcia, E., Carvajal-Lerida, I., Perez-Galvez, A. (2009) *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr. Res.* 29: 751-760

Frankel, E., Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013) Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols, *Agric Food Chem.* 61 (22): 5179-88.

Garcia-Padial, M., Martínez-Ohárriz, M. C., Navarro-Blasco, I., Zornoza, A. (2013). The role of cyclodextrins in ORAC- fluorescence assays. Antioxidant capacity of tyrosol and caffeic acid with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.* 61: 12260–12264.

Generalić Mekinić, I.; Gotovac, M.; Skroza, D.; Ljubenković, I.; Burčul, F.; Katalinić, V. (2014) Effect of the extraction solvent on the oleuropein content and antioxidant properties of olive leaf (cv. Oblica, Lastovka and Levantinka) extracts. *Cro. J. Food Sci. Tech.* 6: 7–14.

Gilani, A.H., Khan, A.U., Shah, A.J., Connor, J., Jabeen, Q. (2005) Blood pressure lowering effect of olive is mediated through calcium channel blockade, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 56 : 613–620.

Gogate, P.R., Kabadi, A.M. (2009) A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology, *Biochem. Eng. J.* 44: 60–72.

Gokani R.H., Desai K.N. (2012) Stability study:Regulatory requirement. *Int. J. of Adv. in Phar. Ana.* 2: 73- 78.

Gong, M., Bassi, A. (2016) Carotenoids from microalgae: a review of recent developments. *Biotechnol. Adv.* 34: 1396-1412.

González-Correa, J.A., Navas, M.D., Muñoz-Marín, J., Trujillo, M., Fernández-Bolaños, J., De la Cruz, J.P. (2008) Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to ratson platelet function compared to acetylsalicylic acid, *J. Agric. Food Chem.* 56: 7872–7876.

Granados-Principal, S., Quiles, J.L., Ramirez-Tortosa, C., Camacho-Corencia, P., Sanchez-Rovira, P., Vera-Ramirez, L., Ramirez-Tortosa, M. (2011) Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours, *Mol. Nutr. Food Res.* 55: S117–S126.

Gray, J.I., Pearson, A.M. (1987) Rancidity, and warmed-over flavor. U: *Advances in Meat Research. Restructured Meat and Poultry Products.* Pearson, A.M.,Dutson, T.R, New York, Van Nostrand Reinhold Compan, str.22.

Greenfield, E.M., Bi, Y., Miyauchi, A. (1999) Regulation of osteoclast activity, *Life Sci.* 65: 1087–1102.

Hamdi, H.K., Castellon, R. (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 769–778.

Hart, H., Hadad, C.M., Craine, L.E., Hart, D.J., (2012) *Organic Chemistry: A Short Course*, Brooks/Cole, USA.

Herceg, Z., Brnčić, M., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo.* 59, 65-69.

Herrero, M., Temirzoda, T.N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza Mand Ibañez, E. (2011) New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *J. Chromatogr. A.*1218: 7511–7520.

Hu, M., Li, X. (2011) *Oral bioavailability: Basic Principles, Advanced Concepts, and Applications.* U: Caco-2 cell culture model for oral drug absorption. Kulkarni K, Hu M, urednici, New York, John Wiley & Sons, str. 431-442.

Jemai, H., El Feki, A., Sayadi, S. (2009) Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats, *J. Agric. Food Chem.* 57: 8798–8804.

Jerman, T., Trebše, P., Mozetič Vodopivec, B. (2010): Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chem.* 123 (1): 175-182.

- Jug, M., Bećirević-Laćan, M. (2002) Ciklodekstrini – nosači lijekova, *Farmaceutski glasnik* 58, 189-204.
- Kadam, U.S., Tiwari, K.B., O'Donnell, C.P. (2013) Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. *J. Agric. Food Chem.* 16: 4667-4675.
- Kallithraka, S., Salacha, M. I., Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry*, 113: 500–505.
- Kapellakis I.E., Tsagarakis K.P., Crowther J.C. (2008). Olive oil history, production and by-product management. *Rev Environ Sci Biotechnol* 7:1–26.
- Karaosmanoglu, H., Soyer, F., Ozen, B., Tokatli, F. (2010) Antimicrobial and antioxidant activities of Turkish extra virgin olive oils, *J. Agric. Food Chem.* 58: 8238–8245.
- Kasper, J.C., Friess, W. (2011) The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biophar*, 78: 248-263.
- Kawabata, Y., Wada, K., Nakatani, M., Yamada, S., Onoue, S. (2011) Formulation Design for Poorly Water-Soluble Drugs Based on Biopharmaceutics Classification System: Basic Approaches and Practical Applications. *Int. J. Pharm.* 420: 1-10.
- Kayaci, F., Uyar, T. (2011). Solid inclusion complexes of vanillin with cyclodextrins: Their formation, characterization, and high-temperature stability. *J. Agric. Food Chem.* 59: 11772–11778.
- Keller, R. B. (2009): *Flavonoidas, Byosintesis, biological effects and Dethary sources*: Nova Science Publishers, Inc. New York.
- Khadhraoui, B., Turk, M., Fabiano-Tixier, A., Petitcolas, E., Robinet, P., Imbert, R., El Maâtaoui, M., Chemat, F. (2018) Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy for studying spatial and temporal extraction of metabolites induced by ultrasound. Towards chain detexturation mechanism, *Ultrason. Sonochem.* 42: 482–492.
- Knobloch, J.; Suhendro, D.K.; Zieleniecki, J.L.; Shapter, J.G.; Köper, I. (2015) Membrane–drug interactions studied using model membrane systems. *Saudi J. Biol. Sci.* 22: 714–718.

- Kondo, T., Kano, E. (1988) Effect of free radicals induced by ultrasonic cavitation on cell killing, *Int. J. Radiat. Biol.* 54: 475–486.
- Krstelj, V. (2003) *Ultrazvučna kontrola*. Fakultet strojarstva i brodogradnje, str. 329.
- Kong, B.; Zhang, H.; Xiong, Y.L. (2010) Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. *Meat. Sci.* 85: 772–778
- Kučić Grgić, D., Gavran, M., Mikšić, K., Škunca, A., Očelić Bulatović V. (2020) Utjecaj komine masline na okoliš, *Kem. Ind.*, 69 (3-4): 153-162.
- Kumar, P., Chu, C., Krishnaiah, D., Bono, A. (2006): High hydrostatic pressure extraction of antioxidants from *Morinda Citrifolia* fruit-process parameters optimisation. *J. Eng. Sci. Technol.* 1, 41-49.
- Kurkov, S.V., Loftsson, T. (2013) Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 453 (1), 167-180.
- Lafka, T.I., Lazou, A., Sinanoglu, V., Lazos, E. (2013): Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants. *Foods*, 2: 18-31.
- Lee, O.-H., Lee, B.-Y., Lee, J., Kim, Y.-C. (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresour. Technol.* 100, 6107–6113.
- Lee-Huang, S., Huang, P.L., Zhang, D., Lee, J.W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y.-T, Zhang, J., Huang, P.L. (2007) Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integraseinhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: part I. Integrase inhibition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 872–878.
- Leighton T. G. (2007): What is ultrasound? *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 93: 3–83.
- Li, C., Yu, W., Wu, P., Chen, X.D. (2020) Current *in vitro* digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends Food Sci. Technol.* 96: 114-126.
- Loffsson, T., Brewster, M. E. (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilisation, *J. Pharm. Sci.* 85 (10): 1017-1025.
- Loffsson, T., Brewster, M. E. (1997) Cyclodextrins as pharmaceutical excipients. *Pharm. Tech. Eur.* 9 (5): 26-32.
- Loftsson, T., Brewster, M.E., (2007) Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev.* 59 (7): 645-666.

Loftsson, T., Brewster, M.E., (2010) Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Basic Science and Product Development. *J. Pharm. Pharmacol.* 62: 1607-1621.

Loftsson, T., Brewster, M.E. (2011) Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Effects on Drug Permeation through Biological Membranes. *J. Pharm. Pharmacol.* 63: 1119- 1135.

Loftsson, T., Brewster, M.E. (2012) Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *J Pharm Sci* 101 (9): 3019-3032.

Lopez-Garcia, M.A., Lopez, O., Maya, I., Fernandez-Bolanos, J.G., (2010) Complexation of hydroxytyrosol with beta-cyclodextrins. An efficient photoprotection. *Tetrahedron* 66: 8006-8011.

López-Nicolás, J. M., Rodríguez-Bonilla, P., García-Carmona, F. (2014). Cyclodextrins and antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54: 251-276.

Luque de Castro, M. D., Garcia-Ayuso, L. E. (1998): Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chim. Acta* 369 (1-2): 1-10.

Luque de Castro, D.M. (2014) Towards a comprehensive exploitation of agrofood residues: Olive tree – olive oil as example. *C.R.Chimie* 17: 252-260

Markens U. (2009) Conducting Stability Studies: Recent Changes to Climate Zone IV. *Life Science* 13:1-4.

Marques, H.M.C. (2010) A Review on Cyclodextrin Encapsulation of Essential Oils and Volatiles. *Flavour Frag. J.* 25: 313-326.

Martinez-Flores, H. E., Garnica-Romo, M. G., Bermúdez-Aguirre, D., Pokhrel, P. R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2015). Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage. *Food Chemistry*, 172, 650–656.

Martínez-Patiño, J., Gullón, B., Romero, Ruiz, E., Brnčić, M., Šic Žlabur, J., Castro, E. (2018) Optimization of ultrasound-assisted extraction of biomass from olive trees using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 51, 487-495.

Mason, J.T. Power ultrasound in food processing – the way forward. U M. J. W. Povey and T. J. Mason (ur.), *Ultrasound in Food Processing*. Blackie Academic & Professional, London, 1998., str. 153.

Mason, T.J., Luche, J.L. (1996): Ultrasound as a new tool for synthetic chemists. In: Chemistry under extreme or non-classical conditions, van Eldk, R., Hubbard, C.D., (ured.), John Wiley and sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, New York., str. 317-380.

McNamara, C.J., Anastasiou, C.C., O` Flaherty, V., Mitchell, R. (2008) Bioremediation of olive mill wastewater. *Int. Biodeter. Biodegr.* 61, 127-134.

Medina, E., De Castro, A., Romero, C., Brenes, M. (2006) Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity, *J. Agric. Food Chem.* 54: 4954–4961.

Mercader-Ros, M.T., Lucas-Abellán, C., Fortea, M.I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delicado, E. (2010) Effect of HP- $\beta$ -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chem.* 118, 769–773.

Messner, M., Kurkov, S.V., Jansook, P., Loftsson, T. (2010) Self-Assembled Cyclodextrin Aggregates and Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 387: 199-208.

Micol, V., Caturla, N., Pérez-Fons, L., Más, V., Pérez, L., Estepa, A. (2005) The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV), *Antiviral Res.* 66: 129–136.

Mohammadi, A.; Jafari, S.M.; Esfanjani, A.F.; Akhavan, S. (2016) Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chem.* 190: 513–519

Moreno, J.J. (2003) Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7, *Free Radic. Biol.Med.* 35: 1073–1081.

Mourtzinis, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A., Karathanos, V.T., (2007) Encapsulation of olive leaf extract in beta-cyclodextrin. *J. Agr. Food Chem.* 55: 8088-8094.

Mourtzinis, I.; Makris, D.P.; Yannakopoulou, K.; Kalogeropoulos, N.; Michali, I.; Karathanos, V.T. (2008) Thermal stability of anthocyanin extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the Presence of beta-Cyclodextrin. *J. Agr. Food Chem.* 56: 10303–10310.

Muzzio C.R., Dini G.D. (2011) Simulation of freezing step in vial lyophilization using finite element method. *Comp. Chem. Eng.* 35, 2274-2283.



Nireesha G.R., Divya L., Sowmya C., Venkateshan N., Niranjana Babu M., Lavakumar V. (2013) Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *Inter. J. Nove. Tren. Pharm. Sci.* 3: 87-98.

NSF International, 2021,

[https://www.nsf.org/newsroom\\_pdf/Stability\\_Testing\\_Dietary\\_Supplements.pdf](https://www.nsf.org/newsroom_pdf/Stability_Testing_Dietary_Supplements.pdf) (Pristupljeno 20.12.2021.)

Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D. Robards K. (2005) Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *J. Agric. Food Chem.* 53:9911–9920.

Obied, H.K., Prenzler, P.D., Syed, O.H., Ismael, R., Servili, M., Esposito, S., Taticchi, A., Selvaggini, R., Urbani, S. (2012) Pharmacology of olive biophenols. U: *Advances of molecular toxicology*. Fishbein JC, Heilman JM, urednici, Elsevier, Amsterdam, Oxford, str.202-216.

Palmerini, C.A., Carlini, E., Saccardi, C., Servili, M., Montedoro, G., Arienti, G. (2005) Activity of olive oil phenols on lymphomonocyte cytosolic calcium, *J. Nutr. Bio-chem.* 16: 109–113.

Pasquet, V., Chérouvrier, J.-R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J.-M., Bérard, J.-B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J.-P. (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem.* 46: 59-67.

Pérez-Serrano, M., Landete-Castillejos, T., Roca, L., Brnčić, M., Rimac Brnčić, S., Lorenzo, J., Marti-Quijal, F., Barba, F. (2020) Green extraction. U: Barba, F., Rosello Soto, E., Brnčić, M., Lorenzo, J. *Green extraction*. Boca Raton, CRC Press, Taylor& Francis Group, str. 1-21.

Perona, J.S., Montero, E., Sánchez-Domínguez, J.M., Cañizares, J., Garcia, M., Ruiz-Gutiérrez, V. (2009) Evaluation of the effect of dietary virgin olive oil on blood pressure and lipid composition of serum and low-density lipoprotein in elderly type2 diabetic subjects, *J. Agric. Food Chem.* 57: 11427–11433.

Pfeilschifter, J., Chenu, C., Bird, A., Mundy, G.R., Roodman, D.G. (1989) Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.* 4: 113–118.

Picó, Y. (2013) Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 43: 84–99.

Pincemail, J., Tabart, J., Defraigne, J.O., Dommès, J., Kevers, C. (2015) The total antioxidant capacity of foods: A reappraisal. application to commercial orange juices. *J. Anti. Act.* 1: 1–7.

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. (2013): Ultrasound – assisted Extraction. U: Natural Product Extraction: Principles and Applications, Rostagno, M.A., Prado, J.M. (ured.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, str. 89-112.

Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., Henriques, M. (2014) Cyclodextrins as Encapsulation Agents for Plant Bioactive Compounds. *Carbohydr. Pol.* 101: 121-135.

Poudyal, H., Campbell, F., Brown, L. (2010) Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats, *J. Nutr.* 140: 946–953.

Povey, M.J.W., Mason, T.J. (1998): Ultrasound in Food Processing, Blackie Academic and Professional, London.

Prieto, M.A., Rodríguez-Amado, I., Vázquez, J.A., Murado, M.A. (2012)  $\beta$ -Carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *J. Agric. Food Chem.* 60: 8983–8993.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized Methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290–4302.

Qi, Z.H., Sikorski, C. T. (2001) Controlled delivery using cyclodextrin technology, *Pharm. Tech. Eur.*, 13 (11): 17 - 27.

Radić, K., Dukovski, B.J., Čepo, D.V. (2020) Influence of pomace matrix and cyclodextrin encapsulation on olive pomace polyphenols' bioaccessibility and intestinal permeability. *Nutrients*, 12 (3) 669.

Rahman, I., Adcock, I. (2006) Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD, *Eur. Resp. J.* 28: 219–242.

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

Rescifina, A., Chiacchio, U., Iannazzo, D., Piperno, A., Romeo, G., (2010) beta-Cyclodextrin and Caffeine Complexes with Natural Polyphenols from Olive and Olive Oils: NMR, Thermodynamic, and Molecular Modeling Studies. *J. Agr. Food Chem.* 58, 11876-11882.

Rey, L., May, J.C. (2010) Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products, 3rd Edt. U: Glimpses into the realm of freeze-drying: Classical issues and new ventures. Zug, Švicarska, Informa, str. 1-28.

Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Werner, Z. (2010): Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća, Kem. Ind. 59 (4): 169–177.

Roig-Juñent, S., Domínguez, M. C., Flores, G. E., Mattoni, C. (2006). Biogeographic history of South American arid lands: A view from its arthropods using TASS analysis. J. Arid Environ., 66(3): 404-420.

Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., De Castro, A. (2007) *In vitro* activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. J. Agric. Food Chem. 55: 680–686.

Rubio-Senent, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A., Fernández-Bolaños J. (2012) New phenolic compounds hydrothermally extracted from the olive oil byproduct alperujo and their antioxidant activities. J. Agric. Food Chem. 60:1175–1186.

Ruiz-Jiménez, J., Priego-Capote, F., Castro, M.D.L. (2004) Identification and quantification of trans fatty acids in bakery products by gas chromatography–mass spectrometry after dynamic ultrasound – assisted extraction, J. Chromatogr. A 1045: 203–210.

Ryan, D., Robards, K., Lavee, S. (1999) Changes in phenolic content of olive during maturation. Int. J. Food Sci. Tech. 34: 265–274.

Saavedra, M.J., Borges, A., Dias, C., Aires, A., Bennett, R.N., Rosa, E.S., Simoes, M. (2010), Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria, Med. Chem. 6: 174–183.

Saini, R.K., Keum, Y.S. (2018) Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. Food Chem. 240: 90-103.

Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes, U: New Methods of Food Preservation. Gould, G. W. (ured.), Blackie Academic & Professional: London, str. 176-204.

Salustio, P.J., Pontes, P., Conduto, C., Sanches, I., Carvalho, C., Arrais, J., Marques, H.M.C. (2011) Advanced Technologies for Oral Controlled Release : Cyclodextrins for Oral Controlled Release. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 12: 1276-1292.

Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, S., Cárdeno, I., Talero, A., Sánchez-Hidalgo, E., Motilva, M., Alarcón de la Lastra, V., (2010) Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice, *Clin. Nutr.* 29: 663–673.

Santos, H.M., Capelo, J.L. (2007) Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta* 73(5):795-802.

Shahidi, F. Zhong, Y. (2010) Lipid Oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* 39: 4067–4079.

Seiquer, I., Rueda, A., Olalla, M., Cabrera-Vique, C. (2015) Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chem.* 188, 496-503.

Servili, M., Montedoro, G.F. (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 602–613.

Singh, R.P.; Chidambara Murthy, K.N.; Jayaprakasha, G.K. (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J. Agric. Food Chem.* 50: 81–86.

Singh, I., Mok, M., Christensen, A.M., Turner, A.H., Hawley, J.A. (2008) The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function, *Nutr. Metab. Cardiovas.* 18: 127–132

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-58.

Sirianni, R., Chimento, A., De Luca, A., Casaburi, I., Rizza, P., Onofrio, A., Iacopetta D., Puoci, F., Ando`, S., Maggiolini, M., Pezzi, V. (2010) Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation, *Mol. Nutr. Food Res.* 54: 833–840.

Soler, A., Romero, M.P., Macia, A., Saha, S., Furniss, C.S.M., Kroon, P.A., Motilva, M.J. (2010) Digestion stability and evaluation of the metabolism and transport of olive oil phenols in the human small intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line. *Food. Chem.* 119, 703-714.

Souza, C.R.F., Schiavetto, I.A., Thomazini, F.C.F., Oliviera, W.P. (2008) Processing of *Rosmarinus officinalis* Linne extract on spray and spouted bed dryers. *Braz. J. Chem. Eng.* 25 (1): 59-69.

Springett, B. (2001): Effect of agronomic factors on grape quality for wine production. In: *Raw Ingredient Quality in Processed Foods*, Springett, M.B. (ured.), Maryland: Aspen Publishers, pp. 125–146.

Steed, J. W., Atwood, J. L. (2009) *Supramolecular Chemistry*, Second Edition, Wiley, str. 35–38, 72–73, 361–370.

Suárez, M., Romero, M.P., Ramo, T., Macià, A., Motilva M.J. (2009) Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 57:1463–1472.

Sudjana, A.N., D’Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V., Hammer, K.A. (2009) Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int. J. Antimicrob. Agents* 33: 461–463.

Suksomtip, M. Pongsamart, S. (2008) Protective effect against oxidation of human low-density lipoprotein and plasmid DNA strand scission of Tamarind seed coat extract in vitro. *LW-Food Sci Technol.* 41: 2002–2007.

Suslick K. (1990) Sonochemistry, *Science* 247, 1439- 1445.

Suslick, K.S. (1994) The chemistry of ultrasound. U: *The Yearbook of Science and the Future* 1994; *Encyclopaedia Britannica*: Chicago, str. 138-155.

Suwal, S., Marciniak, A. (2018) Technologies of the extraction, separation and purification of polyphenols – a review. *Nepal J. Biotechnol.* 6 (1): 74-91.

Szejtli, J., Szente, L. (2005) Elimination of Bitter, Disgusting Tastes of Drugs and Foods by Cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61: 115-125.

Šic Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F., Rimac Brnčić, S., (2015) Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Int. Agrophys.* 29: 231-237.

Šic Žlabur, J., Žutić, I., Radman, S., Pleša, M., Brnčić, M., Barba, F., Rocchetti, G., Lucini, L., Lorenzo, J., Domínguez, R. (2020) Effect of Different Green Extraction Methods and Solvents on Bioactive Components of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Flowers. *Molecules*, 25 (4), 810-817.

Šic Žlabur, J., Radman, S., Opačić, N., Rašić, A., Dujmović, M., Brnčić, M., Barba, F.J., Castagnini, J.M. Voća, S. (2022) Application of Ultrasound as Clean Technology for Extraction of Specialized Metabolites From Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Front. Nutr.* 9:870-923.

Škevin D. (2016) *Kemija i tehnologija ulja i masti, interna skripta, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Tabaraki, R., Heidarizadi, E., Benvidi, A. (2012) Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (L.) peel antioxidants by response surface methodology, *Separ. Purificat. Technol.* 98: 16-23.

Tapas, A.R., Sakarkar, D. M., Kakde, R.B. (2008): Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 7 (3): 1089- 1099.

Temelli, F. (2009) Perspectives on Supercritical Fluid Processing of Fats and Oils. *J. Supercrit. Fluids*, 47: 583-590.

Terpinc, P.; Bezjak, M.; Abramovič, H. (2009) A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chem.* 115: 740–744.

Terzuoli, E., Donnini, S., Giachetti, A., Iniguez, M.A., Fresno, M., Melillo, G., Ziche, M. (2010) Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha by dihydroxyphenylethanol, a product from olive oil, blocks microsomal prostaglandin-E synthase-1/vascular endothelial growth factor expression and reduces tumor angiogenesis, *Clin. Cancer Res.* 16: 4207–4216.

Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T. (2001) Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, *Ultrason. Sonochem.* 8: 137–142.

Tønnesen, H.H., Másson, M., Loftsson, T. (2002). Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: Solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 244: 127–135.

Tranter, H.S., Tassou, S.C., Nychas, G.J. (1993) The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*, *J. Appl. Microbiol.* 74: 253–259.

Tsarbopoulos, A., Gikas, E., Papadopoulos, N., Aligiannis, N., Kafatos, A. (2003). Simultaneous determination of oleuropein and its metabolite in plasma by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 785: 157–164.

Velagaleti R. (2010) *Stability and Shelf Life of Pharmaceutical Products*. U: Gad SC. ur. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Regulations and Quality*. John Wiley & Sons, Inc.; str. 2.

Ventura, S.P.M., Nobre, B.P., Ertekin, F., Hayes, M., García-Vaquero, M., Vieira, F., Koc, M., Gouveia, L., Aires-Barros, M.R., Palavra, A.M.F. (2017) Extraction of value-added compounds from microalgae. U: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts* (Gonzalez-Fernandez, C., Muñoz, R., ured.), Woodhead Publishing, Duxford, str. 461-483.

Villamiel, M., de Jong, P. (2000): Influence of high intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk, *J. Agric. Food. Chem.* 48: 472-478.

Vilkhu K., Mawson R., Simons L., Bates D. (2008): Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review, *Innovat. Food. Sci. Emerg. Tech.* 9: 161–169.

Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrason. Sonochem.* 8, 303-313.

Vinatoru M., Mason, T., Calinescu, I. (2017) Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials, *TrAC Trends Anal. Chem.* 97: 159-178.

Visioli, F., Galli, C., Plasmati, E., Viappiani, S., Hernandez, A., Colombo, C., Sala, A. (2000) Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress, *Circulation* 102: 2169–2171.

Vitali Čepo, D., Albahari, P., Zovko Končić, M., Radić, K., Jurmanović, S., Jug, M. (2017) Solvent extraction and chromatographic determination of polyphenols in olive pomace. *J. Funct. Food Health Dis.*, 6: 7-14.

Vitali Čepo, D., Radić, K., Jurmanović, S., Jug, M., Grdić Rajković, M., Pedisić, S., Moslavac, T., Albahari, P. (2018) Valorization of Olive Pomace – Based Nutraceuticals as Antioxidants in Chemical, Food and Biological Models. *Molecules* 23(8): 2070.

Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Alligiannis, N., Skaltsounis, A.L. (2012) Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *Supercritical Fluids*, 67: 89-93.

Xu, B.J., Chang, S. K. (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.*72: 159-166.

Yuan, J.J.; Qin, F.G.F.; Tu, J.L.; Li, B. (2017) Preparation, characterization, and antioxidant activity evaluation of liposomes containing water-soluble hydroxytyrosol from olive. *Molecules* 22: 870.

Zabot, G. L., Meireles, M. A. A. (2016). On-line process for pressurized ethanol extraction of onion peels extract and particle formation using supercritical antisolvent. *Supercritical Fluids*, 110: 230–239.

Zampa, A., Silvi, S., Servili, M., Montedoro, G., Orpianesi, C., Cresci, A. (2006) In vitro modulatory effects of colonic microflora by olive oil iridoids, *Microb. Ecol. Health Dis.* 18: 147–153.

Zengin, G., Cakmak, Y.S., Guler, G.O., Aktumsek, A. (2010) In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food Chem. Toxicol.* 48: 2638–2641.

Zhang, J., Wider, B., Shang, H., Li, X., Ernst, E. (2012). Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. *Complementary Therapies in Medicine.* 20 (1-2): 100-106.

