

# **Utjecaj ciklodekstrina na fizikalna svojstva i stabilnost ekstrakata komine masline**

---

**Bučela, Ines**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:163:196328>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



Ines Bučela

**Utjecaj ciklodekstrina na fizikalna svojstva i  
stabilnost ekstrakata komine masline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-bioteknološkom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2014-09-9143

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na posvećenom vremenu, znanju, trudu i stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada, kao i suvoditeljici prof. dr. sc. Suzani Rimac Brnčić na svoj pomoći i korisnim savjetima.

Hvala djelatnicama Zavoda za kemiju prehrane Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta na pomoći u izvođenju diplomskog rada.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali dane studiranja.

Hvala Karlu na strpljenju, pomoći i podršci.

Zahvaljujem cijeloj obitelji, a najviše mami, tati i sestri, na naizmjernom razumijevanju, poticanju na rad i podršci tijekom studiranja.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Maslina .....	1
1.1.1. Komina masline .....	1
1.1.2. Polifenoli .....	1
1.2. Ciklodekstrini.....	3
1.3. Liofilizacija.....	5
1.4. CIE LAB sustav boja.....	7
1.5. Raspodjela veličine čestica .....	8
1.6. Ispitivanje stabilnosti.....	9
2.OBRAZLOŽENJE TEME .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	12
3.1. Materijali .....	12
3.1.1. Kemikalije.....	12
3.1.2. Instrumenti i oprema .....	12
3.1.3. Komina masline .....	13
3.2. Priprema ekstrakata komine masline.....	14
3.3. Analiza CIE LAB sustavom boja.....	15
3.4. Analiza raspodjele veličine čestica .....	16
3.5. Ispitivanje stabilnosti ekstrakata komine masline.....	17
3.6. Određivanje udjela hidroksitirosoala, tirosoala i oleuropeina u ekstraktima komine masline .....	18
3.6.1. Priprema standardnih otopina .....	18
3.6.2. Priprema uzoraka za analizu .....	19
3.6.3 Priprema mobilne faze.....	20
3.6.4 HPLC-FLD metoda za određivanje tirosoala, hidroksitirosoala i oleuropeina .....	20

4. REZULTATI I RASPRAVA .....	22
4.1. Utjecaj ciklodekstrina na boju ekstrakata komine masline .....	22
4.2. Utjecaj ciklodekstrina na raspodjelu veličine čestica ekstrakata komine masline .....	24
4.3. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost ekstrakata komine masline .....	26
5. ZAKLJUČCI .....	31
6. LITERATURA.....	32
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	34

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

### 1.1. Maslina

Maslina (*Olea europea* L.) je zimzeleni grm ili stablo iz istoimene porodice maslina (*Oleaceae*). Stablo je razgranato, naraste do 10 metara visine tvoreći nepravilno, kvrgavo deblo s mnogo grana i široku krošnju. Cvate u travnju i lipnju. Plod je mesnata, jajasta koštunica, duga 1-3 cm, široka do 2 cm. U početku je zelena, dozrijevanjem postane tamno modra, crna ili smedezelena. Dozrijeva u rujnu i listopadu. U Hrvatskoj raste u primorskom području, sporog je rasta te može doživjeti starost do 1000 godina ([www.plantea.com.hr](http://www.plantea.com.hr)). Koristi se u proizvodnji maslinovog ulja čije su glavne djelatne tvari oleinska kiselina, fenolne sastavnice te skvaleni. Glavni fenolni spojevi, oleuropein i hidroksitrosol, maslinovom ulju daju gorak okus (Syed Haris, 2010).

#### 1.1.1. Komina masline

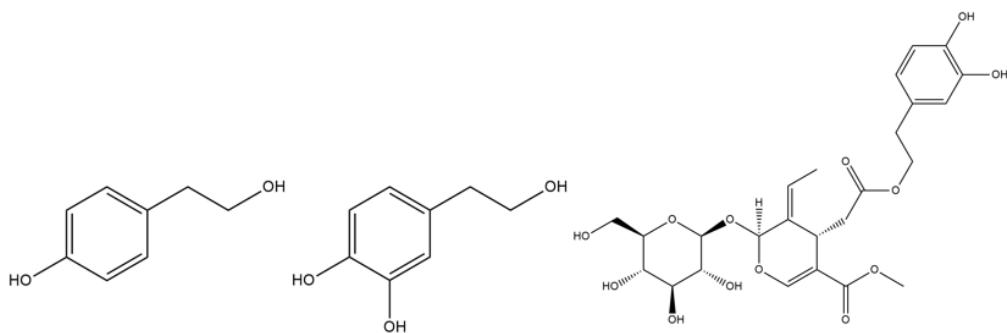
Kolina masline je čvrsti sporedni proizvod dobiven ekstrakcijom maslinovog ulja. Čine ju kožica, pulpa i koštica masline. Kolina sadrži još male količine ulja, tzv. ulje koline masline koja se može odvojiti od koline u dalnjim procesima.

Ulje koline masline odvaja se na dva načina: korištenjem otapala (tradicionalna metoda) i pomoću fizikalne ekstrakcije ili centrifugiranja (sekundarno centrifugiranje). Prvi se proces temelji na ekstrakciji čvrsto - tekuće gdje su masti ekstrahirane pomoću otapala (heksana). Nakon toga, ulje se iz smjese s heksanom odvaja destilacijom (Trgovčević, 2016).

#### 1.1.2. Polifenoli

Polifenoli koje nalazimo u kolini masline su tirosol, hidroksitrosol i oleuropein. Sva tri spoja su slične strukture prikazane na Slici 1.

Hidroksitrosol i tirosol se razlikuju samo po dodatnoj hidroksilnoj skupini hidroksitrosola u meta položaju, dok je oleuropein ester hidroksitrosola i elenoične kiseline.



Slika 1. Kemijske strukture tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina

U razvoju ploda masline razlikujemo tri faze: fazu rasta tijekom koje se akumulira oleuropein, fazu zelenog sazrijevanja pri čemu dolazi do redukcije količine klorofila i oleuropeina te fazu crnog sazrijevanja koja je karakterizirana pojavom antocijanina i u kojoj se nastavlja redukcija količine oleuropeina. Iako je količina oleuropeina u sortama čiji se plodovi beru zeleni manja nego u mladim plodovima, svakako je i dalje jako bitna. U sortama čiji se plodovi beru crni, količina oleuropeina može pasti i na nulu kad su plodovi potpuno crni. S druge strane, količina tirosola i hidroksitirosola raste sazrijevanjem ploda uslijed hidrolize komponenata veće molekulske mase poput oleuropeina.



Slika 2. Farmakološka djelovanja oleuropeina

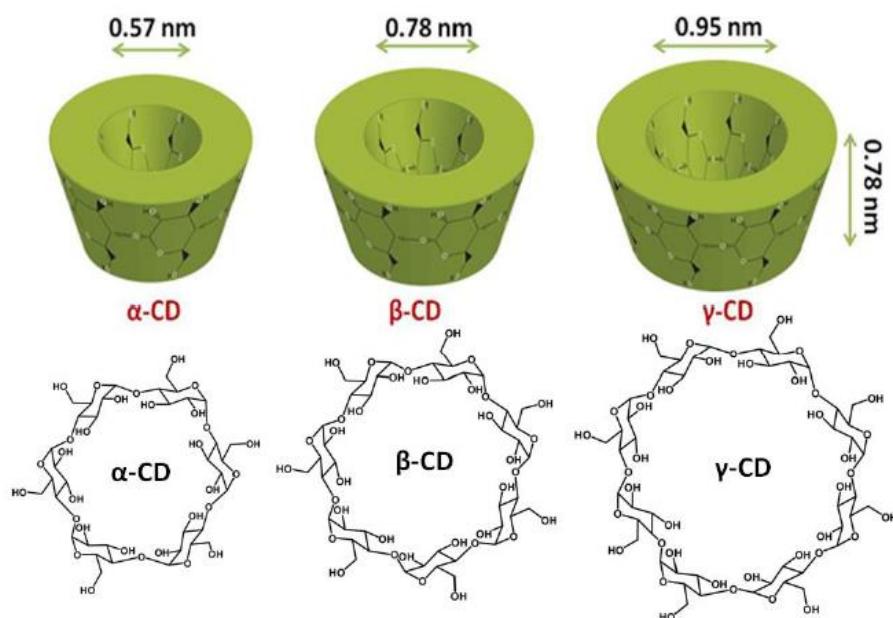
Oleuropein ima nekoliko farmakoloških značajnih svojstava: djeluje antioksidativno, protuupalno, antitumorsko, antimikrobnno, antivirusno, antiaterogeno, a smatra se da djeluje i kardioprotektivno pri akutnom trovanju dokсорубицином te pokazuje anti-ischemične kao i hipolipemičke aktivnosti. Nadalje, tirosol i hidroksitirosol, glavni raspadni produkti

oleuropeina u maslinovom ulju, oboje imaju ulogu u preveniranju koronarne bolesti srca i određenih karcinoma (Syed Haris, 2010).

## 1.2. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini, ciklički oligosaharidi, su korisni farmaceutski ekscipijensi. Temelj njihove popularnosti je sposobnost mijenjanja neželenih svojstava lijekova, primjerice neugodnog okusa, slabe topivosti u vodi, kemijske nestabilnosti te poboljšanje bioraspoloživosti lijekova formiranjem inkluzijskih kompleksa. Mogu se koristiti u oblicima koji se primjenjuju oralno, nazalno, parenteralno i okularno.

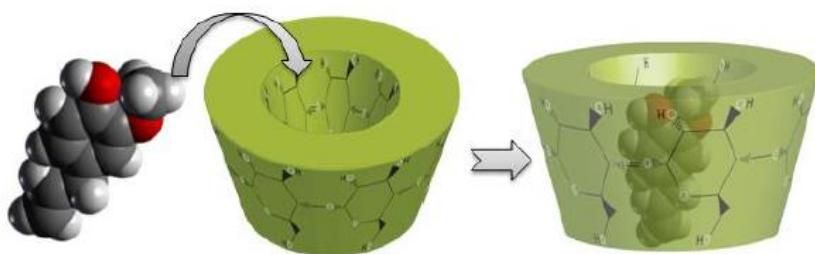
Ciklodekstrini su skupina strukturno sličnih cikličkih oligosaharida koji nastaju bakterijskom razgradnjom škroba.  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -ciklodekstrini sastoje se od 6, 7, tj. 8  $\alpha$ -[1,4] vezanih D-glukopiranoznih jedinica.



Slika 3. Struktura prirodnih ciklodekstrina (preuzeto iz: Šimić, 2015)

Zbog konformacije stolca glukopiranoznih jedinica, ciklodekstrini imaju oblik krnjeg stošca. Hidrosilne grupe su im orientirane prema vanjskoj površini što im daje hidrofilna svojstva, a unutrašnjost ciklodekstrina tvori hidrofobna okosnica ugljika glukopiranoznih monomera, što čini centralnu šupljinu nešto hidrofobnijom od vanjske površine. Navedeno omogućuje stvaranje inkluzijskih kompleksa u vodenim otopinama: molekule lijeka (najčešće lipofilni

dijelovi) se inkorporiraju u centralnu šupljinu ciklodekstrina enkapsulacijom na molekularnoj razini (Jug i Bećirević-Laćan, 2008). Dakle, nastaju molekularni kompleksi karakterizirani zarobljavanjem lipofilne molekule lijeka ili lipofilne skupine slabo vodo-topljivog lijeka u hidrofobnoj centralnoj šupljini ciklodekstrina (Slika 4). Proces stvaranja CD kompleksa je gotovo uvijek reverzibilan, naročito u vodenim otopinama gdje postoji stalna i brza izmjena molekule lijeka između vezanog i nevezanog oblika. Pokretačke sile odgovorne za formiranje kompleksa su elektrostatske interakcije, van der Waalsove veze, vodikove veze, otpuštanje konformacijskog naprezanja te interakcije prijenosa naboja (Brewster i Loftsson, 2007).



