

Primjena ciklodekstrina u ekstrakciji bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala

Regović, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:627963>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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



Josipa Regović

**Primjena ciklodekstrina u ekstrakciji bioaktivnih
sastavnica iz biljnog materijala**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Oblikovanje lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Maria Juga.

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Mariu Jugu na pruženoj prilici, stručnom vodstvu te dragocjenim savjetima i najviše strpljenju prilikom pisanja ovog diplomskog rada.

Veliko hvala cijeloj mojoj obitelji, dečku i prijateljima za bezuvjetnu ljubav, nepresušno strpljenje, podršku i povjerenje. Bez njih ovaj rad ne bi bio moguć.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Biljni materijal kao dio suvremene medicine.....	1
1.2. Ekstrakcija bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala	1
1.3. Ciklodekstrinima potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih tvari.....	2
2. OBRAZLOŽENJE TEME	5
3. MATERIJALI I METODE	6
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	7
4.1. Ekstrakcijski postupci primjenom β -ciklodekstrina	8
4.1.1. Ekstrakcija konvencionalnim metodama uz primjenu β - ciklodekstrina	8
4.1.2. Ekstrakcija ultrazvučnom metodom uz primjenu β -ciklodekstrina	14
4.1.3. Ekstrakcija mikrovalnom metodom uz primjenu β -ciklodekstrina	24
4.2. Ekstrakcijski postupci primjenom derivata β -ciklodekstrina	25
4.2.1. Ekstrakcijski postupci primjenom HP β CD	26
4.2.1.1. Ekstrakcija konvencionalnim metodama uz primjenu HP β CD	26
4.2.2. Ekstrakcijski postupci primjenom M β CD	29
4.2.2.1. Ekstrakcija konvencionalnim metodama uz primjenu M β CD.....	29
4.2.2.2. Ekstrakcija ultrazvučnom i mikrovalnom metodom uz primjenu M β CD	32
4.3. Usporedba ekstrakcija različitim ciklodekstrinima	34
5. ZAKLJUČCI.....	43
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	45
7. LITERATURA.....	47
8. SAŽETAK	51

1. UVOD

1.1. Biljni materijal kao dio suvremene medicine

Uporaba biljnih preparata prisutna je od najranijih vremena ljudskog postojanja. Prema literaturi preko 50,000 biljaka ima dokazan terapijski učinak. Ljekovito bilje jedan je od najbogatijih izvora ljekovitih tvari koje se koriste u tradicionalnoj i modernoj medicini, ali i nutraceutika, dodataka prehrani te intermedijera u farmaceutskoj industriji. Nadalje, polazišna točka mnogih sintetiziranih lijekova poput aspirina, digitoksina, morfina i kinina bila je upravo tradicionalna medicina temeljena na biljnim preparatima (Pandey i sur., 2014; Msomi i Simelane, 2020). Danas se biljni pripravci koriste za liječenje širokog spektra različitih bolesti te se sve više pojavljuju kao osnovni dio komplementarne i alternativne medicine. Biljna medicina također se smatra modernijim, blažim i holističkim načinom liječenja kroničnih bolesti, postizanja te održavanja zdravlja i kvalitete života (Ekor, 2014; Leonti i Verpoorte, 2017). Ono što biljni materijal čini posebnim je vrlo širok spektar različitih djelatnih tvari koje posjeduju različite pozitivne učinke na zdravlje. Biljni materijal korišten u medicinske svrhe bogat je fenolnim sastavnicama koje spadaju u skupinu sekundarnih biljnih metabolita. Građene su od aromatskog prstena koji nosi jedan ili više hidroksilnih supstituenata, uključujući i derivate poput estera, glikozida itd. Fenolne sastavnice pokazale su antioksidativna i druga terapijska djelovanja poput protuupalnog, antimikrobnog, kardioprotektivnog i antikancerogenog te stoga imaju ključnu ulogu u prevenciji bolesti koje su povezane sa starenjem, posebice procesima koji su povezani i uzrokovani oksidativnim stresom, primjerice kod Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, depresije ili anksioznosti. Njihovo terapijsko djelovanje povezano je s njihovom sposobnošću hvatanja slobodnih radikala u autokatalitičkom procesu lipidne peroksidacije. Istraživanja biljnih lijekova danas imaju jednaku važnost kao i istraživanja konvencionalnih lijekova te sve više raste interes za izdvajanje fenolnih sastavnica iz biljnog materijala (Cai i sur., 2018; Nn, 2015; Suvarna i sur., 2017).

1.2. Ekstrakcija bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala

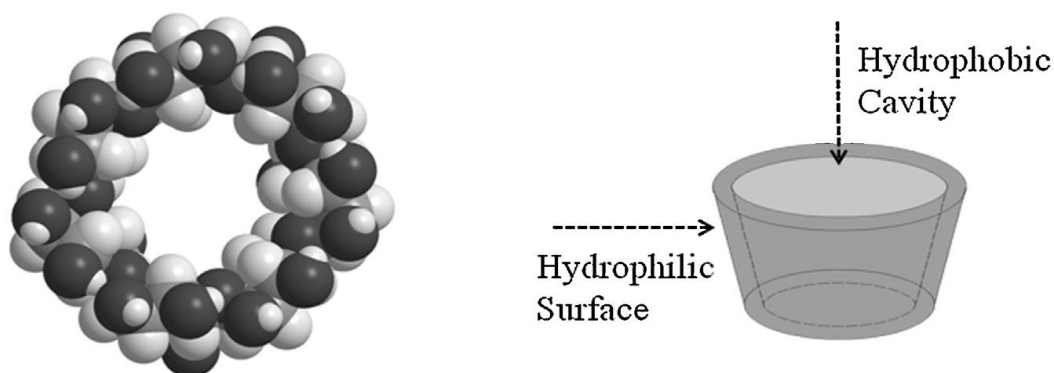
Ekstrakcijske metode korištene u farmaceutskoj industriji temelje se na odjeljivanju bioaktivnih sastavnica ili sekundarnih metabolita poput alkaloida, flavonoida, terpena,

saponina, steroida i glikozida od inaktivnog ili inertnog biljnog materijala, koristeći pritom odgovarajuće otapalo te standardiziranu ekstrakcijsku tehniku. Mehanizam ekstrakcije temelji se na prodiranju, difundiranju otapala kroz kruti biljni materijal te solubilizaciji sastavnica slične polarnosti. Izbor prikladne ekstrakcijske metode ovisi o raznim faktorima kao što su sama priroda biljnog materijala, karakteristike otapala, pH, temperatura, udio otapala (Pandey i sur., 2014; Abubakar i Haque, 2020). Konvencionalne ekstrakcijske metode koriste prilikom procesa ekstrakcije fenolnih sastavnica različita organska otapala poput metanola, etanola, etil-acetata, njihovih međusobnih kombinacija te kombinacija s različitim udjelom vode. Međutim, prilikom ekstrakcije organskim otapalima javljaju se mnogobrojni problemi koji uvelike zasjenjuju njihovu sposobnost učinkovitog otapanja i ekstrakcije fenolnih sastavnica. Sigurnost ekstrakcije i mogućnost toksičnih učinaka, ekološka pitanja o zagađenju prirode i emisiji plinova te ekonomska pitanja poput visoke cijene organskih otapala jedni su od najvažnijih čimbenika koji prisiljavaju industriju da se okrene k novim, „zelenijim“ otapalima koja bi smanjila troškove te povećala kvalitetu i funkcionalnost ekstrakcije (Cai i sur., 2018; Chemat i sur., 2017). Nadalje, konvencionalne ekstrakcijske metode uglavnom su temeljene na stvaranju topline izvan sustava te njenim unosom u sustav, pri čemu dolazi do povećanog gubitka energije u obliku topline te eventualne razgradnje bioaktivnih sastavnica prilikom procesa ekstrakcije, što se također može riješiti primjenom novih tehnologija poput ultrazvuka, mikrovalova, superkritičnog fluida te ciklodekstrinima posredovane ekstrakcije bioaktivnih sastavnica. Navedene nove ekstrakcijske tehnike pokazale su brojne prednosti pred konvencionalnim metodama poput biokompatibilnosti, lakog rukovanja s niskom razinom toksičnosti, skraćivanja vremena trajanja ekstrakcijskog procesa, većih prinosa i reproduktivnosti, manjeg rizika od razgradnje i oksidacije fitokemikalija, smanjenja buke, mogućnosti ekstrakcije termolabilnih sastavnica, manjeg utroška energije te zelenijeg i jeftinijeg industrijskog procesa (Cai i sur., 2018; Roselló-Soto i sur., 2015).