Zhang, X., Cao, J., Zhong, L. (2009) Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 379 581–586.



Zhong, Y., Shahidi, F. (2015) Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Handbook of Antioxidants for Food Preservation, 1st ed.; Shahidi, F., Woodhead, Eds.; Publisher: Sawston, Cambridge, UK; pp. 287–333. ISBN 9781782420897.

Zhao, G., Yin, Z., Dong, J. (2009) Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*, *J. Ethnopharmacol.* 125; 265–268.

## **8. BIOGRAFIJA**

Petra Albahari rođena je 10. lipnja 1986.godine u Zagrebu (Hrvatska), gdje je završila osnovnu školu, osnovnu glazbenu školu i II gimnaziju. Akademski naziv prvostupnika prehrambene tehnologije stekla je 2008. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2010. godine završila je diplomski studij Upravljanja sigurnošću hrane na istom fakultetu. Tijekom studija dobila je Rektorovu nagradu za znanstveni rad „Uporaba površinski modificiranih titanatnih nanocjevčica u amperometrijskim biosenzorima“. Dobitnica je i Stipendije Grada Zagreba te stipendija Njemačke službe za akademsku razmjenu (DAAD) i Talijanskog instituta za kulturu, zahvaljujući kojima je boravila 2007. godine u Berlinu i 2009. godine u Bologni te usavršila znanje njemačkog i talijanskog jezika.

2011. godine zapošljava se kao stručna suradnica - analitičarka u Odsjeku za prehrambene aditive Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. Poslijediplomski doktorski studij „Farmaceutsko – biokemijske znanosti“ upisuje 2013. godine na Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu u Zagrebu.

2016. godine počinje raditi u Plivi Hrvatska d.o.o., kao znanstvenica analitičarka u Globalnom analitičkom laboratoriju (GASL) na razvoju i validaciji analitičkih metoda. Od 2022. godine radi kao stručna suradnica za farmakovigilanciju u Plivi Hrvatska d.o.o.

Suautorica je 3 recenzirana znanstvena rada te 5 sažetaka u zbornicima i časopisima.

#### **Lista publikacija:**

1. Albahari, P., Jug, M., Radić, K., Jurmanović, S., Brnčić, M., Rimac Brnčić, S. & Vitali Čepo, D. (2018) Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction. *Lebensmittel-wissenschaft und-technologie-food science and technology*, 92, 22-31.
2. Vitali Čepo, D., Radić, K., Jurmanović, S., Jug, M., Grdić Rajković, M., Pedisić, S., Moslavac, T. & Albahari, P. (2018) Valorization of olive pomace-based nutraceuticals as antioxidants in chemical, food, and biological models. *Molecules*, 23 (8), 1-22
3. Vitali Čepo, D., Albahari, P., Zovko Končić, M., Radić, K., Jurmanović, S. & Jug, M. (2017) Solvent extraction and chromatographic determination of polyphenols in olive pomace. *Food in Health and Disease*, 6 (1), 7-14.

4. Vitali Čepo, D., Radić, K., Jug, M., Moslavac, T., Albahari, P., Krajinović, R., Vuletić, M. & Knežević, M. (2018) Antioksidativna aktivnost polifenola iz komine masline u modelima hrane. U: Jerković, I., Šubarić, D. & Jašić, M. (ur.) Book of Abstracts of the 11th International Scientific and Professional Conference With Food To Health.
5. Vitali Čepo, D., Jug, M., Albahari, P. & Živko, Tomislav, Koščica, Petra (2016) Cyclodextrins as potent enhancers of olive secoiridoid extraction – the case of oleuropein in olive waste. U: Journal of International Society of Antioxidants in Nutrition & Health Journal of ISANH Volume 3: Special Issue for Porto Polyphenols 2016.
6. Vitali Čepo, D., Brnčić, M., Trgovčević, M., Albahari, P., Knežević, N., Jug, M., Rimac Brnčić, S. (2016) Combination of ultrasound assisted extraction (UAE) and cyclodextrin encapsulation for the isolation of antioxidants from olive pomace. U: IUFoST World Congress of Food Science and Technology, Book of Abstracts.
7. Albahari, P., Vujić, L., Filipović Grčić, G., Jablan, J., Vitali Čepo, D. (2015) Evaluation of olive pomace as a source of potent bioactive compounds. U: Sekeroglu, N. & Cetinkaya, H. (ur.) Abstract Book.
8. Albahari, P., Jug, M., Brnčić, M., Vitali Čepo, D. (2015) Application of ultrasound-assisted extraction for the isolation of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein from olive pomace. U: Šubarić, D. & Jašić M. (ur.) With food to health, Book of abstract and papers of 8th International symposium.

## **SOLVENT EXTRACTION AND CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF POLYPHENOLS IN OLIVE POMACE**

**Dubravka Vitali Čepo<sup>\*</sup>, Petra Albahari, Marijana Zovko Končić, Kristina Radić, Sanja Jurmanović, Mario Jug**

University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, HR-10000 Zagreb, Croatia

*Original scientific paper*

### **Summary**

Olive oil mill waste obtained after two-phase olive oil extraction process was subjected to conventional liquid solvent extraction under different pH/temperature/duration conditions using different types of food-grade solvents. The independent variables were: solvent type (ethanol percentage), extraction temperature (20-90 °C), extraction time (30 min-24 h) and pH (2-10.3) of extraction solvent while the response variables were total phenolic content and antioxidant activity of obtained extracts. The optimum solvent extraction conditions for phenols were 120 min at 70 °C using 60% ethanol as extraction solvent, at solvent to sample ratio 5:1 (v/w). For quantification of major bioactive olive polyphenols hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein in obtained extracts, fast and simple RP-HPLC-DAD method was developed and validated. Oleuropein was presented in highest amounts with average value of 115.14±0.19 mg/kg of fresh olive pomace.

*Keywords:* olive pomace, extraction, HPLC-DAD, hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropein

### **Introduction**

The production of olive oil, the second most important agro-sector in Europe, has increased in recent years and, as the consequence, larger quantities of waste products associated with olive oil production are being disposed in the environment (olive leaves, olive pomace and olive mill waste water). They contribute significantly to excessive nutrient burdens in local ecosystems and represent ecological hazards (Aberg et al., 2004). The exploitation of olive waste from an environmental point of view may be approached in several ways: it can be used for energy generation; as fertilizer or soil conditioner; as herbicide or pesticide, as animal feed or in human consumption; for residual oil recovery; for production of various products (alcohols, biosurfactants, biopolymers, activated carbons) and for organic compounds recovery (pectin, phenolic antioxidants). Most studies dealing with biological activity of olive derived products have been focused on polyphenols as major active constituents. Olive pomace contains different phenolic compounds that can be divided in several classes: simple phenols (e.g., tyrosol (TS) and hydroxytyrosol (HTS)) cinnamic acid derivatives; flavonoids (e.g., apigenin, luteolin and rutin (quercetin-3-rutinoside)); and secoiridoids (e.g., oleuropein (OLE), oleuropein aglycone and de(carboxymethyl) oleuropein aglycone isomers) (Obied et al., 2007).

The potential of olive biophenols (OBPs) has already been recognized by competent authorities, such as EFSA (European Food Safety Authority). Extracts obtained from olives and olive mil wastes are

generally regarded as safe (Soni et al., 2006; Obied et al., 2012) and reported pharmacological properties of particular OBPs include antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular, immunomodulatory, gastrointestinal, respiratory, autonomic, central nervous system, antimicrobial, anticancer and chemopreventive action (Obied et al., 2012). Pharmacologically active OBPs are abundant in different types of olive mill wastes, however the exact qualitative and quantitative composition of obtained extracts is significantly affected by the type of extraction (Kumar et al., 2006; Aliakbarian et al., 2011) and extraction conditions (time, temperature, pressure, solvent).

The increasing use of bioactive compounds in pharmaceutical, food and chemical industries sector such as points out the need of finding adequate extraction method for bioactive components from plant materials (Sasidharan et al., 2011). Bioactive compounds from plant materials can be extracted by various classical extraction techniques. Most of these techniques are based on the extracting power of different solvents in use and the application of heat and/or mixing (Azmir et al., 2013). The major challenges of conventional extraction techniques are longer extraction time, large solvent consumption, evaporation of the huge amount of solvent during the process, low extraction selectivity and thermal decomposition of thermo labile compounds (Luque de Castro and Garcia-Ayuso, 1998). Therefore, nonconventional extraction techniques such as ultrasound assisted extraction, enzyme-assisted

<sup>\*</sup>Corresponding author: [dvitali@pharma.hr](mailto:dvitali@pharma.hr)

extraction, microwave-assisted extraction, pulsed electric field assisted extraction, supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction have been introduced during the last two decades (Azmir et al., 2013). Those techniques have numerous advantages, especially in terms of sustainability and pollution prevention but can be conducted only in well equipped laboratories and in many cases, are demanding or not suitable for scale-up. Therefore, there is a constant need for further optimization of conventional extraction techniques in terms of efficiency, selectivity and sustainability. The aim of this work was to optimize the extraction of olive pomace polyphenols, using simple solvent extraction and only food-grade solvents with special emphasis set on HTS, TS and OLE as the major bioactive polyphenols in live. The additional goal was to develop and validate simple, fast and accurate procedure for their quantification in obtained extracts.

## Materials and methods

### *Reagents and chemicals*

Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), tyrosol (4-hydroxyphenylethanol), hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenylethanol) and oleuropein were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Sodium carbonate and all solvents used throughout the experiments were obtained by Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals were from Kemika (Zagreb, Croatia).

### *Stock standard solutions*

Stock standard solutions of TS, HTS and OLE were prepared in HPLC-grade water at 1 mg/mL level. Working standards were prepared prior to analysis by diluting appropriate volumes of stock solutions with HPLC grade water at 3, 9, 27, 81 and 243 µg/mL level.

### *Instrumentation*

For chromatographic analysis, we used Agilent Life Sciences 1220 LC Gradient System equipped with a dual-channel gradient pump with degasser, autosampler, column oven and an additional Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Chromatographic separation was performed on an Zorbax Eclipse Plus C18 reversed-phase column (250 x 4.6 mm, ID 5 µm) (Agilent,

Santa Clara, CA, USA). Spectrophotometric analysis was conducted on UnicamUV4 UV-VIS spectrometer.

### *Chromatographic analysis of HTS, TS and OLE*

For the chromatographic separation of HTS, TS and OLE a gradient elution program was used. A linear gradient was run with flow rate of 1 ml/min. The column was maintained at 40 °C throughout all experiments with the aid of an electronically controlled oven. All mobile phases were vacuum filtered through 0.45 µm membrane filter and degassed in an ultrasonic bath prior to HPLC analysis. For the validation of analytical method, the guidelines of the International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use recommend the accomplishment of linearity, accuracy, precision, and sensitivity.

To evaluate the linearity of the method, standard solutions were prepared at five concentration levels containing 3, 9, 27, 81 and 243 ppm of TS, HTS and OLE. Five replicates at each concentration were analyzed. The linearity of the data was checked by performing linear least-squares regression analysis. Accuracy of the method was assessed by three quality control standards at three concentration levels, and was evaluated relative percentage error. The assay precision was evaluated by performing the assay at three levels (9, 27 and 243 ppm) in five replicates and calculating the RSD values. Intermediate precision was demonstrated by preparing standard solutions at three levels (9, 27 and 243 ppm) in three replicates on different days and calculation of RSD values. Recovery was evaluated as the ratio of the peak area for every substance in the spiked sample against that of the standard. Olive pomace samples were spiked at three different concentration levels. LOD was determined by preparing a solution that produced a response of about 3 and 10 times the baseline noise. The solution was injected three times, and the S/N (signal/noise) ratio recorded for each injection. Solution concentration is considered LOD if S/N ratio is between 3-10. LOQ was determined in the same manner but with an S/N ratio of 10-20.

### *Total phenolic content*

Total phenolic content (TPC) was determined spectrophotometrically according to the method of Singleton and Rossi (1965) with some modifications. Briefly, adequately diluted olive pomace extracts (200 µL) were mixed with 1.35 mL of distilled water and 150 µL of Folin Ciocalteu reagent. After 5-minute incubation 1.5 mL of 6% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added

to each reaction mixture and obtained solutions were incubated at 50 °C for 30 minutes. Absorbance readings were conducted at 725 nm and results were expressed as gallic acid equivalents (GAE).

#### TEAC assay

The TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) assay reflects the ability of hydrogen or electron-donating antioxidants to scavenge the ABTS•+ radical cation compared with that of Trolox. As described by Re et al. (1999). ABTS radical was prepared by mixing the equal volumes of 7 mM ABTS and 2.45 mM solution of K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> and leaving the mixture overnight allowing the complete development of the chromophore radical. The reaction mixture was prepared by mixing 2.5 mL of adequately diluted ABTS•+ and 300 µL of adequately diluted sample and the absorbance was measured after 3 minutes. The quenching of initial

absorbance was plotted against the Trolox concentration and obtained results were expressed as Trolox equivalents (TE).

#### Experimental design

Fresh olive pomace, obtained by the two-phase extraction process was delivered from the local olive-mill plant. Pomace samples (containing approximately 65% water, low amounts of pomace oil, olive pulp and pits) were homogenized, frozen immediately in the form of thin plates and used for the development and optimization of polyphenol extraction procedure. The independent variables were solvent type (ethanol percentage), extraction temperature, extraction time and pH of extraction solvent, while the response variables were total phenolic content (TPC) and antioxidant activity (TEAC) of obtained extracts (Table 1).

**Table 1.** Variables used in the process of the optimization of the extraction procedure

OPTIMIZATION VARIABLES	
INDEPENDENT VARIABLES	RESPONSE VARIABLES
SOLVENT TYPE (water, 40% EtOH, 60% EtOH, 80% EtOH, 96% EtOH)	TOTAL PHENOLIC CONTENT (mg GAE/g)
TIME OF EXTRACTION (30 min, 60 min, 120 min, 300 min, 24 h)	
TEMPERATURE (room temperature, 20 °C, 50 °C, 70 °C, 90 °C)	TEAC ANTIOXIDANT ACTIVITY (mg TE/g)
pH (2, 6, 8.5, 10.3)	

Extracts obtained under optimized conditions were analyzed for total phenolic content, tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein content, and TEAC. Chromatographic method for determination of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein in obtained extracts was optimized and validated according to ICH guidelines (ICH, 1996). For HTS, TS and OLE determination, olive pomace extracts were freeze-dried immediately after extraction, dissolved in adequate volume of HPLC-grade water, filtered through 0.45 µm membrane filter and subjected to HPLC analysis.

#### Statistical analysis

All analytical measurements were conducted at least in triplicates; the results were averaged and presented as means ± standard deviation. Analyses of variance ANOVA and post-hoc Tukey's test were used to compare significant differences in the values of response variables depending on the solvent composition and pH, extraction time and extraction temperature. Statistically significant influences were

expressed using p values (Tukey's post hoc test, p < 0.05). Analyses were conducted using Prism GraphPad software (GraphPad Software, Inc., USA).

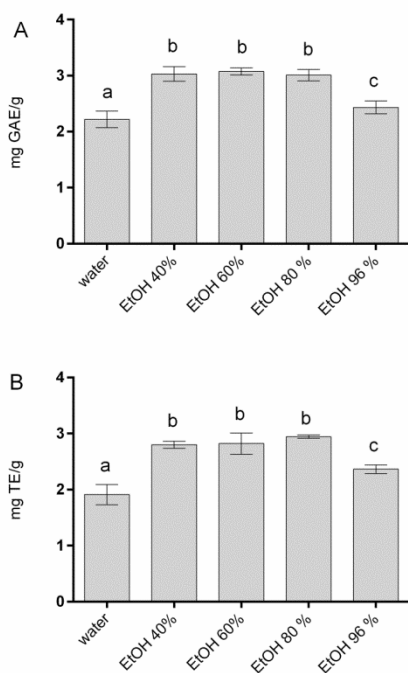
#### Results and discussion

##### *Influence of different extraction parameters on TPC and TEAC*

All olive pomace extracts contained significant amounts of polyphenolic compounds and showed antioxidant activity; however, obtained TPC and TEAC values differed significantly depending on the solvent polarity, pH and the duration and temperature of extraction. The influence of solvent on TPC and TEAC is presented in Fig. 1. Obtained results showed that significantly higher TPC and TEAC were obtained by using ethanol-water mixtures in comparison to pure water or 96% ethanol (p<0.05). Observed differences between TPC and TEAC content in extracts with 60% 40% or 80% ethanol were not statistically significant (p>0.05).

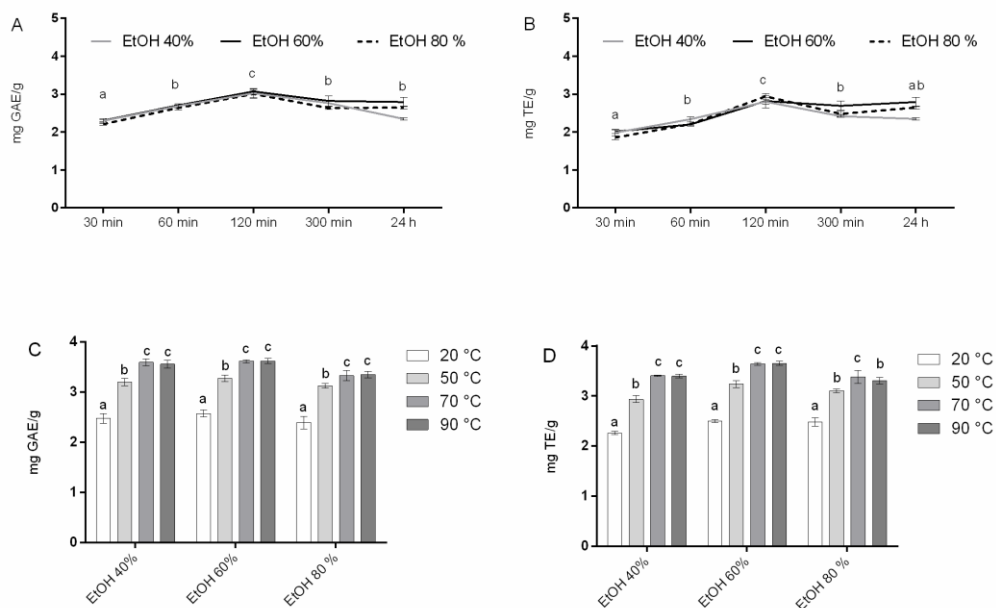
Extractions using different volume fractions of ethanol in water were used for the subsequent optimization of extraction procedure in terms of time

of extraction and applied temperature. Obtained results are presented in Fig. 2.



*a,b,c* columns marked with the same letter belong to the same statistical group ( $p > 0.05$ ). Extractions were performed at pH=6, by shaking the mixtures at 70 °C (100 rpm) for 120 min. Sample to solvent ratio was 1:4.

**Fig. 1.** Impact of the solvent type on the TPC (A) and ABTS antiradical activity (B) of olive pomace extracts



*a,b,c* data marked with the same letter belong to the same statistical group ( $p > 0.05$ ). Extractions were performed at pH 6, by shaking the mixtures at 70 °C (A, B), for 120 min (C, D). Sample to solvent ratio was 1:4.

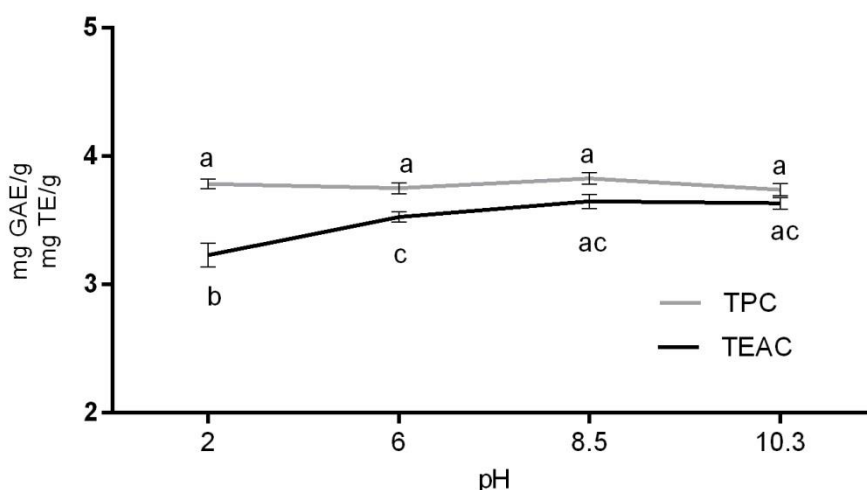
**Fig. 2.** Impact of extraction time (A, B) and temperature (C, D) on the recovery of total phenols and ABTS antiradical activity of pomace extracts



By increasing the time of extraction from 30 to 120 min resulted with significant increase of polyphenolic content and antioxidant activity of obtained extracts for each investigated solvent. Further elongation of the extraction process to 300 min did not contribute to the efficiency of the extraction process, while after 24 h extraction significant decrease of TPC and TEAC was observed (Fig. 2A, Fig. 2B). Observed decrease in the extraction yield is probably due to degradation of polyphenolic compounds caused by hydrolysis, internal redox reactions and polymerization (Alonso-Salce et al., 2001). Under the same extraction conditions, TPC and TEAC were comparable for all investigated extraction solvents (40%, 60% and 80% ethanol). Obtained results are consistent with the trends reported by Aliakbarian et al. (2011) who concluded that the prolongation of extraction time from 15 to 90 min significantly improves extraction of polyphenolic compounds from olive pomace in high-pressure-high temperature reactor, while longer extraction times promote degradation of polyphenols and negatively influences extraction yields. Similar trends were observed by Jerman et al. (2010) who optimized ultrasound-assisted solid liquid extraction of polyphenols from olive fruit.

Extraction temperature was also found as significant factor affecting the TPC and TEAC (Fig. 2C, Fig. 2D) and the higher extraction yields were obtained at the temperatures of 70 °C and higher. However, increasing the temperature above 70 °C did not produce any additional benefit; therefore 70 °C has been chosen as the optimal temperature for the extraction of olive pomace polyphenols. At 70 °C, significant differences were observed between the

efficiency of tested extraction solvents; the efficiency of 80% ethanol was significantly lower in comparison to 40% and 60% ethanol. Obtained results indicate that the major polyphenolic compounds in olive pomace are thermostabile and/or that possible thermal degradation of polyphenols generates new polyphenolic compounds that retain antioxidant activity. Observed results are consistent with data of Herrero et al. (2011), who optimized the pressurized liquid extraction of olive pomace polyphenols using food-grade solvents and obtained the highest yields at high temperatures (150 °C and 200 °C for water and ethanol, respectively). Similarly, Aliakbarian et al. (2011) investigated extraction of olive pomace polyphenols by high-pressure-high temperature reactor and observed higher polyphenol yields at higher temperatures (optimal temperature was 180 °C). pH can also significantly influence the efficiency of extraction procedure, because polyphenolic compounds in plant material are often part of high molecular mass complexes that can be partially degraded under acidic or alkaline conditions enhancing in that way the extractability of phenolic compounds. On the other hand, extreme pH values can cause the degradation of phenolic compounds resulting in lower extraction yields. Therefore, the outcome depends on the nature of plant material and physicochemical characteristics of particular polyphenols. In case of olive pomace, the change of pH of the extraction solvent did not produce significant changes in TPC of obtained extracts; however significantly lower TEAC values were recorded in extracts obtained under acidic conditions (Fig. 3).



<sup>a,b,c</sup> data marked with the same letter belong to the same statistical group ( $p > 0.05$ ). Extractions were performed by shaking the mixtures at 70 °C (100 rpm for 120 min, using 60% ethanol as extraction solvent. Sample to solvent ratio was 1:4.

**Fig. 3.** Impact of pH on the recovery of total phenols and ABTS antiradical activity of pomace extracts

Development and validation of RP HPLC-DAD method for determination of HTS, TS and OLE in olive pomace extract

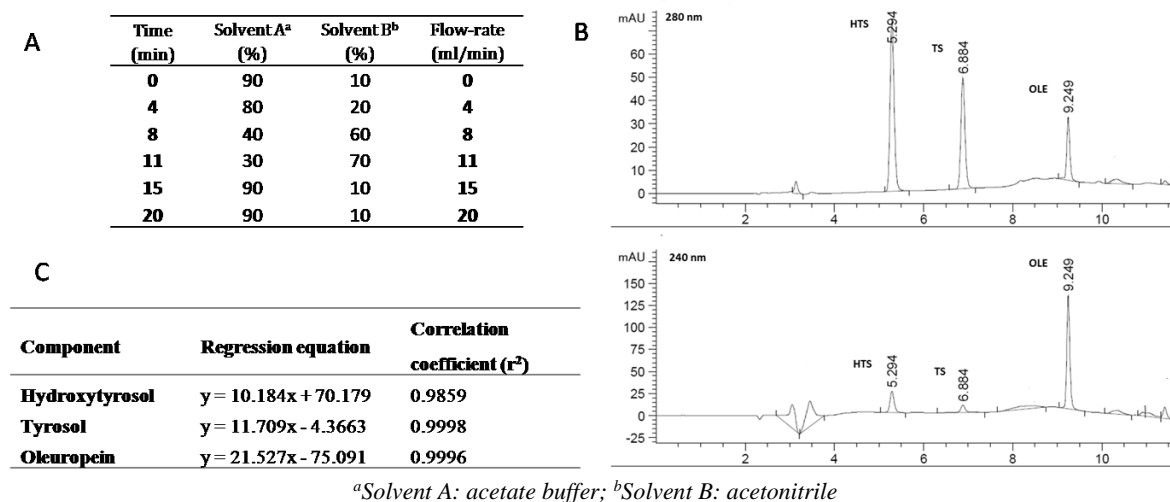


Fig. 4. RP HPLC-DAD method for determination of HTS, TS and OLE in olive pomace extracts: gradient elution program (A); chromatograms of reference standards (27 ppm) (B); regression equation and correlation coefficients (C)

For the chromatographic separation of HTS, TS and OLE a gradient elution program was used as shown in Fig. 4A. Solvent A was 0.05 M Na-acetate buffer (pH=5) and solvent B was acetonitrile.