Slika 4. Formiranje inkluzijskog kompleksa (preuzeto iz: Šimić, 2015)

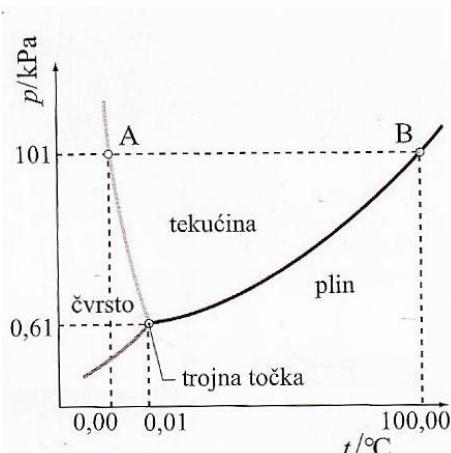
Ciklodekstrini se u farmaceutske svrhe najčešće koriste kao solubilizatori. Stvaraju komplekse poboljšane topljivosti te lijek enkapsuliran u ciklodekstrinski nosač prevode u amorfni oblik koji je stabilniji i veće oralne bioraspoloživosti od originalnog lijeka. Nakon otapanja inkluzijskog kompleksa u gastrointestinalnom traktu, ciklodekstrini djeluju kao nosači koji lipofilne molekule lijeka isporučuju do površine biološke membrane gdje se one apsorbiraju.

Toksikološka pitanja i biološka sudbina ciklodekstrina su detaljno istražene. Ciklodekstrini nisu podložni razgradnji ljudskom slinom ni gušteračnim amilazama. Zbog velike molekulske mase i hidrofilne prirode, prirodni ciklodekstrini izuzetno teško prolaze kroz lipofilne biološke membrane te se samo 1-3% primijenjene doze ciklodekstrina apsorbira u gastrointestinalnom traktu, dok su dermalna, okularna i nazalna bioraspoloživost još niže (Jug i Bećirević-Laćan, 2008).

### 1.3. Liofilizacija

Liofilizacija ili sušenje zamrzavanjem je proces u kojem se voda zamrzava, a zatim i uklanja iz uzorka prvenstveno procesom sublimacije (primarno sušenje) te desorpcijom (sekundarno sušenje). Pogodna je za farmaceutike i proizvode biološkog podrijetla koji su termolabilni ili na drugi način nestabilni u vodenoj otopini pri dugom skladištenju te im se tako povećava stabilnost i omogućuje dugotrajno skladištenje.

Sublimacija je proces u kojem se zamrznuta tekućina izravno prevodi u plinovito stanje bez prolaska kroz tekuću fazu. Liofilizacija se izvodi na temperaturi i tlaku ispod trojne točke, kako bi se omogućila sublimacija leda, a čvrste i osušene komponente izvorne otopine zaostaju. Trojna točka je karakteristika svake supstancije. U trojnoj su točki sva tri agregatna stanja u ravnoteži. Kako se cijeli postupak provodi na niskoj temperaturi i tlaku, pogodan je za sušenje termolabilnih spojeva.



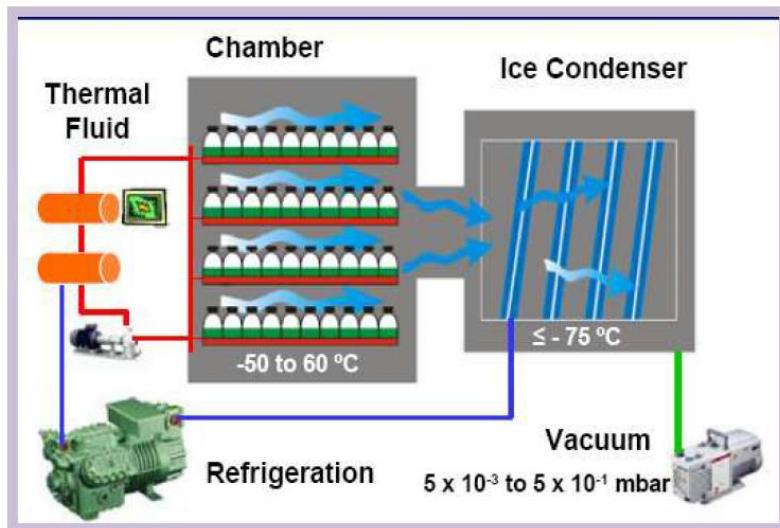
Slika 5. Djelomični fazni dijagram vode (preuzeto iz: Herak, 2001)

Sama liofilizacija sastoji se od nekoliko koraka: priprema otopine uzorka nakon čega slijedi zamrzavanje, primarno i sekundarno sušenje te rezultira dobivanjem konačnog osušenog produkta uz željeni sadržaj vlage.



Slika 6. Koraci liofilizacije (preuzeto iz: Lavakumar i sur, 2013)

Uzorak se zamrzava pri sniženom tlaku i niskoj temperaturi u liofilizatoru. Budući da su većina uzoraka koji se liofiliziraju eutektične smjese, zamrzavaju se na nižoj temperaturi od okolne vode. Zato je vrlo važno da se prethodno zamrznu ispod te eutektične temperature. Proces pokreće gradijent koncentracije vodene pare između komore za sušenje i kondenzatora što omogućuje uklanjanje vode tijekom liofilizacije. Tlak pare vode raste s povećanjem temperature tijekom primarnog sušenja pa temperatura primarnog sušenja treba biti što viša, ali ispod kritične temperature procesa, kako bi se izbjeglo narušavanje strukture. Zato je bitno određivanje kritične temperature proizvoda. Primarnim sušenjem, led nastao za vrijeme zamrzavanja ukloni se sublimacijom u vakuumu pri niskim temperaturama. Ostaje vrlo porozna struktura preostale amorfne otopljene tvari koja obično sadrži do 30% vode. Desorpција, tj. sekundarno sušenje zagrijavanjem se koristi povremeno za uklanjanje heterogenosti pri zamrzavanju i smanjenje vremena primarnog sušenja. Sekundarnim sušenjem, većina preostale vode desorbira kako se temperatura uzorka postupno povećava uz zadržavanje niskog tlaka. U idealnom slučaju konačni produkt je suh, lako rekonstituibilan prašak velike površine.

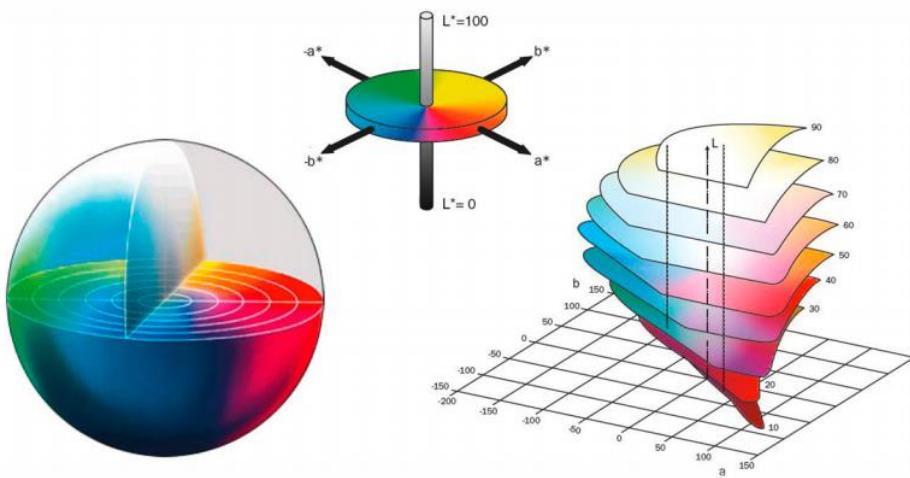


Slika 7. Dizajn liofilizatora (preuzeto iz: Lavakumar i sur., 2013)

Liofilizacija ima raširenu upotrebu u farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji, prehrabenoj i tehnološkoj industriji (Lavakumar i sur., 2013).

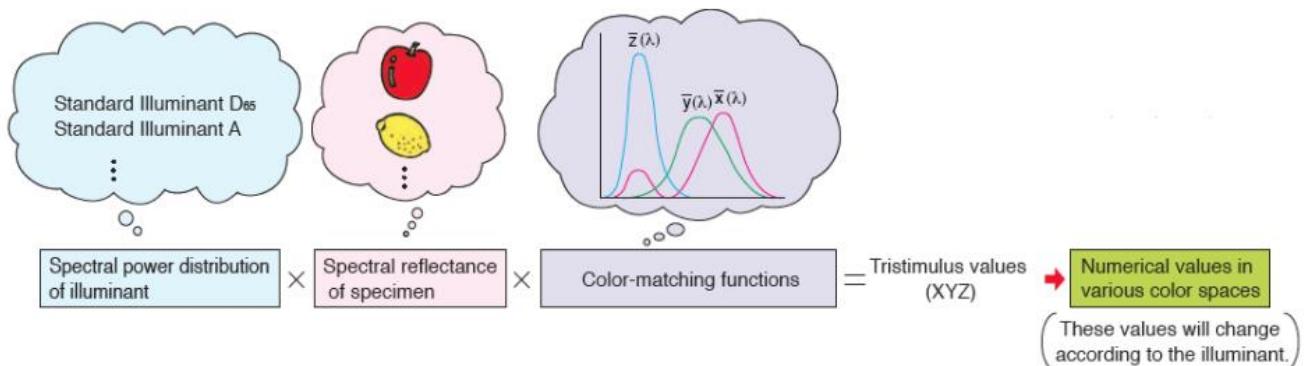
#### 1.4. CIE LAB sustav boja

CIE (Commision Internationale de l'Eclairage) je internacionalna komisija za rasvjetu, utemeljitelj znanosti o boji, razumijevanju nastanka boje, njenog instrumentalnog mjerjenja i brojčanog vrednovanja. CIE LAB je prostor boja temeljen na objektivnom vrednovanju boja i najbliži je vizualnoj percepciji boja ([www.grf.unizg.hr](http://www.grf.unizg.hr)).



Slika 8. Prikaz načina očitanja boja u CIELAB sustavu (preuzeto iz: [www.grf.unizg.hr](http://www.grf.unizg.hr))

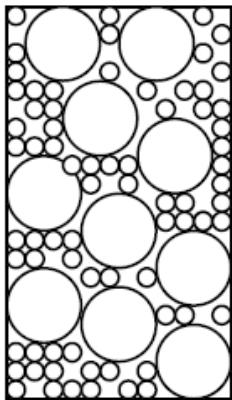
Mjerenje boje uzorka sa određenim ekscipijensima provodi se na kolorimetru. Kolorimetar je uređaj koji mjeri tristimulusne vrijednosti boje (na način sličan ljudskom doživljaju boja), u pravilu podešenom prema krivulji standardnog promatrača. Mjerenje boja kolorimetrom temelji se na uspoređivanju ispitivane boje s bojom nastalom u kolorimetru miješanjem osnovnih boja aditivnom sintezom, prema Grassmanovim zakonima ([www.grf.unizg.hr](http://www.grf.unizg.hr)).



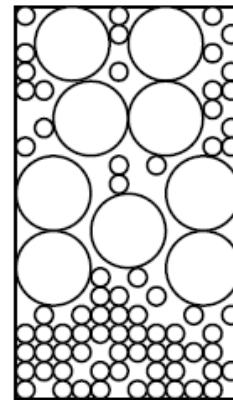
Slika 9. Mjerenje boja kolorimetrom (preuzeto iz: [www.grf.unizg.hr](http://www.grf.unizg.hr))

### 1.5. Raspodjela veličine čestica

Veličina čestica praškastih formulacija utječe na njihova reološka svojstva, volumnu gustoću, segregaciju čestica, raslojavanje i variranje sadržaja. Primjerice, što su dimenzije čestica manje, a distribucija veličine čestica veća, to su osobine tečenja materijala lošije. Prahovi imaju velike smetnje u tečenju izazvane relativnom vlažnošću materijala, raznolikoj veličini čestica (izuzetno sitni materijali) i pritiska uslijed zbitosti samih čestica. Stupanj prolaza čestica ovisi o snazi i gravitaciji koja djeluje na čestice različitih veličina, oblika i gustoće. Volumna gustoća prahova ovisi o kombiniranom utjecaju veličine čestica, broju kontaktnih mjesa kao i intenzitetu privlačnosti sila među česticama. Promjena jednog od ovih faktora utječe na promjenu ukupne volumne gustoće. Nadalje, prašak može segregirati ako je sačinjen od čestica različite granulacije, to lakše ako je veći broj sitnih čestica prisutan u prahu (Bauman, 2015).