1.3. Ciklodekstrinima potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih tvari

Unazad nekoliko godina razvijen je nov tehnološki način ekstrakcije bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala primjenom ciklodekstrina kojim se pospješuje postupak ekstrakcije bioaktivnih sastavnica. Posljednjih se godina pridaje sve veća pozornost njegovom

razvitku. Mnoštvo bioaktivnih sastavnica pokazuje nisku topljivost u vodi, sporo otapanje, nizak stupanj stabilnosti te nisku i izrazito lošu bioraspoloživost. Glavni razlog navedenih loših svojstava bioaktivnih tvari je u njihovoj strukturi. Građene su od poliaromatskih prstenova sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Glomaznost i lipofilnost aromatskih prstenova čine ove sastavnice manje topljivim u vodi. Nadalje, na stabilnost ovih fitokemikalija uvelike utječu čimbenici okoline poput pH, temperature, svjetlosti te prisutnosti enzima. Jedan od pristupa kako poboljšati topljivost bioaktivnih tvari u vodi, a samim time i uspješnost ekstrakcije, jest korištenje ciklodekstrina kako bi se poboljšala topljivost i povećala sistemska bioraspoloživost te smanjilo vrijeme ekstrakcije i uporaba organskih otapala (Hadi i sur., 2015b; Suvarna i sur., 2017). Ciklodekstrini pripadaju u skupinu cikličkih polisaharida, odnosno oligosaharida, a pripremaju se enzimatskim djelovanjem ciklodekstringlikozil transferaze na škrob pri čemu nastaju ciklički polisaharidi koji se najčešće sastoje od šest, sedam ili osam D-(+)-glukopiranoznih jedinica međusobno povezanih α -1,4 glikozidnim vezama što odgovara α -, β - i γ -ciklodekstrinima. Ovi derivati se još nazivaju i nativni ciklodekstrini. Ovakav način povezivanja glukopiranoznih jedinica daje ciklodekstrinima oblik krnjeg stošca kao što je prikazano na Slici 1. Specifična struktura krnjeg stošca sastoji se od hidrofobne središnje šupljine obložene vodikovim atomima i glukozidnim mostovima kisika koja im omogućuje stvaranje inkluzijskih kompleksa s vrlo širokim spektrom različitih molekula pomoću nekovalentnih veza poput Van der Waalsovih i hidrofobnih interakcija te vodikovim vezama. Vanjska površina sastoji se od hidroksilnih grupa, posebice sekundarnih, koji čine površinu ciklodekstrina hidrofilnom te omogućuju dobru topljivost ciklodekstrina u vodi stvarajući vodikove veze (Braga i Pais, 2018; Cai i sur., 2018).



Slika 1. Shematski prikaz ciklodekstrina u obliku krnjeg stošca (preuzeto i prilagođeno iz (Pinho i sur., 2014) uz dopuštenje izdavača)

Ciklodekstrini dobivaju sve veću pozornost tijekom godina. Danas se uvelike koriste kao protektivni agensi, inkapsulirajuće molekule u procesu u kojem nastaju inkluzijski kompleksi. Ciklodekstrini stabiliziraju molekule „gosta“ i štite molekule „gosta“ od razgradnje djelovanjem kisika, topline, UV-zračenja itd. Nadalje, povećavaju topljivost lipofilnog „gosta“, omogućuju izolaciju sastavnice koja je inkompatibilna s okolinom, stabiliziraju mirise i okuse, eliminiraju neugodan okus te onemogućuju mikrobiološku kontaminaciju. Ciklodekstrini se danas sve više istražuju kao novi agensi za ekstrakciju fenolnih sastavnica poput fenolnih kiselina, flavonoida i stilbena iz različitog biljnog materijala te pokazuju obećavajući potencijal kao alternativa organskim otapalima prilikom ekstrakcije bioaktivnih tvari iz biljnog materijala. Korištenje otopine ciklodekstrina u vodi kao nova ekstrakcijska metoda može se shvatiti i nazvati novom, „zelenom“ ekstrakcijom s obzirom da je glavno otapalo u ovom procesu upravo voda koja se smatra sigurnom za okoliš i zdravlje, ekonomski prihvatljivom dok ciklodekstrini pospješuju ekstrakcijski postupak stvaranjem inkluzijskih kompleksa pri čemu dolazi do uklapanja nepolarne komponente, primjerice fenolne i polifenolne, u hidrofobnu šupljinu ciklodekstrina. Prilikom stvaranja inkluzijskog kompleksa dolazi do smanjenja energije sustava što povećava stabilnost sustava (Cai i sur., 2018; Suvarna i sur., 2018). Istraživanje i razvoj novih ekstrakcijskih tehnologija pridonosi razvoju kvalitetnijih, učinkovitijih i optimalnijih tehnika. Kao što je već istaknuto, ekstrakcija ciklodekstrinima rezultira smanjenjem trajanja ekstrakcije i količine otapala potrebnim za ekstrakcijski postupak. Ekstrakcija pomoću ciklodekstrina pruža priliku većeg iskorištavanja prirodnih izvora i fenolnih sastavnica u farmaceutskoj industriji i industriji hrane (Mourtzinis i sur., 2016).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Primjena biljnih lijekova i dodataka prehrani široko je rasprostranjena u suvremenoj farmakoterapiji (Ekor, 2014). Neki podaci pokazuju da u zadnja tri desetljeća više od 80% bolesnika u primarnoj zdravstvenoj zaštiti poseže za biljnim pripravcima. U Europskoj uniji njihova primjena značajno varira, pa su biljni pripravci u Mađarskoj zastupljeni sa svega 10%, dok u drugim zemljama, kao što je Njemačka, je njihova primjena značajno rasprostranjenija i doseže čak 40% (Kemppainen i sur., 2018; Leonti i Verpoorte, 2017). Biljni pripravci se uglavnom koriste za liječenje blažih oboljenja. Biljni pripravci su u fokusu mnogobrojnih znanstvenih istraživanja te je za značajan broj ljekovitih pripravaka temeljenih na biljnim drogama potvrđena njihova sigurnost i terapijska učinkovitost, naročito za preventivne svrhe (Welz i sur., 2019).

Jedan od fokusa znanstvenih istraživanja usmjeren je prema razvoju novih i učinkovitijih postupaka ekstrakcije biološki aktivnih sastavnica iz biljnog materijala. Ciljevi su usmjereni na skraćivanje duljine trajanja ekstrakcijskog postupka, postizanje selektivnije izolacije sastavnica od interesa te smanjenje količine i toksičnosti otapala koja se pri tome primjenjuju, kako bi se postupci učinili ekološki prihvatljivijim (Pandey i sur., 2014). Tako je razvijena nova alternativna ekstrakcijska metoda koja se temelji na „zelenoj ekstrakciji“, a uključuje primjenu ciklodekstrina. Otopina ciklodekstrina u vodi omogućuje zamjenu konvencionalnog ekstrakcijskog postupka i organskih otapala s ekstrakcijskom metodom baziranom na vodi, bez negativnog učinka na značajke kvalitete produkta ekstrakcije, što je jedno od najbitnijih pitanja, ali i izazova u području ekstrakcije fenolnih sastavnica (Suvarna i sur., 2017).

Cilj ovog diplomskog rada jest proučiti i istražiti literaturno dostupne podatke te pregledno prikazati najnovija saznanja o primjeni ciklodekstrina u ekstrakciji bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala. U tu svrhu bit će prikazani rezultati više istraživanja koja su se temeljila na ekstrakciji biljnih sastavnica iz različitih biljaka koristeći ciklodekstrine. Nadalje, razmatrat će se uvjeti ekstrakcije i korišteni ciklodekstrini u pojedinim istraživanjima te koristi ostvarene prilikom korištenja ciklodekstrina u postupku ekstrakcije bioaktivnih sastavnica. U ovom diplomskom radu želi se naglasiti velik potencijal ciklodekstrina u povećanju učinkovitosti i uspješnosti ekstrakcije vodenim otapalom.