UV spectra of all substances were recorded by diode array detection system and the maximum of absorbance were determined to be 240 nm for OLE and 280 nm for HTS and TS (Fig. 4B). Identification of the eluting peaks was performed by comparing their retention time values and the corresponding UV spectra with those of the standards. The linearity of the method was evaluated by linear regression analysis using five concentrations of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein. Good linearity was achieved for all the analytes, as shown in Fig. 4C. For accuracy determination, three standard solutions at concentration levels 27, 81 and 243 ppm were analyzed. Obtained results were expressed as relative percentage error ranging from 1.33% - 4.04% for HTS; 1.99% - 3.42% for TS and 0.64% - 2.35% for OLE. Precision analysis was conducted by analyzing 5 replicates of standard solution at three concentration levels (9, 27 and 243 ppm). RSD values were ranged from 0.84 - 2.99 for HTS; 0.04 - 0.13 for TS and 0.86 - 3.45 for OLE. Intermediate precision was determined by analyzing three replicates of prepared standard solutions at three concentration levels on different days. Obtained RSD values were from 1.12 - 2.60 for HTS; 1.47 - 2.79 for TS and 0.67 - 2.38 for OLE. For recovery

determination olive pomace samples were spiked with standard solutions of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein at three concentration levels (27, 81 and 243 ppm). The obtained recovery was 100.9% - 102.4% for HTS; 99.3% - 101.3% for TS and 99.9% - 100.5% for OLE. The sensitivity of the method has been assessed by determining LOD values for HTS (1.5 ppm), TS (1.0 ppm) and OLE (2.0 ppm).

Applied method was found to be suitable for the analysis of olive pomace extracts due to simple sample preparation (it does not require any sample pre-treatment), short time of analysis and satisfying validation parameters. The only disadvantage of the method was its relatively low sensitivity especially in the case of OLE; however, it was high enough for the analysis of obtained olive pomace extracts.

*The content of HTS, TS and OLE in olive pomace extracts obtained under optimized conditions*

Olive pomace extracts obtained under optimized extraction conditions (continuous shaking at 70 °C for 120 min) using 40% and 60% ethanol as extraction solvents were subjected to HPLC analysis in order to compare the efficiency the two extraction solvents. Namely, there were no significant differences between the two solvents regarding total phenol yields or antioxidant activity of obtained extracts. Namely, despite the wide variety of polyphenolic compounds present in olive oil and

pomace HTS, TS and OLE are considered to be the main polyphenolic bearers of the health-promoting properties of olive oil.

The only authorised health claim for olive oil, listed in the Regulation 432/2012 (EC, 2012), relates to the level of olive phenolic compounds and the impact on the protection of blood lipids from oxidative stress. The conditions of use of the claim are that it “may be used only for olive oil which contains at least 5 mg of hydroxytyrosol

and its derivatives (e.g. OLE complex and TS) per 20 mg of olive oil. In order to bear the claim, information shall be given to the consumer that the beneficial effect is obtained with a daily intake of 20 mg of olive oil (EFSA, 2011).

Obtained results are presented in Table 2, and clearly emphasize that using 60% ethanol (instead of 40% ethanol) results in small but statistically significant increase in HTS, TS and OLE content of obtained extracts.

**Table 2.** TPC, AA, HTS, TS and OLE content of ethanolic pomace extracts obtained under optimized conditions

Compound*	40 % EtOH	60 % EtOH
TPC (mg GAE/g)	3.59±0.07 <sup>a</sup>	3.62±0.03 <sup>a</sup>
AA (mg TE/g)	3.41±0.01 <sup>a</sup>	3.64±0.03 <sup>a</sup>
HTS (mg/kg)	75.46±0.33 <sup>a</sup>	81.8±0.41 <sup>b</sup>
TS (mg/kg)	82.08 ±0.13 <sup>a</sup>	86.05±0.34 <sup>b</sup>
OLE (mg/kg)	110.37±0.07 <sup>a</sup>	115.14±0.19 <sup>b</sup>

\*values are expressed per g(kg) of fresh olive pomace. Differences between values in the same row marked with different letters are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

The amounts of HTS, TS and OLE are generally comparable to levels found in olive pomace by other authors. The content of bioactive polyphenols in olive pomace is variable and depends on numerous factors: olive cultivar, the olive oil extraction process and the type of pomace that remains as the by-product (traditional extraction, two-phase process or three-phase process, continuous combined percolation-centrifugation etc.) (Dermeche, 2013). However, our results show that OLE is the most abundant among analysed polyphenols in olive pomace which is consistent with observations of other authors (Cioffi et al., 2010; Rubio-Senet et al., 2013). They investigated more advanced extraction methods, using hydrothermally treated pomace, different types of organic solvents or applying higher temperatures or pressures. It is hard to compare the absolute yields of HTS, TS and OLE to ours since results obtained by different authors are often expressed in different ways (per g of dry extract, per g of dry pomace, per g of fresh pomace) without sufficient data that would allow re-calculation and comparison.

## Conclusions

Extracts with different antioxidant (phenolics) concentrations and activities were obtained from fresh olive pomace by changing the conditions of conventional solvent extraction. For this purpose, RP HPLC-DAD method was validated and found to be suitable for the analysis of olive pomace

extracts due to simple sample preparation (it does not require any sample pre-treatment), short time of analysis and satisfying validation parameters. Among different food-grade solvents, 60% ethanol was selected as the most appropriate solvent for the extraction of phenolic compounds from olive oil pomace under optimized conditions (120 min with shaking, 70 °C, 120 min). Satisfactory phenolic (antioxidant) yields prove that oil mill waste is a low-cost, renewable and abundant source of phenolic antioxidants and that simple solvent extraction which uses only food-grade solvents can be successfully applied to olive pomace.

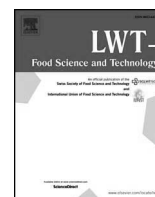
## Acknowledgement

This work has been fully supported by Croatian Science Foundation (UIP-2014-09-9143).

## References

- Aberg, C. M., Chen, T., Olumide, A., Raghavan, S. R., Payne, G. F. (2004): Enzymatic grafting of peptides from casein hydrolysate to chitosan. Potential for value-added byproducts from food-processing wastes. *J. Agr. Food Chem.* 52, 788-793.
- Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Perego, P. (2011): Valorization of olive oil solid waste using high pressure-high temperature reactor. *Food Chem.* 128 (3), 704-710.
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F. (2001): Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *J. Chromat.* 933 (1-2), 37-43.

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013): Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 117 (4), 426-436.
- Cioffi, G., Pesca, M. S., De Caprariis, P., Braca, A., Severino, L., De Tommasi, N. (2010): Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem.* 121, 105-111.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P. (2013): Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem.* 48 (10) 1532-1552.
- EC (2012): Regulation No 432/2012, OJ L 136/25-5-2012. EFSA J no 2011; 94:2033.  
[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/2033.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2033.pdf).
- Herrero, M., Temirzoda, T. N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., Ibañez, E. (2011): New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *J. Chromat.* 42 (21), 7511-7520.
- ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (1996): Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH-Q2B, Geneva.
- Jerman, T., Trebše, P., Mozetič Vodopivec, B. (2010): Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chem.* 123 (1) 175-182.
- Kumar, P., Chu, C., Krishnaiah, D., Bono, A. (2006): High hydrostatic pressure extraction of antioxidants from *Morinda Citrifolia* fruit-process parameters optimisation. *J. Eng. Sci. Technol.* 1, 41-49.
- Luque de Castro, M. D., Garcia-Ayuso, L. E. (1998): Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chim. Acta* 369 (1-2), 1-10.
- Obied, H. K., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K. (2007): Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 603, 176-189.
- Obied, H. K., Prenzler, P. D., Omar, S. H., Ismael, R., Servili, M., Esposito, S., Taticchi, A., Selvaggini, R., Urbani, S. (2012): Pharmacology of Olive Biophenols. *Advan. Molec. Toxic.* 196-223.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical. Bio. Med.* 26, 1231-1237.
- Rubio-Senent, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A., Fernández-Bolaños, J. (2013): Phenolic extract obtained from steam-treated olive oil waste: Characterization and antioxidant activity. *LWT Food Sci. Tech.* 54 (1), 114-124.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., Latha, Y. L. (2011): Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 8 (1), 1-10.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.
- Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M., Crea, R. (2006): Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food Chem. Tox.* 44, 903-915.



## Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction



Petra Albahari<sup>a</sup>, Mario Jug<sup>b</sup>, Kristina Radić<sup>b</sup>, Sanja Jurmanović<sup>b</sup>, Mladen Brnčić<sup>c</sup>, Suzana Rimac Brnčić<sup>c</sup>, Dubravka Vitali Čepo<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Pliva d.o.o., Zagreb, Croatia

<sup>b</sup> University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia

<sup>c</sup> University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb, Croatia

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Olive pomace  
Ultrasound assisted extraction  
Cyclodextrin  
Olive polyphenols  
Antioxidant activity

### ABSTRACT

Cyclodextrin enhanced pulsed ultrasound assisted extraction procedure was developed for obtaining olive pomace extract rich in bioactive polyphenols, principally oleuropein, tyrosol, and hydroxytyrosol. 20-minute extraction using 12 mm probe at 100% output intensity was selected as optimal for the extraction of olive pomace polyphenols, using 60% ethanol at 1:40 solvent to solid ratio. Addition of cyclodextrins to extraction solvent (especially randomly-methylated-beta cyclodextrin and hydroxypropyl-beta cyclodextrin) significantly affected extraction yields, stability and the appearance (colour and particle size distribution) of obtained extracts. Extracts obtained under optimized conditions contained 887 mgkg<sup>-1</sup> of hydroxytyrosol, 1117 mgkg<sup>-1</sup> of tyrosol and 1744 mgkg<sup>-1</sup> of oleuropein. In comparison to conventional solvent extraction, application of ultrasound-assisted extraction resulted in significantly higher yields, reduced extraction time and solvent consumption.

### 1. Introduction

Growing of olive trees and olive oil production is widespread in Mediterranean area and is constantly increasing (Ruggeri, Battista, Bernardi, Fino, & Mancini, 2015). However, managing the waste products generated during the process of olive oil production is rather expensive. The most known by-products are olive pomace – solid residue remained after solvent extraction of the olives, and olive mill wastewaters – aqueous effluent derived during production processes. Olive pomace is composed of lignin, cellulose, hemicellulose, pulp retained olive oil and mineral components. Also, significant amounts of polyphenols remain in olive pomace contributing to its antioxidant potential (Herrero et al., 2011). Due to high polyphenolic content, olive waste exerts significant negative effects on the ecosystem, as has been demonstrated in several studies (Della Greca et al., 2001; Paredes, Moreno, Eamos-Cormenzana, & Martinez, 1987). On the other hand, phenolic compounds from olive waste possess wide range of specific biological activities that can have good impact on human health. Also, their strong antioxidant activity, accessibility, and certain advantages that polyphenols from natural sources have over synthetic antioxidants make them suitable for numerous applications in food and cosmetic industry (Peschel et al., 2006; Viro, Tomao, Le Bourvellec, Renard, & Chemat, 2010).

Considering all of the above, the idea of present investigation was to use environmentally harmful waste (olive oil by-products) for the production of potent natural antioxidant diminishing, at the same time, olive waste ecological hazard. Development of efficient procedures for extraction of bioactive compounds from biomass and simultaneous production of added value products is an important and useful approach in the process of achieving higher profitability and sustainability of food industry (Viro et al., 2010). Because of its simplicity, maceration is the most widely used process of extraction of polyphenols from biomass. The main drawbacks of applying this technique in industrial scale are the consumption of large quantities of toxic solvents and the duration of the process. Since the idea of the exploitation of olive oil by-products is primarily ecological, their further manufacturing processes should be based on the principles of sustainability and green chemistry.

In developing such processes, certain key principles should be kept in mind: the use of non-toxic extraction solvents, the reduction of the volume of extraction solvent and short extraction time in terms of increasing the productivity. In order to achieve these goals applying new technologies such as ultrasound, microwaves, high temperature in combination with high pressure or superheated liquid extraction is usually required (Carbonell Capella et al., 2017; Luque de Castro, 2014).

\* Corresponding author. University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Food Chemistry, A. Kovačića 1, Zagreb, 10000, Croatia.  
E-mail address: [dvitali@pharma.hr](mailto:dvitali@pharma.hr) (D. Vitali Čepo).

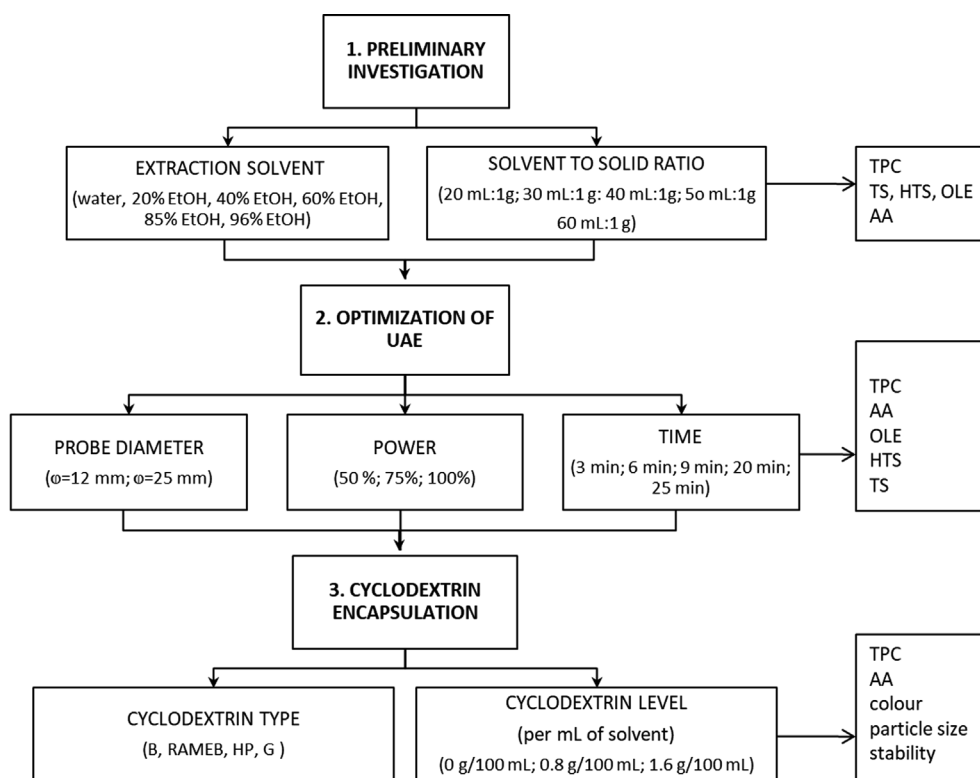


Fig. 1. Schematic presentation of the study design.

AA-antioxidant activity; B-beta-cyclodextrin; EtOH-ethanol; G-gamma cyclodextrin; HPB-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; HTS-hydroxytyrosol; OLE-oleuropein; RAMEB-randomly-methylated beta cyclodextrin; TPC-total phenolic content; TS-tyrosol; UAE-ultrasound assisted extraction.

Due to its lower cost in comparison to other unconventional extraction techniques and simple up-scaling of ultrasonic device, ultrasound-assisted extraction (UAE) has become a well-established technique both, in laboratories and in industrial scale. Its efficiency is based on the growth and collapses of microbubbles in the liquid phase (Chemat, Tomao, & Viro, 2008; Ljubić Herceg et al., 2010; Dujmić et al., 2013; Herceg et al., 2009) and simultaneous formation of extreme temperature and pressure conditions (5000 °C and 2000 atm) (Herceg et al., 2009; Suslick & Flannigan, 2008) resulting in efficient fragmentation and disaggregation of the analyzed sample. Therefore, this technique enables highly efficient extraction of target compounds and shortens the duration of extraction (Chemat et al., 2008).

Extraction of polyphenols from complex matrices generally represents a big challenge mainly due to the fact that many polyphenolic compounds decompose when exposed to high temperature or light. Additionally, obtained extracts are usually instable, hygroscopic, and show unfavourable organoleptic characteristics. These properties might affect extraction efficiency and limit the use of natural extract as functional ingredient. In order to overcome mentioned issues, the use of pharmaceutical excipients, such as cyclodextrins, represents an efficient and simple approach in the process of formulation of stable and organoleptically acceptable products.

Cyclodextrins are organic molecules, with an internal hydrophobic cavity and therefore are able to form inclusion complexes with the wide variety of organic molecules. Formation of such complexes can affect physico-chemical properties of the target molecule, such as antioxidant activity, water solubility and stability (López-García, López, Maya, & Fernández-Bolanos, 2010). Encapsulation can also increase dissolution rate, membrane permeability and bioavailability, mask flavour and increase the shelf-life of the product by providing protection against light- or thermal degradation (Mourtzinou, Salta, Yannakopoulou, Chiou, & Karathanos, 2007). When designing this study, the idea was to combine the benefits of ultrasound-assisted extraction and cyclodextrin encapsulation in the formulation of olive pomace extract rich in

polyphenols, principally oleuropein, tyrosol and hydroxytyrosol.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Olive pomace (OP) was collected from several two-phase olive mills in Croatia. Fresh pomace containing approximately 85% water was immediately frozen and transported to the laboratory. After drying at 60 °C for 36 h, moisture content was reduced to approximately 20% in order to prevent microbial and enzymatic degradation and concentrate bioactive compounds. The kernels were removed and pomace was milled, homogenized and defatted in Soxhlet apparatuses using petroleum ether as the extraction solvent (4 h). Defatted olive pomace was milled, sieved (1.25 mm) and used for extraction.

### 2.2. Chemicals

Ethanol (99.5% of purity) and methanol (99.8% purity) were bought from Kemika, Zagreb, Croatia. Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate, gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), oleuropein, hydroxytyrosol, tyrosol, beta-cyclodextrin (B), randomly-methylated beta cyclodextrin (RAMEB), hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPB) and gamma cyclodextrin (G) were purchased from Sigma-Aldrich, St. Luis, Missouri, USA. Deionized water (18 mΩ) used throughout the experiments was obtained from Millipore-MiliQ water purification system.

### 2.3. Experimental design

Investigation of the impact of the UAE parameters and the type and the amount of cyclodextrin on the efficiency of the extraction of polyphenolic compounds from olive pomace and subsequent optimization

has been conducted in three phases as presented in Fig. 1.

The major responses (dependent variables), depending on the phase of the experiment were: total phenolic content, antioxidant activity, and the content of bioactive olive polyphenols (BOP) that was calculated as the sum of the content of tyrosol, hydroxytyrosol, and oleuropein in obtained extracts. During the first phase, the effect of solvent and solvent to solid ratio (SSR) on total phenolic content and antioxidant activity of obtained extracts was investigated at constant, randomly chosen ultrasonic processor conditions (titanium 25 mm probe; extraction duration 6 min; pulsed mode at 50% amplitude). During the second phase, UAE process variables (extraction time, probe diameter and power) using previously determined optimal solvent and SSR. During the last phase of the process optimization we combined optimized UAE conditions with the addition of different types and amounts of cyclodextrins in order to additionally improve extraction yields, technical properties and the stability of obtained extracts. Yields obtained after optimized UAE were compared to those obtained by conventional extraction.

After each experiment, extraction mixture was vacuum filtered (LLG-PTFE syringe filter, 0.45  $\mu\text{m}$ ), ethanol was removed on rotavapor (Rotavapor R-100, Buchi, Germany) and the remaining extract was freeze-dried (Alpha 1–4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany). Freeze-dried products were finely ground in a mortar with the pestle and passed through a sieve with 850  $\mu\text{m}$  mesh size (ISO 3310/1, Retsch, Germany). The obtained powders were used for all future analyses.

#### 2.4. Conventional extraction procedure and ultrasound-assisted extraction (UAE)

For the conventional extraction 2 g of OP and 100 mL of extraction solvent (60% ethanol (w/w)) were placed in 250 mL baker, covered and subjected to shaking (100 rpm) at 70 °C for 120 min.

UAE was conducted using the ultrasonic processor that consisted of a transducer for converting electric signals into ultrasonic waves and a probe with a specific diameter. The maximal nominal output power of the device (Q Sonica Sonicators, Newtown, CT, USA) was 400 W and the ultrasonic frequency was 20 kHz. The coupling of the 3 ultrasound variables was investigated and applied during sonication: treatment time (3, 6, 9, 20, and 25 min), 2 different probe diameters (12.5 and 25 mm) and the power amplitude of ultrasound waves (50%, 75% and 100%). For each testing condition, the extraction was conducted in duplicate. During the extraction process the sample container was covered with an aluminum-foil paper to prevent light induced degradation. Temperature of extraction mixture was recorded every 30 s throughout each experiment.

#### 2.5. Optimization of cyclodextrin enhanced UAE

The impact of the addition of cyclodextrins to the extraction mixture on the extraction efficiency under optimized UAE conditions was tested during the third phase of the experiment. The impact of the type (B, RAMEB, HPB, G) and the concentration levels of cyclodextrins (0 g/100 mL; 0.8 g/100 mL and 1.6 g/100 mL) on total phenolic content, antioxidant activity, bioactive polyphenols, particle size distribution, CIELab parameters, and extract stability were investigated.

#### 2.6. Stability testing

Stability testing of olive pomace extract (OPE) was conducted under accelerated test conditions. Briefly, freeze-dried OPEs prepared with different types and amounts of cyclodextrins were weighted into plastic containers with lids, in four parallels. Containers were closed and stored for 45 days at 60 °C under constant humidity (74.5%) that was achieved by keeping the samples in desiccators above saturated NaCl solution. To determine the changes of total phenolic content, bioactive polyphenols

and antioxidant activity, a particular parallel of each OPE was analyzed at predetermined day (0, 15, 30 or 45 day).

#### 2.7. Total phenolic content and antioxidant activity

The antioxidant activity of the olive pomace extracts was evaluated by modified TEAC method, as reported by Re et al. (1999) and by using the stable 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH<sup>•</sup>) according to method of Kirigaya, Kato, and Fujimaki (1971) and Shimada, Fujikawa, Yahara, and Nakamura (1992) depending on the phase of the experiment.

DPPH method is based on the reduction of DPPH radical in the presence of an antioxidant (Blois, 1958) that results in a color change from purple to yellow which is monitored at 528 nm (Chanda & Dave, 2009). The reaction mixture consisted of 600  $\mu\text{l}$  of adequately dissolved olive pomace extract in methanol, 1.4 ml of methanol and 1.5 ml of DPPH solution. It was incubated for 30 min, then the absorbance was measured at 528 nm ( $A_{t=30}$ ). Solution used for measuring initial absorbance ( $A_{t=0}$ ) was prepared as sample solution but with appropriate amount of methanol instead of sample. Each sample was analyzed at three concentration levels in duplicates, so that the decrease of the absorbance varied between 10% and 90%. The results were calculated from linear dependence of absorbance decrease (%) and OPE concentration and expressed as EC<sub>50</sub>, which represents a concentration of OPE (g/L) extract that caused the 50% absorbance decrease.

TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) method uses the pre-formed ABTS<sup>•+</sup> generated by oxidation of ABTS with potassium persulfate that is manifested by the occurrence of green blue coloration of solution. The amount of antioxidant (hydrogen donating compound) in the reaction mixture is proportional to the rate of discoloration of the reaction mixture. Reaction mixture was provided by mixing 300  $\mu\text{l}$  of adequately dissolved OPE and 2.5 ml of adequately diluted ABTS solution. The absorbance reading was taken 3 min after initial mixing. All determinations were carried out three times (UV4 Spectrophotometer, Unicam, UK). The percentage inhibition of absorbance at 734 nm was calculated from the difference of the initial coloring ( $A_{0\text{min}}$ ) and the coloring after 3 min ( $A_{3\text{min}}$ ). An antioxidant potential was read off from calibration curve, and it was expressed as mg of Trolox equivalent (TE) per kg of OPE (mg TE/kg).

Total phenolic content was determined spectrophotometrically (UV4 Spectrophotometer, Unicam, UK) according to the method of Singleton and Rossi (1965) with some modifications. Briefly, adequately dissolved OPE (200  $\mu\text{L}$ ) was mixed with 1.35 mL of distilled water and 150  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteu reagent. After 5-min incubation 1.5 mL of 6% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added to each reaction mixture and obtained solutions were incubated at 50 °C for 30 min. Absorbance readings were conducted at 725 nm and results were expressed as grams of gallic acid equivalents (GAE) per kg of OPE (mg GAE/kg).

#### 2.8. HPLC analysis

Identification and determination of the main bioactive phenolic compounds from OPE (tyrosol, hydroxytyrosol, and oleuropein) were performed by high performance liquid chromatography according to method of Tzarbopoulos, Gikas, Papadopoulos, Aligiannis, and Kafatos (2003) with some modifications (Vitali Čepo et al., 2017). An integrated HPLC System (model 1220 Infinity, Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA) consisting of a binary low pressure mixing (dual gradient) pump, auto sampler, column compartment and variable wavelength detector, coupled to a diode array detector was utilized. Chromatographic separation was achieved on C18 reversed phase column (250 × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Zorbax Eclipse plus). A gradient elution program was achieved for the separation of tyrosol, hydroxytyrosol, and oleuropein. The mobile phase used was 0.05 M ammonium acetate buffer (adjusted to pH 5.0 with glacial acetic acid) (A) versus acetonitrile (B), the flow rate was 1 ml/min and the injection volume was

20  $\mu\text{L}$ . All mobile phases were vacuum -filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter and degassed in an ultrasonic bath prior to HPLC analysis. The analyses were therefore performed at the two wavelengths: 240 (oleuropein) and 280 nm (tyrosol and hydroxytyrosol). Identification of the eluting peaks was performed by comparing their retention times and the corresponding UV spectra with those of the standards. The quantification of the analytes was performed by external standard calibration, and the data were processed by Agilent ChemStation program.

### 2.9. Particle size distribution

Size distribution and mean diameter of microparticles were determined by light scattering technique using laser diffraction (Mastersizer 2000 Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). A beam length of 2.4 mm and 300 RF lens were used. Analyses were performed by dry method and the sample was loaded into sample feeder between the center of the sample tray and the sieve of the instrument to prevent it from entering the measurement zone. The determinations were carried out in duplicate for each sample and expressed as the mean diameter  $d_{[4,3]}$  and polydispersity index (PDI) that was calculated according to the following equation:

$$PDI = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (1)$$

where  $d_{10}$ ,  $d_{50}$ , and  $d_{90}$ , are the particle diameters at the 10<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentile of particles undersized, respectively.