Prije protresanja



Nakon protresanja

Slika 10. Shematski prikaz segregacije uzrokovane razlikom u veličini čestica (preuzeto iz:  
Bauman, 2015)

Čestice su trodimenzionalne strukture za koje je potrebno poznavati tri parametra (dužina, širina i visina) pomoću kojih ih je moguće u potpunosti okarakterizirati. Radi pojednostavljenja u mjerenjima, brojne metode koriste aproksimacije koje čestice opisuju kao kugle, za koje je dovoljno znati samo jedan parametar (promjer) za potpunu karakterizaciju.

Analiza veličine čestica laserskom difrakcijom temelji se na činjenici da čestice prilikom prolaska kroz izvor svjetlosti (lasersku zraku) raspršuju svjetlost pod određenim kutovima koji izravno ovise o veličini čestica. Kut pod kojim čestica raspršuje svjetlost logaritamski raste sa smanjenjem veličine čestica. Intenzitet raspršene svjetlosti također ovisi o veličini čestica. Čestice velikih dimenzija raspršuju svjetlost pod malim kutovima, ali sa visokim

intenzitetom, dok čestice malih dimenzija svjetlost raspršuju pod širim kutovima ali sa manjim intenzitetom ([www.pbf.unizg.hr](http://www.pbf.unizg.hr)).

### 1.6. Ispitivanje stabilnosti

Stabilnost farmaceutskih tvari je definirana kao sposobnost pojedine formulacije da u određenom spremniku, tj. sustavu zadrži svoja fizička, kemijska, mikrobiološka, toksikološka, protektivna i informacijska svojstva. Dakle, to je doseg unutar kojeg proizvod zadržava, do određene granice, kroz određeno vrijeme skladištenja i upotrebe, ista svojstva i karakteristike koje je imao u trenutku pakiranja. Ispitivanje stabilnosti procjenjuje učinak okolišnih faktora na kvalitetu formulacije što se koristi u predviđanju roka valjanosti, određivanju uvjeta skladištenja i informacija o proizvodu.

Ispitivanje stabilnosti je rutinski postupak koji se provodi u različitim fazama razvoja proizvoda. U ranim fazama, ubrzani testovi stabilnosti (pri visokim temperaturama i/ili vlažnosti) se koriste za određivanje nusprodukata koji nastaju razgradnjom proizvoda pri dugotrajnom skladištenju. Testiranje pri blažim uvjetima (pri blago povišenoj temperaturi) se preporučuje za određivanje roka valjanosti proizvoda. Osnovni cilj ispitivanja stabilnosti je mogućnost pružanja jamstva da će proizvod zadržati prihvatljivu razinu kvalitete u određenom razdoblju.

Razlikujemo četiri tipa ispitivanja stabilnosti: ispitivanje stabilnosti u stvarnom vremenu, ubrzano ispitivanje stabilnosti, zadržano ispitivanje stabilnosti te ispitivanje stabilnosti cikličkom izmjenom temperature. Ispitivanje stabilnosti u stvarnom vremenu provodi se kroz duži period kako bi došlo do značajnijeg raspadanja proizvoda pod preporučenim uvjetima skladištenja. Ubrzano ispitivanje stabilnosti izlaže proizvod povišenoj temperaturi koja uzrokuje njegov ubrzani raspad, a na osnovu tih informacija se predviđa rok valjanosti. Osim povišenoj temperaturi, proizvod se može izložiti i drugim stresnim uvjetima, npr. vlazi, svjetlu, agitaciji, gravitaciji, pH i pakiranju. Zadržano ispitivanje stabilnosti se provodi za sve prodane proizvode za koje su potrebni podaci o stabilnosti, a provodi se na uzorcima iz barem jedne šarže godišnje. Ispitivanje stabilnosti cikličkom izmjenom temperature nije rutinsko ispitivanje, a provodi se na temelju očekivane promjene temperature na mjestu čuvanja proizvoda (npr. minimalna i maksimalna dnevna temperatura) (Bajaj S. i sur., 2012).

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, a za procjenu stabilnosti biljnih lijekova i preparata, kao i ishodnih tvari za njihovu proizvodnju, koriste se odabrani „markeri“. Njihova se količina određuje pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), plinske kromatografije (GC) ili tankoslojne kromatografije (TLC). Prednost HPLC i GC kromatografija je dobivanje specifičnog „fingerprint“ kromatograma, identifikacija i određivanje čistoće pojedinog uzorka te detekcija pojedinih sastavnica uzorka tijekom jedne analize.

Važno je imati na umu da na biljni materijal utječe klima, biološka raznolikost i sama berba te proces proizvodnje – od kultivacije do završnog proizvoda. Bitno je tu prirodnu raznolikost „markera“ uzeti u obzir (Kruse, 2010).

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

## 2.OBRAZLOŽENJE TEME

Maslinovo ulje je jedno od najšire upotrebljavanih jestivih ulja. Pri njegovoj proizvodnji nastaju velike količine dva nusprodukta: čvrsti ostatak, tj. komina masline i otpadna voda. Oba nusprodukta su štetna za okoliš jer sadrže visoke koncentracije polifenola i sumporovih spojeva što štetno djeluje na mikrobiološku floru tla, vodenim ekosustav i zrak. Budući da neki od polifenola (oleuropein, hidroksitirosol i tirosol) imaju dokazana antioksidacijska, protuupalna te druga pozitivna svojstva, prepoznata je mogućnost iskorištavanja komine masline u svrhu formulacije stabilnog, tehnološki prihvatljivog produkta te dobivanje proizvoda dodane vrijednosti uz ostvarivanje ekonomske i ekološke koristi.

Cilj ovog rada je odrediti kojom će se kombinacijom vrsta i količina ciklodekstrina iz sušene, odmašćene i prosijane komine masline dobiti ekstrakt polifenola masline dobrih tehnoloških svojstava uz što veći prinos polifenola, optimalnu raspodjelu veličine čestica te optimalnu boju i zadovoljavajuću stabilnost. Nakon klasične ekstrakcije uz dodatak ciklodekstrina, uparavanja i liofilizacije provedena su spomenuta ispitivanja.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

- Etanol, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Petroleter, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- $\beta$ -ciklodekstrin ( $\beta$ -CD): Wacker Chemie GMBH, Njemačka
- $\gamma$ -ciklodekstrin ( $\gamma$ -CD): Wacker Chemie GMBH, Njemačka
- nasumično metilirani derivat  $\beta$ -ciklodekstrina (RAMEB-CD): Wacker Chemie GMBH, Njemačka
- hidroksipropilirani derivat  $\beta$ -ciklodekstrina (HP- $\beta$ -CD): Wacker Chemie GMBH, Njemačka
- 2-hidroksipropilirani derivat  $\beta$ -ciklodekstrina (2-HP- $\beta$ -CD): Wacker Chemie GMBH, Njemačka
- Standard oleuropeina (Sigma, St. Luis, SAD)
- Acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ); HPLC stupnja čistoće,  $\geq 99,93\%$  (Sigma-Aldrich, SAD)
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ); HPLC stupnja čistoće,  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, SAD)
- Acetatni pufer
- Ultračista voda za HPLC (miliQ  $\text{H}_2\text{O}$ )

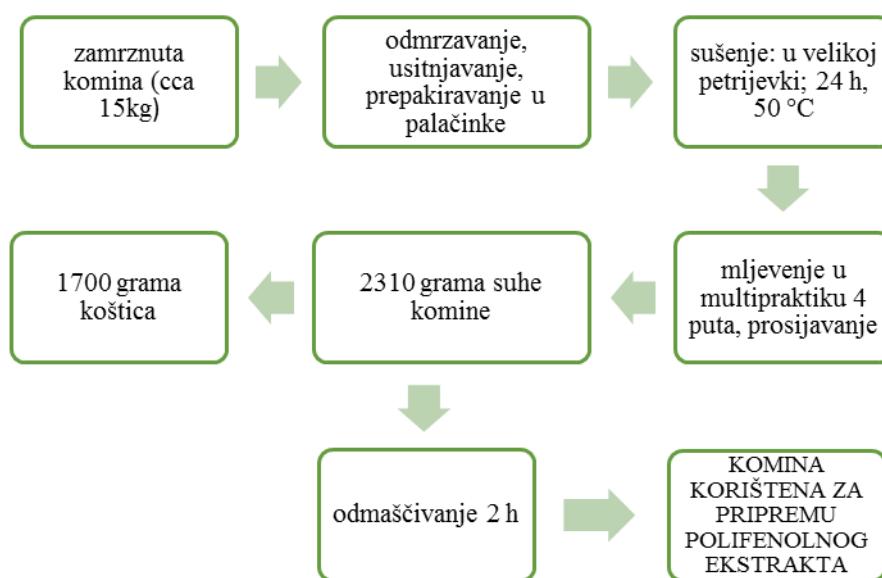
##### 3.1.2. Instrumenti i oprema

- Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti sa DAD detektorom, serija Waters 2475 (Waters, USA)
- Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 kolona dimenzije 250x4,6 mm i veličine čestica 5  $\mu\text{m}$ .
- Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta, Japan)
- UV/VIS spektrometar UV4, Unicam, UK
- Sustav za određivanje raspodjele veličine čestica Malvern Masterseizer 2000 (Malvern Instruments, UK)
- Laboratorijska peć, Over industrijska elektronika, Sv. Nedjelja, Hrvatska
- Soxhlet aparatura, Behr Labortechnik, Düsseldorf, Njemačka
- Vortex miješalica, tip VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan

- Termostatirana kupelj s mućkalicom, tip 1086, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Njemačka
- Liofilizator Alpha 1-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka
- Analitička vaga, Metler Toledo AB265S
- Viale 1,5 mL (LLG Labware)
- Filteri za pripremu uzoraka (LLG-PTFE syringe filter, promjer pora: 0,45 µm)
- Šprice (6 mL)
- Filteri od celuloze-acetata; promjer pora: 0,45 µm (Whatman)
- Eppendorf epruvete od 2 mL za uzorke

### 3.1.3. Komina masline

Uzorke komine masline korištene u ovom radu čini mješavina komina masline iz više hrvatskih uljara, prikupljena tijekom jeseni/zime 2014./2015. godine.



Slika 11. Shematski prikaz pripreme uzorka

Svježa komina je pohranjena u zamrznutom stanju; u obliku tankih ploča prosječne mase oko 100 g. Priprema ispitivanih uzoraka započela je odmrzavanjem, prebacivanjem u velike petrijeve zdjelice i sušenjem u laboratorijskoj peći tijekom 24 sata na 50 °C. Osušena komina je usitnjena, nakon čega je prosijana kroz sito poroziteta 1.25 mm. Na taj su način uklonjene koštice masline. Osušena i usitnjena komina potom je odmašćena petroleterom tijekom 2 sata (metodom po Soxhlet-u) te ponovno usitnjena, homogenizirana i prosijana kroz sito poroziteta

1.25 mm. Dobivena osušena, prosijana, odmašćena komina masline korištena je za sva daljnja istraživanja (Slika 11).