3. MATERIJALI I METODE

U izradi ovog preglednog diplomskog rada korišteni su različiti preglednici znanstvene literature kao što su baze podataka (PubMed, PubFacts, Science Direct), društvena mreža Research Gate, znanstvene i stručne knjige te mrežne stranice sa srodnom tematikom, uključujući mrežne stranice Europske agencije za lijekove i Američke Agencije za hranu i lijekove. Više od 95% ovog diplomskog rada temeljeno je na radovima objavljenima u znanstvenim časopisima. Metode rada uključivale su uglavnom pretraživanje uz pomoć ključnih riječi vezanih za određeno potpoglavlje ovog diplomskog rada. Iz relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji podaci, rezultati i zaključci, te su pregledno prikazani u ovom diplomskom radu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Posljednjih desetljeća, mnoge se istraživačke skupine i farmaceutske tvrtke okreću novim, poboljšanim tehnologijama koje se temelje na „zelenoj kemiji“ kako bi se čim više smanjilo korištenje potencijalno opasnih i štetnih kemikalija prilikom procesa proizvodnje lijekova. Nadalje, sve je veća posvećenost zelenim tehnologijama s ciljem smanjenja nastanka i gomilanja otpada te kako bi se omogućilo djelovanje u različitim ekološki prihvatljivim aspektima. U području fitoterapije, učinkovitost i djelotvornost mnogih medicinskih biljnih vrsta ovisi o odgovarajućoj dostavi bioaktivnih sastavnica biljnog materijala u ciljno mjesto. No, učinkovitost bioaktivnih sastavnica kao farmaceutskih tvari je ograničena zbog loše bioraspoloživosti i topljivosti u vodi te ograničene kemijske stabilnosti zbog uslijed razgradnje posredovane pH, temperaturom i svjetlosti. Iz navedenih razloga, očuvanje strukturnog integriteta bioaktivnih sastavnica često zahtjeva korištenje pomoćnih tvari i/ili uklapanje u formulacije kako bi se dostavile ciljnim mjestima bez gubitka njihove aktivnosti (Lanna i sur., 2016). Procesi ekstrakcije i pročišćavanja biljnog materijala primarni su koraci u ekstrakciji bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala. Organska otapala konvencionalno su korištena prilikom ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala. S ciljem smanjenja korištenja organskih otapala zbog toksikološke i sigurnosne zabrinutosti, alternativne, ekološki prihvatljive ekstrakcijske metode sve se više implementiraju u proces ekstrakcije. Posljednjih godina ciklodekstrini dobivaju sve veću pozornost u procesima ekstrakcije. Mikrokapsuliranje i stvaranje inkluzijskih kompleksa pomoću ciklodekstrina povećava stabilnost, topljivost i bioraspoloživost bioaktivnih sastavnica. Upravo zbog toga, vodene otopine ciklodekstrina uspješno se koriste u izolaciji bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala, poput flavonola iz komine jabuke (Parmar i sur., 2015), resveratrola iz *Polygonum cuspidatum* (Gao i sur., 2016), oleuropeina iz lista masline (Mourtzinis i sur., 2016) i mnogih drugih. Njihova učinkovitost ekstrakcije, optimalni uvjeti prilikom ekstrakcije te usporedba ekstrakcija različitim tipovima ciklodekstrina bit će razmatrani u nastavku (Rajha i sur., 2015; Wang i sur., 2019).

4.1. Ekstrakcijski postupci primjenom β -ciklodekstrina

4.1.1. Ekstrakcija konvencionalnim metodama uz primjenu β -ciklodekstrina

Ekstrakcija polifenolnih sastavnica mladice vinove loze (*Vitis vinifera* L.) provedena je korištenjem vodene otopine β -ciklodekstrina (Rajha i sur., 2015). Studija je promatrala učinak koncentracije β -ciklodekstrina, temperature i vremena na uspješnost ekstrakcije polifenola iz mladice vinove loze. Ukupni sadržaj polifenola izražen je kao miligram ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe tvari (mg GAE/g DM), dok je antioksidativni kapacitet izražen kao mikromolarni ekvivalent Troloxa po mililitru (μ MTE). Nakon provedene ekstrakcije ukupni sadržaj polifenola varirao je u rasponu od 0,36-2,48 mg GAE/g DM, zavisno o primijenjenim uvjetima. Uočeno je kako temperatura, vrijeme i koncentracija β -ciklodekstrina imaju pozitivan linearni učinak na uspješnost ekstrakcije polifenola iz mladica vinove loze. Temperatura pozitivno utječe na ukupni sadržaj polifenola jer se povećanjem temperature povećava molekularna difuzija, smanjuje viskoznost otapala, povećava topljivost sastavnica i smanjuje površinska napetost. No, prekomjernim povećanjem temperature moguća je oksidacija i/ili razgradnja polifenola drugim mehanizmima, a raste i utrošak energije koji utječe na ukupni trošak postupka. Nadalje, trajanje ekstrakcijskog postupka također je izravno povezano s ukupnim sadržajem polifenola u pripremljenim ekstraktima. Vrijeme ima vrlo bitnu ulogu u ekstrakcijskom procesu koji uključuje tri koraka: difuziju otapala u biljni materijal, otapanje ciljnih molekula te difuziju otopljenih molekula iz biljnog materijala. β -ciklodekstrin pospješuje ekstrakciju jer stvaranjem inkluzijskih kompleksa s hidrofobnim polifenolima povećava njihovu topljivost u vodi.

Antioksidativni kapacitet ekstrakata iznosio je između 800,96 i 1740,37 μ MTE. I u ovom slučaju uočena je linearna ovisnost temperature, vremena ekstrakcije i koncentracije β -ciklodekstrina na antioksidativni kapacitet, pri čemu najizraženiji učinak pokazuje koncentracija β -ciklodekstrina. Pretpostavlja se da je razlog tomu privremeno „zaključavanje“ polifenola unutar hidrofobne šupljine ciklodekstrina koje štiti polifenole od razgradnje uzrokovane toplinom, svjetlošću ili oksidacijom. Optimalni uvjeti ekstrakcije β -ciklodekstrinom uključuju primjenu temperature od 66,6°C u trajanju od 4,4 h uz koncentraciju β -ciklodekstrina od 37,7 mg/mL. Optimizacija procesa vrlo je bitan korak jer posljedično smanjuje trošak ekstrakcije zbog smanjenja duljine trajanja postupka, potrošnje energije i utroška β -ciklodekstrina, zadržavajući pritom visok prinos polifenolnih sastavnica i

antioksidativni kapacitet. U nastavku istraživanja uspoređen je prinos polifenola te antioksidativni kapacitet ekstrakata pripremljenih ekstrakcijom s 37,7 mg/mL β -ciklodekstrina te 50% etanolno-vodenom otopinom. Uočeno je kako je jednak polifenolni prinos od 2,6 mg GAE/g DM bio postignut za 0,5 h kod ekstrakcije 50% etanolno-vodenom mješavinom za razliku od 5 h koliko je trebalo prilikom ekstrakcije β -ciklodekstrinom. Razlog tomu je što etanol istodobno djeluje na svojstva samog otapala i na matriks ekstrahirane tvari na način da djeluje na polarnost otapala i njegovu sposobnost solubilizacije lipofilnih polifenola te ima mogućnost kemijskog i biofizičkog djelovanja na biološke membrane povećavajući permeabilnost stanične membrane i posljedično olakšavanje difuzije. Međutim, prilikom usporedbe antioksidativnog kapaciteta, kod jednakog polifenolnog prinosa (2,6 mg GAE/g DM), veći je antioksidativni kapacitet uočen kod ekstrakta polifenola s β -ciklodekstrinom (1864 μ MTE) za razliku od etanolno-vodene mješavine (1100 μ MTE). Razlog tomu jest što je oksidacija ili razgradnja polifenola dominantnija u smjesi etanola i vode nego u otopini β -ciklodekstrina, gdje inkapsulacija štiti polifenole od razgradnje. Nadalje, velika različitost u sastavu i raznolikost ekstrahiranih polifenola moguć je uzrok poboljšane antioksidativne aktivnosti kod ekstrakata s β -ciklodekstrinom. S obzirom na nižu cijenu β -ciklodekstrina i manje količine potrebne za proces ekstrakcije u usporedbi s etanolom posljedično čine taj ekstrakti postupak ekonomičnijim. Nadalje, β -ciklodekstrin povećava stabilnost, maskira neugodan miris, povećava bioraspoloživost i vrijeme polueliminacije. Na kraju, nije potrebno uklanjanje β -ciklodekstrina nakon ekstrakcije za razliku od organskih otapala. Zaključno, primjenom β -ciklodekstrina razvijena je ekološki prihvatljiva metoda ekstrakcije polifenola s visokom antioksidativnom aktivnosti (Rajha i sur., 2015).

Lanna i suradnici (2016) proučavali su nastajanje fitokompleksa koji se sastoji od etanolnog ekstrakta lista *Bryophyllum pinnatum* (parnabija, biljka zraka, katedralna zvona) i β -ciklodekstrina (Lanna i sur., 2016). Proces pripreme započeo je ekstrakcijom flavonoida iz osušenog i usitnjenog lista statičkom maceracijom pomoću etanola pri sobnoj temperaturi tijekom 48 sati, u 20 frakcija. Etanolni ekstrakt potom je filtriran i uparen. Nakon toga, fitokompleks flavonoida s β -ciklodekstrinom pripremljen je metodom koprecipitacije na način da su jednake količine etanolnog ekstrakta i β -ciklodekstrina otopljene u mješavini etanola i vode. Otopina je homogenizirana miješanjem te liofilizirana kako bi se pripremio fitokompleks u čvrstom stanju, koji je karakteriziran primjenom različitih metoda, poput UV/VIS i FTIR spektroskopije, mjerenja veličine i zeta potencijala, termogravimetrijske analize i diferencijalne termalne analize. Nadalje, određena je antioksidativna aktivnost fitokompleksa i topički