### 2.10. Color analysis

The color analyses were performed by direct reading of the reflectance of the rectangular coordinate system ( $L^*$  - brightness,  $a^*$  - red/green opponent colors (redness), and  $b^*$  - yellow/blue opponent colors (yellowness)). Measurements were conducted by using CM-3500d colorimeter (Konica Minolta, Japan) and obtained data were processed using the software according to CIE Lab color system (Konica Minolta, Japan). The impact of the addition cyclodextrins on OPE color was expressed as the perceived difference in color ( $\Delta E$ ) that was calculated according to the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (2)$$

where  $\Delta L$ ,  $\Delta a$  and  $\Delta b$  are variations of the  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  coordinates, calculated as the differences between  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  values of the native sample and the sample containing particular cyclodextrin at pre-determined concentration level.

### 2.11. Statistical analysis

Two replicate extractions were conducted for each sample, followed by three spectrophotometric/HPLC measurements of each replicate ( $n = 6$ ). Each replicate was also analyzed for particle size distribution and color ( $n = 2$ ). Statistical analysis was conducted using the ANOVA procedure or Student's t-test, (depending on  $n$ ) using the GraphPad® software, Prism 6 (GraphPad, San Diego, USA). Post hoc Tukey's test was used for the estimation of statistical significance ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of solvent to solid ratio (SSR) and ethanol concentration for pulsed UAE of olive pomace polyphenols

During the first phase of this investigation, the impact of solvent type and solvent to solid ratio (SSR) on total phenolic content, bioactive polyphenol content, and antioxidant activity was investigated at constant ultrasonic processor conditions (titanium 25 mm probe; extraction duration 3 min; pulsed mode at 50% amplitude) (Fig. 2).

Among the key parameters influencing the extraction efficiency and quality of obtained extracts is SSR. Generally, higher SSR results in increased extraction yields; however, increasing SSR above certain critical ratio ceases to produce significant effects and results in over-diluted liquors that need to be further processed, thus hindering the economical sustainability of the process. In this work, tested SSRs ranged from 20 to 60 and were investigated by using 60% ethanol as the extraction solvent. As presented in Fig. 2A, polyphenolic yields generally improved as SSR increased which is consistent with the basic mass transfer principles. However, observed impact was only significant in the SSR range below 40, while further SSR increase ceased to affect extraction yields. Obtained results are in consistence with the results of other authors who developed and optimized UAE protocols for extraction of polyphenols from different types of food- and industrial wastes and generally used SSRs in the SSR range of 20–50 (Sahin & Samli, 2013; Tabaraki & Nateghi, 2011; Tabaraki, Heidarzadi, & Benvidi, 2012).

Choosing the proper solvent for the optimization of polyphenol extraction is of absolute importance since it is among the most important parameters affecting not only the quantity but also the polyphenolic composition of the obtained extract. Although the wide variety of organic solvents have been tested and found suitable for the efficient extraction of olive polyphenols (Xynos et al., 2012; Lee, Lee, Lee, & Kim, 2009), in the development of “green” extraction procedure available choices are limited to food-grade solvents such as water, ethanol, and n-butanol (Bartnik, Mohler, & Houlihan, 2006). As presented in Fig. 2B, in present research the influence of different ethanol concentrations ranging from 0 to 96% has been evaluated. In terms of total phenolic content, bioactive polyphenol content, and antioxidant activity of obtained extracts. Ethanol concentration demonstrated the pronounced influence on observed parameters, where 40% (w/w) and 60% (w/w) produced very similar extracts in terms of antioxidant activity and total phenolic content. However, the yields of bioactive polyphenols were higher in 60% ethanol extracts; therefore, it has been selected as the solvent of choice for the further optimization of pulsed UAE parameters.

### 3.2. Optimization of UAE process parameters

Due to well-known benefits of UAE such as improving extraction efficiency and reducing the amount of solvent, extraction time, and power consumption in comparison to classic solvent extraction, the aim of present study was to investigate the possibilities of utilization of ultrasound for the efficient extraction of bioactive compounds from OP. Although a variety of novel techniques such as supercritical  $\text{CO}_2$  extraction, extraction in high pressure-high temperature reactors or pressurized liquid extraction have recently been investigated and successfully applied for the extraction of OP (Aliakbarian, Casazza, & Perego, 2011; Herrero et al., 2011; Temelli, 2009), the applicability of UAE for this purpose has not been investigated yet, at least to our knowledge.

The extraction capacity of UAE for antioxidant activity, total phenolic content, tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropein, and bioactive polyphenol content depending on different extraction conditions is presented in Table 1. Obtained values were compared with the yields obtained by conventional extraction.

For all investigated target compounds, maximal yields were obtained by 12 mm probe. Significant impact of probe diameter on the efficiency of the extraction procedure could be due to its effect on the temperature of extraction mixture. Namely, temperature that develops during ultrasonic extraction is an important parameter affecting the efficiency of the extraction process and it can either increase or decrease its efficiency, depending on the thermal stability of the target substance (Šic Žlabur et al., 2015). During the UAE with smaller diameter probe, extraction mixture temperature increased gradually, and the highest measured temperature was 55 °C. The use of 25 mm



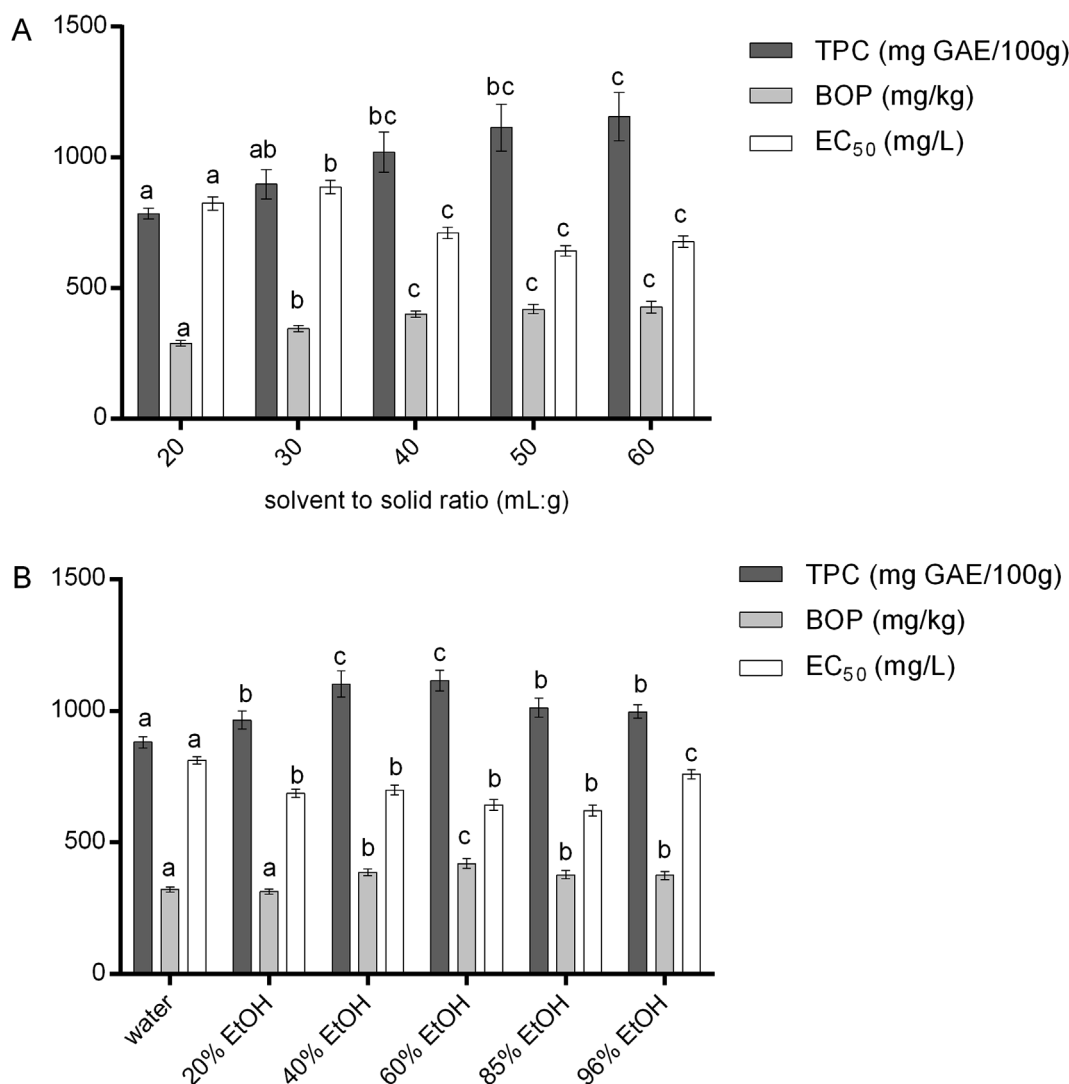


Fig. 2. Impact of solvent to solid ratio (A) and extraction solvent (B) on polyphenolic content and antioxidant activity of olive pomace extract.

bars within the same group of data marked with the same letter belong to the same statistical group ( $p > 0.05$ ). BOP-bioactive olive polyphenols; EC<sub>50</sub>- half maximal effective concentration; GAE-gallic acid equivalents; TPC-total phenolic content.

diameter probe resulted with more rapid increase of temperature and the highest measured temperature was 82 °C. High temperatures caused solvent evaporation, particularly at longer extraction times (9 min) and therefore decreased SSR. High temperatures during UAE also reduce the cavitation and can induce thermal degradation of thermolabile compounds leading to lower extraction yields. Similar observations were published by Šic Žlabur et al. (2015) who found the 7 mm diameter probe to be superior to 22 mm diameter probe in the process of UAE of functional ingredients of *Stevia rebaudiana*.

In addition to probe diameter, extraction time was the process parameter with the most pronounced impact on extraction yields, while probe amplitude showed less pronounced effect. For example, in the case of antioxidant activity, oleuropein, and hydroxytyrosol, the same (maximal) yields were obtained after 9 min of extraction, regardless of the level of probe amplitude. In the case of total phenolic content, tyrosol, and bioactive polyphenols, the same trend was observed, but the increase of power showed additional effect and maximal yields were obtained at 100% amplitude. Due to significant linear correlation determined between extraction time (3–9 min) and extraction yields of observed compounds, the impact of prolonged extraction time (20 and 25 min) at 100% probe amplitude was also investigated. 20-minute-extraction produced significantly higher total phenolic content and tyrosol yields, decreased oleuropein yields (probably causing its

degradation) and had no significant effect on other compounds of interest. Further prolongation of extraction time did not produce additional benefits.

Therefore, 20-min pulsed UAE using 12 mm probe at 100% output intensity was selected as optimal for the extraction of OP polyphenols using 60% EtOH at 1:40 SSR. However, it is important to emphasize that under those conditions oleuropein can be partially degraded; maximal oleuropein yields are obtained after 9-min extraction under proposed conditions. Obtained yields were comparable to conventional extraction in terms of antioxidant activity, total phenolic content, and hydroxytyrosol content. However, application of pulsed UAE resulted with significantly higher yields of oleuropein, tyrosol, and bioactive polyphenols. Also, the application of UAE significantly reduced extraction time and solvent consumption in comparison to conventional approach.

Optimal UAE parameters obtained in this investigation are comparable to conditions proposed by Japón-Luján, Luque-Rodríguez & Luque de Castro (2006), that applied continuous UAE for extraction of bioactive polyphenols from olive leaves and achieved optimal yields with 12 mm probe, after 25-min extraction using 59% ethanol as extraction solvent. On the other hand, they operated in continuous mode, at lower temperatures and used 30% of radiation amplitude and those differences are probably due to diverse sample characteristics.

**Table 1**

Total phenolic content, the content of bioactive olive polyphenols and antioxidant activity of olive pomace extracts as affected by ultrasound assisted processing conditions.

PROBE (mm)	POWER (%)	TIME (min)	AA (EC <sub>50</sub> ; g/L)	TPC (g GAE/kg)	OLE (mg/kg)	HTS (mg/kg)	TS (mg/kg)	BOP (mg/kg)	
12	50	3	1.06 ± 0.04A	7.86 ± 0.32A	227 ± 2A	177 ± 3A	177 ± 1A	581 ± 4A	
		6	0.97 ± 0.02A	8.96 ± 0.15B	232 ± 1AC	193 ± 9B	175 ± 6A	600 ± 4B	
		9	<b>0.72 ± 0.20B</b>	10.44 ± 0.42C	<b>252 ± 7B</b>	<b>192 ± 5B</b>	184 ± 9A	628 ± 7C	
	75	3	1.17 ± 0.25A	9.36 ± 0.08B	225 ± 2A	148 ± 2C	162 ± 1B	535 ± 1E	
		6	0.99 ± 0.04A	7.54 ± 0.08A	234 ± 6AC	183 ± 3A	176 ± 5A	593 ± 2B	
		9	<b>0.80 ± 0.03B</b>	11.18 ± 0.17CD	<b>247 ± 1B</b>	<b>190 ± 6B</b>	185 ± 9A	622 ± 5C	
	100	3	1.18 ± 0.07A	8.85 ± 0.38B	222 ± 4A	147 ± 0C	154 ± 14C	523 ± 10F	
		6	1.12 ± 0.04A	10.72 ± 0.02CD	239 ± 1C	162 ± 6D	180 ± 3A	580 ± 5A	
		9	<b>0.76 ± 0.11B</b>	11.45 ± 0.32D	<b>248 ± 4B</b>	<b>192 ± 6B</b>	199 ± 1D	<b>639 ± 9D</b>	
		20	<b>0.73 ± 0.00B</b>	<b>16.31 ± 1.01E</b>	238 ± 4C	<b>189 ± 2B</b>	<b>218 ± 3E</b>	<b>645 ± 6D</b>	
		25	<b>0.74 ± 0.06B</b>	<b>15.97 ± 0.45E</b>	231 ± 7C	<b>185 ± 4B</b>	<b>220 ± 5E</b>	<b>640 ± 3D</b>	
	25	50	3	1.51 ± 0.10a	9.89 ± 0.40a	191 ± 1a	117 ± 1a	141 ± 8a	434 ± 2a
			6	1.56 ± 0.05b	11.35 ± 1.25b	190 ± 0a	103 ± 2b	117 ± 2b	410 ± 0bd
			9	0.99 ± 0.02c	7.85 ± 0.14c	200 ± 2b	108 ± 1b	117 ± 7b	426 ± 7a
		75	3	1.76 ± 0.03d	14.66 ± 1.53d	200 ± 1b	117 ± 0a	117 ± 1b	448 ± 1c
6			1.16 ± 0.10e	9.77 ± 0.19a	190 ± 1a	103 ± 1b	109 ± 1b	402 ± 4b	
9			0.89 ± 0.07c	11.15 ± 0.89a	209 ± 3c	110 ± 2b	101 ± 2c	420 ± 3d	
100		3	0.98 ± 0.11c	10.59 ± 0.21a	212 ± 1c	118 ± 6a	135 ± 7a	465 ± 6e	
		6	0.84 ± 0.11c	10.17 ± 0.38a	197 ± 4b	111 ± 12b	107 ± 7c	415 ± 3d	
		9	0.84 ± 0.08c	12.55 ± 0.66e	209 ± 2c	114 ± 6ab	99 ± 2c	422 ± 6d	
conventional extraction			<b>0.81 ± 0.09Bc</b>	<b>16.92 ± 1.78Ef</b>	225 ± 9Ad	<b>187 ± 7Bc</b>	165 ± 2Bd	577 ± 12Af	

Differences among values in the same column marked with the same letter are not statistically significant ( $p > 0.05$ ). Results obtained by conventional extraction were statistically analyzed with both 12 mm probe results (capital letters) and 25 mm probe results (small letters). Bold font indicates maximal yields for each category.

AA-antioxidant activity; EC<sub>50</sub>- half maximal effective concentration; TPC-total phenolic content; GAE-galic acid equivalents; OLE-oleuropein; HTS-hydroxytyrosol; TS-tyrosol; BOP-bioactive olive polyphenols.

### 3.3. Impact of cyclodextrins on yields, stability and physicochemical properties of OPE

Cyclodextrins are the group of structurally related oligosaccharides able to interact with the wide range of bioactive food constituents, improving their water solubility, activity, stability, and bioavailability by formation of inclusion complex (Pinho, Grootveld, Soares, & Henriques, 2014). Therefore, they were investigated as extraction enhancers in the combination with UAE and the observed impact on the extraction yields are presented in Table 2.

Addition of cyclodextrins to extraction solvent significantly improved the extractability of all investigated compounds, and the best results were obtained with the higher concentration level of HPB followed by the higher concentration levels of RAMEB or G, depending on the compound of interest. Observed impact on the improved extractability of olive pomace polyphenols is probably due to inclusion complex formation that has been confirmed previously by several authors.  $\beta$ -cyclodextrin has been shown to form stable inclusion complexes with oleuropein (Efimorfolopoulou & Rodis, 2004; Mourtzinos

et al., 2007; Barao, Paiva-Martins, Zanin & Moraes, 2014). Also,  $\beta$ -cyclodextrin, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and methyl- $\beta$ -cyclodextrin form stable complexes with tyrosol (Garcia-Padial, Martínez-Ohárriz, Navarro-Blasco, & Zornoza, 2013). Formation of such complexes contributes to the increased solubility of olive polyphenols in water but also increases their chemical stability during extraction process, considering that ultrasound may trigger their degradation and/or oxidation. Our results emphasize higher efficiency of cyclodextrin derivatives such as HPB and RAMEB in comparison to parent B what is consistent with available literature data (Pinho et al., 2014; López-Nicolás, Rodríguez-Bonilla & García-Carmona 2014).

This protective effect of cyclodextrins might also reflect to the stability of obtained extracts. The impact of investigated cyclodextrins on the 45-day stability of analyzed extract is presented in Fig. 3.

During the 45 days of storage, the content of polyphenols in analyzed extracts has been either slightly increased or reduced, depending on the type and the amount of used cyclodextrin. Again, the best results were obtained for HPB, followed by RAMEB, regardless of the applied concentration; on the contrary, B and G did not produce any protective

**Table 2**

The effect of the type and the amount of cyclodextrins on polyphenol yields and antiradical activity of olive pomace extracts.

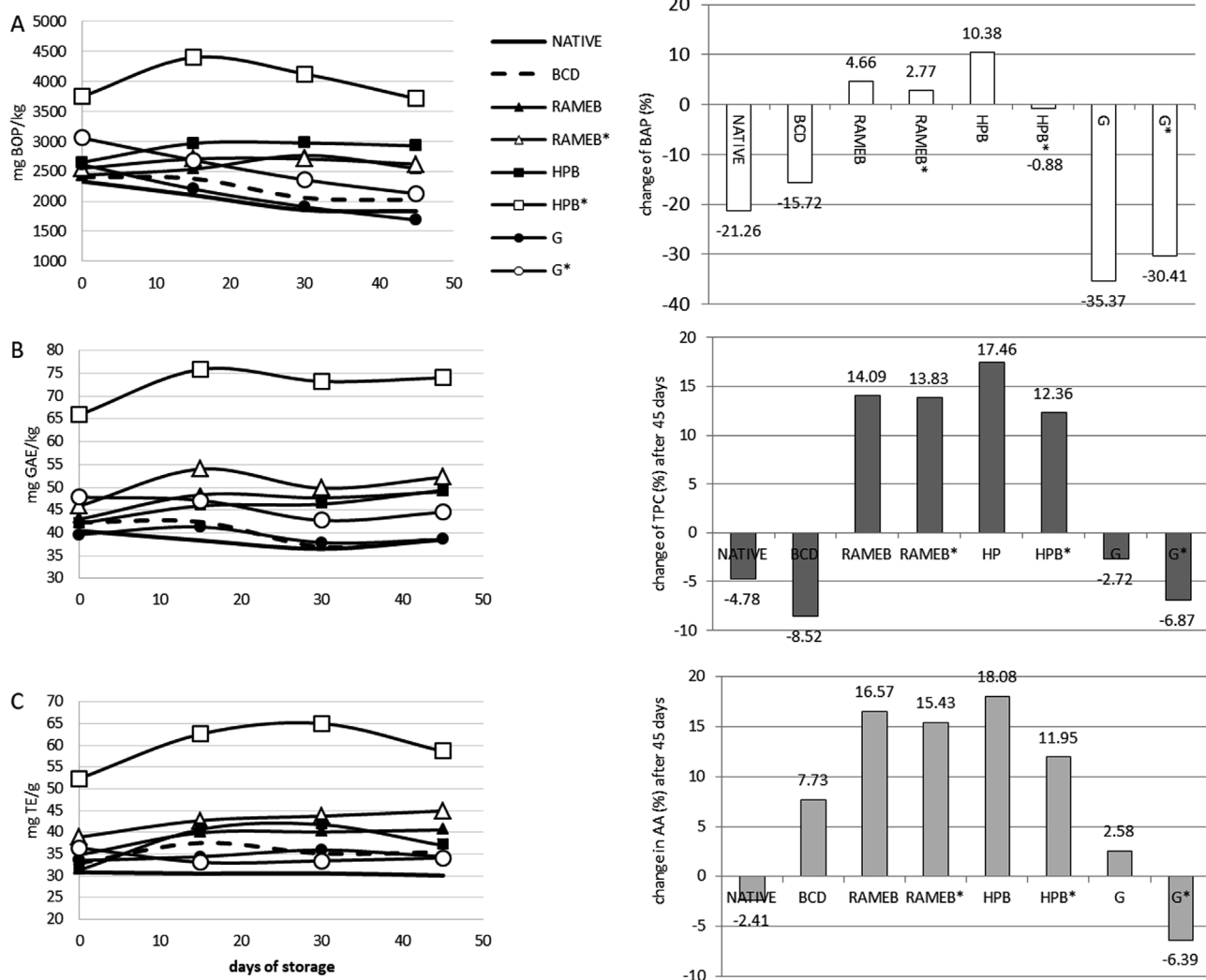
YIELDS <sup>a</sup>	TPC (g GAE/kg)	HTS (mg/kg)	TS (mg/kg)	OLE (mg/kg)	AA (mgTE/kg)
NATIVE	41.90 ± 0.14	533 ± 6	710 ± 4	1090 ± 13	31.50 ± 0.56
B	43.49 ± 1.39b	523 ± 6	721 ± 8	1161 ± 9	32.48 ± 1.64
RAMEB	45.85 ± 1.27b	566 ± 34	752 ± 3b	1119 ± 41	34.29 ± 0.14
RAMEB*	48.65 ± 0.64b	601 ± 6b	766 ± 4b	1183 ± 10b	37.96 ± 3.92b
HPB	45.65 ± 0.41b	588 ± 22b	790 ± 8b	1273 ± 60b	31.57 ± 0.60
HPB*	69.62 ± 1.37b	887 ± 13b	1117 ± 6b	1744 ± 5b	52.21 ± 3.02b
G	40.65 ± 1.17	571 ± 15	772 ± 9b	1271 ± 10b	32.87 ± 0.60
G*	50.37 ± 1.35b	682 ± 0b	919 ± 8b	1459 ± 32b	36.15 ± 1.93

<sup>a</sup>In order to investigate the effect of excipients on the yields of compounds of interest results are expressed as mg of analyte per kg of pure pomace extract taking into account different amounts of excipient in analyzed extracts.

<sup>b</sup>Values are significantly different in comparison to native sample ( $p < 0.05$ ).

\*higher concentration level of cyclodextrin.

TPC-total phenolic content; GAE-galic acid equivalents; HTS-hydroxytyrosol; TS-tyrosol; OLE-oleuropein; AA-antioxidant activity; TE-Trolox equivalents; B-beta-cyclodextrin, RAMEB-randomly-methylated beta cyclodextrin, HPB- hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; G-gamma cyclodextrin.



**Fig. 3.** Influence of the type and the concentration level of cyclodextrin on bioactive polyphenol content (A), total phenolic content (B) and antioxidant activity (C) of olive pomace extract during 45-day storage. \*indicates higher concentration level of cyclodextrin; AA-antioxidant activity; B-beta-cyclodextrin; BOP-bioactive olive polyphenols; G-gamma cyclodextrin; GAE-gallic acid equivalents; HPB-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; HTS-hydroxytyrosol; OLE-oleuropein; RAMEB-randomly-methylated beta cyclodextrin; TE-Trolox equivalent; .TPC-total phenolic content; TS-tyrosol.

effect during storage. Our results can be explained by the opposite effect that cyclodextrin complexation could have on the stability and the degradation rate of included compounds (Kayaci & Uyar, 2011; Pinho et al., 2014; Tønnesen, Måsson, & Loftsson, 2002). The effect is mainly depended on the structure of the complexes formed. If the reactive moiety of the included molecule is located inside the cyclodextrin central cavity, the reduction of its degradation rate is usually observed. On the contrary, when such reactive group is located outside the cyclodextrin cavity, the protective effect of cyclodextrin is absent. Furthermore, the interactions of compounds reactive groups and substituents on the cyclodextrin core could lead to further destabilization of the interacting molecule, catalyzing its degradation (Cugovčan et al., 2017; Loftsson & Brewster, 2010). It seems that complexation with HPB and RAMEB provided the best microenvironment for olive polyphenols which prevented them from degradation caused by storage at elevated temperature (45 °C). Unexpected increase of antioxidant activity, total phenolic content and bioactive polyphenol content during storage that we observed in HPB and RAMEB has been observed previously by other authors. They reported a possible increment of polyphenolic compounds associated to the microbial growth or to reactions between oxidized polyphenols and formation of new compounds of antioxidant character during storage (Kallithraka, Salacha, & Tzourou, 2009;

Martinez-Flores, Garnica-Romo, Bermúdez-Aguirre, Pokhrel, & Barbosa-Cánovas, 2015). As discussed above, the lack of protective effect in the case of B and G might be explained by inadequate shielding of included polyphenols; they protected sample polyphenols during the UAE but were degraded during long term storage. However, we cannot confirm this assumption with our experimental data or data from the literature.