### 3.2. Priprema ekstrakata komine masline

Polifenoli iz osušene, odmašćene i prosijane komine masline ekstrahirani su prethodno optimiziranim postupkom klasične ekstrakcije - 2 sata na 70°C i 110 rpm-a, potom su filtrirani kroz gusti filter papir, raspoređeni u tikvice i upareni. Nakon uparavanja su zamrznuti i podvrgnuti liofilizaciji kroz 48 h na -55°C (Alpha 1-4 freeze-dryer, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany). Uz nativni uzorak, pripremljeni su i uzorci sa dodatkom različitih vrsta ciklodekstrina:  $\beta$ -ciklodestrina, metiliranog- $\beta$ -ciklodestrina (Randomly Methylated  $\beta$ -cyclodextrine - RAMEB),  $\gamma$ -ciklodekstrina i hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina. Sastav i uvjeti pripreme uzoraka prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Izrada ekstrakata komine masline korištenjem različitih količina i vrsta ekscipijensa

Oznaka uzorka	Odvaga komine/g	Ekscipijens	Odvaga ekscipijensa/g	Volumen ekstrakcijskog sredstva/mL
native	4			200
$\beta$ 1	4	$\beta$ -ciklodekstrin	1.6	200
$\gamma$ 1	4	$\gamma$ -ciklodekstrin	1.6	200
$\gamma$ 2	4	$\gamma$ -ciklodekstrin	3.2	200
HP $\beta$ 1	4	hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin	1.6	200
HP $\beta$ 2	4	hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin	3.2	200
met $\beta$ 1	4	metil- $\beta$ -ciklodekstrin	1.6	200
met $\beta$ 2	4	metil- $\beta$ -ciklodekstrin	3.2	200

### 3.3. Analiza CIE LAB sustavom boja

Mjerenje boje svježih liofiliziranih ekstrakata komine masline provedeno je na kolorimetru. Podaci kolorimetrijske analize su obrađeni pomoću SpectraMagic NX softwarea po tzv. CIE LAB sustavu boja koji daje približne vrijednosti boje kao i ljudsko oko. 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.

CIE također preporuča prilagodbu ove ljestvice boja poznate kao CIELCH ili L\*C\*h\*. Ovakvim načinom označava se nijansa boje (h\*), kao jedna od tri dimenzije, dok su ostale svjetlina (L\*) i ton boje (C\*).

Prema dobivenim podacima izračunate su promjene parametara boje pomoću slijedećih formula:

$$\Delta L = L_{\text{uzorak}} - L_{\text{standard}}$$

pri čemu: + ΔL znači da je uzorak svjetlij od standarda

- ΔL znači da je uzorak tamniji od standarda

$$\Delta a = a_{\text{uzorak}} - a_{\text{standard}}$$

pri čemu: + Δa znači da je uzorak crveniji od standarda

- Δa znači da je uzorak zeleniji od standarda

$$\Delta b = b_{\text{uzorak}} - b_{\text{standard}}$$

pri čemu: +Δb znači da je uzorak žući od standarda

-Δb znači da je uzorak plavljji od standarda

Ukupna promjena boje u odnosu na kontrolni uzorak, računa se prema tzv. Euklidovoj udaljenosti između boja izražene kao L, a i b:

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

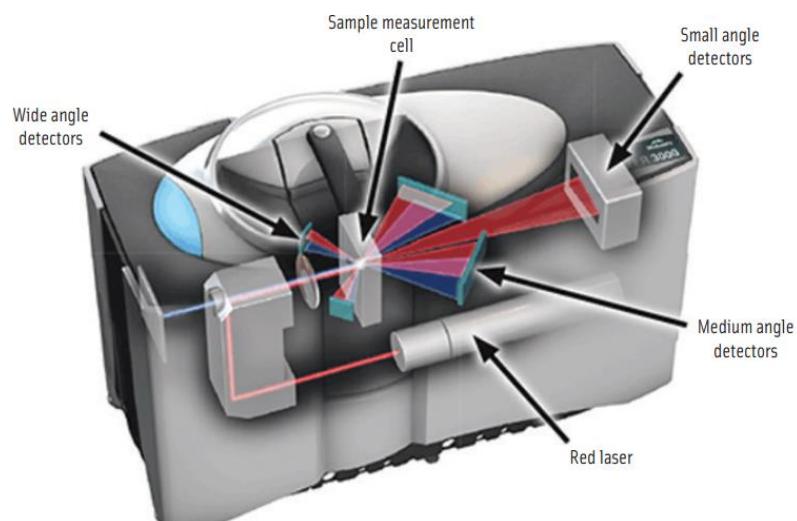
Parametar ΔE pokazuje koliko neki proizvod odstupa od referente boje.

Tablica 2. Značenje razlike između izmjerene  $\Delta E$  vrijednosti i referentne

$\Delta E$	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

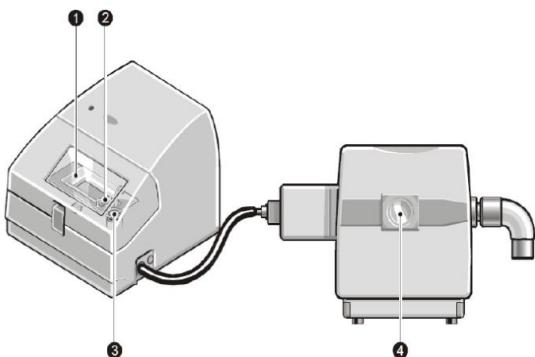
### 3.4. Analiza raspodjele veličine čestica

Raspodjela veličine čestica analiziranih uzoraka određena je primjenom laserske difrakcije. Uređaji za određivanje veličine čestica sastoje se od lasera kao izvora svjetlosti točno definirane valne duljine, detektora koji mjeru intenzitet raspršene svjetlosti pod raznim kutovima te dobavne jedinice koja je odgovorna za raspršenje i ravnomjernu raspodjelu čestica u mjernoj ćeliji.



Slika 12. Raspored optičkih dijelova Malvernovog instrumenta za lasersku difrakciju  
(preuzeto iz: [www.malvern.com](http://www.malvern.com))

Tijekom mjerenja raspodjele veličine čestica, uzorak prolazi kroz mjernu ćeliju na koju je usmjeren laserska zraka. Čestice raspršuju svjetlost pod kutom koji je obrnuto proporcionalan njihovoj veličini. Intenzitet raspršene svjetlosti mjeri se pomoću fotosenzitivnih detektora. Osim He-Ne lasera (svjetlost crvene boje), submikronska osjetljivost povećana je i izvorom plave svjetlosti manje valne duljine, što uvelike povećava mjerni raspon instrumenta koji iznosi 0,02 – 2000  $\mu\text{m}$ .



Slika 13. SCIROCCO jedinica za suhu disperziju (preuzeto iz: [www.pbf.unizg.hr](http://www.pbf.unizg.hr))

Na Slici 13. prikazana je SCIROCCO jedinica za suhu disperziju. Praškasti materijal se stavlja u kadicu (1). Zbog vibracija uzorak iz kadice putuje prema otvoru (2) kroz koji prolazi i upada na sito opremljeno kuglicama radi razbijanja aglomerata (3). Nakon prolaska kroz sito, strujanje čestica se ubrzava pomoću stlačenog zraka. Čestice kroz zračnu ćeliju (4) ulaze u optičku jedinicu u kojoj se provodi mjerenje. Višak uzorka iz optičke jedinice izvlači se pomoću vakuma ([www.pbf.unizg.hr](http://www.pbf.unizg.hr)).

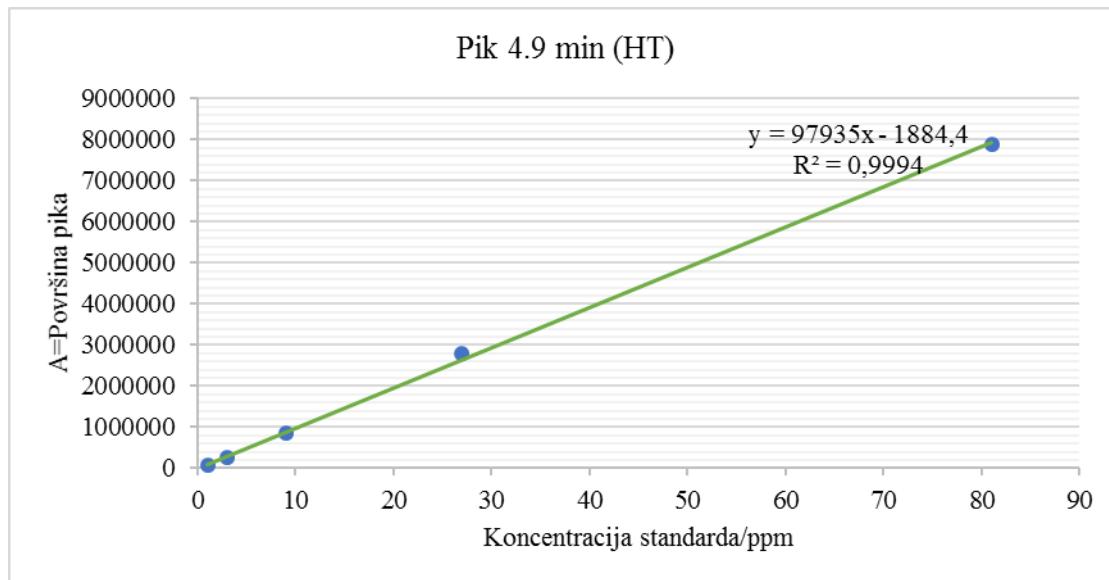
### 3.5. Ispitivanje stabilnosti ekstrakata komine masline

Stabilnost suhih ekstrakata komine masline ispitana je u uvjetima ubrzane razgradnje (60°C, 75% vlažnost, 45 dana). Praškasti uzorci pakirani su u polipropilenske spremnike i pohranjeni u eksikatore nad zasićenom otopinom natrijevog-klorida. Zatvoreni eksikatori pohranjeni su u termostat i čuvani na 60°C kroz 45 dana. Uzorkovanja su provedena nakon 0, 15, 30, i 45 dana. Kao parametri stabilnosti praćeni su udio ukupnih fenola, antiradikalni potencijal uzorka, udio hidroksitirosoala, tirosoala i oleuropeina.

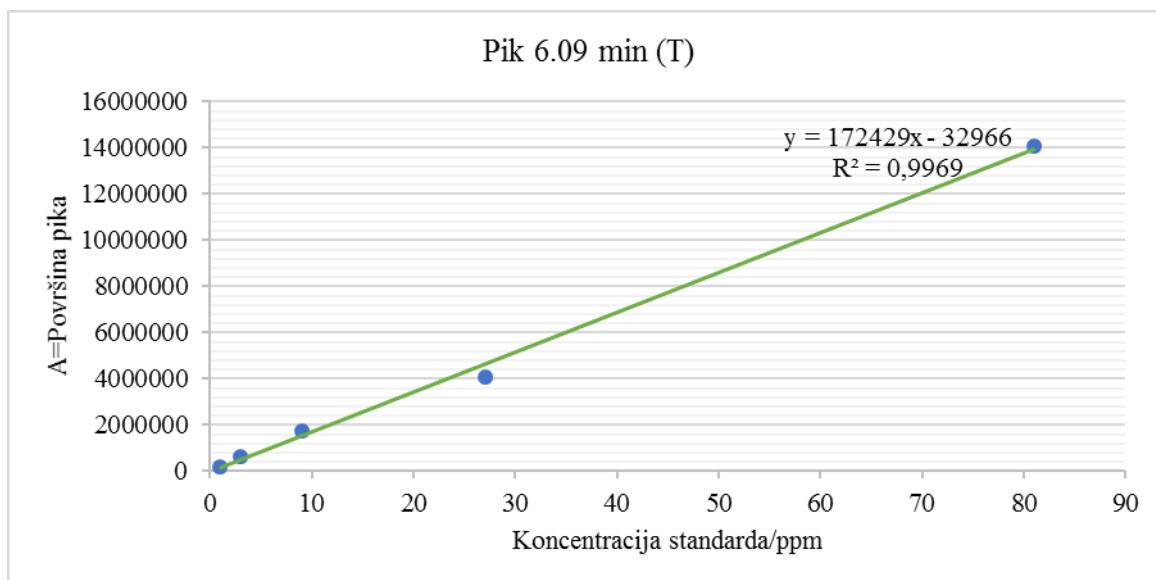
### 3.6. Određivanje udjela hidroksitirosoala, tirosoala i oleuropeina u ekstraktima komine masline