protuupalni učinak na akutni edem uha miša mjereći težinu uha, aktivnost mijeloperoksidaze (MPO) te provodeći histopatološku analizu tkiva uha. Rezultati FTIR spektra korišteni su kako bi se potvrdio nastanak interakcija između β -ciklodekstrina i sastavnica ekstrakta. U spektru etanolnog ekstrakta (EEBP) s β -ciklodekstrinom vidljive su značajne promjene u poziciji i izgledu vibracijskih vrpca kao rezultat interakcije sastavnica ekstrakta s β -ciklodekstrinom. UV-VIS spektroskopija korištena je u svrhu ispitivanja postojećih interakcija u otopini. Modifikacije u spektru prilikom usporedbe EEBP i EEBP/ β -CD kompleksa ukazuju da postoje interakcije između β -ciklodekstrina i kromoforne skupine flavonoida. Nadalje, ispitivana su koloidna svojstva oblikovanih agregata EEBP i EEBP/ β -CD mjerenjem električne vodljivosti, prosječnog hidrodinamičkog promjera te zeta potencijala. Rezultati ukazuju na prisutnost nanometarskih struktura nastalih kao rezultat samoagregacije ekstrahiranih sastavnica. U prisutnosti β -ciklodekstrina uočeno je značajno smanjenje veličine takvih agregata, s prosječnim promjerom manjim od 200 nm, dok su dimenzije agregata kod EEBP oko 400 nm. Jedan od mogućih mehanizama kojim β -ciklodekstrin utječe na smanjenje veličine čestica jest parcijalna solubilizacija komponenata ekstrakta s naknadnim stvaranjem inkluzijskih kompleksa. Nadalje, promatrajući električnu vodljivost uočeno je kako se ona značajno povećala kod EEBP/ β -CD kompleksa, zbog parcijalne ionizacije β -ciklodekstrina s posljedičnim otpuštanjem H^+ iona u vodeni okoliš i prijenosa ionskih specija s agregata u otopinu. Mjerenjem zeta potencijala dokazana je prisutnost negativnog naboja na površini čestica kod EEBP i EEBP/ β -CD. Veće vrijednosti negativnog potencijala uočene su kod EEBP/ β -CD kompleksa kao rezultat lokalizacije ioniziranih ciklodekstrina na površini nanočestica i višeg stupnja ionske adsorpcije koja doprinosi većoj električnoj repulziji između čestica te ometa koalescenciju i rast čestica. Prisutnost flavonoida osigurava da ekstrakti *B. pinnatum* pokazuju antioksidativni učinak. Antioksidativni učinak promatran je koristeći dvije reakcije transfera elektrona, od kojih svaka koristi različiti kromogeni redoks reagens s različitim standardnim potencijalima. Prva spomenuta metoda jest DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda, dok je druga FRAP (eng. *ferric reducing antioxidant power*) metoda te su obje mjerene spektrofotometrijski. U obje metode fitokompleks EEBP/ β -CD pokazao je jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na EEBP. Kod DPPH metode IC_{50} fitokompleksa iznosio je $7,03 \pm 0,92 \mu\text{g/mL}$ dok je za EEBP iznosio $12,27 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$. Rezultati FRAP metode pokazali su da IC_{50} fitokompleksa iznosi $387,21 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$ u odnosu na EEBP čiji je IC_{50} iznosio $536,90 \pm 1,69 \mu\text{g/mL}$. Mehanizam kojim se to objašnjava je u stvaranju vodikovih veza između -OH skupine polifenolnih sastavnica s kisikovim atomom ciklodekstrina tijekom nastanka inkluzijskog kompleksa. Nastale vodikove veze mogu oslabiti kovalentne veze između

kisika i vodika u hidroksilnoj skupini, što posljedično omogućuje lakše doniranje vodika. Tradicionalno, *B. pinnatum* koristi se za liječenje bolesti kože. U radu je istraživana protuupalni učinak topikalno primijenjenih EEBP i EEBP/ β -CD fitokompleksa mjerenjem zadebljanja kože (*in vivo*) na modelu miša. U ovom ispitivanju, edem uha izazvan je primjenom kroton ulja kao iritansa. EEBP/ β -CD fitokompleks pokazao je produljen protuupalni učinak što se pripisuje povećanju bioraspoloživosti ekstrakta što je posljedica povećanja topljivosti i termalne stabilnosti sastavnica uslijed interakcije s ciklodekstrinima. Dodatno, inkluzijski kompleksi mogu se nakupljati u upaljenom tkivu kroz stvaranje vodikovih veza između hidroksilnih skupina ciklodekstrina i staničnih sastavnica što posljedično povećava vrijeme zadržavanja sastavnica i osigurava njihovo produljeno otpuštanje u tkivu (Lanna i sur., 2016).

Matičnjak (*Melissa officinalis* L.), aromatična je biljka koja pripada u skupinu usnača (Lamiaceae) te je prepoznata kao vrijedan izvor polifenolnih sastavnica. Od mnogobrojnih učinaka matičnjaka, ističu se kognitivni učinci te smanjenje stresa i anksioznosti. Uz to, matičnjak je prepoznat po svom antioksidativnom, antimikrobnom i antitumorskom djelovanju, no zbog niske stabilnosti, topljivosti i bioraspoloživosti bioaktivnih sastavnica potrebno je razviti nove metode ekstrakcije. Glavni su ciljevi smanjiti trajanje ekstrakcije i volumen otapala uz istovremeno povećanje prinosa te osiguravanje ekstrahiranih sastavnica od termalne razgradnje. Binello i sur. (2017) istraživali su ekstrakciju u čvrstom stanju biljnog materijala u kugličnom mlinu uz β -ciklodekstrin. Navlaženi materijal mljeven je u prisutnosti β -ciklodekstrina u omjeru 1:2 u kugličnom mlinu pri 350 rpm-a. Tamnozeleno pasta prebačena je u Büchnerov lijevak, isprana vodom, nakon čega je sušena smrzzavanjem. Iz osušenog materijala β -ciklodekstrinski kompleksi reekstrahirani su metanolom. Mljevenjem u kugličnom mlinu poboljšavaju se interakcije između β -ciklodekstrina i polifenolnih sastavnica matičnjaka. Iako je prinos ostvaren primjenom ove nove tehnike nešto niži u odnosu na ekstrakciju primjenom ultrazvukova ili mikrovalova (11,0% u odnosu na 16,1 – 31,1 i 1,2 – 26,5%, ovisno o korištenom otapalu), brojne su prednosti ekstrakcije β -ciklodekstrinom. Očituju se u prvom redu u smanjenju trajanja ekstrakcije i potrebne količine otapala, a sama tehnika je izrazito jednostavna. Nadalje, dokazano je kako se takvim pristupom povećava stabilnost, topljivost i bioraspoloživost prirodnih bioaktivnih sastavnica (Binello i sur., 2017).

El Darra i sur. (2018) ispitali su prikladnost vodene otopine β -ciklodekstrina kao zamjene za konvencionalnu ekstrakciju etanolom pri ekstrakciji polifenola iz komine breskve (*Prunus persica* L.). Riječ je o otpadu koji zaostaje nakon obrade breskve, a koji je vrijedan izvor polifenola. Ekstrakcijski proces bio je izveden u omjeru droge i ekstrakcijskog sredstva

1:10, varirajući koncentraciju β -ciklodekstrina u ekstraktom mediju u rasponu od 10 do 50 mg/mL. Osim toga, provedena je i ekstrakcija etanolom pri jednakim koncentracijama. Nakon postupka ekstrakcije, biljni materijal je odvojen od iscrpina centrifugiranjem. Karakterizacija pripremljenih uzoraka pokazuje kako je prinos polifenola proporcionalan koncentraciji β -ciklodekstrina i etanola u ekstrakcijskom mediju. Nadalje, pri jednakim koncentracijama, β -ciklodekstrin pokazuje veću učinkovitost ekstrakcije polifenola od etanola. Primjerice, kod 50 mg/mL, prinos polifenola iznosio je 715 mg GAE/g DM za β -ciklodekstrine, dok je za etanolnu otopinu iznosio 630 mg GAE/g DM. Nadalje, ekstrakcija tanina i flavonoida iz komine breskve također je značajno poboljšana primjenom β -ciklodekstrina i etanola u odnosu na vodu. Bolja učinkovitost ekstrakcije polifenola i ostalih sastavnica iz komine breskve pripisuje se nastanku inkluzijskih kompleksa čime se povećava njihova topljivost, a samim time i prinos ekstrakcije. β -ciklodekstrin u odnosu na etanol značajno poboljšava ekstrakciju beta-karotena. Primjerice, 50 mg/mL β -ciklodekstrina omogućuje veći prinos beta-karotena (32 mg/L) nego 500 mg/mL etanola (18 mg/L). No međutim, ekstrakcija vitamina C nije poboljšana primjenom β -ciklodekstrina ni etanola. Antiradikalna aktivnost ekstrakata povezana je s koncentracijom polifenola u uzorcima. Nadalje, pri jednakoj koncentraciji polifenola, β -ciklodekstrinski ekstrakti pokazuju veći antioksidativni kapacitet od etanolnih ekstrakata, ukazujući pritom na veću kvalitetu ekstrahiranih sastavnica te zaštitni učinak β -ciklodekstrina od razgradnje posredovane toplinom, UV zračenjem te oksidacijom. Na kraju istraživanja uspoređena je antimikrobna aktivnost ekstrahiranih polifenolnih sastavnica. Uspoređujući antibakterijsku aktivnost pri jednakim koncentracijama β -ciklodekstrina i etanola od 50 mg/mL, veća antibakterijska aktivnost zabilježena je kod ciklodekstrinskih ekstrakata. Sve navedeno upućuje na zaključak kako primjena β -ciklodekstrina u ekstrakcijskom procesu predstavlja „zelenu“ tehnologiju koja omogućuje iskorištavanje prehrambenog otpada, poput komine breskve (el Darra i sur., 2018).