Particle size distribution of powder products is an important characteristic that largely determines their quality and performance. Namely, rheological properties as well as drug release in case of encapsulated bioactive compounds are influenced by the particle size (Zabot & Meireles, 2016). Based on this context, freeze-dried OPE prepared with different amounts/concentration levels of cyclodextrins were characterized in relation to mean diameter  $d_{[4,3]}$ , PDI (Table 3) and particle size distribution (Fig. 4A).

Dry extracts were obtained by freeze drying of OPE prepared under optimized UAE conditions combined with the addition of different types and amounts of cyclodextrins. As obvious from presented data, addition of cyclodextrins to the extraction solvent significantly changed the appearance of obtained dried extracts. Namely, due to the fact that native extract was extremely unstable and hygroscopic and got sticky and rubber-like appearance short after the exposure to the atmosphere,

**Table 3**  
The effect of the type and the amount of cyclodextrin on color parameters and particle size of olive pomace extract.

	L(D65)	a(D65)	b(D65)	d <sub>[4,3]</sub>	PDI
NATIVE	16.05 ± 0.09a	1.48 ± 0.02a	1.73 ± 0.06a	–	–
B	62.13 ± 0.25b	8.93 ± 0.11b	23.49 ± 0.15b	48.34 ± 0.29a	5.73 ± 0.03a
RAMEB	58.47 ± 1.39c	9.15 ± 0.11b	21.87 ± 0.17c	38.01 ± 0.35bf	4.38 ± 0.00b
RAMEB*	63.77 ± 0.40b	7.89 ± 0.15c	21.39 ± 0.04c	33.36 ± 0.28c	5.01 ± 0.05c
HPB	44.54 ± 0.59d	10.54 ± 0.25d	22.14 ± 0.01d	66.19 ± 0.74d	5.36 ± 0.02d
HPB*	58.70 ± 0.47c	9.16 ± 0.16b	23.14 ± 0.16b	40.13 ± 0.19b	3.82 ± 0.00e
G	57.55 ± 0.28c	9.80 ± 0.33b	24.79 ± 0.15e	89.26 ± 0.14e	5.16 ± 0.02f
G*	65.34 ± 0.59b	7.43 ± 0.16c	21.41 ± 0.12c	39.04 ± 0.11f	6.34 ± 0.01g

Values in the same column, marked with the same letter belong to the same statistical group (p > 0.05).

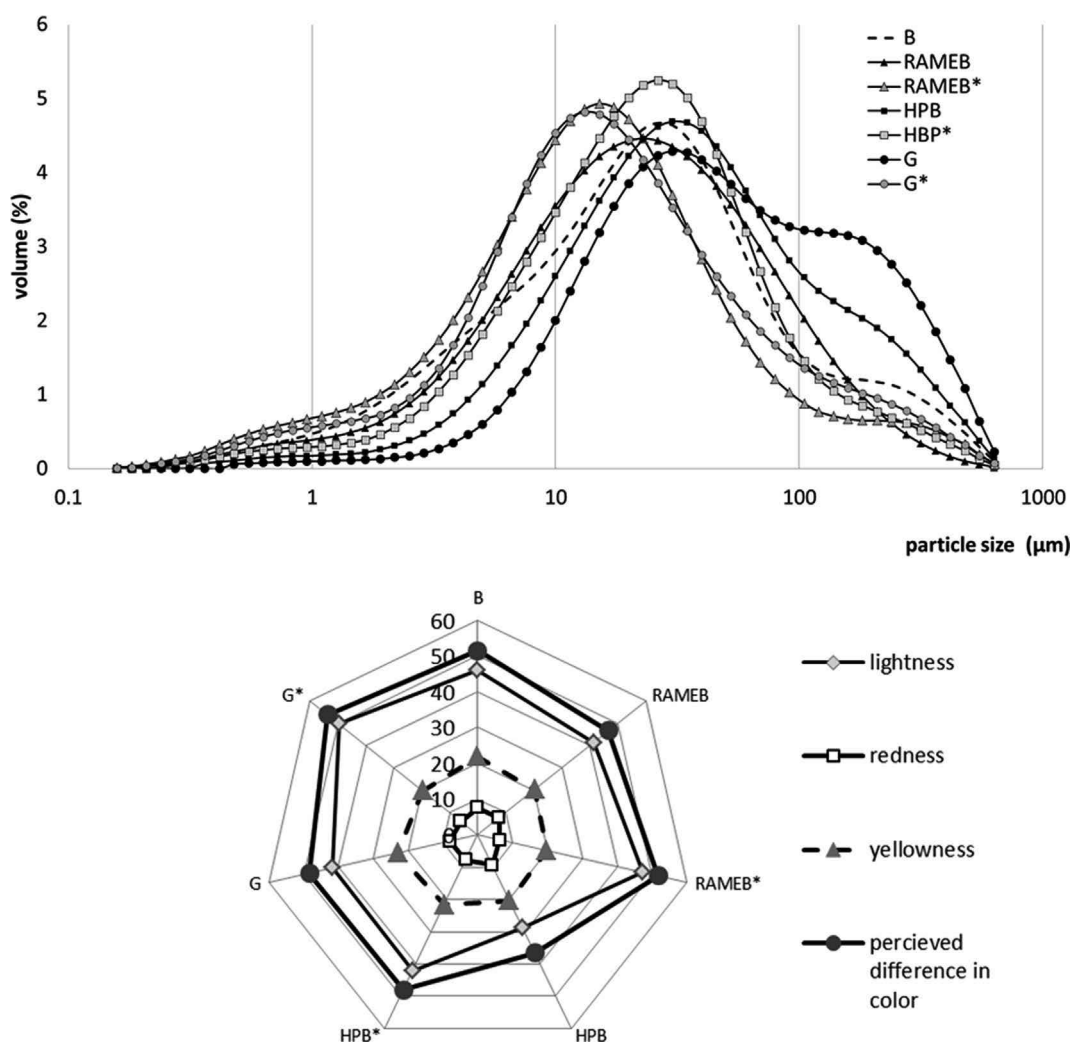
\*higher level of cyclodextrin.

L-brightness; a-redness; b-yellowness; d<sub>[4,3]</sub> –mean diameter; PDI-polydispersity index; B-beta-cyclodextrin; RAMEB-randomly-methylated beta cyclodextrin; HPB-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; G-gamma cyclodextrin.

it was impossible to conduct particle size analysis. Freeze dried extracts containing cyclodextrins were in the form of voluminous flakes and had to be grounded into powder and sieved prior to particle size analysis. Particle size distribution was normal and mean particle sizes, considering the size distribution in volume, were significantly affected by the type and the amount of used cyclodextrin (p < 0.05). Generally, d<sub>[3,4]</sub> values ranged from 33.36 μm (RAMEB\*) up to 89.26 μm (G). Also, the mean particle size was significantly affected by the concentration

level of cyclodextrin and significantly smaller d<sub>[3,4]</sub> values were obtained at higher cyclodextrin concentrations. For different cyclodextrins, we obtained significantly different PDIs ranging from 3.82 (HPB\*) up to 6.34 (G\*) indicating narrow and more uniform particle size distribution in HPB\*.

Regarding the investigated color parameters (Table 3, Fig. 4B), ANOVA showed significant effect of the carrier type and concentration. Brightness of obtained powders was the most influenced parameter



**Fig. 4.** Influence of the type and the level of cyclodextrin on particle size distribution (A) and perceived difference in color (B) of olive pomace extract. \*indicates higher concentration level of cyclodextrin; B-beta-cyclodextrin; G-gamma cyclodextrin; HPB-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; RAMEB-randomly-methylated beta cyclodextrin.

(28.8%–49.6%); however, the redness and the yellowness were also significantly increased in relation to native sample (6.08% – 9.26% and 19.67%–22.99% respectively). High perceived difference in color was obtained, between 36.54 and 53.79 indicating evident and visible differences in relation to native sample that were mostly due to pronounced impact on the brightness of cyclodextrin containing extracts (Fig. 4B). At the same concentration levels, B and G showed the most pronounced perceived difference in color. Higher concentration level of the particular cyclodextrin (from 0.8 to 1.6 g/100 mL) additionally increased the brightness, and had no significant impact on the yellowness or redness of obtained samples. Color parameters are among the most important food/supplement characteristics due to their significant role in attracting consumers to a specific product. Considering the possible application of OPE, primarily as natural antioxidative functional food ingredient, the brightness of the sample might be considered as preferred characteristic since it diminishes the possibility of adverse effect on the original food color. Therefore it can be stated that cyclodextrins generally exert positive impact on the OPE color by increasing its brightness with B and G showing the most pronounced effect.

#### 4. Conclusions

Cyclodextrin-enhanced pulsed UAE was found to be a useful and sustainable approach for obtaining OPE rich in bioactive polyphenolic compounds. In comparison to conventional solvent extraction, application of UAE resulted in significantly higher yields of oleuropein, tyrosol, and bioactive polyphenols, reduced extraction time and reduced solvent consumption. UAE parameters, showing the most pronounced impact on the extraction yields were probe diameter and extraction time. The addition of particular cyclodextrin to extraction solvent significantly improved yields, stability, and appearance of dry OPE. This attempt contributes significantly to the possibilities of olive waste management and further investigation and utilization of olive polyphenols in food and pharmaceutical industry.

#### Funding

This work has been fully supported by Croatian Science Foundation (UIP-2014-09-9143).




#### References

- Aliakbarian, B., Casazza, A. A., & Perego, P. (2011). Valorization of olive oil solid waste using high pressure-high temperature reactor. *Food Chemistry*, *128*, 704–710.
- Barão, C., Paiva-Martins, F., Zanin, G. M., & Moraes, F. (2014). Determination of the inclusion complex constant,  $t$  between oleuropein and cyclodextrins by complexation theory. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, *78*, 1–4.
- Bartnik, D. D., Mohler, C. M., Houlihan, M. (2006). US Patent application 20060088627.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *181*, 1199–1150.
- Carbonell Capella, J., Šic Žlabur, J., Rimac Brnčić, S., Barba, F., Grimi, N., Kouba, M., et al. (2017). Electrotechnologies, microwaves, and ultrasounds combined with binary mixtures of ethanol and water to extract steviol glycosides and antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13179>.
- Chanda, S., & Dave, R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, *3*, 981–996.
- Chemat, F., Tomao, V., & Viot, M. (2008). Ultrasound-assisted extraction in food analysis. In S. Ötles (Ed.). *Handbook of food analysis instruments* (pp. 85–103). Taylor & Francis, CRC Press.
- Cugovčan, M., Jablan, J., Lovrić, J., Cinčić, D., Galić, N., & Jug, M. (2017). Biopharmaceutical characterization of praziquantel cocrystals and cyclodextrin complexes prepared by grinding. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *137*, 42–53.
- Della Greca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtara, I., & Temussi, F. (2001). Phyto-toxicity of low-molecular-weight phenols from olive oil mill waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *67*, 352–359.
- Dujmić, F., Brnčić, M., Karlović, S., Bosiljkov, T., Ježek, D., Tripalo, B., et al. (2013). Ultrasound-assisted infrared drying of pear Slices: Textural issues. *Journal of Food Process Engineering*, *36*, 397–406.
- Efmoropoulou, E., & Rodis, P. (2004). Complexation of oleuropein and *trans*-cinnamic acid with cyclodextrins. *Chemistry of natural compounds*, *40*, 362–366.
- García-Padial, M., Martínez-Ohárriz, M. C., Navarro-Blasco, I., & Zornoza, A. (2013). The role of cyclodextrins in ORAC: fluorescence assays. Antioxidant capacity of tyrosol and caffeic acid with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 12260–12264.
- Herceg, Z., Brnčić, M., Jambrak Režek, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., & Sokolić, I. (2009). Possibility of application high intensity ultrasound in milk industry. *Mljekarstvo*, *59*, 65–69.
- Herrero, M., Temirzoda, T. N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., & Ibañez, E. (2011). New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A*. *1218*, 7511–7520.
- Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J. M., & Luque de Castro, M. D. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*. *1108*, 76–82.
- Kallithraka, S., Salacha, M. I., & Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry*, *113*, 500–505.
- Kayaci, F., & Uyar, T. (2011). Solid inclusion complexes of vanillin with cyclodextrins: Their formation, characterization, and high-temperature stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 11772–11778.
- Kirigaya, N., Kato, H., & Fujimaki, M. (1971). Studies on antioxidant activity of non-enzymatic browning reaction products. Part III. Fractionation of browning reaction solution between ammonia and D-glucose and antioxidant activity of the resulting fractions. *Nippon Noigei Kagaku Kaishi*, *45*, 292–298.
- Lee, O.-H., Lee, B.-Y., Lee, J., & Kim, Y.-C. (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*, *100*, 6107–6113.
- Ljubić Herceg, I., Jambrak, A. R., Šubarić, D., Brnčić, M., Brnčić, S. R., Badanjak, M., et al. (2010). Texture and pasting properties of ultrasonically treated corn starch. *Czech Journal of Food Sciences*, *28*, 83–93.
- Loftsson, T., & Brewster, M. E. (2010). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *62*, 1607–1621.
- López-García, M. A., López, O., Maya, I., & Fernández-Bolanos, J. G. (2010). Complexation of Hydroxytyrosol with  $\beta$ -cyclodextrins. An efficient photoprotection. *Tetrahedron*, *66*, 8006–8011.
- López-Nicolás, J. M., Rodríguez-Bonilla, P., & García-Carmona, F. (2014). Cyclodextrins and antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*, 251–276.
- Luque de Castro, D. M. (2014). Towards a comprehensive exploitation of agrofood residues: Olive tree - olive oil as example. *Comptes Rendus Chimie*, *17*, 252–260.
- Martinez-Flores, H. E., Garnica-Romo, M. G., Bermúdez-Aguirre, D., Pokhrel, P. R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2015). Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage. *Food Chemistry*, *172*, 650–656.
- Mourtziinos, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A., & Karathanos, V. T. (2007). Encapsulation of olive leaf extract in beta-cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 8088–8094.
- Paredes, M. J., Moreno, E., Eamos-Cormenzana, A., & Martinez, J. (1987). Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, *16*, 1557–1564.
- Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., et al. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, *97*, 137–150.
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., & Henriques, M. (2014). Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 121–135.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*, 1231–1237.
- Ruggeri, B., Battista, F., Bernardi, M., Fino, D., & Mancini, G. (2015). The selection of pretreatment options for anaerobic digestion (AD): A case study in olive oil waste production. *Chemical Engineering Journal*, *259*, 630–639.
- Şahin, S., & Şamlı, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*, 595–602.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*, 945–948.
- Šic Žlabur, J., Voča, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F., & Rimac Brnčić, S. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertonii leaves. *International Agrophysics*, *29*, 231–237.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144–158.
- Suslick, K. S., & Flannigan, D. J. (2008). Inside a collapsing bubble: Sololuminescence and the conditions during cavitation. *Annual Reviews of Physical Chemistry*, *59*, 659–683.
- Tabaraki, R., Heidarzadi, E., & Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, *98*, 16–23.
- Tabaraki, R., & Nateghi, A. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*, 1279–1286.
- Temelli, F. (2009). Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *Supercritical Fluids*, *47*, 583–590.
- Tønnesen, H. H., Måsson, M., & Loftsson, T. (2002). Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: Solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics*, *244*, 127–135.

- Tsarbopoulos, A., Gikas, E., Papadopoulos, N., Aligiannis, N., & Kafatos, A. (2003). Simultaneous determination of oleuropein and its metabolite sin plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 785, 157–164.
- Viot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonic Sonochemistry*, 17, 1066–1074.
- Vitali Čepo, D., Albahari, P., Zovko Končić, M., Radić, K., Jurmanović, S., & Jug, M. (2017). Solvent extraction and chromatographic determination of polyphenols in olive pomace. *Food in Health and Disease*, 6, 7–14.
- Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., & Skaltsounis, A. L. (2012). Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *Supercritical Fluids*, 67, 89–93.
- Zabot, G. L., & Meireles, M. A. A. (2016). On-line process for pressurized ethanol extraction of onion peels extract and particle formation using supercritical antisolvent. *Supercritical Fluids*, 110, 230–239.

Article

# Valorization of Olive Pomace-Based Nutraceuticals as Antioxidants in Chemical, Food, and Biological Models

Dubravka Vitali Čepo <sup>1,\*</sup>, Kristina Radić <sup>1</sup> , Sanja Jurmanović <sup>1</sup>, Mario Jug <sup>1</sup> ,  
Marija Grdić Rajković <sup>1</sup> , Sandra Pedisić <sup>2</sup>, Tihomir Moslavac <sup>3</sup> and Petra Albahari <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia; kradic@pharma.hr (K.R.); sjurmanovic@gmail.com (S.J.); mjug@pharma.hr (M.J.); mgrdic@pharma.hr (M.G.R.); saler\_petra@yahoo.com (P.A.)

<sup>2</sup> Department of Food Engineering, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Pijerottijeva 6, 10000, Zagreb, Croatia; spedisic@pbf.hr

<sup>3</sup> Faculty of Food Technology, University in Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia; tihomir.moslavac@ptfos.hr

\* Correspondence: [dvitali@pharma.hr](mailto:dvitali@pharma.hr); Tel.: +38-501-0639-4772

Received: 28 July 2018; Accepted: 17 August 2018; Published: 18 August 2018



**Abstract:** Waste remaining after the production of olive oil (olive pomace) is known to contain significant amounts of phenolic compounds that exert different types of biological activities, primarily acting as antioxidants. In this work, a sustainable approach that combines ultrasound-assisted extraction with food-grade solvents and encapsulation with different types of cyclodextrins was used to prepare olive pomace-based polyphenol rich extracts that were tested as antioxidants in various chemical, food, and biological model systems. Encapsulation with cyclodextrins had a significant positive impact on the chemical composition of obtained extracts and it positively affected their antioxidant activity. Observed effects can be explained by an increased content of polyphenols in the formulations, specific physical properties of encapsulated compounds improving their antioxidant activity in complex food/physiological environment, and enhanced interaction with natural substrates. Depending on the applied model, the tested samples showed significant antioxidant protection in the concentration range 0.1–3%. Among the investigated cyclodextrins, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and randomly methylated- $\beta$ -cyclodextrin encapsulated extracts showed particularly good antioxidant activity and were especially potent in oil-in-water emulsion systems (1242 mg/g and 1422 mg/g of Trolox equivalents, respectively), showing significantly higher antioxidant activity than Trolox (reference antioxidant). In other models, they provided antioxidant protection comparable to commonly used synthetic antioxidants at concentration levels of 2–3%.

**Keywords:** olive pomace; cyclodextrin encapsulation; antioxidant activity; meat model;  $\beta$ -carotene linoleate model; inhibition of DNA scission; liposome model

## 1. Introduction

The production of the olive oil leads to large amounts of waste known as olive pomace and olive mill wastewater. Since it needs to be adequately processed before disposal to the environment, it creates considerable economic and ecological burden [1]. Therefore, a suitable use of these residues could positively affect economic status of the olive oil producers and reduce the negative impact on the environment. However, only small amounts of olive mill waste are re-used, mainly as fertilizers, biomass, or additive in animal feed, while a large quantity remains without actual application [2].

Olive pomace is a heterogeneous mixture of many chemical compounds, such as metals, sugars, and polyphenols [3]. Polyphenols are particularly abundant, since, only 2% of them is transferred to the olive oil during production and the rest retained in the pomace, making it an interesting alternative source of phenolic compounds [4].

Phenolic compounds are the main antioxidant compounds in olive pomace. When consumed, a large amount of them is hydrolyzed into hydroxytyrosol, which is then absorbed in the small intestine. Hydroxytyrosol is a powerful antioxidant, exerting a wide variety of biological effects. So, hydroxytyrosol derivatives are considered the main bearers of pharmacological effects of extra virgin olive oil [5]. It is well known that dietary antioxidants protect the body from free radicals which are constantly formed during physiological processes. Imbalance between the production of free radicals and the antioxidant defense system is responsible for the occurrence of oxidative stress which is related to different physiological and pathological processes such as ageing, cancer, cardiovascular diseases, and diabetes [6,7]. A large number of epidemiological studies indicates the existence of an inverse relationship between dietary intake of foods rich in antioxidants and the incidence of the abovementioned diseases [8]. New research also shows that olive-derived polyphenols can exert particular pharmacological effects by other mechanisms, such as participating in the activation of different signaling pathways involved in the prevention of inflammation, oxidative stress, or insulin resistance [9]. Polyphenols can also be used by the food industry as natural food additives with antioxidant properties and be used for extending the shelf life of food and reducing nutritional losses and formation of harmful substances. This is especially important nowadays when increased nutritional intake of certain synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) is potentially linked to particular safety issues [10,11]. Therefore, currently, the development and utilization of effective but non-toxic antioxidants of natural origin is the area of an extensive research. In this sense, investigation of the possibility of recovering a polyphenol-rich extract from olive pomace—a low-cost and widely available by-product—presents a logical and sustainable approach. An effective search of sources of naturally occurring antioxidants and sustainable design and validation of novel functional formulations require simple and available but reliable methods of antioxidant activity evaluation.

To this day, many chemical-based (in vitro) methods have been developed for measuring the efficiency of different types of antioxidants. They can be divided into two major groups: hydrogen atom transfer reactions (oxygen radical absorbance capacity (ORAC) or carotene bleaching) and electron transfer reactions (Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) or diphenyl- picryl-hydrazyl radical (DPPH<sup>•</sup>) scavenging assay) [12]. These methods are inexpensive, useful for screening, show high-throughput, and produce an index value that allows comparison between different products. However, they are performed in the absence of lipids and do not evaluate the partitioning of antioxidants, leading to a lack of correlation with the actual performance of particular antioxidants in food or biological systems.

In order to additionally improve the accuracy of in vitro testing, new models have been developed that simulate the chemical, physical, and environmental conditions similar to foods or biological matrices [13]. Several types of food models can be used: bulk oil, oil-in-water emulsions, and a model of muscle food. Compared to chemical methods, biological models (like liposome membrane system or methods utilizing plasmid DNA) that apply natural substrates and mimic physiological environment could more accurately predict the activity of tested compounds in biological systems. Unlike cell-culture methods, they still only take into account the ability of antioxidant to scavenge free radicals, and cannot assess other aspects of antioxidant activity, such as upregulation of antioxidant and detoxifying enzymes, modulation of redox cell signaling and gene expression, etc. However, in comparison to widely used cell culture methods, they are still significantly faster, simpler, and cheaper and therefore more applicable for screening or during earlier phases of product development. Therefore, they should be used in combination or instead of chemical-based methods in order to provide more accurate information about tested compounds/extracts. Namely, only proper selection of



the method or more methods can provide accurate assessment of antioxidant activity and give reliable information about the potential of the antioxidant as a food preservative or health-promoting agent.

An additional problem in the development of novel formulations from complex plant-based extracts is the fact that they frequently occur as a sticky material of poor stability and poor solubility with penetrating smell and unpleasant taste, all presenting practical difficulties for their validation and industrial use [14]. Utilization of an efficient carrier system during the extraction and/or drying process is therefore necessary to ensure adequate powder consistency, and to increase the stability of active compounds during drying and storage. Previously, Albahari et al. [15] showed that application of cyclodextrins during production of olive pomace extracts significantly improved extraction yields, powder properties, and stability during storage. By enhancing the content and stability of active compounds in the formulation and by modulating their release and availability [16], cyclodextrins could significantly affect the functionality of the final product. Increasing the reuse of olive waste by producing novel added-value products might result in both environmental and economic benefits. To do that, simple and sustainable processes of extraction and product formulation need to be developed. Also, possible areas of application (dietary supplement, natural food additive, etc.) need to be defined more specifically so that targeted formulation design can be applied, resulting in optimal product characteristics. Therefore, the aim of this study was to test the applicability of dried olive pomace extracts (DOPE) as antioxidants in different food and biological model systems and to assess the impact of different cyclodextrins on the activity of developed formulation. To our knowledge, until now, olive pomace extracts were tested as antioxidants only in common chemical-based tests and the current application of cyclodextrins in complexation of bioactive compounds present in olive waste is mainly focused on the study of interaction between the selected components with naturally occurring cyclodextrins. Obtained data will provide novel information about the possible applications of processed olive waste and mechanisms of their antioxidant action and elucidate potential benefits of utilizing cyclodextrin-encapsulation as a simple and cost-effective approach for improving the functionality of complex natural extracts.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Chemical Composition and Antioxidant Activity in Chemical Model Systems

#### 2.1.1. Chemical Composition of DOPE

Olive pomace extracts were obtained by applying ultrasound-power and using only food-grade solvents (the mixture of ethanol and water), according to previously optimized procedure [14]. As presented in Table 1, the most abundant polyphenolic compounds in the obtained extract were hydroxytyrosol derivatives, hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein, with concentrations ranging from 16.29 to 51.29 mg/100 g. The amount of simple phenolic acids (3,4-dihydroxybenzoic acid, vanillic acid, homovanillic acid and *p*-hydroxybenzoic acid) was significantly lower, ranging from 0.33 up to 3.72 mg/100 g.

**Table 1.** Contents of main phenolic compounds in DOPE.

Hydroxytyrosol Derivatives (mg/100 g)		Phenolic Acids (mg/100 g)	
Hydroxytyrosol	51.26 ± 0.40 <sup>A</sup>	3,4-dihydroxybenzoic acid	3.72 ± 0.47 <sup>A</sup>
Tyrosol	88.67 ± 1.17 <sup>B</sup>	vanillic acid	2.16 ± 0.13 <sup>B</sup>
Oleuropein	16.29 ± 0.39 <sup>C</sup>	homovanillic acid	1.25 ± 0.12 <sup>C</sup>
		<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	0.33 ± 0.058 <sup>D</sup>

All tests were performed in triplicate ( $n = 3$ ); results are means ± SD of parallel tests. For each group of compounds, means in a column followed by different letters (from <sup>A</sup> to <sup>D</sup>) are significantly different at  $p < 0.05$ .