#### 3.6.1. Priprema standardnih otopina

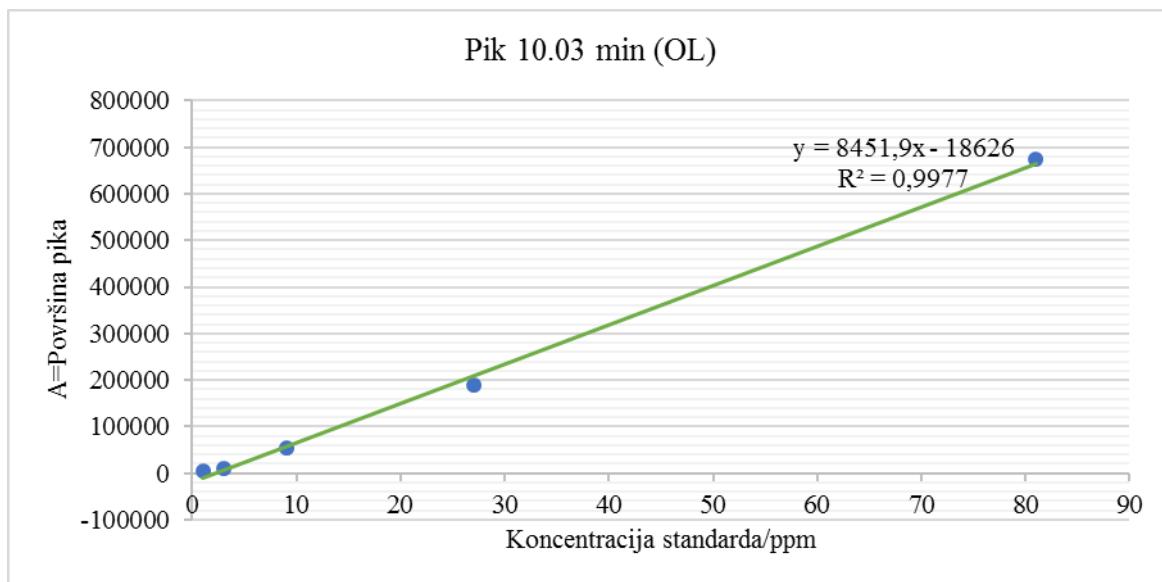
Sadržaj hidroksitirosoala, tirosoala i oleuropeina u suhim ekstraktima komine masline određen je HPLC-FLD metodom. U svrhu izrade kalibracijskih krivulja pripremljene su standardne otopine oleuropeina, hidroksitirosoala i tirosoala koncentracija 3, 9, 27 i 81 mg/L otapanjem odgovarajuće odvage standarda u vodi HPLC čistoće.



Slika 14. Baždarni dijagram hidroksitirosoala



Slika 15. Baždarni dijagram tirosoala



Slika 16. Baždarni dijagram oleuropeina

Za svaki istraživani analit dobiveni su zadovoljavajući koeficijenti korelacije (oleuropein  $R^2=0.9977$ , hidroksitirosol  $R^2=0.9994$  i tirosol  $R^2=0.9969$ ). Kalibracijske krivulje pojedinih analita su prikazane Slikama 14., 15. i 16.

### 3.6.2. Priprema uzorka za analizu

Priprema uzorka započela je vaganjem suhih ekstrakata. Odvage suhih, liofiliziranih ekstrakata koji su uzeti u HPLC analizu iznosile su 75 mg suhog ekstrakta (uzorak bez ciklodekstrina); 135 mg suhog ekstrakta (uzorci sa 3,2 g ciklodekstrina u 400 mL otapala) odnosno 195 mg suhog ekstrakta (uzorci sa 6,4 g ciklodekstrina u 400 mL otapala). Odvage pojedinih suhih ekstrakata podešene su tako da se u obzir uzme količina ekscipijensa u pojedinom ekstraktu koja razrjeđuje uzorak kako bi se dobiveni rezultati mogli međusobno uspoređivati. Odvagnuti uzorci su otopljeni u 1,5 mL ultračiste vode pomoću Vortex miješalice. Otopine ekstrakata potom su filtrirane kroz filtre za šprice veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  kako bi se uklonila moguća kruta onečišćenja. Potom su uzorci za HPLC analizu preneseni u vijale.

### 3.6.3 Priprema mobilne faze

Acetatni pufer (pH=5) pripremljen je miješanjem 0,5 L 0,1 M octene kiseline i 1 L 0,1 M natrijevog acetata. Za pripremu 1 L 0,1 M octene kiseline 5,88 mL koncentrirane octene kiseline nadopuni se do 1 L u odmjernoj tikvici od 1 L s ultračistom vodom. 1 L 0,1 M natrijevog acetata pripremi se otapanjem 13,6 g natrijevog acetata u ultračistoj vodi i u odmjernoj tikvici od 1 L se nadopuni do 1 L ultračistom vodom. Nakon pripreme pufera pH metrom se provjerava pH te, ukoliko je potrebno, dodaje još kiseline ili natrijevog acetata kako bi se podesio pH acetatnog pufera na 5. Mobilna faza filtrirana je vakuum filtracijom kroz filter od celuloza-acetata veličine pora 0,45 µm.

### 3.6.4 HPLC-FLD metoda za određivanje tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina

U kromatografskom postupku primijenjena je obrnuto fazna C18 kolona dimenzije 250x4,6 mm i veličine čestica 5 µm. Gradijentni program mobilne faze prikazan je u Tablici 3. Mobilna faza A je acetatni pufer (pH=5), a mobilna faza B je acetonitril HPLC čistoće. Brzina protoka mobilne faze podešena je na 1 mL/min. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20 µL, a temperatura kolone bila je održavana na 40°C.

Tablica 3. Gradijentni eluacijski program obrnuto fazne HPLC identifikacije i određivanja oleuropeina, hidroksitirosola i tirosola

Vrijeme/min	Mobilna faza A/%	Mobilna faza B/%	Brzina protoka mobilne faze/ mLmin <sup>-1</sup>
0	90	10	1
4	80	20	1
8	40	60	1
11	30	70	1
15	90	10	1
20	90	10	1

Nakon stabiliziranja instrumenta i postizanja radnih uvjeta, injektirani su uzorci.

Kromatogrami su snimljeni pri  $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm te  $\lambda_{\text{em}}=635$  nm uz pomoć FLD detektora. Identifikacija eluiranih pikova provedena je usporedbom s retencijskim vremenom standarda. Sadržaj oleuropeina, hidroksitirosola i tirosola u analiziranim uzorcima određen je iz izmjerene površine pika (A) uz pomoć kalibracijskih krivulja s pripadajućim jednadžbama.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Utjecaj ciklodekstrina na boju ekstrakata komine masline

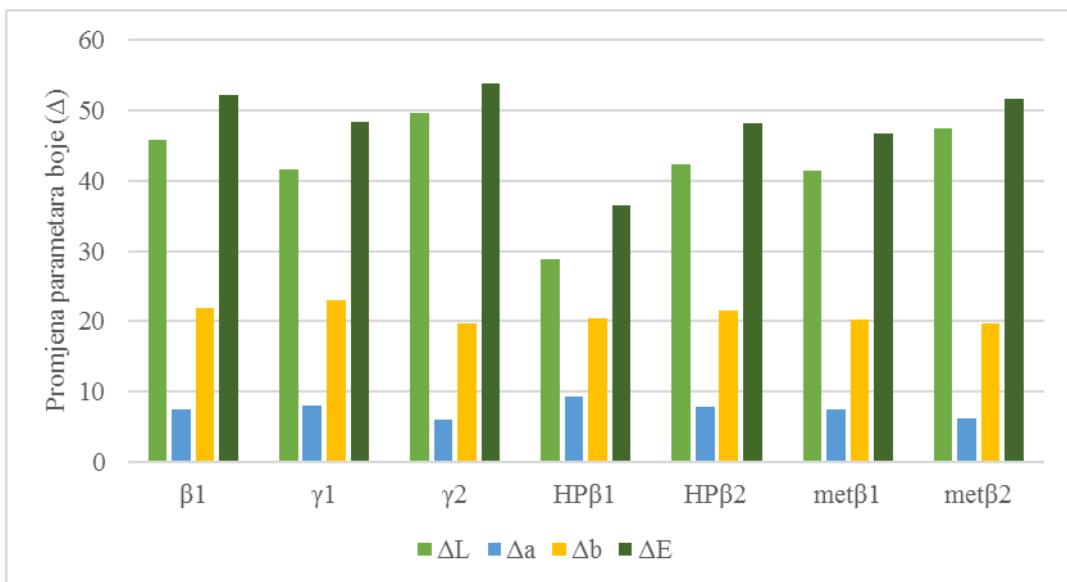
Mjerenje boje svježih liofiliziranih ekstrakata komine masline provedeno je na kolorimetru te su dobiveni rezultati prikazani u Tablici 4. i Slici 17.

Tablica 4. Utjecaj ciklodekstrina na boju uzoraka prašaka:

Uzorak	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)
native	16,11	1,46	1,69	2,23	49,17
$\beta$ 1	61,95	9	23,59	25,25	69,11
$\gamma$ 1	57,74	9,56	24,68	26,46	68,82
$\gamma$ 2	65,75	7,54	21,49	22,77	70,68
HP $\beta$ 1	44,95	10,72	22,13	24,59	64,15
HP $\beta$ 2	58,36	9,27	23,25	25,03	68,26
met $\beta$ 1	57,48	9,07	21,99	23,78	67,59
met $\beta$ 2	63,49	7,78	21,36	22,74	69,99

L\* - svjetlina uzorka, a\* - udio crvene/ zelene komponente, b\* - udio žute/plave komponente, h\* - nijansa boje, C\* - ton boje.

U odnosu na nativni uzorak svi uzorci su svjetlijiji, što je posljedica „razrjeđivanja“ nativnog uzorka svijetlim ciklodekstrinom. Upravo se zbog toga, povećanjem koncentracije korištenog ekscipijensa povećava i svjetlina dobivenog praška. Najsvetlijiji uzorci su oni dobiveni primjenom  $\gamma$ CD. Također, svi uzorci su i crveniji od nativnog (najviše uzorak HP $\beta$ 1) te žući u odnosu na nativni uzorak (najviše uzorak  $\gamma$ 1).



Slika 17. Promjena parametara boje u odnosu na nativni uzorak

Prema dobivenim podacima izračunate su promjene parametara boje, prikazane Slikom 17. Dobivene  $\Delta L$ ,  $\Delta a$  i  $\Delta b$  vrijednosti su pozitivne kod svih uzoraka, te se može zaključiti da su svi uzorci svjetlijii, crveniji i žući od nativnog uzorka. Primjećujemo da su uzorci sa  $\gamma$ -CD, hidroksipropil- $\beta$ -CD i metil- $\beta$ -CD u koncentraciji 3.2 g / 200 mL svjetlijii u odnosu na one u koncentraciji 1.6 g / 200 mL, dok su uzorci u koncentraciji 1.6 g / 200 mL crveniji i žući u odnosu na koncentriranije uzorke, uz iznimku hidroksipropil- $\beta$ -CD koji je žući u višoj koncentraciji.

Parametar  $\Delta E$  pokazuje koliko neki uzorak odstupa od referente boje. Ukoliko vrijednost  $\Delta E$  iznosi više od 12.0, smatra se da postoji vrlo velika razlika između boje uzorka i referentne boje.  $\Delta E$  vrijednosti dobivene za uzorke kompleksirane s različitim ciklodekstrinima iznosile su od 36,54 do 53,79. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se boja svih mjerenih uzoraka jako razlikuje od referentne boje. Pri tome je najmanja razlika od referentne boje dobivena kod uzorka uz dodatak HP  $\beta$ -CD (1.6g/200ml) te iznosi 36,54, dok je najveća razlika od referentne boje dobivena kod uzorka uz dodatak  $\gamma$ -CD (3.2g/200ml), za koji ona iznosi 53,72. Kod uzoraka s  $\gamma$ -CD, hidroksipropil- $\beta$ -CD i metil- $\beta$ -CD u koncentraciji 3.2 g / 200 mL ta je promjena veća u odnosu na uzorke sa nižom koncentracijom ciklodekstrina.