Dai i sur. (2019) proučavali su učinak dodatka β -ciklodekstrina na kvalitetu infuza zelenog čaja (*Camellia sinensis* L.), ispitujući stabilnost boje, viskoznost te razinu otopljenog kisika. Određena količina zelenog čaja ekstrahirana je s destiliranom vodom pri 85°C. Uzorci s β -ciklodekstrinom pripremljeni su na način da je dodan postotak β -ciklodekstrina u uzorak zelenog čaja u vodi. Na početku ispitivanja, oba ekstrakta zelenog čaja bila su bistra i zeleno-žuta zbog visokog sadržaja klorofila u infuzu. Međutim, kako je vrijeme skladištenja odmicalo, infuz zelenog čaja s β -ciklodekstrinom pokazuje veću sposobnost zadržavanja boje zbog stvaranja inkluzijskih kompleksa s klorofilom te povećanja njegove stabilnosti i topljivosti u

vodi uz povećanje otpornosti na zagrijavanje. Primjerice, vrijednost svjetline („lightness“), „L“, u zelenom čaju s β -ciklodekstrinom ostao je visok, $72,1 \pm 4,6$, dok se kod konvencionalno kuhanog zelenog čaja vrijednost smanjila na $60,3 \pm 3,3$ nakon 20 dana. Također, boja infuza čaja koja je sadržavala β -ciklodekstrin ostala je zelenija nego konvencionalnom ekstrakcijom, kao i sadržaj crvene i smeđe boje, koji su niži kod ekstrakcije β -ciklodekstrinom. β -ciklodekstrini mogu selektivno povećati topljivost određenih organskih komponenata, poput polifenola, katehina i klorofila, čiji je sadržaj bio značajno veći u infuzijama čaja s dodatkom β -ciklodekstrina nego konvencionalno ekstrahiranim. Tako se ukupni sadržaj polifenola povećao s $234,6 \pm 12,1$ na $252,5 \pm 17,8$ g/kg, dok se sadržaj klorofila povećao više od dvostruko s $0,5 \pm 0,1$ na $1,2 \pm 0,6$ g/kg. Dodatak β -ciklodekstrina utjecao je i na sadržaj ekstrahiranih pektina, čiji se sadržaj smanjio što dovodi do zaključka da je β -ciklodekstrin inhibirao topljivost pektina što za posljedicu može imati smanjeno stvaranje taloga čaja koji je zaslužan za neugodan miris i boju čaja. Prilikom proučavanja viskoznosti otopine dodatkom β -ciklodekstrina, uočeno je da pri nižim koncentracijama čestice u otopini međudjeluju s β -ciklodekstrinom što povećava viskoznost otopine. Međutim, u određenom trenutku, vodikove veze između čestica postaju u potpunosti zasićene β -ciklodekstrinom. Nakon tog događaja, dodatak β -ciklodekstrina neće imati nikakav učinak na viskoznost i reakcija više nije ovisna o koncentraciji. Infuz zelenog čaja je stabilna disperzija zbog elektrostatske repulzije između čestica koje su pojačane dodatkom β -ciklodekstrina. Posljednje je u radu istraživani učinak β -ciklodekstrina na sadržaj otopljenog kisika u vodi. Otopljeni kisik može ubrzati različite neželjene procese poput enzimatskog tamnjenja, oksidacije ulja, razgradnju askorbinske kiseline te gubitak okusa. Rezultati su pokazali kako je β -ciklodekstrin zaustavio otapanje kisika u infuzu čaja što je povećalo kvalitetu skladištenja čajnih napitaka. Nadalje, dodatkom β -ciklodekstrina bilo je potrebno više vremena kako bi došlo do zasićenja infuza kisikom te je maksimalna količina otopljenog kisika značajno niža nego u infuzu čaja bez β -ciklodekstrina. Zaključno, u eksperimentu su dokazani brojni pozitivni učinci β -ciklodekstrina na kvalitetu boje infuza čaja te povećanu kemijsku stabilnost procesuiranih čajnih napitaka (Dai i sur., 2019).

Su i sur. (2019) proveli su ekstrakciju eteričnog ulja kore pomela, *Exocarpium citri grandis* (ECG) stvaranjem inkluzijskog kompleksa s β -ciklodekstrinom. Skladištenje eteričnih ulja ima kritičnu ulogu u očuvanju njihove aktivnosti i arome s obzirom na njihovu osjetljivost na svjetlost, zrak i toplinu. Dosadašnja saznanja ukazuju da eterična ulja imaju dobru stabilnost i biološku aktivnost nakon kompleksiranja s ciklodekstrinima. U ovom istraživanju, kora pomela je osušena, a eterično ulje je izdvojeno destilacijom vodenom parom. ECG je posušen

te mu se dodala određena količina vode kako bi se ekstrahiralo eterično ulje. Inkluzijski kompleks s β -ciklodekstrinom pripremljen je dodatkom smjese eteričnog ulja i etanola u omjeru 1:1 u otopinu β -ciklodekstrina. Nastala otopina je miješana pri temperaturi od 40°C tijekom 3 sata. Nakon zadanog vremena otopina je ohlađena te je filtracijom izdvojen talog koji je osušen u vakuumskom eksikatoru pri 4°C. Fizička mješavina pripremljena je miješanjem β -ciklodekstrina u smjesi eteričnog ulja i etanola uz naknadno sušenje. Proučavanjem UV spektra uočeno je da postoje razlike u apsorpcijskim vrpama čistog eteričnog ulja i inkluzijskog kompleksa, što dovodi do zaključka kako su sastavnice eteričnog ulja pomela uspješno inkapsulirane s β -ciklodekstrinom. Međutim, UV spektar eteričnog ulja inkapsuliranog s β -ciklodekstrinom nije se razlikovao od UV spektra slobodnog eteričnog ulja, što ukazuje da se struktura eteričnog ulja te njegova fizikalna i kemijska svojstva nisu promijenila tijekom inkapsulacije. Nadalje, inkapsulaciju eteričnog ulja dokazuje i mikroskopski prikaz u kojem je očita promjena strukture sastavnica prije i nakon nastajanja inkluzijskog kompleksa. Elektronskom skenirajućom mikroskopijom ustanovljene su promjene u veličini i obliku čestica, kao i u njihovoj strukturi. Termalnom analizom je dokazano da eterično ulje pomela u inkluzijskom kompleksu ima povećanu termalnu stabilnost te da β -ciklodekstrin inkapsulacijom prevenira evaporaciju eteričnog ulja. Promatrajući antioksidativnu aktivnost, uočeno je kako β -ciklodekstrin nema značajnu antioksidativnu aktivnost. Međutim, kompleks eteričnog ulja pomela i β -ciklodekstrina pokazuje veću sposobnost hvatanja slobodnih radikala nego čisto eterično ulje. Razlog tomu jest povećanje topljivosti i stabilnosti eteričnog ulja, posebice polienskih komponenata, prilikom kompleksiranja β -ciklodekstrinom. Navedene karakteristike čine kompleks eteričnog ulja pomela prikladnim za primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Su i sur., 2019).

4.1.2. Ekstrakcija ultrazvučnom metodom uz primjenu β -ciklodekstrina

Propolis pčela (*Apis mellifera*) prepoznat je od davnina kao ljekovita tvar. Propolis pokazuje širok spektar bioloških aktivnosti poput antioksidativnog, protuupalnog, antitumorskog, hepatoprotektivnog, imunostimulativnog i mnogih drugih. Nadalje, sadrži više od 150 sastavnica od kojih su najzastupljeniji polifenoli, terpeni, flavonoidi poput apigenina i pinocembrina, antrakinoni poput krizofanola, emodina i ostalih te terpenke kiseline poput abietske i dehidroabietske kiseline. Zbog loše topljivosti u vodi, gorkog okusa te osjetljivosti