Obtained results are generally in agreement with data available for the composition of olive pomace published by other authors. Majority of authors point out hydroxytyrosol, tyrosol and

oleuropein as major polyphenolic compounds in olive pomace; however, oleuropein is usually the most represented one [17–19]. In our case, the amount of oleuropein was significantly lower in comparison to the amounts of hydroxytyrosol or tyrosol. This is not in accordance with previously obtained data about the content of hydroxytyrosol derivatives in olive pomace extracts produced from the pomace collected from two-phase mills that contained significantly higher content of oleuropein (1090 mg/kg) [15]. Similarly, Cioffi et al. [18] reported significantly lower hydroxytyrosol and tyrosol content of olive pomace obtained from two olive cultivars (8.4–10.4 mg/kg and 20.7–21.6 mg/kg, respectively) in comparison to oleuropein content (81.7–83.0 mg/kg). Aliakbarian et al. [17] analyzed the chemical composition of olive pomace extracts obtained in high-pressure-high temperature reactor and reported relatively low hydroxytyrosol and tyrosol content (21.9 and 21.1 mg/100g dry matter, respectively) and high oleuropein content (203.1 mg/100 g dry matter) in extract obtained under conditions similar to ours.

Observed discrepancies can be explained by the fact that oleuropein content in olives and olive by-products can be significantly influenced by various factors such as olive cultivar, maturation stage, processing conditions etc. [20]. In our case, it is important to state out that pomace has been collected from the mills during February when majority of fruits is in its black maturation phase that is characterized by hydrolysis of components with higher molecular weight (such as oleuropein) and subsequent formation of tyrosol and hydroxytyrosol [21].

Independent of raw material characteristics, the chemical composition of olive pomace extract can be significantly affected by the type of extraction, drying process, and the presence of different carrier systems during product development [15]. Impact of the utilization of different types of cyclodextrins during formulation of DOPE on the polyphenolic content and composition is presented in Table 2.

As shown, the presence of cyclodextrins in the extraction solvent significantly affected the content of hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein in DOPE, which is consistent with our previous investigations [15]. Randomly-methylated  $\beta$  cyclodextrin (RAMEB) and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD) significantly increased hydroxytyrosol yields, RAMEB increased tyrosol content, while HP $\beta$ CD significantly increased oleuropein yields. When taking into account total hydroxytyrosol derivatives (HTD) content, RAMEB and HP $\beta$ CD can be considered the most efficient among the tested cyclodextrins.

**Table 2.** Impact of cyclodextrins on the content of hydroxytyrosol derivatives and chemical antioxidant activity of olive pomace extracts.

	nDOPE	hpDOPE	ramDOPE	bDOPE	gDOPE
Hydroxytyrosol (mg/kg)	513.1 ± 4.77 <sup>A</sup>	716.8 ± 16.97 <sup>B</sup>	663.6 ± 39.03 <sup>B</sup>	497.4 ± 5.67 <sup>A</sup>	527.1 ± 12.87 <sup>A</sup>
Tyrosol (mg/kg)	870.1 ± 35.07 <sup>A</sup>	715.7 ± 19.92 <sup>B</sup>	950.9 ± 7.61 <sup>C</sup>	804.9 ± 0.33 <sup>AC</sup>	777.7 ± 7.65 <sup>BC</sup>
Oleuropein (mg/kg)	166.0 ± 7.45 <sup>A</sup>	249.4 ± 5.93 <sup>B</sup>	157.6 ± 12.96 <sup>A</sup>	171.4 ± 1.00 <sup>A</sup>	226.8 ± 10.19 <sup>B</sup>
HTD (mg/100 g)	1549.2 ± 22.9 <sup>A</sup>	1682 ± 8.9 <sup>B</sup>	1772.1 ± 44.4 <sup>B</sup>	1473 ± 4.3 <sup>A</sup>	1531 ± 30.7 <sup>A</sup>
TRC (mg/g GAE)	39.24 ± 0.042 <sup>A</sup>	50.97 ± 0.516 <sup>B</sup>	53.16 ± 0.164 <sup>C</sup>	44.21 ± 0.878 <sup>D</sup>	42.71 ± 0.45 <sup>D</sup>
IC <sub>50</sub> against DPPH (g/L)	1.65 ± 0.129 <sup>A</sup>	1.039 ± 0.129 <sup>B</sup>	1.032 ± 0.094 <sup>B</sup>	1.175 ± 0.007 <sup>B</sup>	1.429 ± 0.083 <sup>A</sup>
TEAC (mg/g TE)	12.86 ± 0.419 <sup>A</sup>	15.44 ± 0.133 <sup>B</sup>	17.07 ± 0.51 <sup>C</sup>	14.00 ± 0.33 <sup>A</sup>	12.71 ± 0.24 <sup>A</sup>
ORAC (mg/kg TE)	152.8 ± 5.06 <sup>AB</sup>	166.5 ± 7.51 <sup>A</sup>	165.8 ± 6.34 <sup>A</sup>	142.7 ± 10.21 <sup>B</sup>	162.8 ± 10.24 <sup>A</sup>

Results are expressed as means ± standard deviations of four parallel investigations ( $n = 4$ ). Different letters in the same row indicate significant difference at  $p < 0.05$ . HTD-hydroxytyrosol derivatives (sum of hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein); GAE-gallic acid equivalents; TRC: total reducing capacity; DPPH-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; TE-Trolox equivalents; TEAC: Trolox equivalent antioxidant activity; ORAC: oxygen radical activity test; nDOPE-native dry olive pomace extract; hpDOPE-extract prepared with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; ramDOPE-extract prepared with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin; bDOPE: extract prepared with  $\beta$ -cyclodextrin; gDOPE: extract prepared with  $\gamma$ -cyclodextrin.

Observed results are consistent with previous findings pointing out  $\beta$ -cyclodextrins with the central cavity diameter of 8 Å, as the most appropriate for the inclusion of antioxidant compounds from the olive oil [22,23]. Tyrosol was also proved to form stable inclusion complexes with native  $\beta$ CD and its 2-hydroxypropyl- and methylated- derivatives [24]. Complexation of hydroxytyrosol with

$\beta$ CD also provided a strong photo-protection of the polyphenolic compound upon irradiation with UV ( $\lambda = 254$  nm). Finally, oleuropein (OLE) also forms stable inclusion complexes with  $\beta$ CD, increasing its aqueous solubility by 50% and protecting it against oxidation, as demonstrated by DSC studies under oxidative conditions [25]. In our study, only the oleuropein content of the obtained DOPE was positively affected by utilization of  $\gamma$ CD. This particular effect on oleuropein might be explained by the larger central cavity of  $\gamma$ CD (in comparison to  $\beta$ CDs), making it suitable for formation of an inclusion complex with oleuropein but not with smaller (tyrosol and hydroxytyrosol) molecules.

Formation of inclusion complexes increases solubility of target compounds in aqueous solvents (such as water–ethanol mixtures used in this investigation) and protects target compounds during drying process resulting with increased content in the final product.

### 2.1.2. Antioxidant Activity of DOPE in Chemical Models

The impact of the addition of cyclodextrins on antioxidant activity determined in chemical models (total reducing capacity (TRC) and antiradical efficiency) is presented in Table 2. Total reducing capacity of analyzed samples ranged from 39.34 mg/g GAE in nDOPE up to 53.16 mg/g in RAMEB encapsulated DOPE (ramDOPE). Statistical analysis showed that TRC of all cyclodextrin-encapsulated DOPEs was significantly higher in comparison to the native sample, but especially in HP $\beta$ CD encapsulated DOPE (hpDOPE) and ramDOPE. Scavenging capacity against free radicals was measured utilizing 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation (ABTS<sup>+</sup>) and DPPH<sup>•</sup> and by the ORAC method. A significant increase of ABTS<sup>+</sup> scavenging activity was achieved by hpDOPE and ramDOPE and increase of DPPH<sup>•</sup> scavenging activity was achieved by hpDOPE, ramDOPE, and  $\gamma$ CD encapsulated DOPE (gDOPE). Similar results were obtained by DPPH methods—ramDOPE and hpDOPE had the lowest EC50 values among the tested samples, while encapsulation with  $\beta$ CD or  $\gamma$ CD produced less significant or no effect.

Enhanced antiradical activity against ABTS<sup>+</sup> or DPPH<sup>•</sup> can be explained by increased content of hydroxytyrosol derivatives (HTD) in CD-containing extracts (Table 2). Namely, hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein have previously been identified as the principal antioxidative compounds in olives and derived products [1,4]. Additionally, the antioxidant activity of complexed polyphenols can be increased because in the form of the inclusion complex, there are protected against the rapid oxidation by free radicals [26].

ORAC assay was used for the measurement of scavenging activity of DOPE against peroxy radical scavenging activity. Since it is simple method, adoptable for both hydrophilic and lipophilic antioxidants, reproducible, utilizes a biologically relevant radical source, and is adaptable for routine quality control analyses, it has been considered as a serious candidate as a standardized AOC method for antioxidant capacity of foods and dietary supplements [27]. Also, as opposed to methods that utilize fixed end-point measurement, ORAC takes into account different kinetic behaviours of the antioxidants, providing more complete information about antioxidant behavior [28]. Therefore, despite criticism and recent challenges [29,30], it is still among the most widely used methods for the measurement of antioxidant capacity in foods. The antioxidant activity of the samples was calculated from the net area under the curve (nAUC) obtained by measuring the fluorescence of samples (and blank) for 45 min. A standard curve was generated by plotting the nAUC against corresponding Trolox concentrations.

As can be seen from the presented data (Table 2), ORAC values in analysed samples ranged from 142.7 mg/g TE in bDOPE up to 166.5 mg/g TE in hpDOPE. Although antioxidant activity was higher in hpDOPE and ramDOPE in relation to native DOPE (nDOPE) (which is consistent with the data obtained by other applied methods), the observed changes were not statistically significant. The obtained results indicate that under more realistic conditions where antioxidants are expected to work during a significant amount of time, positive effects of HP $\beta$ CD or RAMEB could be less significant than indicated by TRC, TEAC, or DPPH radical scavenging activity measurements.

However, the obtained results generally underline the benefits provided using cyclodextrins as extraction enhancers and the spray drying additives. During extraction, cyclodextrins can increase the

extractability of certain polyphenolic compounds by forming inclusion complexes that can increase the solubility of a target compound in hydrophilic solvents and increase its stability during the extraction process. Formation of inclusion complexes between olive-derived phenolic compounds, such as oleuropein, tyrosol, and different types of cyclodextrins, has been proven by several authors [24,31]. Also, encapsulated within the cavity of the cyclodextrin molecule, the stability of the target compound during extraction or drying process is additionally protected.

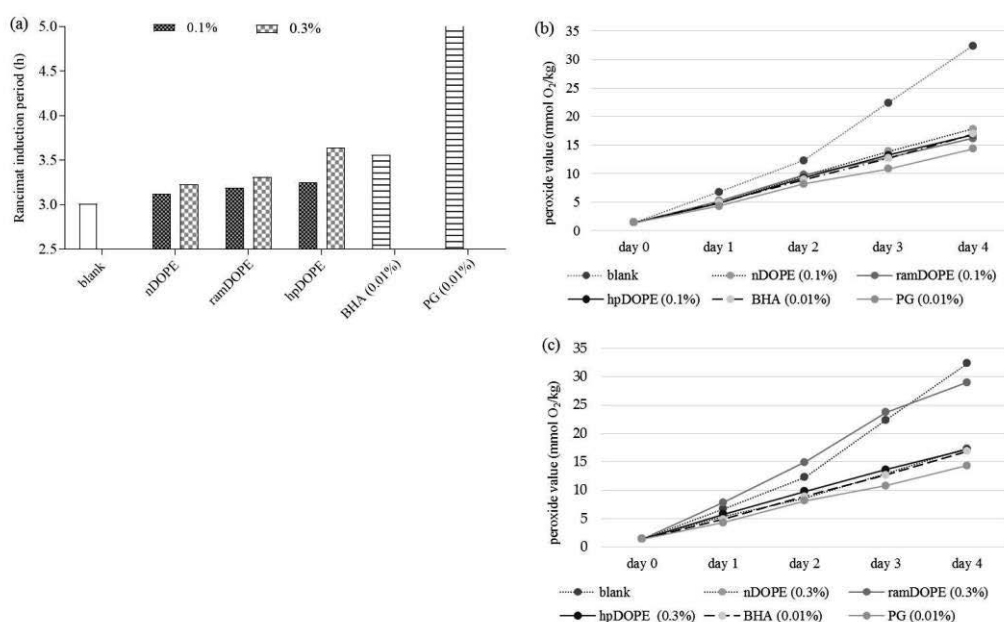
Our results are consistent with the aforementioned observations and point out the particular advantages of HP $\beta$ CD and RAMEB in relation to other tested cyclodextrins (CDs). This is consistent with our previous investigation [15] and might be explained by the preferential steric compatibility and higher complex stability of major polyphenols in olive pomace with HP $\beta$ CD and RAMEB over other tested CDs. Therefore, hpDOPE and ramDOPE were tested as antioxidants in different food and biological model systems and their activity was compared to the activity of nDOPE and commonly used synthetic antioxidants (BHA or Trolox).

## 2.2. Antioxidant Activity of DOPE in Food Model Systems

### 2.2.1. Antioxidant Activity of DOPE in Oil

Oxidation of lipids is the major cause of oil quality reduction, leading to formation of toxic compounds and off-flavours. The oxidative stability of oil depends primarily on its fatty acid composition and the presence of anti- and pro-oxidative concomitant compounds and interactions between them [32]. Oxidation proceeding in oils may be inhibited by the application of various methods decreasing air content in the package, including inert gases: nitrogen and carbon dioxide, and elimination of oxygen, e.g. oil flushing with a specified gas and/or formation of a gas cushion above the oil in the package. Addition of synthetic antioxidants (such as BHT or propylgallate (PG)) to oil is also an efficient and widely accepted approach. However, since the safety of the mentioned synthetic antioxidants has recently been questioned, there is increasing demand to find safer natural alternatives that can be produced by sustainable methods from available resources.

In this work, the ability of DOPEs to decrease lipid peroxidation of cold-pressed safflower oil was investigated by two accelerated oxidation approaches: the Rancimat method at 110 °C (Figure 1a) and the Shall oven test at 65 °C. (Figure 1b,c). In the Rancimat test, we tested the effect of the addition of DOPEs to oils at two concentration levels (0.1% and 0.3%) and the induction period was compared to the blank (pure safflower oil with no added antioxidants) and commonly used synthetic antioxidants (BHA and propyl-gallate (PG)).



**Figure 1.** Antioxidant activity of DOPE in oil. (a): Rancimat induction period; (b): Peroxide value of safflower oil during storage with 0.1% DOPE; (c): Peroxide value of safflower oil during storage with 0.3% DOPE. nDOPE-native dry olive pomace extract; hpDOPE-extract prepared with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; ramDOPE-extract prepared with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin; BHA: Butylhydroxyanisol; PG: Propyl-gallate.

The induction period for pure safflower oil was 3.01 h and was increased by the addition of all tested DOPEs at both concentration levels. Observed effects were concentration depended (addition of 0.3% DOPE showed higher protection effect in comparison to 0.1% DOPE) (Figure 1a). Among the tested DOPEs, nDOPE was the least potent. Cyclodextrin encapsulation significantly improved antioxidant efficiency DOPE in oil, from 2.3% (by addition of RAMEB) to 12.7% (by addition of HP $\beta$ CD). The best antioxidant protection of safflower oil was achieved by applying hpDOPE, especially at the concentration level of 0.3%, when it provided antioxidant efficiency comparable to 0.01% BHA. Recently, Mohammadi et al. [33] showed that significant antioxidant protection of soybean oil cannot be achieved by applying nano-encapsulated olive leaf extract (as determined by Rancimat test) but they used 3- to 10-fold lower sample concentrations in comparison to our investigation. PG provided the best oxidative stability during the Rancimat test and its efficiency at concentration level of 0.01% was approximately 60% higher in comparison to DOPEs at concentration levels of 0.1%. The main drawback of the Rancimat test in investigating the oxidative stability of plant oils is the fact that relatively high temperatures must be applied to obtain adequate sensitivity and selectivity of the method. However, at high temperatures, oxidation processes in oils are altered and can differ significantly from oxidation processes that occur under normal storage settings. For example, secondary oxidation reactions are favoured, and formation of peroxides becomes dependent on the oxygen concentration.

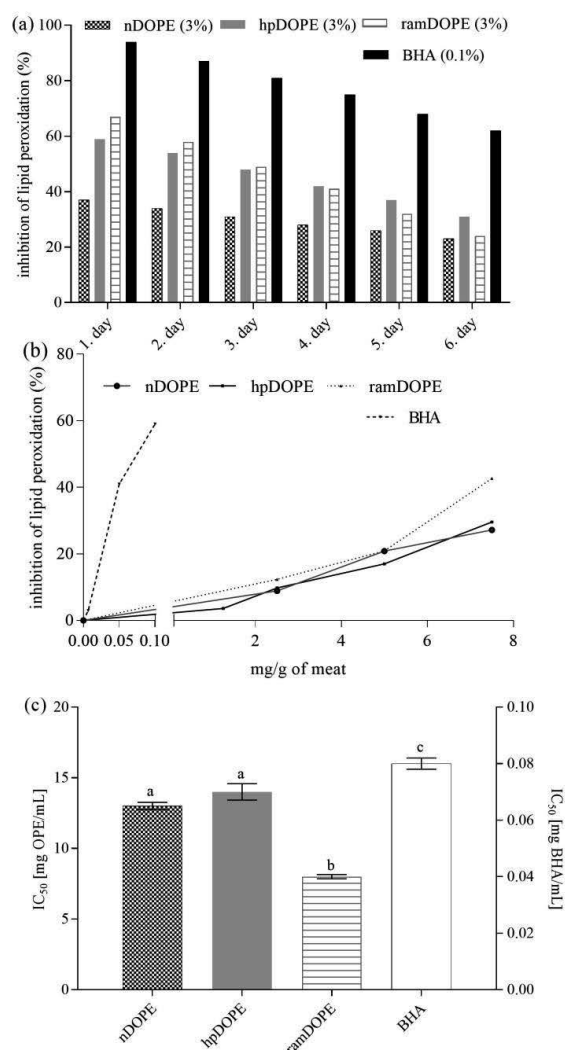
Therefore, the determination of the peroxide value measured under milder conditions (65 °C in Scholl Oven test) is probably a more reliable indicator of oxidation processes that occur under normal storage conditions. For that purpose, we monitored the increase of peroxide value of pure safflower oil (control) during the 4-day storage at 65 °C and compared it to results obtained for oil samples containing DOPEs or commonly used synthetic antioxidants (BHA and PG). Analysed DOPEs were applied at two concentration levels 0.1% (Figure 1b) and 0.3% (Figure 1c). The presented results clearly show that addition of all DOPEs significantly reduced formation of lipid peroxides in comparison to the control. The efficiency of tested DOPEs (at both concentration levels) was comparable to or even

higher than BHA (0.01%) as in the case of hpDOPE or ramDOPE (0.1%, 4th day of storage) (Figure 1b). Interestingly, applying higher concentration levels of all DOPEs (0.3%) except nDOPE increased peroxide formation in safflower oil indicating possible prooxidative effects. It was especially notable in the case of ramDOPE. Considering that this effect was only observed in samples encapsulated with CDs, it can be assumed that CDs (and especially RAMEB) might increase the content of lipid peroxides in oil. This observation is in discrepancy with the data obtained by the Rancimat method, where higher RAMEB level provided better antioxidant protection. The main difference of applied methods is that the Scholl oven test measures the peroxide value of the oil (primary reaction products) and the Rancimat method detects the content of secondary reaction products formed during the latter stages of lipid peroxidation. Therefore, the dose-dependent activity observed in the Rancimat test suggests that DOPE provides antioxidant protection of the oil primarily by inhibiting the formation of secondary reaction products. This is consistent with the recent findings of Lopez-Nicolas et al. [34], showing that cyclodextrins can be used as the potent inhibitors of secondary oxidation reactions in food (browning reactions).

### 2.2.2. Antioxidant Activity of DOPE in Meat Model

Lipid oxidation is among the major factors contributing to quality deterioration of muscle food during storage, particularly due to production of aldehydes responsible for the development of rancid flavours and specific colour changes in meat [35]. Common antioxidants used by the food industry are highly efficient BHA and BHT. Recent discussions considering their safety and possible health implications of long term exposure have contributed to increasing consumer demand for more natural food-products, including antioxidants of natural origin. Among their main drawbacks is that they are more expensive than synthetic antioxidants since large amounts of plant materials are needed for their production and they need to be used in larger concentrations (since they are less effective than synthetic antioxidants). Therefore, novel approaches for extracting antioxidants from highly available food industry waste represents a sustainable and cost-effective concept.

In this work, the efficiency of DOPEs as antioxidants in meats was assessed in minced meat by applying two approaches: stability testing during storage (Figure 2a) and accelerated stability testing and comparison to the activity of BHA (Figure 2b,c).



**Figure 2.** Oxidative stability of minced meat during storage at 4 °C and accelerate stability testing. (a): Oxidative stability during storage at 4 °C; (b): Inhibition of meat lipid peroxidation during accelerated testing in relation to concentration of antioxidant; (c): Antioxidant activity against meat lipid peroxidation during accelerated stability testing expressed as IC<sub>50</sub>. nDOPE-native dry olive pomace extract; hpDOPE-extract prepared with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; ramDOPE-extract prepared with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin; BHA: butylhydroxyanisol; IC<sub>50</sub>: Half maximal inhibitory concentration. Different letters above data bars indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

In both studies, the antioxidant potential of the tested antioxidants in meat was expressed as the inhibition of lipid peroxidation (relative to lipid peroxidation in meat sample with no added antioxidants) (Figure 2a,b). For stability testing during storage, meat samples containing no antioxidant (control), 3% DOPE, or 0.1% BHA were stored at 4 °C for 6 days and were analysed every day.

For accelerated stability testing, the impact of DOPE concentration (0–8 mg/g of meat) and BHA concentration (0–0.1 mg/g of meat) on inhibition of lipid peroxidation was monitored (Figure 2b). Half maximal inhibitory concentrations were calculated for each tested antioxidant and were used for the calculation of half minimal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) (Figure 2c).

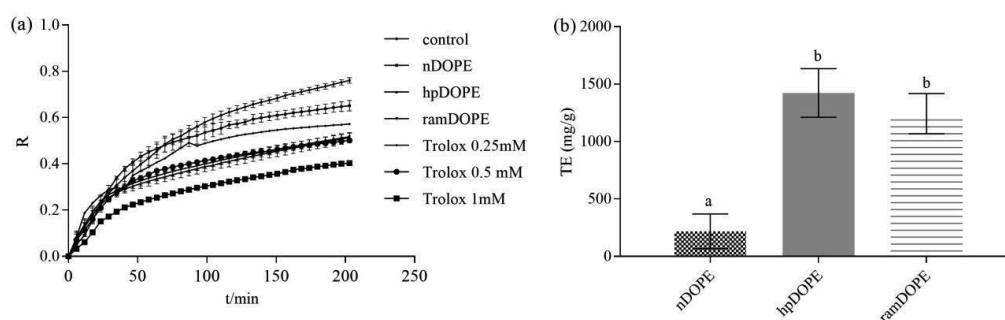
As can be seen from Figure 2a, in meat containing nDOPE, inhibition of lipid peroxidation ranged from 37% (day 1) to 23% (day 6) and was significantly lower in comparison to ramDOPE (67–24%) or hpDOPE (59–31%). Obtained results clearly point out that cyclodextrin encapsulation significantly increased the ability of DOPE to inhibit lipid peroxidation in meat during storage. However, the observed activity was low compared to 0.1% BHA which provided inhibition rates of

94–61%. Enhanced protective effects of cyclodextrin-encapsulated DOPE were also notable during accelerated stability testing. As expected, BHA was more potent than the tested DOPEs, providing 59% lipid peroxidation inhibition at the concentration level of 0.1%. Among tested DOPE, ramDOPE was particularly potent, providing a 42.7% inhibition rate at the concentration level of 7.5 mg/g of meat (in comparison to 27.2% and 29.5% provided by nDOPE and hpDOPE, respectively) (Figure 2b). This resulted with low  $IC_{50}$  values obtained for ramDOPE (Figure 2c) showing that encapsulation with RAMEB is particularly effective in increasing antioxidant efficiency of DOPE while hpDOPE and nDOPE are significantly less potent. Discrepancies in the results obtained by two approaches (storage and accelerated stability testing) might be due to high temperatures used for accelerated stability testing (80 °C) probably affecting the stability of CD-polyphenol complexes or altering the kinetics and chemistry of lipid oxidation reactions naturally occurring in meat during storage.

Both approaches showed that extracts were effective in preventing lipid peroxidation in meat (compared to control); however, their efficiency was significantly lower than BHA. To achieve effects comparable to BHA (0.01%), DOPE had to be used at concentration levels of 1–3%. Those concentration levels are consistent with other published data; Tanabe et al. [36] proved the efficiency of 22 herbal extracts such as oregano, sage, thyme, etc. as antioxidants in meat applied in the concentration range 0.5–2.5% (used as freshly prepared liquid extracts) which is comparable with our data. Many other authors used medicinal plants and their freshly prepared extracts in similar concentration ranges for this purpose [37]. The advantage of our approach is that we used highly available raw material (food industry waste) for extract preparation, used green extraction techniques for extraction of antioxidants, and formulated a stable, dry extract that can be stored and is easy to manipulate. Therefore, applying DOPEs as natural alternatives to antioxidants used by the meat industry represents a cheaper, easier, and more sustainable approach.

### 2.2.3. Antioxidant Activity of DOPE in the $\beta$ -Carotene Emulsion Model System

A common practice in most antioxidant assays is to measure given responses of the sample and reference antioxidant at a single time. Measuring antioxidant activity at one predetermined time-point does not consider the kinetics of the process and unnecessarily simplifies the chemistry of the process, leading to incorrect results and misinterpretations. This is especially the case in investigations of complex natural extracts containing complex mixtures of anti- and pro-oxidants [37]. Therefore, the antioxidant activity of olive pomace extracts in the  $\beta$ -carotene-linoleate emulsion system was measured in a kinetic model by monitoring the absorption:inhibition ratio during 200 min of incubation (Figure 3).