#### 4.2. Utjecaj ciklodekstrina na raspodjelu veličine čestica ekstrakata komine masline

Analiza veličine čestica laserskom difrakcijom provedena je na uzorcima kompleksiranim s različitim ciklodekstrinima, i to na uzorcima uz dodatak  $\beta$ -ciklodekstrina,  $\gamma$ -ciklodekstrina, hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina i metil- $\beta$ -ciklodekstrina u različitim koncentracijama. Nije bilo moguće napraviti analizu za nativni uzorak jer on vrlo brzo nakon izlaganja zraku gubi praškasta svojstva, apsorbira vlagu i poprima gumastu konzistenciju. Kao rezultat analize veličine čestica dobiveni su parametri: ostatak, d (0,5), d (0,1), d (0,9), raspon, koncentracija, opskuracija, uniformnost i specifična dodirna površina. Na temelju navedenih parametara provodi se interpretacija rezultata.

Tablica 5. Utjecaj ciklodekstrina na veličinu čestica uzorka prašaka

	native	$\beta$ 1	$\gamma$ 1	$\gamma$ 2	HP $\beta$ 1	HP $\beta$ 2	met $\beta$ 1	met $\beta$ 2
Ostatak/%	/	0,114	0,176	0,119	0,205	0,101	0,086	0,091
d (0,5)/ $\mu$ m	/	21,051	44,307	14,928	31,758	21,276	20,140	13,349
d (0,1) / $\mu$ m	/	3,033	9,967	3,010	6,753	4,483	3,666	2,274
d (0,9) / $\mu$ m	/	124,101	239,507	97,798	176,599	85,759	91,937	68,735
Raspon	/	5,751	5,181	6,350	5,348	3,820	4,383	4,979
Koncentracija (volumna)/%	/	0,0014	0,0011	0,0019	0,0019	0,0019	0,0015	0,0026
Opskuracija/%	/	6,73	1,88	10,95	5,03	7,53	6,87	16,83
Uniformnost	/	1,86	1,55	2,13	1,59	1,4	1,45	2,02
Specifična dodirna površina/m/g	/	0,886	0,312	1,08	0,477	0,739	0,883	1,28

Ostatak pokazuje slaganje modela i rezultata mjerenja. Dobro slaganje rezultata i modela podrazumijeva ostatak manji od 1%. Kod svih uzoraka dobivena je zadovoljavajuća vrijednost. Najbolje slaganje s modelom pokazuje uzorak uz dodatak metil- $\beta$ -CD (1.6 g/200 ml) (0,086%), dok najmanje slaganje s modelom pokazuje uzorak uz dodatak HP- $\beta$ -CD (1.6g/200ml) (0,205%).

d (0,5) predstavlja promjer čestica za koji vrijedi da je 50% ukupnog broja čestica promjera većeg od tog promjera i 50% ukupnog promjera manjeg od tog promjera. Ova vrijednost poznata je kao medijan volumne raspodjele. d (0,1) predstavlja veličinu čestice od koje je manje 10% čestica cijelog uzorka. d (0,9) predstavlja veličinu čestica od koje je manje 90% čestica cijelog uzorka.

Najveće vrijednosti za d(0,5), d(0,1) i d(0,9) dobivene su kod uzorka uz dodatak  $\gamma$ -CD (1.6 g/200ml), a iznosile su redom 44,307  $\mu\text{m}$ , 9,967  $\mu\text{m}$  i 239,507  $\mu\text{m}$ . Na temelju dobivenih vrijednosti može se zaključiti da čestice uzorka uz dodatak  $\gamma$ -CD (1.6 g/200ml) imaju najveći promjer. Rezultati dobiveni za uzorak uz dodatak metil- $\beta$ -CD (3.2g/200 ml) pokazuju da su njegove čestice najmanje (vrijednosti d(0,5), d(0,1) i d(0,9) iznose redom 13,349  $\mu\text{m}$ , 2,274  $\mu\text{m}$  i 68,735  $\mu\text{m}$ ). Također, bitno je napomenuti da na prosječne vrijednosti veličine čestica osim vrste ciklodekstrina utječe i koncentracija jer su više koncentracije istog CD u uzorku rezultirale manjom srednjom veličinom čestica.

Raspon predstavlja širinu raspodjele čestica. Za čestice s užom distribucijom, manja je i vrijednost raspona. Uzorak uz dodatak  $\gamma$ -CD (3.2g/200ml) pokazuje najširu raspodjelu čestica (raspon=6,350). Kod uzorka uz dodatak HP  $\beta$ -CD (3.2g/200ml) vrijednost raspona iznosi 3,820, te se može zaključiti da navedeni uzorak ima najužu raspodjelu čestica.

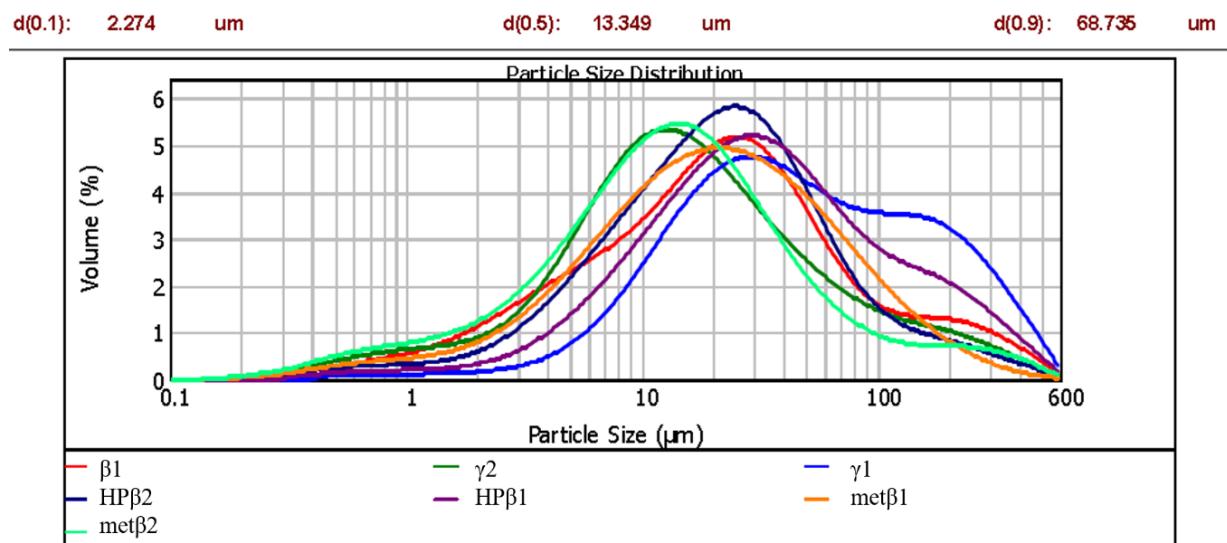
Parametar koncentracija podrazumijeva volumnu koncentraciju koja se izračunava prema Lambert – Beerovom zakonu. Najveća koncentracija dobivena je kod uzorka uz dodatak metil- $\beta$ -CD (3.2g/200 ml) te iznosi 0,0026%. Uzorak uz dodatak  $\gamma$ -CD (1.6 g/200ml) ima najmanju koncentraciju, koja iznosi 0,0011%.

Opskuracija je mjera za količinu svjetlosti koja se gubi prilikom prolaska uzorka kroz lasersku zraku. Idealan raspon opskuracije za praškaste uzorke iznosi 5 – 20%. Uzorak uz dodatak  $\gamma$ -CD (1.6 g/200ml) jedini ne udovoljava ovom zahtjevu, jer je opskuracija kod tog uzorka manja od 5% (iznosi 1,88%).

Uniformnost je mjera apsolutne devijacije od medijana. Najveća devijacija od medijana dobivena je kod uzorka uz dodatak  $\gamma$ -CD (3.2g/200ml) te iznosi 2,13. Uzorak uz dodatak HP- $\beta$ -CD (3.2g/200ml) pokazuje najmanju devijaciju od medijana – njegova uniformnost iznosi 1,4.

Specifična dodirna površina je sveukupna dodirna površina svih čestica podijeljena sa masom uzorka. Vrijednost najveće specifične površine dobivena je kod uzorka uz dodatak metil- $\beta$ -CD (3.2g/200 ml) te iznosi 1,28 m/g. Uzorak uz dodatak  $\gamma$ -CD (1.6 g/200ml) ima najmanju specifičnu dodirnu površinu (0,312 m/g).

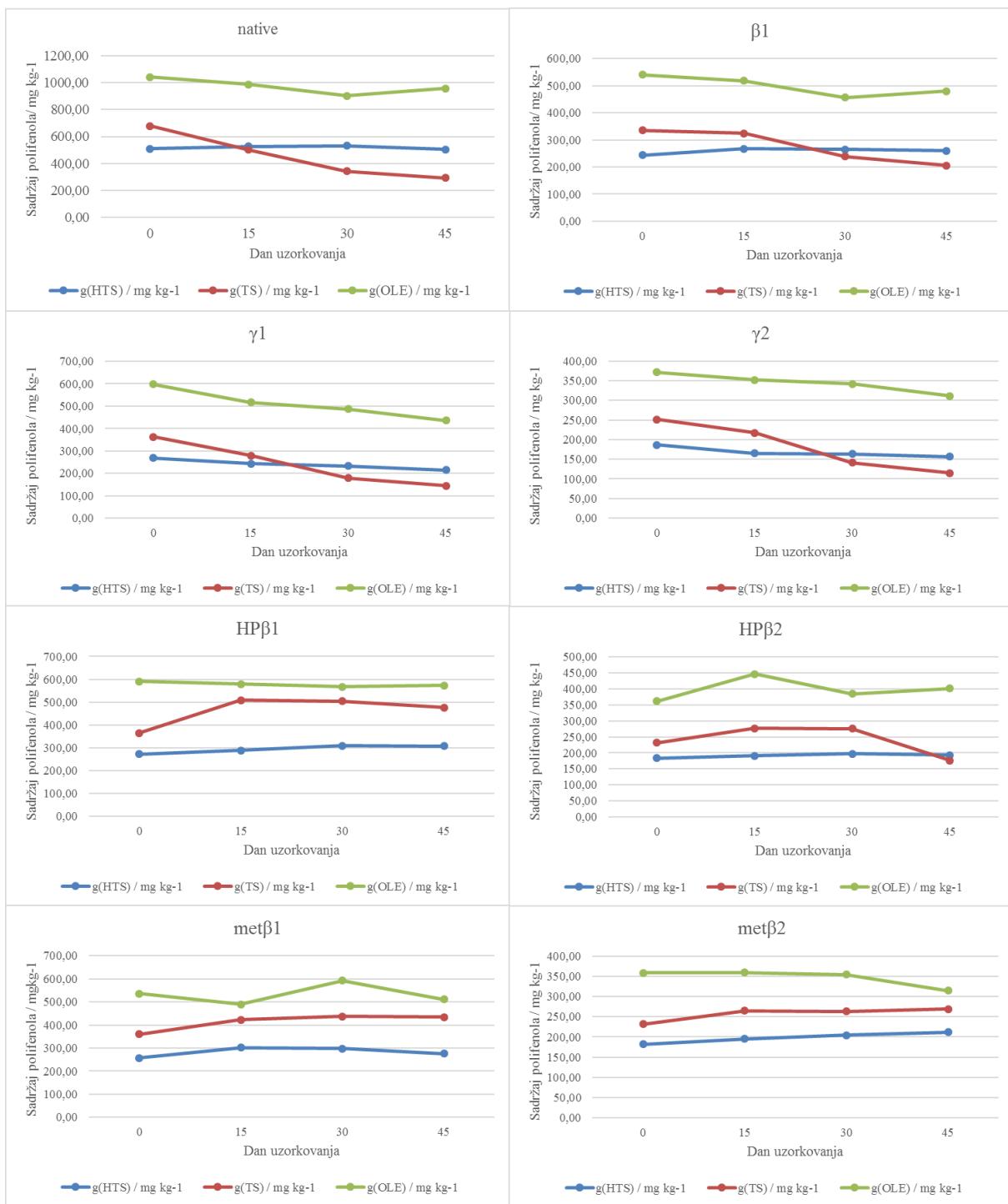
Grafički prikazi raspodjele veličine čestica analiziranih uzoraka prikazani su na Slici 18.