na svjetlost i oksidaciju, Kalogeropoulos i sur. (2009) ispitali su učinak inkapsulacije etanolnog ekstrakta propolisa β -ciklodekstrinom na topljivost pojedinih bioaktivnih sastavnica u vodi. Ekstrakt propolisa izrađen je 72-satnom ekstrakcijom usitnjenog propolisa 70%-tnim etanolom u omjeru 1:10 uz miješanje magnetskom miješalicom. Ekstrakt je smrznut i filtriran u tri ciklusa kako bi se uklonili voskovi i ostale netopljive komponente. Sušenjem etanolnog ekstrakta te suspendiranjem u vodenoj otopini β -ciklodekstrina uz sonikaciju te naknadnu filtraciju i liofilizaciju pripremljen je inkluzijski kompleks β -ciklodekstrinom. Ispitivanjem fazne topljivosti uočena je linearna povezanost između topljivosti sastavnica ekstrakta propolisa i koncentracije β -ciklodekstrina na ispitivanim temperaturama. Rezultati dokazuju nastanak inkluzijskih kompleksa zbog uklapanja polifenola u šupljinu β -ciklodekstrina i posljedično povećanje topljivosti sastavnica ekstrakta propolisa. Primjerice, abietska kiselina, jedna od glavnih sastavnica propolisa, gotovo je netopljiva u vodi. Inkapsulacija s β -ciklodekstrinom rezultirala je značajnim povećanjem topljivosti i otapanjem 2,3g abietske kiseline po kilogramu ekstrakta propolisa. Zbog različitih fizikalnih i kemijskih svojstava sastavnica ekstrakta propolisa, molekulske mase sastavnica, mogućim van der Waalovim i vodikovim interakcijama različita je sposobnost stvaranja interakcija i vezanja β -ciklodekstrinom. Nadalje, različita polarnost skupina prisutnih u strukturi ekstrahiranih sastavnica određuju koji će se kraj molekule vezati u hidrofobnu šupljinu ciklodekstrina. Primjerice, *trans*-cinaminska kiselina stvara 1:1 kompleks s β -ciklodekstrinom. Nadalje, kafeinska i ferulinska kiselina djelomično ulaze u šupljinu β -ciklodekstrina, pri čemu se fenolni dio uklapa u šupljinu dok je karboksilni dio isturen prema van. 9,10-antrakinoni i supstituirani 9,10-antrakinoni gotovo su u potpunosti inkapsulirani β -ciklodekstrinom u omjeru 1:1. Poučavanjem flavonoida uočena je 1:1 stehiometrija prilikom uklapanja flavonoida u šupljinu β -ciklodekstrina. Stabilnost kompleksa osigurana je intermolekularnim vodikovim vezama. B, C i dio A prstena flavonoida stvaraju interakcije sa šupljinom β -ciklodekstrina kao kod kvercetina. Flavanoni stvaraju kompleks kod kojeg se B prsten nalazi u šupljini β -ciklodekstrina te se 4-okso i 5-OH skupine vodikovim vezama vežu sa sekundarnim hidroksilnim skupinama na obodu šireg kraja β -ciklodekstrinske šupljine. Kod terpenskih kiselina poput oleanolne, dokazano je stvaranje stabilnih 1:1 inkluzijskih kompleksa, ali je moguće i stvaranje 2:1 kompleksa, pri čemu je jedna molekula oleanolne kiseline uklopljena u dvije molekule ciklodekstrina. Proučavanjem brzine otapanja inkluzijskih kompleksa u gastrojnoj tekućini uočeno je da se sastavnice nižeg stupnja inkapsulacije, poput terpenskih kiselina i flavonoida lakše oslobađaju u otopini. Suprotno navedenom, molekule koje su uklopljene u šupljinu β -ciklodekstrina većim afinitetom poput

malih fenolnih molekula ne mogu se jednakom lakoćom osloboditi iz šupljine β -ciklodekstrina te se njihova topljivost povećala u manjoj mjeri (Kalogeropoulos i sur., 2009).

S ciljem prevencije termički posredovane razgradnje polifenola, uspoređena je učinkovitost klasične maceracije polifenola iz indijskog mangovca (*Magnifera indica* L.), odnosno dekokcije u vrućoj vodi i ultrazvučne ekstrakcije u vodenoj otopini β -ciklodekstrina (Mura i sur., 2015). Paralelno su izrađena dva ekstrakta. Klasičnom metodom dekokcije fino samljevena kora ekstrahirana je vodom pri temperaturi 98-100°C tijekom 1 h. Vodena iscrpina je izdvojena filtracijom i osušena smrzavanjem. UAE (eng. *ultrasound assisted extraction*) u 1,5%-tnoj otopini β -ciklodekstrina provedena je dodatkom fino mljevene kore indijskog mangovca te je ekstrahirana primjenom ultrazvuka tijekom sat vremena pri 25°C. I u ovom slučaju je vodena iscrpina izdvojena filtracijom i osušena smrzavanjem. Kromatogrami oba ekstrakta pokazali su sličan fitokemijski profil, pri čemu je glavna sastavnica ekstrakata magniferin. Sadržaj magniferina u vodenom ekstraktu iznosio je do 66,4 mg/g dok je kod β -ciklodekstrinskog ekstrakta iznosio do 72,5 mg/g. Nadalje, usporedbom kromatograma uočena je veća selektivnost ultrazvučne ekstrakcije β -ciklodekstrinom koja se pripisuje uklapanju magniferina u kompleks s β -ciklodekstrinom. Ekstrakcija vodenom otopinom β -ciklodekstrina uz sonikaciju pokazala se jednom od najboljih ekstrakcijskih metoda koja omogućuje najveći prinos magniferina. Promatranjem učinka ekstrakata na TNF α induciranu endotelnu disfunkciju uočeno je kako β -ciklodekstrinski ekstrakt učinkovitije smanjuje razine interleukina-6 i interleukina-8 induciranih djelovanjem proupalnog citokina TNF α u odnosu na ekstrakt pripremljen dekokcijom. U isto vrijeme, β -ciklodekstrinski ekstrakt snižava i bazalnu razinu interleukina-8 u netretiranim stanicama. Nadalje, β -ciklodekstrinski ekstrakt obnovio je ekspresiju endotelne NO sintetaze, smanjio bazalnu razinu enzima u netretiranim stanicama te snizio razinu interstaničnih adhezijskih molekula ICAM-1 potaknutim TNF α -om. Iz navedenih rezultata može se zaključiti kako β -ciklodekstrinski ekstrakt pruža protektivan učinak na endotelnu funkciju u većoj mjeri nego ekstrakt pripremljen dekokcijom, ne samo suprotstavljajući se štetnom i neželjenom učinku TNF α , već djelujući i na bazalnu ekspresiju ključnih molekula uključenih u vaskularnu homeostazu, stvarajući protuupalni i antiaterogeni učinak. UAE i β -ciklodekstrin sinergistički djeluju prilikom ekstrakcije i inkapsulacije polifenola, čak i pri sobnoj temperaturi. Inkluzijom s β -ciklodekstrinom povećana je topljivost, stabilnost, bioraspoloživost i isporuka bioaktivnih sastavnica ciljnim stanicama. Konačno, ultrazvučna ekstrakcija uz inkapsulaciju β -ciklodekstrinom metoda je koja štiti polifenole od

nepovoljnih uvjeta, poput oksidacije i termalne degradacije čime pridonosi bioraspoloživosti i biološkoj aktivnosti ekstrahiranih sastavnica (Mura i sur., 2015).

Ispitana je inkapsulacija bioaktivnih sastavnica ekstrahiranih iz cvijeta jasmina (*Jasminum officinale* L.) koristeći β -ciklodekstrin uz sušenje elektroraspršivanjem (Rahmam i sur., 2016). Elektroraspršivanje je jedna od novijih metoda koja se koristi u nanotehnologiji, a temelji se na stvaranju sfera iz polimernih tekućina u električnom polju visokog napona. Ova metoda odabrana je zbog osjetljivosti biljnog materijala na toplinu, visoke potrošnje energije i dugog vremena trajanja konvencionalnih metoda. Ekstrakcija je izvedena sonikacijom cvijeta jasmina u deioniziranoj vodi u trajanju od 10 minuta, uz pauze od 15 sekundi nakon svake minute kako bi se spriječio pretjerani razvitak topline tijekom procesa, s obzirom da ultrazvučni proces povećava temperaturu otopine zbog vibracija ultrazvučne sonde. Ekstrakt je centrifugiran kako bi se razdvojile veće i manje čestice. Miješanjem ekstrahiranih sastavnica jasmina i β -ciklodekstrina u masenom omjeru 10:1 pripremljena je otopina kompleksa. Elektroraspršivanjem su osušene čista otopina ekstrakta jasmina i otopina ekstrakta jasmina s β -ciklodekstrinom. Rezultati pokazuju da su čestice uzorka koji nije sadržavao β -ciklodekstrin porozne i niske sferičnosti te se nisu uspjele u potpunosti osušiti primjenom elektroraspršivanja. Međutim, čestice uzorka s β -ciklodekstrinom istaložene su u čvrstom stanju kao neporozni kristali, što upućuje na zaključak kako su ovom metodom sastavnice eteričnog ulja jasmina uspješno uklopljene u komplekse s β -ciklodekstrinom. Pri tome nastaju finije čestice koje pokazuju manju sklonost agregaciji. Jedan od razloga koji je pridonio uspješnijem formiranju čestica kod elektroraspršivanja otopine s ciklodekstrinom je u činjenici da je ona sadržavala manje vode (75% u odnosu na 85% za otopinu bez ciklodekstrina), pa je time i sam proces sušenja brži. Nadalje, inkluzija β -ciklodekstrinom pospješuje proces skrućivanja u odnosu na slobodni ekstrakt jasmina. Inkapsulacija ekstrakta jasmina s β -ciklodekstrinom dodatno je potvrđena usporedbom FTIR spektara ekstrakta jasmina sa i bez ciklodekstrina (Rahmam i sur., 2016).