**Figure 3.** Antioxidant activity of DOPE in the  $\beta$ -carotene emulsion model system. (a):  $\beta$ -carotene absorbance inhibition ratio during 120 min incubation; (b): antioxidant activity expressed as  $IC_{50}$ . nDOPE-native dry olive pomace extract; hpDOPE-extract prepared with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; ramDOPE-extract prepared with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin; BHA: butylhydroxyanisol;  $IC_{50}$ : half maximal inhibitory concentration. Columns (in Figure 3b) marked with different letters belong to different statistical groups ( $p < 0.05$ )



Figure 3a presents  $\beta$ -carotene absorbance inhibition ratios during 120 min incubation in emulsion without added antioxidant (control), emulsions containing DOPEs, and emulsions containing different Trolox concentrations. Obtained data were used for development of Trolox calibration curve and obtained results were then expressed as mg/g of Trolox equivalents (Figure 2b).

Antioxidant activity of the analysed DOPEs ranged from 324.8 mg/g (nDOPE) up to 1272.4 mg/g and 1442.2 mg/g (hpDOPE and ramDOPE, respectively). This shows that the ability of analysed samples to inhibit the bleaching of  $\beta$ -carotene in the presence of hydroxyperoxide radicals formed from linoleic acid was particularly (approximately 4-fold) enhanced in cyclodextrin-encapsulated extracts. This is consistent with the results obtained in chemical tests for measuring antioxidant activity; however, both the antioxidative efficiency of DOPEs and the positive impact of cyclodextrins are much more pronounced in emulsion systems. For example, the ABTS<sup>+</sup> scavenging activity of analysed extracts was 12.86–17.07 mg/g TE, as opposed to 1509–1749 mg/g TE obtained in the  $\beta$ -carotene-linoleate emulsion system. The IC<sub>50</sub> values of the analysed samples obtained by DPPH test ranged from 1.03–1.65 g/L, while in the  $\beta$ -carotene-linoleate emulsion system, a 50% increase of antioxidant protection was achieved with average DOPE concentrations around 0.125 g/L. The observed differences can be partially explained by the lower efficiency of Trolox, as a water-soluble form of vitamin E in oil-in-water emulsions, but also indicate the applicability of the tested DOPEs as antioxidants in such systems. Obtained results also point out significant limitations of the most commonly applied chemical approaches in assessing the applicability of natural extracts as potential antioxidants in foods. Namely, food models more closely reflect an oxidizing-food situation and can therefore provide more reliable data. Investigating efficiency in an oil/water emulsion system is very important since many food lipids exist as oil-in-water emulsions (e.g., milk products, dressings, beverages, ice cream, etc). They are especially susceptible to oxidation due to higher surface area that enables easier interaction of the oil with prooxidants present in the aqueous phase [38].

Our results are consistent with results obtained by Singh et al. [39] who showed that 0.1 g/L pomegranate peel and seed extracts provided a 20–40% increase of antioxidant protection in a  $\beta$ -carotene linoleate model system. Similar results were obtained for different *Centaurea* species extracts (1 g/L) by Zengin et al. [40].

### 2.3. Antioxidant Activity of DOPE in Biological Model Systems

#### 2.3.1. Inhibition of Plasmid DNA Strand Scission by DOPE

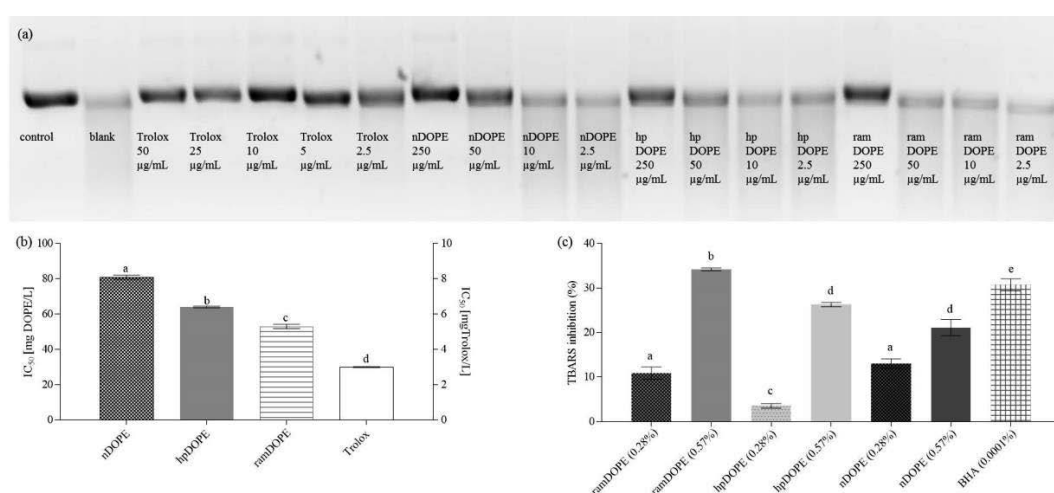
Free radicals produced by cellular metabolism or exogenous agents can react with biomolecules in cells, including DNA. The resulting oxidative damage to DNA is implicated in many biological processes such as mutagenesis, carcinogenesis, and aging [41]. Using plasmid DNA as a biological substrate presents an interesting step forward in developing non-cellular biological models for measuring antioxidant activity and has been used by several authors in evaluating biological activity of complex natural extracts [42,43].

The native conformation of plasmid DNA found *in vivo* is the supercoiled form, and is desired when isolating plasmid DNA. However, different external factors, such as free radicals, can change this native form into nicked relaxed circular plasmid, linear plasmid (when the DNA helix is cut in both strands at the same place), or circular single-stranded plasmid (due to disruption of hydrogen bonds). Different DNA forms show different mobility in agarose gel during electrophoresis: circular single strand is the fastest-migrating form, followed by the supercoiled form, linear, and nicked DNA, respectively.

In the DNA scission assay, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride radical (AAPH<sup>•</sup>) was used to induce damage of the native supercoiled plasmid DNA and changes were monitored by agarose gel. In the control sample, DNA was present as supercoiled and to a significantly lesser extent, as nicked relaxed circular plasmid. Addition of AAPH<sup>•</sup> significantly decreased the content of the

supercoiled and nicked forms and increased the content of linear form indicating significant oxidative damage (Figure S1).

As presented in Figure 4, addition of Trolox (2.5–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and tested DOPEs (2.5–250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) significantly reduced the damaging effect of AAPH in dose-dependent manner and enhanced the percentage of the plasmid DNA retained in native form. Applied concentrations of antioxidants were plotted against their respective supercoiled DNA retention percentages and used for the calculation of  $\text{IC}_{50}$  values (Figure 4b).



**Figure 4.** Inhibition of plasmid DNA strand scission and antioxidant activity of DOPE in liposome membrane model. (a): supercoiled (native) form of plasmid pBR322 DNA in electrophoresis gel after incubation with AAPH with or without the presence of antioxidants; (b): antioxidant activity against plasmid DNA strand scission expressed as  $\text{IC}_{50}$ ; (c): antioxidant activity of DOPE in liposome membrane model system. nDOPE-native dry olive pomace extract; hpDOPE-extract prepared with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; ramDOPE-extract prepared with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin; BHA: butylhydroxyanisole;  $\text{IC}_{50}$ : half maximal inhibitory concentration; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances. Different letters above data bars indicate significant difference ( $p \leq 0.05$ ).

$\text{IC}_{50}$  calculated for ramDOPE (53  $\text{mg}/\text{L}$ ) was similar to hpDOPE and significantly lower than nDOPE (64 and 81  $\text{mg}/\text{L}$ , respectively), indicating higher protective potential. A possible mechanism that could explain the protective effect of tested extracts against DNA scission is the scavenging of reactive oxygen species, and the results obtained by antiradical activity testing chemical model systems (ORAC, ABTS, DPPH) support this theory (Table 2). Utilization of cyclodextrins in the formulation of dry extracts significantly improved the antioxidant activity of the final product, probably by increasing the content of hydroxytyrosol derivatives (HTD), major antioxidant species in DOPEs. Although the obtained  $\text{IC}_{50}$  values are high in comparison to the reference antioxidant (Trolox;  $\text{IC}_{50} = 3 \text{ mg}/\text{L}$ ), their effective concentrations are comparable to the activity of different plant extracts assessed by other authors [42,43], indicating potential for further investigations using cellular in vitro models and in vivo investigation.

### 2.3.2. Antioxidant Activity of DOPE in the Liposome System

Liposomes are spherical phospholipid bilayers that mimic cellular structures and can be used as model membrane systems. They are widely used as xenobiotic delivery systems since they improve the availability of the active compound, target and slow its release, and show protective features [44]. This is why liposomes have potential applications in a wide range of fields, including pharmaceutical sciences, food technology, or agriculture. Additionally, they are used as model systems for investigation

of membrane–drug interactions in terms of efficiency, toxicity, or pharmacokinetics [45]. As such, they provide a natural environment for studying the mechanisms of action and potency of biological antioxidants and can be used to predict their interaction with biological membranes and ability to protect them from oxidative degradation. They can also be used as models for measuring the ability of a particular antioxidant to inhibit lipid peroxidation and formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) during storage or heat treatment, and as such are a useful model for investigation in the food industry. Their relevance as cell-free liposome-based cellular models in investigating antioxidant activity has recently been emphasized by Balducci et al. [46].

In our work, liposomes were prepared by the sonication of a lipid dispersion and used for monitoring the ability of DOPE to inhibit lipid peroxidation induced by copper ions during storage at 37 °C (Figure 4c). Liposomes prepared without the addition of antioxidants were used as control and showed the highest rates of lipid peroxidation that was monitored by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production (data not shown). Production of TBARS was lower in liposomes containing antioxidants and their efficiency was expressed as the percentage of TBARS formation inhibition (relative to control). Tested DOPEs were applied at two concentration levels, 0.28% and 0.57%, respectively, and their efficiency was compared to 0.0001% BHA (Figure 4c).

At lower concentration levels, ramDOPE and nDOPE showed significantly higher inhibition rates (IR) against copper-induced lipid peroxidation in comparison hpDOPE (10.9 and 13.0 vs. 3.5%). At lower concentration levels nDOPE and ramDOPE showed the best antioxidant activity. At higher concentration levels, ramDOPE was still the most efficient among tested antioxidants and its IR was comparable to BHA that was used as control (34.2 vs. 30.7). The observed results can be explained primarily by tyrosol content of tested DOPEs (Table 2). Namely, among different phenolic compounds in olive pomace extract, hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein are the most abundant (Table 1) and their content correlated well with TRC, ABTS antiradical activity, and ORAC (correlation coefficients were 0.8556, 0.8764, and 0.7838, respectively). Tyrosol is characterized with significantly higher logP in comparison to hydroxytyrosol and oleuropein (logP = 0.4 vs. −0.7 and −0.4, respectively). Tyrosol can therefore be most easily incorporated into hydrophobic interior of the liposome and inhibit lipid peroxidation. The content of tyrosol in ramDOPE ( $950.9 \pm 7.61$  mg/100 g) was significantly higher in comparison to nDOPE or hpDOPE (870.1 and 715.7 mg/100 g, respectively) resulting in significantly higher IR. However, hydrophilic antioxidants that remain in the outer solution and are not incorporated into liposome's interior can also prevent its oxidation by the additive effect of their metal chelation ability. Namely, by chelating the copper ions in the solution, they inhibit the initiation of the oxidation process [47].

Our observations are consistent with the conclusions of Kong et al. [48] who used a liposome system to evaluate the antioxidant activity of various spice extracts. They showed that TBARS inhibition in oxidizing liposomes is correlated with total phenolic content and chelating activity of analyzed extracts, but not with DPPH· scavenging activity, which is consistent with our data. Contribution of other characteristics of antioxidants in providing efficient protection in biological environment (in addition to their antiradical activity), such as self-assembly and their interaction with liposomes has been shown by Balducci et al. [46], showing that the chain-length of synthesized hydroxytyrosyl esters significantly affects their antioxidant activity in liposome model.

### 3. Materials and Methods

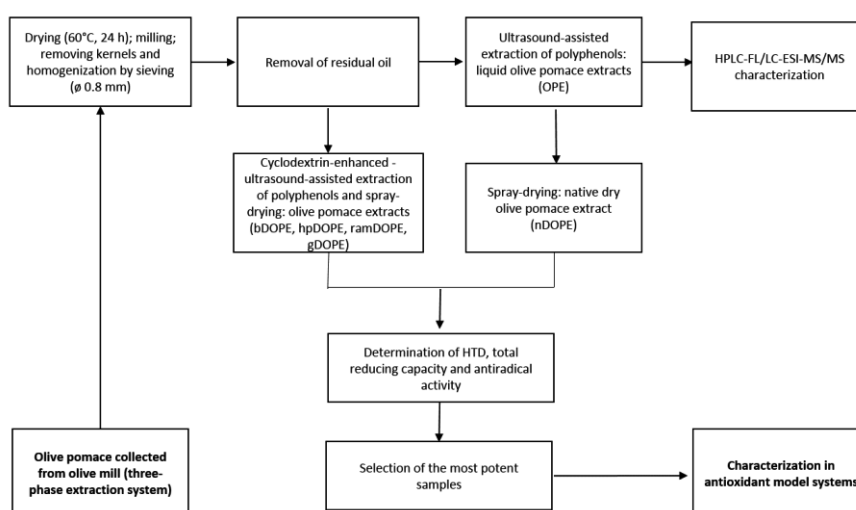
#### 3.1. Chemicals and Reagents

Ethanol (96%) (Gram-mol, Zagreb, Croatia) was mixed with distilled water in order to obtain ethanol-water mixture used as extraction solvent. Acetonitrile ( $\geq 99.9\%$ ), methanol ( $\geq 99.9\%$ ), and formic acid used for the preparation of high performance liquid chromatography (HPLC) mobile phases and ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS-MS) analysis were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Reference

standards of phenolic compounds 2-(4-hydroxyphenyl) ethanol (tyrosol > 99.5%), 3-hydroxytyrosol ( $\geq 98\%$ ), oleuropein ( $\geq 98\%$ ), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid), 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid (homovanillic acid), 3,4-dihydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid were purchased from Sigma-Aldrich. Folin–Ciocalteu reagent, sodium carbonate, gallic acid, butyl-hydroxy anisole (BHA), phosphate buffer saline (PBS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS),  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) randomly-methylated  $\beta$  cyclodextrin (RAMEB), hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD),  $\gamma$  cyclodextrin ( $\gamma$ CD), 3',6'-dihydroxyspiro[isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanthen]-3-one (fluorescein), 2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride (AAPH), pBR322 Plasmid DNA from *Escherichia coli* RRI, malondialdehyde (MDA) tetrabutylammonium salt, 2-thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, and human LDL (in PBS, pH 7.4, containing 0.01% of EDTA) were purchased from Sigma-Aldrich. GelRed<sup>®</sup> dye for gel electrophoresis was obtained from Biotium (Fremont, CA, USA). Soy lecithin and other used chemicals were from Kemika (Zagreb, Croatia). Deionized water (18 m $\Omega$ ) was obtained from Millipore-MiliQ water purification system (Merck, Kenilworth, NJ, USA).

### 3.2. Plant Material

Olive pomace was collected from several three-phase olive-mill plants during winter 2016/2017. As described previously [15], plant material pretreatment included drying, milling, removing kernels homogenization, and de-fatting in a Soxhlet apparatus in order to obtain powder suitable for the extraction of polyphenols (Scheme 1).



**Scheme 1.** Flowchart of the experimental design (preparation of extracts and analyses). HTD-hydroxytyrosol derivatives; nDOPE: native dry olive pomace extract; hpDOPE: extract prepared with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; ramDOPE-extract prepared with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin; bDOPE: extract prepared with  $\beta$ -cyclodextrin; gDOPE: extract prepared with  $\gamma$ -cyclodextrin.

### 3.3. Preparation of Olive Pomace Extracts

Extraction of polyphenols was conducted according to previously optimized procedure [14]. Briefly, powdered olive pomace was extracted using 60% ethanol at 1:40 solvent to solid ratio using ultrasound-assisted extraction (Q Sonica Sonicators, Newtown, CT, USA). For maximal yields, 20 min pulsed extraction was applied, using 12 mm titanium probe at 100% output intensity. For CD-enhanced extraction, cyclodextrins were added to extraction solvent at concentration levels 8 g/L ( $\beta$ CD) or 16 g/L (HP $\beta$ CD, RAMEB,  $\gamma$ CD), as previously suggested [14]. Obtained liquid extracts were spray-dried using Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Flavil, Switzerland) in combination with either  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD,

RAMEB, or  $\gamma$ CD encapsulation or without the addition of cyclodextrin under previously optimized conditions (*unpublished data*). Different types of DOPEs were obtained: nDOPE, hpDOPE, ramDOPE, dry extract encapsulated with  $\beta$ CD (bDOPE), and dry extract encapsulated with  $\gamma$ CD (gDOPE).

### 3.4. Chromatographic Analysis of Olive Pomace Extract

#### 3.4.1. HPLC Analysis of Hydroxytyrosol Derivatives

Identification and determination of the main hydroxytyrosol derivatives (tyrosol, hydroxytyrosol, and oleuropein) was conducted by Waters 2695 HPLC system (Waters Milford, MA, USA) coupled with a 2475 multi fluorescence detector (FLD), according to method of Tsarbopoulos et al. [49]. Samples were dissolved in deionized water and filtered through 0.45  $\mu$ m syringe filters (polyethersulfone membrane, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Chromatographic separation was achieved on a C18 reversed phase column (250  $\times$  4.6mm, 5  $\mu$ m) (Agilent Zorbax Eclipse plus, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The gradient elution program was applied for satisfactory separation of peaks (Table S1). The mobile phase used was 0.05 mol/L ammonium acetate buffer (adjusted to pH 5.0 with glacial acetic acid) versus acetonitrile. The flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 20  $\mu$ L. The FLD was set at the excitation wavelength of 280 nm, and emission wavelength of 635 nm. The column temperature was maintained at 25  $^{\circ}$ C. The identification of tyrosol, hydroxytyrosol, and oleuropein was carried out by the comparison of the retention times of pure standards. The quantification of the analytes was performed by external standard calibration. Standard stock solutions were prepared by dissolving reference compounds in methanol. Aliquots of these solutions were further diluted with to obtain calibration standards at concentrations between 1–81 mg/L (five concentration points: 1, 3, 9, 27, and 81 ppm). Identification of the eluting peaks was performed by comparing their retention times with those of the standards.

#### 3.4.2. UPLC–ESI-MS/MS Analysis of Phenolic Acids

The phenolic compounds were analyzed by Agilent series 1290 RRLLC instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to an Agilent triple quadrupole mass spectrometer (6430) with ESI ion source (UPLC-MS/MS). Analysis was conducted according to the method of López de las Hazas et al. [50] with some modifications: instead of 0.2% (*v/v*) acetic acid, 0.1% (*v/v*) formic acid was used and flow rate was reduced to 0.2 mL/min. Ionization was done by electrospray (ESI) in the negative mode, and the data were collected in the dynamic MRM mode. The MS/MS parameters were as follows: capillary voltage, 4000 V in positive and 3500 V in negative acquisitions; nebulizer pressure 40 psi; drying gas temperature 300  $^{\circ}$ C; gas flow rate 11 L/min. Nitrogen (>99% purity) was used as the nebulizing and collision gas, respectively. Precursor and product ions were identified and optimized using Mass Hunter Optimizer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Different phenolic compounds were characterized according to their mass spectra and according to retention times that were compared with commercial standards. All standards were qualified and quantified in dynamic multiple reaction monitoring (MRM) mode, using the optimized specific parameters: precursor ion, product ion, fragmentor voltage, collision energy, and ionization mode (Table S2). Quantification was performed using the external standard method. Standard stock solutions were prepared by dissolving reference compounds in methanol and were adequately diluted with deionized water to obtain calibration standards at concentrations between 0.1–10 mg/L. Samples were sonicated for 30 min with methanol in the ultrasonic bath at constant frequency of 37 kHz and at temperature of 50  $\pm$  5  $^{\circ}$ C (Model Elma, Elmasonic S 40 (H), Singen, Germany), centrifuged at 3000 rpm for 15 min, and filtered through 0.45  $\mu$ m filter.

### 3.5. Determination of Antioxidant Activity in Chemical Model Systems

#### 3.5.1. Determination of Total Reducing Power

The quantification of the total phenolic content was carried out by Folin–Ciocalteu method according to Singleton and Rossi [51] with some modifications. The reaction mixture consisted of 200  $\mu\text{L}$  of adequately diluted extract or extraction medium (blank), 1.35 mL of deionized water and 150  $\mu\text{L}$  of Folin–Ciocalteu reagent. Reaction mixture was vortexed. After 5 min, 1.5 mL of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (6%, *w/v*) was added and the mixture was shaken in water bath (70 rpm) for 30 min, at 50 °C. Absorbance was measured at 725 nm, after cooling to room temperature. Calibration curve was prepared with gallic acid and total reducing capacity was expressed as mg of gallic acid equivalents (mg/g GAE).

#### 3.5.2. DPPH Radical-Scavenging Assay

The radical-scavenging activity against DPPH $\cdot$  was determined according to method of Kirigaya et al. [52] and Shimada et al. [53]. DPPH $\cdot$  radical scavenging activity is method based on the reduction of DPPH $\cdot$  in methanol solution in the presence of a hydrogen-donating antioxidant that results with discoloration of purple solution that can be measured at 528 nm [54]. The reaction mixture consisted of 600  $\mu\text{L}$  of adequately dissolved extract in methanol, or 600  $\mu\text{L}$  of pure methanol for estimating initial absorbance ( $A_{0\text{min}}$ ), 1.4 mL of methanol, and 1.5 mL of DPPH solution. It was incubated for 30 min and the absorbance was measured at 528 nm ( $A_{30\text{min}}$ ). Each sample was analyzed at 4–5 concentration levels, so that the decrease of the absorbance varied between 10% and 90%. Absorbance decrease (%) was plotted against the concentration of particular antioxidant and obtained equations were describing observed linear dependence were used for the calculation of  $\text{IC}_{50}$ , which represents a concentration of extract that caused the 50% absorbance decrease.

#### 3.5.3. Scavenging Activity against the ABTS Radical (TEAC Test)

Scavenging activity of olive pomace extracts against the  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  was determined by a colorimetric assay described by Re et al. [55].  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  solution was prepared by 7 mmol/L aqueous ABTS solution reacting with 2.45 mmol/L potassium persulfate solution in the dark at 4 °C for 12 h. After reaction,  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  solution was diluted with distilled water to give an absorbance of  $0.70 \pm 0.02$  at 732 nm. The reaction mixture consisted of 300  $\mu\text{L}$  of adequately diluted extract or deionized water ( $A_{0\text{min}}$ ) and 2.5 mL  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  solution. Absorbance of the samples was measured at 732 nm, after 3 min of reaction ( $A_{3\text{min}}$ ). The percentage of quenching the absorbance was calculated according to the Equation (Eq1) [1]:

$$\Delta A = \frac{A_{0\text{min}} - A_{3\text{min}}}{A_{0\text{min}}} \times 100 \quad (1)$$

The calibration curve was generated by plotting different Trolox concentrations against respective absorbance quenching percentages. Antiradical efficiency was expressed as mg of Trolox equivalents (mg/g TE).

#### 3.5.4. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) measures free radical oxidation of a fluorescent probe through the change in its fluorescence intensity. It was determined using fluorescein as the fluorescent probe [56]. The assay was performed in a 96-well microplate and was assessed with a Victor X3 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Briefly, 150  $\mu\text{L}$  of 5  $\mu\text{M}$  fluorescein was added to each well of a black microplate and mixed with 25  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer (75 mM, pH 7.0; blank), Trolox standard (6.25–100  $\mu\text{mol/L}$ ) or adequately diluted sample. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 10 min and the oxidation reaction was initiated by addition of 25  $\mu\text{L}$  of AAPH (150 mM in phosphate buffer). The fluorescence of the reaction mixtures (excitation 485 nm, emission 530 nm) was plotted against time (60 min).

The area under the curve (AUC) was calculated for blank, samples, and standard (Trolox). For each sample and each Trolox concentration, netAUC was calculated by subtracting  $AUC_{\text{blank}}$  from  $AUC_{\text{sample/Trolox}}$ . A linear standard curve was generated by plotting Trolox concentrations against respective netAUC values. The obtained standard curve was used to express the antioxidant activity of the samples as mg of Trolox equivalents per gram (mg/g TE).

### 3.6. Antioxidant Activity in Food Model Systems

#### 3.6.1. Antioxidant Activity in Oil

##### Oil Thermal Oxidative Stability Index (Rancimat Test)

Oxidative stability of oils containing different amounts of DOPEs was investigated by determining the induction period (IP) on a Rancimat 743 apparatus (Metrohm, Herisau, Switzerland) at 110 °C and an air flow of 20 L/h [57]. The Rancimat test measures the conductivity of deionized water caused by dry air that bubbled through a heated sample and automatically determines the time needed to produce maximal conductivity [58]. 3 g of oil containing the tested samples or synthetic antioxidants were weighed into reaction vessels and analyzed simultaneously. The IP was determined for all sample oils. The IP has been analyzed in triplicate.

##### Schaal Oven Stability Test

Oil samples were submitted to an accelerated storage test [59] which was conducted in a forced-draft oven at 63 °C for 4 days. Peroxide value (PV), as the marker of oxidative stability of safflower oil was determined in fresh oil, and after 1, 2, 3, and 4 days. All determinations were carried out in duplicate.

#### 3.6.2. Antioxidant Activity in Meat Model System

Antioxidant activity in meat model system was determined according to the modified procedure described by Fasseas et al. [35]. In this method lipid peroxidation is determined by the reaction of MDA with thiobarbituric acid (TBA) to form a colorimetric (532 nm) product proportional to the MDA present. MDA tetrabutylammonium salt was used for the preparation of standard curve. Minced meat was homogenized, and visible fat was removed. Meat samples, with or without (control) the addition of DOPE/BHA were subjected to either thermal processing or storage at 4 °C. For determination of lipid peroxidation products, samples were mixed with 1 mL of water, 1.5 mL of acetic acid (20%, *v/v*), and 1.5 mL of 0.8% (*w/w*) TBA in 1,1% (*w/w*) sodium-dodecyl-sulphate (pH of reaction mixture was 2). Reaction mixture was vortexed for 30 s and incubated in water bath for 60 min at 100 °C. After cooling, 5 mL of butan-1-ol was added to reaction mixture and vortexed for 60 s. Reaction mixtures were centrifuged at 4000 rpm for 3 min. The absorbance of the butanol layer was determined at 532 nm and butan-1-ol was used as blank.