Slika 18. Raspodjela veličine čestica uzoraka

#### 4.3. Utjecaj ciklodekstrina na stabilnost ekstrakata komine masline

Stabilnost suhih ekstrakata komine masline ispitana je u uvjetima ubrzane razgradnje ( $60^\circ\text{C}$ , 75% vlažnost, 45 dana). Praškasti uzorci pakirani su u polipropilenske spremnike i pohranjeni u eksikatore nad zasićenom otopinom natrijevog-klorida. Zatvoreni eksikatori pohranjeni su u termostat i čuvani na  $60^\circ\text{C}$  kroz 45 dana. Uzorkovanja su provedena nakon 0, 15, 30, i 45 dana.



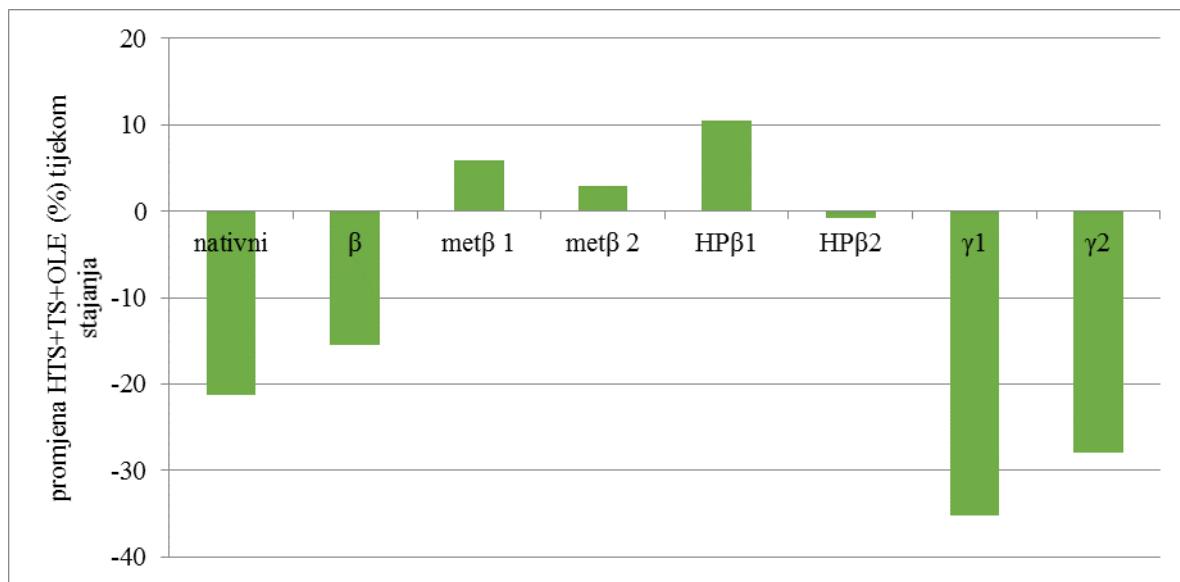
Slika 19. Udio bioaktivnih fenola masline (hidroksitirosol, tirosol i oleuropein) u ekstraktima masline tijekom 45 dana skladištenja

Iz dobivenih rezultata (Slika 19.) vidimo da je početna koncentracija bioaktivnih fenola masline (hidroksitirosol, tirosol i oleuropein) najveća u nativnom uzorku, što je posljedica "razrijеđenja" ostalih uzoraka ciklodekstrinima. Najzastupljeniji polifenol u svim uzorcima bio je oleuropein (1041 mg/kg u nativnom uzorku); bitno su niže bile koncentracije tirosola i

hidroksitirosolu (678 i 510 mg/kg nativnog ekstrakta). Dobiveni rezultati su u skladu sa rezultatima studije Cioffi i suradnika (2010) koji su u ulju komine masline utvrdili puno niže koncentracije spomenutih polifenola, ali u istim međusobnim odnosima obzirom na zastupljenost. Aliakbarian i suradnici (2011) optimirali su ekstrakciju polifenola iz komine masline u visokotlačnom-visokotemperaturnom reaktoru te dobili metanolne ekstrakte u kojima je najzastupljeniji među 3 karakteristična polifenola bio oleuropein dok su hidroksitirosol i tirosol bili zastupljeni u podjednakim, značajno nižim koncentracijama.

Brzina razgradnje polifenola tijekom 45 dana skladištenja bila je najbrža upravo u nativnom uzorku. Najdrastičnije se promijenila koncentracija tirosola, sa početnih 678 mg/kg na 282 mg/kg nakon 45 dana skladištenja. Koncentracije oleuropeina također su se smanjile, ali ne toliko značajno (sa 1041 mg/kg na 958 mg/kg) dok su koncentracije hidroksitirosolova ostale nepromijenjene. Izostanak utjecaja skladištenja na koncentracije hidroksitirosolova može se objasniti činjenicom da je hidroksitirosol produkt razgradnje oleuropeina. Slične promjene uočene su i kod uzoraka  $\gamma_1$  i  $\gamma_2$  pa se može zaključiti da se dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina ne ostvaruje nikakav protektivni učinak u smislu poboljšanja stabilnosti ekstrakata. Dodatak  $\beta$ -ciklodekstrina u ekstrakcijsko sredstvo rezultiralo je dobivanjem produkta nešto veće stabilnosti u odnosu na prethodne, međutim i u ovim uzorcima razgradnja oleuropeina i tirosola je i dalje velika. Kao što je prikazano na Slici 20., značajan protektivni učinak na stabilnost ekstrakata ostvaren je korištenjem HP- $\beta$ -ciklodekstrina te met- $\beta$ -ciklodekstrina, s tim da su značajniji protektivni učinci postignuti primjenom nižih koncentracija ekscipijensa (8 g/L ekstrakcijskog sredstva). Kod tih uzoraka koncentracija bioaktivnih polifenola masline (TS, HTS i OLE) tijekom skladištenja je porasla i to za 5,9 % (met $\beta$ 1) odnosno 10,5 % (HP $\beta$ 1). Za usporedbu, u nativnom ekstraktu količina bioaktivnih polifenola masline smanjena je za 21%, a u uzorku sa  $\beta$ -ciklodektrinom za 15.5%. Korištenjem  $\gamma$ -ciklodekstrina kao ekscipijensa, ostvaren je dodatan negativan učinak na stabilnost ekstrakta te je razgradnja u uzorcima  $\gamma_1$  i  $\gamma_2$  bila, slijedom 35.2% i 27.5%. Povećanjem koncentracije ekscipijensa u uzorku ne ostvaruju se dodatni protektivni učinci, dapače, protektivni učinak ciklodekstrina slabi te je koncentracija od 8g CD/L ekstrakcijskog sredstva odabrana kao optimalna. Opaženi porast koncentracija HTS i TS tijekom skladištenja u uzorcima, može se objasniti razgradnjom kompleksnih struktura (npr. glikozida ili oleuropeina) pri čemu se oslobađaju aglikoni koji se detektiraju na kromatogramu, a zbog prisustva protektivnih CD zaostaju u uzorku i ne razgrađuju se (uzorci HP $\beta$ 1, HP $\beta$ 2, met $\beta$ 1 i met $\beta$ 2.) Slični trendovi opaženi su kod drugih autora. Primjerice, Koyu i suradnici (2015) pratili su stabilnost suhog ekstrakta

gospine trave, pri čemu je tijekom skladištenja došlo do porasta udjela nekih jednostavnih polifenola. Ciklodekstrini i drugi ekscipijensi se intenzivno istražuju i uspješno koriste za stabilizaciju različitih aktivnih tvari u kompleksnim prirodnim ekstraktima. Tako su primjerice Kalogeropoulos i suradnici (2010) uspješno poboljšali termalnu stabilnost antocijanskog ekstrakta stvaranjem inkluzijskih kompleksa sa  $\beta$ -ciklodekstrinima, Mourtzinos i suradnici (2008) primjenom  $\beta$ -ciklodekstrina uspješno su stabilizirali ekstrakt biljke Hibiscus sabdariffa L. bogat antocijanima; Kopjar i Piližota (2011) poboljšali su termičku stabilnost soka borovnice dodatkom trehaloze.  $\beta$ -ciklodekstrin se pokazao uspješnim odabirom za uklapanje kurkumina pri čemu je stvaranjem inkluzijskog kompleksa bitno poboljšana stabilnost aktivne tvari kod različitih temperturnih i pH uvjeta (Mangolim i sur., 2014).



Slika 20. Promjena sadržaja bioaktivnih polifenola masline (HTS+TS+OLE) tijekom 45 dana skladištenja

Prema našim saznanjima, ovo je prvi pokušaj stabilizacije ekstrakata komine masline stvaranjem inkluzijskih kompleksa polifenola masline sa ciklodekstrinima. Mourtzinos i suradnici (2007) uspješno su primijenili  $\beta$ -ciklodekstrin u proizvodnji ekstrakta lista masline te su stvaranje inkluzijskog kompleksa  $\beta$ -CD i oleuropeina kao glavne aktivne sastavnice potvrdili pretražnom diferencijalnom kalorimetrijom i NMR-om. Iako je primjena  $\beta$ -CD i u našem istraživanju pokazala mali protektivni učinak na stabilnost ekstrakata (obzirom da je razgradnja polifenola bila značajno manja u usporedbi s nativnim uzorkom) neusporedivo bolji rezultati postignuti su primjenom met $\beta$ CD i HP $\beta$ CD. Njihova učinkovitost također se

može pripisati stvaranju inkluzijskih kompleksa sa polifenolima ekstrakta masline. Prema dostupnim literaturnim podacima, met $\beta$ CD i HP $\beta$ CD dokazano stvaraju inkluzijske komplekse sa tirosolom ( García-Padial et al, 2013).

## 5. ZAKLJUČCI

- Primjena ekscipijensa nužna je za formulaciju stabilnih ekstrakata komine masline obzirom da su nativni ekstrakti izrazito higroskopni te nakon kratke izloženosti atmosferi poprimaju ljepljiva i gumasta svojstva
- Korištenjem ciklodekstrina ostvaruje se značajan učinak na boju suhog ekstrakta. Neovisno o vrsti i količini ciklodekstrina, dobiveni ekstrakti su svjetlijici, crveniji i žući od nativnog ekstrakta
- Najveće prosječne vrijednosti veličine čestica i najveći raspon veličine čestica dobiveni su kod uzorka pripremljenog uz dodatak  $\gamma$ -CD. Najmanje čestice dobivene su primjenom met $\beta$ CD dok suhi ekstrakti sa HP $\beta$ CD imaju najužu raspodjelu veličine čestica
- Korištenjem  $\gamma$ CD za pripremu suhog ekstrakta komine masline ne ostvaruje se pozitivan učinak na stabilnost analiziranih polifenola (HTS, TS i OLE).
- met $\beta$ CD, HP $\beta$ CD i  $\beta$ CD poboljšavaju stabilnost ekstrakata komine masline pri čemu je protektivan utjecaj  $\beta$ CD neusporedivo manji od met $\beta$ CD i HP $\beta$ CD pa upravo njih možemo smatrati ciklodekstrinima izbora za pripremu suhog ekstrakta komine. Na temelju dostupnih literurnih podataka možemo pretpostaviti da se protektivni učinak ostvaruje stvaranjem inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina sa bioaktivnim polifenolima masline