Ultrazvučna ekstrakcija pomoću β -ciklodekstrina primijenjena je i u ekstrakciji antioksidativnih sastavnica timijana (*Thymus vulgaris* L.) (Favre i sur., 2018). Usitnjeni list timijana pomiješan je s vodenom otopinom β -ciklodekstrina (1:4) i podvrgnut ultrazvučnoj ekstrakciji. U procesu statističke optimizacije procesa ekstrakcije, kao neovisne varijable odabrane su vrijeme trajanja ekstrakcije (0,5-15 min), koncentracija β -ciklodekstrina (0-15 mM) i temperatura ekstrakcije (20-50°C). Nakon ekstrakcije ekstrakt je centrifugiran te je supernatant korišten za analizu. Najveći sadržaj polifenola (199,61 mg GAE/mL) i

antioksidativna snaga određena FRAP metodom (3,36 mg GAE/mL) uočeni su pri koncentraciji β -ciklodekstrina od 7,5 mM, vremenu ekstrakcije 7,7 min i pri temperaturi 35°C, dok je najveća antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom u iznosu od 16,14 mg GAE/mL uočena pri koncentraciji β -ciklodekstrina 0 mM, trajanju ekstrakcije 0,5 min i temperaturi od 35°C. Povećanjem temperature povećava se prinos ekstrakcije polifenola zbog povećanja topljivosti i difuzije bioaktivnih sastavnica. No, pri visokim temperaturama dolazi do stvaranja uvjeta u kojima može doći do razgradnje sastavnica i posljedičnog smanjenja antioksidativnog kapaciteta ekstrakta. Zbog zaštitne uloge β -ciklodekstrina prema termolabilnim sastavnicama, povećane koncentracije β -ciklodekstrina tijekom ultrazvučne ekstrakcije dozvoljavaju primjenu više temperature, što rezultira povećanjem prinosa ekstrahiranih polifenolnih sastavnica. Prilikom usporedbe različitih uvjeta koncentracije β -ciklodekstrina, temperature i trajanja ekstrakcijskog procesa može se zaključiti kako u prisutnosti β -ciklodekstrina, vrijeme trajanja ekstrakcije i temperatura značajno utječu na prinos polifenolnih sastavnica, antioksidativnu aktivnost i antioksidativnu snagu. Optimizacijom procesa određeno je kako koncentracija β -ciklodekstrina od 15 mM, trajanje procesa ekstrakcije 5,90 min i temperatura ekstrakcijskog procesa pri 36,6°C daju ukupni sadržaj polifenola od 189,3 mg GAE/mL, antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom od 14,8 mg GAE/mL i antioksidativnu snagu određenu FRAP metodom od 3,3 mg GAE/mL. Ekstrakcija korištenjem β -ciklodekstrina u odnosu na ekstrakciju vodom rezultirala je većim prinosom polifenola. Dodatno, bio je procijenjen utjecaj ekstrakta timijana na kinetiku Maillardove reakcije. Dokazano je da β -ciklodekstrin povećava stabilnost ekstrahiranih antioksidativnih sastavnica, no ne utječe na razvitak Maillardove reakcije. Međutim, prisutnost ekstrakta timijana značajno je inhibirao Maillardovu reakciju na visokim temperaturama. Koristeći β -ciklodekstrin i ultrazvučnu ekstrakciju optimizirana je ekstrakcija antioksidansa iz lista timijana te je osigurana učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda uz korištenje manje energije i otapala (Favre i sur., 2018).

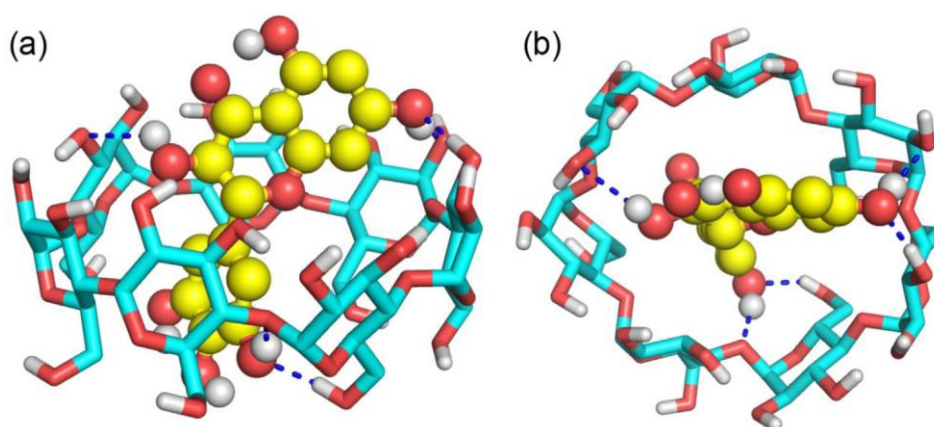
Crvena cikla (*Beta vulgaris* L.) biljka je koja sadrži visoku koncentraciju bioaktivnih sastavnica poput betalaina, polifenola, karotenoida i flavonoida koji su važni nutritivni izvori, ali i čimbenici zdravlja. Kao i većina sastavnica navedenih u prethodnim istraživanjima, betalaini i fenolne komponente, najvažniji sastojci cikle, izrazito su osjetljivi na temperaturu, pH, kisik i svjetlost koji dovode do njihove brze razgradnje. Bioaktivne sastavnice cikle ekstrahirane su primjenom ultrazvučne ekstrakcije koja povećava učinkovitost ekstrakcije stvaranjem kavitacija u ekstrakcijskom mediju koje dovode do ruptur staničnih stijenki unutar biljnog materijala, čime se olakšava penetracija otapala i prijenos mase, a primjenom vodene

otopine β -ciklodekstrina dodatno je povećana učinkovitost ekstrakcije (Tutunchi i sur., 2019). Nakon sušenja, cikla je samljevena u mlinu. Prah cikle pomiješan je s ekstrakcijskim otapalima (voda, 80% etanol, vodena otopina β -ciklodekstrina 1 i 5 %, etanolna otopina β -ciklodekstrina 1 i 5%). Ekstrakcija je provedena u omjeru 1:10 uz miješanje u trajanju od 3 h. Uzorci su nakon tretirani ultrazvučnim valovima pomoću ultrazvučne kupelji tijekom 30 min. Iscrpine su izdvojene centrifugiranjem te su osušene liofilizacijom. Rezultati FTIR analize pokazali su različitost spektara uzoraka koji su ekstrahirani β -ciklodekstrinom u odnosu na one ekstrahirane vodom te se povezuju s mogućim interakcijama između betalaina i β -ciklodekstrina. Naime, uočeno je kako određene skupine betalaina poput -OH, -COOH i -NH imaju sposobnost stvaranja vodikovih veza s -OH skupinama β -ciklodekstrina. Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom je pokazano kako kod uzorka ekstrahiranog 5%-tnom vodenom otopinom β -ciklodekstrina dolazi do nestanka pikova prisutnih u uzorcima pripremljenih prilikom ekstrakcije vodom. Osim toga, uočen je novi pik pri višoj temperaturi, što ukazuje na stvaranja supramolekularne strukture između sastavnica crvene cikle i β -ciklodekstrina. Nestajanje endotermnog pika povezano je s taljenjem sastavnica ekstrakta u prisutnosti β -ciklodekstrina pri čemu se potvrđuje nastanak kompleksa između sastavnica ekstrakta i β -ciklodekstrina. Stvaranjem kompleksa zaštićuju se sastavnice od termalne degradacije. Nadalje, dodatkom β -ciklodekstrina u ekstrakcijsku otopinu značajno se poboljšao stupanj ekstrakcije betalainskih sastavnica. Hidrofilne sastavnice poput betalaina vežu se na vanjsku površinu β -ciklodekstrina vodikovim vezama, čime se povećava stabilnost betanina tijekom procesa ekstrakcije, a samim time i učinkovitost ekstrakcije. Ukupni sadržaj polifenola iznosio je $11,88 \pm 1,43$ mg GAE/g DW, dok je dodatak 1 i 5% β -ciklodekstrina značajno povećao ukupni sadržaj polifenola na $15,80 \pm 1,40$ i $20,03 \pm 1,28$ mg GAE/g DW. Međutim, ekstrakcijom etanolom ukupni sadržaj polifenola iznosio je $9,53 \pm 1,08$ mg GAE/g DW te $14,74 \pm 1,63$ i $16,41 \pm 2,13$ mg GAE/g DW dodatkom 1 i 5%-tne otopine β -ciklodekstrina. Čini se kako se povećanjem koncentracije β -ciklodekstrina povećava prinos polifenolnih sastavnica u vodenom i etanolnom mediju zbog povećanja topljivosti i stabilnosti fenolnih sastavnica tijekom procesa ekstrakcije. Određivanjem antiradikalne aktivnosti uočeno je kako je najniža antiradikalna aktivnost primijećena kod čistog etanolnog ekstrakta ($30,53 \pm 3,54\%$), dok se dodatkom β -ciklodekstrina antiradikalna aktivnost značajno povećala te je najveća bila prilikom ekstrakcije 5%-tnom vodenom otopinom β -ciklodekstrina i iznosila $59,87 \pm 4,94\%$. Povećanje antiradikalne aktivnosti povezano je s nekoliko mehanizama: interakcijom β -ciklodekstrina s betalainskim sastavnica čime se povećava učinkovitost ekstrakcije, povećanjem učinkovitosti ekstrakcije polifenola zbog nastajanja inkluzijskih kompleksa i povećanjem njihove stabilnosti te