For accelerated stability testing, meat samples without added antioxidant, containing different concentrations of DOPEs or containing BHA, were shaken in water bath (100 rpm) for 120 min, at 85 °C. Inhibition of MDA products formation (%) was plotted against the concentration of added antioxidant DOPE (0.25–0.75%) or BHA (0.005–0.1%) and results were expressed as the  $IC_{50}$ .

Stability during storage was assessed by daily sampling of meat stored at 4 °C in a dark over 6 consecutive days. 3 mg of DOPE or 0.1 mg of BHA was added to 100 mg of meat, while meat stored without the addition of antioxidants was used as control. The results were expressed as the percentage of the inhibition of formation of lipid peroxide radicals (quantified as MDA) in relation to control.

#### 3.6.3. Antioxidant Activity in $\beta$ -Carotene Emulsion Model System

The antioxidant activity of the extracts in the  $\beta$ -carotene emulsion model system was determined by the improved method of Prieto et al. [37] in a microtiter plate, using a kinetic approach. For the preparation of the  $\beta$ -carotene–linoleic acid emulsion  $\beta$ -carotene (4 mg), linoleic acid (0.5 mL), and Tween-40 (4 g) were dispersed in 20 mL of chloroform and shaken to obtain a suspension. The

chloroform was evaporated at a temperature lower than 50 °C in a short period of time to avoid the beginning of the lipid oxidation process as much as possible. 1 mL of the oily residue was mixed with 30 mL of 100 mmol/L Britton buffer (pH 6.5, preheated at 45 °C) to prepare emulsion. The subsequent procedure was performed in a 96-well microplate with flat-bottom wells by combining 50 µL of DOPE (0.125 g/L), buffer (blank), or Trolox (standard; 0.125 mmol/L) and 250 µL of emulsion. The reader device was programmed to 45 °C with agitation (660 s/min and 2 mm amplitude). The absorption of reaction mixture was monitored every minute for 200 min at 470 nm using the Victor X3 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Absorbance inhibition ratios ( $R$ ) were calculated according to the Equation (Eq2) [2]:

$$R = 1 - \frac{A_0}{A_t} \quad (2)$$

where  $A_0$  is maximal absorbance of reaction recorded at time 0 and  $A_t$  is absorbance recorded at time  $t$  (1–200 min).  $R$  was plotted against time (Figure 3a) and obtained values were used for calculation of area under the curve (AUC) for each analysed sample/Trolox solution. Linear regression curve was generated by plotting AUC with respective Trolox concentrations (0.125–1 mM) and obtained regression equation was used to calculate and express antioxidant activity of analyzed samples as mg/g of Trolox equivalents (TE).

### 3.7. Antioxidant Activity in Biological Model Systems

#### 3.7.1. Inhibition of Plasmid DNA Strand Scission

Inhibition of DNA scission in plasmid pBR322 was measured according to the procedure modified from Kitts and Wijewickreme [60]. Briefly, 4 µL of pBR322 plasmid DNA (50 µg/L) was mixed with 2 µL of extract solution (different dilutions; sample), PBS (10 mmol/L; pH = 7.4; blank), or Trolox (different concentrations; control); 2 µL of AAPH (50 mmol/L) or PBS (control). The final volume of the reaction mixture was brought to 10 µL with PBS. Following incubation (37 °C, 120 min, 350 rpm), 4 µL of loading dye (2.5 g/L of bromophenol blue; 40 g/L saccharose; 10 mL/L GelRed dye) was added to reaction mixture and loaded onto 7 g/L of agarose gel. After electrophoresis DNA bands were visualized and quantified with Image Quant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK). Antioxidant activity was assessed based on the percentage of DNA remaining in its native supercoiled form after incubation with AAPH radical. Based on regression equation that has been calculated by plotting the sample concentration in the reaction mixture (10–250 mg/L) against the percentage of intact DNA,  $IC_{50}$  has been established for each analyzed sample.

#### 3.7.2. Antioxidant Activity in Liposome Model System

Antioxidant activity in liposome model system was determined according to the modified procedure described by Liu et al. [61]. Briefly, 2.4 g of soy lecithin was suspended in 300 mL of deionized water (8 mg/mL) by stirring and sonicating for 15 min. 1 mL of antioxidant ethanol solutions (BHA or DOPEs) or ethanol (control sample) was added to 50 mL of liposome and the mixture was sonicated for 5 min. 20 µL of cupric acetate (30 mmol/L) was added to the solution and reaction mixture was mixed thoroughly. The antioxidant activity of DOPE was measured at two concentration levels: 0.28% and 0.57%.

Liposome solutions were incubated in water bath for 60 min, at 37 °C. After cooling to room temperature, 1 mL of liposome solution was mixed with 1.5 mL of acetic acid (20%,  $v/v$ ) and 1.5 mL of 0.8% ( $w/w$ ) TBA in 1.1% ( $w/w$ ) sodium-dodecyl-sulphate (pH of reaction mixture was 2). Reaction mixture was vortexed for 30 s and incubated in water bath for 60 min at 100 °C. After cooling, 5 mL of butan-1-ol were added and mixed. Samples were then centrifuged at 4000 rpm for 3 min. The absorbance of the upper layer was determined at 540 nm and butan-1-ol was used as a blank. Antioxidant activity was expressed as the percentage of inhibition of TBARS formation in relation to control sample).



### 3.8. Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate. The results were expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical comparisons among the analyzed samples were made using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the demo version of GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 4. Conclusions

This study explored the possibilities of utilizing olive pomace extracts as antioxidants in different models and investigated the effect of cyclodextrin encapsulation on the activity of the final formulation. Cyclodextrin encapsulation enhanced the antioxidant activity of olive pomace extracts by significantly increasing their polyphenolic content, especially in the case of hydroxytyrosol derivatives (hydroxytyrosol, tyrosol, and oleuropein). Other proposed mechanisms of positive cyclodextrin effects on antioxidant activity are the modification of physical characteristics and increasing the stability of active substances under oxidative conditions. The tested cyclodextrins significantly differed regarding their ability to improve the functionality of olive pomace extracts; encapsulation with HP $\beta$ CD and RAMEB provided comparable and the most significant benefits. Applying food and biological models for testing antioxidant activity revealed more significant differences in antioxidant activity between native and cyclodextrin-encapsulated extracts in comparison to chemical models, suggesting their applicability for testing the activity of substance/extract in natural environments and their interaction with biological substrates. hpDOPE and ramDOPE were particularly potent in oil-in-water emulsion systems, showing higher antioxidant activity than Trolox. Their antioxidant activity in the oil and meat models was comparable to that of BHA when applied at concentration levels of 0.1% and 2–3%, respectively. ramDOPE showed significantly higher antioxidant activity in food models (in comparison to hpDOPE). In biological models, they showed the ability to inhibit lipid peroxidation by direct radical scavenging capacity and metal-chelating properties and successfully protected DNA from AAPH-induced scission. The obtained results contribute significantly to the current knowledge on the antioxidant activity of olive pomace extracts, their potential application as nutraceuticals, and significant benefits that can be provided by the simple process of cyclodextrin encapsulation.

**Supplementary Materials:** The following are available online. Figure S1: Plasmid pBR322 DNA forms visible after electrophoresis in agarosis gel in the presence or absence of free radicals (AAPH) and/or antioxidants (Trolox), Table S1: HPLC elution program (gradient of mobile phase and flow rate). A mobile phase is sodium acetate buffer (pH 5.0), and B is acetonitrile, Table S2: ESI-MS/MS parameters for studied phenolic compounds.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.V.Č.; Data curation, K.R., S.P., T.M. and P.A.; Formal analysis, K.R., S.J., M.G.R., S.P., T.M. and P.A.; Investigation, K.R., M.J. and M.G.R.; Supervision, D.V.Č.; Validation, M.J.; Writing – original draft, D.V.Č. and M.J.

**Funding:** This work has been fully supported by Croatian Science Foundation (UIP-2014-09-9143).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Clemente, A.; Sánchez-Viquore, R.; Viquore, J.; Bautista, J.; Millán, F. Chemical composition of extracted dried pomaces containing two and three phases. *Food Biotechnol.* **1997**, *11*, 273–291. [CrossRef]
2. Pagnanelli, F.; Mainelli, S.; Vegliò, F.; Toro, L. Heavy metal removal by olive pomace: Biosorbent characterization and equilibrium modeling. *Chem. Eng. Sci.* **2003**, *58*, 4709–4717. [CrossRef]
3. Sánchez Moral, P.; Ruiz Méndez, M.V. Production of pomace olive oil. *Grasas Y Aceites* **2006**, *57*, 47–55. [CrossRef]
4. Suárez, M.; Romero, M.P.; Ramo, T.; Macià, A.; Motilva, M.J. Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1463–1472. [CrossRef] [PubMed]

5. Echeverría, F.; Ortiz, M.; Valenzuela, R.; Videla, L.A. Hydroxytyrosol and cytoprotection: A projection for clinical interventions. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 930. [CrossRef] [PubMed]
6. Nakiboglu, M.; Urek, O.R.; Kayali, A.H.; Tarhan, L. Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey. *Food Chem.* **2007**, *104*, 630–635. [CrossRef]
7. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Cross, C.E. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*, 598–620. [PubMed]
8. Aruoma, O.I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 199–212. [CrossRef]
9. Soto-Alarcon, S.A.; Valenzuela, R.; Valenzuela, A.; Videla, L.A. Liver protective effects of extra virgin olive oil: Interaction between its chemical composition and the cell-signaling pathways involved in protection. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2018**, *18*, 75–84. [PubMed]
10. Grice, H.C. Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food Chem. Toxicol.* **1986**, *24*, 1127–1130.
11. Wichi, H.P. Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem. Toxicol.* **1988**, *26*, 717–723.
12. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841–1856. [CrossRef] [PubMed]
13. Decker, E.A.; Warner, K.; Richards, M.P.; Shahidi, F. Measuring antioxidant effectiveness in food. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4303–4310. [CrossRef] [PubMed]
14. Sansone, F.; Mencherini, T.; Picerno, P.; d'Amore, M.; Aquino, R.P.; Lauro, M.R. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *J. Food Eng.* **2011**, *105*, 468–476. [CrossRef]
15. Albahari, P.; Jug, M.; Radić, K.; Jurmanović, S.; Brnčić, M.; Rimac Brnčić, S.; Vitali Čepo, D. Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction. *LWT-Food Sci. Tech.* **2018**, *92*, 22–31. [CrossRef]
16. Braithwaite, M.C.; Tyagi, C.; Tomar, L.K.; Kumar, P.; Chiinara, Y.E.; Pillay, V. Nutraceutical-based therapeutic and formulation strategies augmenting their efficiency to complement modern medicine: An overview. *J. Funct. Food.* **2014**, *6*, 82–99. [CrossRef]
17. Aliakbarian, B.; Casazza, A.A.; Perego, P. Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor. *Food Chem.* **2011**, *128*, 704–710. [CrossRef]
18. Cioffi, G.; Pesca, M.S.; De Caprariis, P.; Braca, A.; Severino, L.; De Tommasi, N. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem.* **2010**, *121*, 105–111. [CrossRef]
19. Herrero, M.; Temirzoda, T.N.; Segura-Carretero, A.; Quirantes, R.; Plaza, M.; Ibañez, E. New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 7511–7520. [CrossRef] [PubMed]
20. Ryan, D.; Robards, K.; Lavee, S. Changes in phenolic content of olive during maturation. *Int. J. Food Sci. Tech.* **1999**, *34*, 265–274. [CrossRef]
21. Cimato, A.; Mattei, A.; Osti, M. Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Hort.* **1990**, *286*, 453–456. [CrossRef]
22. Efmorfopoulou, E.; Rodis, P. Complexation of oleuropein and trans-cinnamic acid with cyclodextrins. *Chem. Nat. Compd.* **2004**, *40*, 362–366. [CrossRef]
23. Efmorfopoulou, E.; Rodis, P. Application of cyclodextrins to the extraction of antioxidant compounds from olive oil. *Chem. Nat. Compd.* **2005**, *41*, 22–26. [CrossRef]
24. García-Padial, M.; Martínez-Ohárriz, M.C.; Navarro-Blasco, I.; Zornoza, A. The role of cyclodextrins in ORAC-fluorescence assays. Antioxidant capacity of tyrosol and caffeic acid with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 260–264. [CrossRef] [PubMed]
25. Mourtzinis, I.; Makris, D.P.; Yannakopoulou, K.; Kalogeropoulos, N.; Michali, I.; Karathanos, V.T. Thermal stability of anthocyanin extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the Presence of beta-Cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10303–10310. [CrossRef] [PubMed]
26. Mercader-Ros, M.T.; Lucas-Abellán, C.; Fortea, M.I.; Gabaldón, J.A.; Núñez-Delicado, E. Effect of HP- $\beta$ -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chem.* **2010**, *118*, 769–773. [CrossRef]
27. Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302. [CrossRef] [PubMed]

28. Terpinic, P.; Bezjak, M.; Abramovič, H. A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chem.* **2009**, *115*, 740–744. [CrossRef]
29. Amorati, R.; Valgimigli, L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Res.* **2015**, *49*, 633–649. [CrossRef] [PubMed]
30. Pincemail, J.; Tabart, J.; Defraigne, J.O.; Dommès, J.; Kevers, C. The total antioxidant capacity of foods: A reappraisal. application to commercial orange juices. *J. Anti. Act.* **2015**, *1*, 1–7. [CrossRef]
31. Barão, C.E.; Paiva-Martins, F.; Zanin, G.M.; Moraes, F.F.D. Determination of the inclusion complex constant between oleuropein and cyclodextrins by complexation theory. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2014**, *78*, 465–470. [CrossRef]
32. Shahidi, F.; Zhong, Y. Lipid Oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4067–4079. [CrossRef] [PubMed]
33. Mohammadi, A.; Jafari, S.M.; Esfanjani, A.F.; Akhavan, S. Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chem.* **2016**, *190*, 513–519. [CrossRef] [PubMed]
34. López-Nicolás, J.M.; Rodríguez-Bonilla, P.; García-Carmona, F. Cyclodextrins and antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 251–276. [CrossRef] [PubMed]
35. Fasseas, M.K.; Mountzouris, K.C.; Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.; Zervas, G. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chem.* **2008**, *106*, 1188–1194. [CrossRef]
36. Tanabe, H.; Yoshida, M.; Tomita, N. Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat. *J. Anim. Sci.* **2002**, *73*, 389–393. [CrossRef]
37. Prieto, M.A.; Rodríguez-Amado, I.; Vázquez, J.A.; Murado, M.A.  $\beta$ -Carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 8983–8993. [CrossRef] [PubMed]
38. Zhong, Y.; Shahidi, F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, 1st ed.; Shahidi, F., Woodhead, Eds.; Publisher: Sawston, Cambridge, UK, 2015; pp. 287–333. ISBN 9781782420897.
39. Singh, R.P.; Chidambara Murthy, K.N.; Jayaprakasha, G.K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 81–86. [CrossRef] [PubMed]
40. Zengin, G.; Cakmak, Y.S.; Guler, G.O.; Aktumsek, A. In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2638–2641. [CrossRef] [PubMed]
41. Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M.; Rodriguez, H. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biol. Med.* **2002**, *32*, 1102–1115. [CrossRef]
42. Chatti, I.B.; Boubaker, J.; Skandrani, I.; Bhour, W.; Ghedira, K.; Ghedira, L.C. Antioxidant and antigenotoxic activities in *Acacia salicina* extracts and its protective role against DNA strand scission induced by hydroxyl radical. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 1753–1758. [CrossRef] [PubMed]
43. Suksomtip, M.; Pongsamart, S. Protective effect against oxidation of human low-density lipoprotein and plasmid DNA strand scission of Tamarind seed coat extract in vitro. *LW-Food Sci Technol.* **2008**, *41*, 2002–2007. [CrossRef]
44. Yuan, J.J.; Qin, F.G.F.; Tu, J.L.; Li, B. Preparation, characterization, and antioxidant activity evaluation of liposomes containing water-soluble hydroxytyrosol from olive. *Molecules* **2017**, *22*, 870. [CrossRef] [PubMed]
45. Knobloch, J.; Suhendro, D.K.; Zieleniecki, J.L.; Shapter, J.G.; Köper, I. Membrane–drug interactions studied using model membrane systems. *Saudi J. Biol. Sci.* **2015**, *22*, 714–718. [CrossRef] [PubMed]
46. Balducci, V.; Incerpi, S.; Stano, P.; Tofani, D. Antioxidant activity of hydroxytyrosyl esters studied in liposome models. *BBA-Biomembr.* **1860**, *1860*, 600–610. [CrossRef] [PubMed]
47. Generalić Mekinić, I.; Gotovac, M.; Skroza, D.; Ljubenković, I.; Burčul, F.; Katalinić, V. Effect of the extraction solvent on the oleuropein content and antioxidant properties of olive leaf (cv. *Oblica*, Lastovka and Levantinka) extracts. *Cro. J. Food Sci. Tech.* **2014**, *6*, 7–14.
48. Kong, B.; Zhang, H.; Xiong, Y.L. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. *Meat. Sci.* **2010**, *85*, 772–778. [CrossRef] [PubMed]
49. Tsarbopoulos, E.; Gikas, N.; Papadopoulos, N.; Aligiannis, N.; Kafatos, A. Simultaneous determination of oleuropein and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **2003**, *785*, 157–164. [CrossRef]

50. López de las Hazas, M.C.; Piñol, C.; Macià, A.; Romero, M.P.; Pedret, A.; Solà, R.; Rubió, L.; Motilva, M.J. Differential absorption and metabolism of hydroxytyrosol and its precursors oleuropein and secoiridoids. *J. Funct. Food* **2016**, *22*, 52–63. [CrossRef]
51. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **1965**, *16*, 144–158.
52. Kirigaya, N.; Kato, H.; Fujimaki, M. Studies on antioxidant activity of nonenzymatic browning reaction products. Part III: Fractionation of browning reaction solution between ammonia and D-glucose and antioxidant activity of the resulting fractions. *Nippon Nogei. Kagaku Kaishi.* **1971**, *45*, 292–298. [CrossRef]
53. Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K.; Nakamura, T. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 945–948. [CrossRef]
54. Chanda, S.; Dave, R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2009**, *3*, 981–996.
55. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [CrossRef]
56. Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Deemer, E.K. Analysis of Antioxidant Activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3122–3128. [CrossRef] [PubMed]
57. Animal and vegetable fats and oils—Determination of oxidative stability (accelerated oxidation test). Available online: <https://www.iso.org/standard/69594.html> (accessed on 28 July 2018).
58. Matthäus, B.W. Determination of the oxidative stability of vegetable oils by rancimat and conductivity and chemiluminescence measurements. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 1039–1043. [CrossRef]
59. Pardun, H.; Kroll, E. Bestimmung der oxydationsstabilität von Ölen und fetten mit hilfe einer automatischen version des swift-testes. *Fette Seifen Anstrichmittel Die Ernährungsindustrie* **1972**, *74*, 366–372. [CrossRef]
60. Kitts, D.D.; Wijewickreme, A.N.; Hu, C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract. *Mol. Cell Biochem.* **2000**, *203*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
61. Liu, T.; Cao, Y.; Zhao, M. Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. var. major) fruits. *Food Chem.* **2010**, *119*, 1656–1662. [CrossRef]

**Sample Availability:** Not available.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmaceutsko-biokemijske znanosti  
Zavod za Kemiju prehrane  
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

### ULTRAZVUČNA IZOLACIJA ANTIOKSIDANSA IZ KOMINE MASLINE I RAZVOJ VISOKOVRIJEDNOG NUTRACEUTIKA

Petra Albahari

#### SAŽETAK

Proizvodnjom maslinovog ulja zaostaju velike količine nusproizvoda koji se smatraju otpadom, a zbog kompleksnosti sastava i dokazane toksičnosti velika su opasnost za okoliš. Komina masline, jedan od glavnih nusprodukata proizvodnje maslinovog ulja, značajan je izvor prirodnih antioksidansa, od kojih su najznačajniji tirosol, hidroksitirosol i oleuropein. Uzevši u obzir njihove brojne pozitivne učinke na zdravlje, osnovni cilj ovog istraživanja bio je razvoj zelenog postupka dobivanja suhog ekstrakta komine masline bogatog hidroksitiosolom, tirosolom i oleuropeinom primjenom kombinacije ultrazvučne ekstrakcije i uklapanja u ciklodekstrine. S ciljem utvrđivanja potencijala daljnje primjene dobivenih ekstrakata bila je nužna njihova funkcionalna karakterizacija. U prvoj fazi istraživanja optimirani su postupci klasične ekstrakcije, inovativne ultrazvučne ekstrakcije i ultrazvučne ekstrakcije uz dodatak ciklodekstrina. Zatim je u drugom dijelu istraživanja ispitana primjenjivost postupka liofilizacije te utjecaj korištenih ciklodekstrina na tehnološke i kemijske karakteristike suhog ekstrakta. U završnoj fazi istraživanja provedena je funkcionalna karakterizacija suhog ekstrakta komine masline u naprednim biološkim i model sustavima hrane te je određena bioraspoloživost glavnih aktivnih polifenolnih sastavnica. Optimiranom klasičnom ekstrakcijom dobiveni su ekstrakti s oleuropeinom kao najzastupljenijim fenolnim spojem (115,14±0,19 mg/kg svježe komine masline). Primjenom optimalnih uvjeta ultrazvučne ekstrakcije u kombinaciji s uklapanjem u ciklodekstrine, postignuti su još veći prinosi oleuropeina (1744 mg/kg komine masline), tirosola (1117 mg/kg komine masline) i hidroksitirosola (887 mg/kg). Uklapanje u ciklodekstrine imalo je pozitivan utjecaj na kemijski sastav i antioksidativnu aktivnost dobivenih ekstrakata. Ekstrakti s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina i nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina pokazali su osobitu antioksidativnu aktivnost, pa su tako u emulzijskom modelu imali značajno višu antioksidativnu aktivnost (1242 mg/g i 1422 mg/g Trolox ekvivalentna) od Troloxa kao referentnog antioksidansa. U ostalim su modelima (primjenjeni u koncentracijskim nivoima 2-3%) pružili antioksidativnu zaštitu usporedivu s često korištenim sintetskim antioksidansima. Rezultati dobiveni primjenom gastrointestinalnog modela pokazuju visoku biodostupnost polifenola komine masline, a dodatkom ciklodekstrina dodatno je poboljšana gastrointestinalna stabilnost tirosola.

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

Rad sadrži: 145 stranica, 27 grafičkih prikaza, 15 tablica i 216 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: komina masline, polifenoli, ekstrakcija, ciklodekstrini, antioksidativna aktivnost

Mentori: **prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

**prof. dr. sc. Marijan Brnčić**, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet

Ocjenjivači: **prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

**prof. dr. sc. Danijela Ašperger**, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

**doc. dr. sc. Lovorka Vujić**, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Rad prihvaćen: rujan 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmaceutical Biochemical studies  
Department of Food Chemistry  
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

### ULTRASOUND ISOLATION OF ANTIOXIDANTS FROM OLIVE POMACE AND DEVELOPMENT OF HIGHLY VALUED NUTRACEUTICAL

**Petra Albahari**

#### SUMMARY

Olive oil production generates large quantities of by-products, which are considered waste and pose a major threat to the environment due to their complex composition and proven toxicity. Olive pomace, one of the main by-products of olive oil production, is a significant source of natural antioxidants, the most important of which are tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein. Due to its numerous beneficial effects on health, the main objective of this study was developing an environmentally friendly process of production of the olive pomace dry extract rich in hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein using a combination of ultrasonic extraction and cyclodextrin encapsulation. Functional characterization of the extracts obtained was necessary to determine their further application potential. In the first phase of the research, the methods of classical extraction, innovative ultrasonic extraction and ultrasonic extraction combined with cyclodextrin encapsulation were optimized. In the second part of the research, the applicability of the freeze-drying process and the influence of cyclodextrins on the technological and chemical properties of the dry extracts were studied. In the last phase of the research, the functional characterization of olive pomace dry extracts in advanced biological and food model systems was performed and the bioavailability of the main active polyphenolic components was determined. Optimized classical extraction yielded extracts with oleuropein as the most abundant phenolic compound ( $115.14 \pm 0.19$  mg/kg fresh olive pomace). By applying optimal ultrasonic extraction conditions in combination with cyclodextrin encapsulation, even higher yields of oleuropein (1744 mg/kg olive pomace), tyrosol (1117 mg/kg olive pomace), and hydroxytyrosol (887 mg/kg) were obtained. Encapsulation with cyclodextrin had a positive effect on the chemical composition and antioxidant activity of the extracts obtained. Among the cyclodextrins studied, the extracts encapsulated with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and random methylated- $\beta$ -cyclodextrin showed particularly good antioxidant activity and were especially effective in emulsion systems (1242 mg/g and 1422 mg/g Trolox equivalent, respectively), exhibiting significantly higher antioxidant activity than Trolox (reference antioxidant). In other models, they provided antioxidant protection comparable to commonly used synthetic antioxidants at concentrations of 2-3%. The results of the gastrointestinal model showed high bioavailability of olive pomace polyphenols, and the addition of cyclodextrins further improved the gastrointestinal stability of tyrosol.

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

Thesis includes: 145 pages, 27 figures, 15 tables and 216 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Olive pomace, polyphenols, extraction, cyclodextrins, antioxidant activity

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D., Full Professor**, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mladen Brnčić, Ph.D., Full Professor**, University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology

Reviewers: **Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D., Full Professor**, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Danijela Ašperger, Ph.D., Full Professor**, University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology  
**Lovorka Vujić, Ph.D., Assistant Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2022.