## 6. LITERATURA

- Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P. Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor. *Food Chem*, 2011, 128, 704-710.
- Bajaj S, Singla D, Sahuja N. Stability Testing of Pharmaceutical Products. *J App Pharm Sci*. 2012, 2, 129-138.
- Bauman I. Udžbenik za studente Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za kolegij Tehnologija prahova. Zagreb, 2015, str. 24.
- Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Del Rev*, 2007, 59, 645-666.
- Cioffi G, Pesca MS, 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.
- García-Padial M, Martínez-Ohárriz MC, Isasi JR, Vélaz I, Zornoza A. Complexation of tyrosol with cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2013, 75, 241-245.
- Grafički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017.,  
[repro.grf.unizg.hr/media/download\\_gallery/OSNOVE%20O%20BOJI.pdf](http://repro.grf.unizg.hr/media/download_gallery/OSNOVE%20O%20BOJI.pdf),  
pristupljeno 5.1.2017.
- Grafički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017.,  
[repro.grf.unizg.hr/media/download\\_gallery/OSNOVE%20O%20BOJI%203.dio.pdf](http://repro.grf.unizg.hr/media/download_gallery/OSNOVE%20O%20BOJI%203.dio.pdf),  
pristupljeno 5.1.2017.
- Herak J. Osnove kemijske fizike. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2001, str. 168.
- Jug M, Bećirević-Laćan M. Cyclodextrin based pharmaceuticals. *Med Sci*, 2008, 499, 9-26.
- Kalogeropoulos N, Yannakopoulou K, Gioxari A, Chiou A, Makris DP. Polyphenol characterization and encapsulation in  $\beta$ -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. *Food Sci Technol*, 2010, 43, 882-889.
- Kopjar M, Piližota V. Prevention of thermal degradation of anthocyanins in blackberry juice with addition of different sugars. *J Food*, 2011, 9, 237-242.
- Koyu A, Zeki Haznedaroglu M. Investigation of impact of storage conditions on *Hypericum perforatum* L. dried total extract. *J Food Drug Analysis*, 2015, 23, 545-551

- Kruse SO. Stability testing of herbal medicinal products. *Innov Pharma Tech*, 2010, 33, 64-68.
- Lavakumar V, Nireesha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Niranjan Babu M. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *IJNTPS*. 2013, 4, 87-98.
- Malvern Instruments Ltd is a Spectris company, 2017.,  
<http://www.malvern.com/Assets/2016%2008%20Sizing%20Up%20Particles.pdf>, pristupljeno 5.1.2017.
- Mangolim SC, Moriwaki C, Nogueira AC, Sato F, Baesso ML, Medina Neto A, Matioli G. Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chem*, 2014, 153, 361-370.
- Mourtzinos I, Makris DP, Yannakopoulou K, Kalogeropoulos N, Michali I, Karathanos VT. Thermal Stability of Anthocyanin Extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the Presence of  $\beta$ -Cyclodextrin. *J Agric Food Chem*, 2008, 56, 10303-10310.
- Mourtzinos I, Salta F, Yannakopoulou K, Chiou A, Karathanos VT. Encapsulation of olive leaf extract in beta-cyclodextrin. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 8088-8094
- NSF International, 2017.,  
[https://www.nsf.org/newsroom\\_pdf/Stability\\_Testing\\_Dietary\\_Supplements.pdf](https://www.nsf.org/newsroom_pdf/Stability_Testing_Dietary_Supplements.pdf), pristupljeno 10.1.2017.
- Plantea, 2017., <http://www.plantea.com.hr/maslina/>, pristupljeno 12.3.2017.
- Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2017.,  
[http://www.pbf.unizg.hr/content/download/28555/111044/version/1/file/VJEZBA%2B2\\_2015.pdf](http://www.pbf.unizg.hr/content/download/28555/111044/version/1/file/VJEZBA%2B2_2015.pdf), pristupljeno 5.1.2017.
- Syed Haris O. Oleuropein in Olive and its Pharmacological effects, *Sci Pharm*. 2010, 78, 133.
- Šimić S. Izolacija antioksidativnih sastavnica biljke *Medicago sativa L.* primjenom ciklodestrina. Zagreb, 2015, str. 7-8.
- Trgovčević M. Optimizacija kombiniranog postupka ultrazvučne ekstrakcije i enkapsulacije za ekstrakciju polifenola masline, diplomski rad. Zagreb, 2016, str. 3.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Pri proizvodnji maslinovog ulja nastaju velike količine dva nusprodukta: komina masline i otpadna voda. Oba su štetna za okoliš, a neki od polifenola koje nalazimo u komini masline (oleuropein, hidroksitirosol i tirosol) imaju dokazana antioksidacijska, protuupalna te druga pozitivna svojstva. Prepoznata je mogućnost iskorištavanja komine masline u svrhu formulacije stabilnog, tehnološki prihvatljivog ekstrakta polifenola masline te dobivanje proizvoda dodane vrijednosti uz ostvarivanje ekonomске i ekološke koristi. Cilj ovog rada bio je odrediti kojom će se kombinacijom vrsta i količina ciklodekstrina iz sušene, odmašćene i prosijane komine masline dobiti ekstrakt polifenola masline dobrih tehnoloških svojstava uz što veći prinos polifenola, optimalnu raspodjelu veličine čestica te optimalnu boju i zadovoljavajuću stabilnost. Zaključeno je da je primjena ekscipijensa nužna za formulaciju stabilnih ekstrakata komine masline obzirom da su nativni ekstrakti izrazito higroskopni te nakon kratke izloženosti atmosferi poprimaju ljepljiva i gumasta svojstva. Korištenjem ciklodekstrina dobiveni su ekstrakti svjetlijii, crveniji i žući od nativnog ekstrakta. Najveće prosječne vrijednosti veličine čestica i najveći raspon veličine čestica dobiveni su kod uzorka pripremljenog uz dodatak  $\gamma$ -CD. Najmanje čestice dobivene su primjenom met $\beta$ CD dok suhi ekstrakti sa HP $\beta$ CD imaju najužu raspodjelu veličine čestica. Korištenjem  $\gamma$ CD za pripremu suhog ekstrakta komine masline ne ostvaruje se pozitivan učinak na stabilnost analiziranih polifenola (HTS, TS i OLE). met $\beta$ CD, HP $\beta$ CD i  $\beta$ CD poboljšavaju stabilnost ekstrakata komine masline pri čemu je protektivan utjecaj  $\beta$ CD neusporedivo manji od met $\beta$ CD, HP $\beta$ CD pa upravo njih možemo smatrati ciklodekstrinima izbora za pripremu suhog ekstrakta komine.

## SUMMARY

During the production of olive oil, large quantities of two byproducts are produced: olive pomace and waste water. Both are harmful to the environment, but some of the polyphenols found in olive pomace (oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol) have proven antioxidant, anti-inflammatory and other positive properties. The possibility of using olive pomace in formulating a stable, technologically acceptable olive polyphenol extract has been recognized as the way of obtaining an added value product while achieving economic and ecological benefits. The goal of this paper was to determine the optimal combination of the type and the amount of cyclodextrins to be used for the extraction of olive pomace in the process of the preparation of olive polyphenol extracts with good technological properties and high antioxidant yields. It was concluded that the use of excipients is necessary for the formulation of stable olive pomace extracts since the naturally occurring extracts are highly hygroscopic and, after a short exposure to the atmosphere, they have sticky and gumble properties. Using cyclodextrins, the obtained extracts were lighter, redder and yellower than the native extract. The highest mean particle size values and the largest particle size range were obtained in the sample prepared with the addition of  $\gamma$ -CD. The smallest particles were obtained by using met $\beta$ CD while the dry extracts with HP $\beta$ CD had the narrowest particle size distribution. Using  $\gamma$ -CD for the preparation of dry olive extract didn't have positive effect on the stability of the analyzed polyphenols (HTS, TS and OLE). met $\beta$ CD, HP $\beta$ CD and  $\beta$ CD improved the stability of olive pomace extracts whereby the protective effect of  $\beta$ -CD is incomparably smaller than that of met $\beta$ CD, HP $\beta$ CD. Therefore we can consider met $\beta$ CD and HP $\beta$ CD to be the cyclodextrins of choice for the preparation of dry olive pomace extract.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### UTJECAJ CIKLODEKSTRINA NA FIZIKALNA SVOJSTVA I STABILNOST EKSTRAKATA KOMINE MASLINE

Ines Bučela

#### SAŽETAK

Pri proizvodnji maslinovog ulja nastaju velike količine dva nusprodukta: komina masline i otpadna voda. Oba su štetna za okoliš, a neki od polifenola koje nalazimo u komini masline (oleuropein, hidroksitrosol i tirosol) imaju dokazana antioksidacijska, protuupalna te druga pozitivna svojstva. Prepoznata je mogućnost iskorištavanja komine masline u svrhu formulacije stabilnog, tehnološki prihvatljivog ekstrakta polifenola masline te dobivanje proizvoda dodane vrijednosti uz ostvarivanje ekonomске i ekološke koristi. Cilj ovog rada bio je odrediti kojom će se kombinacijom vrsta i količina ciklodekstrina iz sušene, odmašćene i prosijane komine masline dobiti ekstrakt polifenola masline dobrih tehnoloških svojstava uz što veći prinos polifenola, optimalnu raspodjelu veličine čestica te optimalnu boju i zadovoljavajuću stabilnost. Zaključeno je da je primjena ekscipijensa nužna za formulaciju stabilnih ekstrakata komine masline obzirom da su nativni ekstrakti izrazito higroskopni te nakon kratke izloženosti atmosferi poprimaju ljepljiva i gumasta svojstva. Korištenjem ciklodekstrina dobiveni su ekstrakti svjetlijih, crvenijih i žućih od nativnog ekstrakta. Najveće prosječne vrijednosti veličine čestica i najveći raspon veličine čestica dobiveni su kod uzorka pripremljenog uz dodatak  $\gamma$ -CD. Najmanje čestice dobivene su primjenom met $\beta$ CD dok suhi ekstrakti sa HP $\beta$ CD imaju najužu raspodjelu veličine čestica. Korištenjem  $\gamma$ CD za pripremu suhog ekstrakta komine masline ne ostvara se pozitivan učinak na stabilnost analiziranih polifenola (HTS, TS i OLE). met $\beta$ CD, HP $\beta$ CD i  $\beta$ CD poboljšavaju stabilnost ekstrakata komine masline pri čemu je protektivni utjecaj  $\beta$ CD neusporedivo manji od met $\beta$ CD, HP $\beta$ CD pa upravo njih možemo smatrati ciklodekstrinima izbora za pripremu suhog ekstrakta komine.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 20 grafičkih prikaza, 5 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ciklodekstrini, komina masline, stabilnost, boja, veličina čestica

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

Suvoditelj: Dr. sc. Suzana Rimac Brnčić, *redovita profesorica Sveučilišta U Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta*

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

Dr. sc. Suzana Rimac Brnčić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta*

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

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

# INFLUENCE OF CYCLODEXTRINS ON PHYSICAL PROPERTIES AND STABILITY OF OLIVE POMACE EXTRACTS

Ines Bučela

## SUMMARY

During the production of olive oil, large quantities of two byproducts are produced: olive pomace and waste water. Both are harmful to the environment, but some of the polyphenols found in olive pomace (oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol) have proven antioxidant, anti-inflammatory and other positive properties. The possibility of using olive pomace in formulating a stable, technologically acceptable olive polyphenol extract has been recognized as the way of obtaining an added value product while achieving economic and ecological benefits. The goal of this paper was to determine the optimal combination of the type and the amount of cyclodextrins to be used for the extraction of olive pomace in the process of the preparation of olive polyphenol extracts with good technological properties and high antioxidant yields. It was concluded that the use of excipients is necessary for the formulation of stable olive pomace extracts since the naturally occurring extracts are highly hygroscopic and, after a short exposure to the atmosphere, they have sticky and gumble properties. Using cyclodextrins, the obtained extracts were lighter, redder and yellower than the native extract. The highest mean particle size values and the largest particle size range were obtained in the sample prepared with the addition of  $\gamma$ -CD. The smallest particles were obtained by using met $\beta$ CD while the dry extracts with HP $\beta$ CD had the narrowest particle size distribution. Using  $\gamma$ -CD for the preparation of dry olive extract didn't have positive effect on the stability of the analyzed polyphenols (HTS, TS and OLE). met $\beta$ CD, HP $\beta$ CD and  $\beta$ CD improved the stability of olive pomace extracts whereby the protective effect of  $\beta$ -CD is incomparably smaller than that of met $\beta$ CD, HP $\beta$ CD. Therefore we can consider met $\beta$ CD and HP $\beta$ CD to be the cyclodextrins of choice for the preparation of dry olive pomace extract.

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

Thesis includes: 35 pages, 20 figures, 5 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cyclodextrins, olive pomace, stability, colour, particle size

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

Comentor: Dr. Sc. Suzana Rimac Brnčić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Food technology and Biotechnology

Reviewers: Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Suzana Rimac Brnčić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Food technology and Biotechnology  
Mario Jug, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.