povećanjem stabilnosti betalaina i fenolnih sastavnica tijekom procesa ekstrakcije. Niži stupanj ekstrakcije i antiradikalna aktivnost ekstrahiranih sastavnica u etanolnoj otopini rezultat je višeg afiniteta betalaina prema hidrofilnoj okolini zbog njihove visoke polarnosti. Primjena β -ciklodekstrina ima pozitivan utjecaj i na kemijsku stabilnost pripremljenih ekstrakata cikla. Stabilnost betanina tijekom skladištenja zavisi o pH, temperaturi, aktivnosti vode i matriksu hrane u kojoj je sadržan. Prilikom ispitivanja stabilnosti betanina pri različitim temperaturama i pH tijekom 28 dana, uočeno je kako je stabilnost betanina ekstrahiranih β -ciklodekstrinom značajno veća nego u uzorcima s vodom ili etanolom. Nadalje, stabilnost se povećava proporcionalno povećanju koncentracije β -ciklodekstrina. Povećanje stabilnosti povezano je sa smanjenjem aktivnosti vode stvaranjem vodikovih veza od strane polarnih skupina β -ciklodekstrina. Također, pokazano je da primjena β -ciklodekstrina značajno pridonosi stabilnosti polifenolnih sastavnica u ekstraktu. Nadalje, β -ciklodekstrin pridonosi antiradikalnoj aktivnosti uzoraka te oni pokazuju značajno veću aktivnost u odnosu na uzorke ekstrahirane vodom ili etanolom. Antiradikalna aktivnost ekstrakta crvene cikla ovisi o sadržaju betalaina i ukupnom sadržaju fenolnih sastavnica. Pri različitim uvjetima temperature, pH i aktivnosti vode dolazi do njihove razgradnje, a samim time i smanjenja antiradikalne aktivnosti. Nastajanjem inkluzijskih kompleksa s β -ciklodekstrinom, fenolne sastavnice ekstrakta zaštićene su od razgradnje (Tutunchi i sur., 2019).

Dihidromiricetin glavna je flavonoidna sastavnica kineske biljke lozarovac (*Amelopsis grossedentata* L.). Dihidromiricetin posjeduje širok spektar različitih bioloških aktivnosti, poput kardioprotektivnog, protuupalnog, antimikrobnog, hepatoprotektivnog, antikancerogenog i antioksidativnog te pomaže u smanjivanju kašlja. Wang i sur. (2019) proveli su ekstrakciju dihidromiricetina pri 55°C koristeći ultrazvučni procesor opremljen ultrazvučnom sondom. Prah uzorka je dodano ekstrakcijsko otapalo (1:20) koje je uključivalo vodu, 70% etanol, vodenu otopinu β -ciklodekstrina i ionsku tekućinu. Ionska tekućina je smjesa organskih soli koje se tale pri temperaturi nižoj od 100°C. Zbog neznatne hlapljivosti, nezapaljivosti, velike toplinske, kemijske i elektrokemijske stabilnosti te posebice mogućnosti regeneracije, posljednjih godina intenzivno se proučavaju kao zelena zamjena za sveprisutna tradicionalna škodljiva otapala (Bubalo i sur., 2014). Ekstrakcija je provedena u neutralnom pH području. Nakon ekstrakcije u trajanju od 10 minuta, ekstrakt je odvojen od biljnog materijala centrifugom, filtriran i korišten za daljnje istraživanje. Primjenom β -ciklodekstrina u koncentraciji do 3% povećao se prinos dihidromiricetina. Smatra se da inkapsulacija dihidromiricetina s β -ciklodekstrinom povećava njegovu topljivost u vodi i stabilnost, kao i

zaštitu od oksidacije tijekom ekstrakcije. Daljnjim povećanjem koncentracije prinos se smanjio zbog povećane viskoznosti vodene otopine koja posljedično sprečava otapanje dihidromiricetina. Upotrebom ultrazvučne ekstrakcije dodatno se povećao prinos dihidromiricetina. Povećanjem duljine trajanja ultrazvučne ekstrakcije do 8 minuta povećava se prinos, nakon čega prinos dihidromiricetina ostaje nepromijenjen. To se pripisuje nestabilnosti dihidromiricetina tijekom duljeg vremena ekstrakcije i višoj temperaturi. Zbog toga, pri duljoj ekstrakciji raste udio razgradnih produkata, a kvaliteta uzorka se smanjuje. Omjer čvrsto-tekuće također je bitan čimbenik ekstrakcije. Minimalna količina otapala je ona koja je dovoljna da se materijal uzorka u potpunosti navlaži. Daljnjim povećanjem količine otapala raste koncentracijski gradijent i otapanje sastavnica materijala postaje sve lakše. Uočeno je kako je kod omjera čvrste i tekuće faze od 0,03 g/mL otapanje dihidromiricetina gotovo potpuno, stoga je ta koncentracija odabrana kao optimalna. Nadalje, promatran je učinak ultrazvučne snage na uspješnost ekstrakcije. Uočeno je kako povećanje snage do 420 W uzrokuje povećanje prinosa dihidromiricetina, nakon čega se prinos smanjuje jer prevelik intenzitet ultrazvuka dovodi do razgradnje dihidromiricetina. Primjenom tehnike molekularnog modeliranja istražen je način povezivanja dihidromiricetina i β -ciklodekstrina. Shematski prikaz vezanja dihidromiricetina i ciklodekstrina prikazan je na Slici 2. Dihidromiricetiske molekule se dobro uklapaju u šupljinu β -ciklodekstrina pri čemu dolazi do nastajanja pet vodikovih veza uz energiju vezanja od -6,0 kcal/mol. Pri tome, benzopiranski dio dihidromiricetina stvara vodikove veze s β -ciklodekstrinom, dok elektrostatske interakcije nisu uočene s obzirom da su dihidromiricetin i β -ciklodekstrin elektrostatski neutralne molekule.



Slika 2. Shematski prikaz optimalnog vezanja CD i DMY. Glavni prikaz (a) i prikaz odozgor (b). Žuta boja predstavlja DMY, plava β -CD, iscrtane plave linije predstavljaju vodikove veze (preuzeto i prilagođeno iz (Wang i sur., 2019) uz dopuštenje izdavača)

Istovremena primjena ultrazvukova i β -ciklodekstrina pokazala je veću učinkovitost ekstrakcije dihidromiricetina u usporedbi s metodom baziranom na konvencionalnim otapalima. Razvijena metoda je ekološki prihvatljiva s obzirom da koristi nezapaljiva i netoksična otapala, a u isto vrijeme može povećati stabilnost, topljivost i bioraspoloživost bioaktivnih sastavnica biljnog materijala (Wang i sur., 2019).

Danas se mnoga istraživanja okreću novim, ekonomski prihvatljivim prirodnim bioaktivnim sastavnicama te se sve više shvaća ozbiljnost agrikulturalnog otpada. Primjerice, u Iranu 35% poljoprivredne produkcije pretvoreno je u otpad koji sadrži bioaktivne sastavnice s pozitivnim učinkom na zdravlje. Više od 60% ploda nara (*Punica granatum* L.) prilikom obrade postaje otpad. Kora nara sadrži fenolne sastavnice koje imaju brojne terapijske učinke poput antikancerogenog, protuupalnog, antidijabetičkog, a djeluje pozitivno na rad bubrega. Kalantari i sur. (2020) opisali su ultrazvučnu ekstrakciju polifenolnih sastavnica otpada nara primjenom β -ciklodekstrina. Otopina β -ciklodekstrina zamijenila je tradicionalna organska otapala čime se upotreba potencijalno štetnih kemijskih tvari svela na minimum. U isto vrijeme, primjenom β -ciklodekstrina izbjegla se mogućnost kontaminacije konačnog produkta. Primjenom ultrazvuka povećana je učinkovitost ekstrakcije uz istovremeno smanjenje njezinog trajanja. Ekstrakcija je provedena korištenjem ultrazvučne kupelji koja je generirala ultrazvukove frekvencije 40 KHz i snage 100 W. Tijekom ekstrakcije, varirana je količina ciklodekstrina u ekstrakcijskom mediju (0, 0,9, 1,8%), a omjer biljnog materijala (usitnjena osušena kora nara) i ekstrakcijske tekućine bio je konstantan (1:10). U ispitivanju je varirano vrijeme i temperatura pri kojoj je ekstrakcija provedena. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je odvojen centrifugiranjem. Istraživan je učinak različitih parametara na uspješnost ekstrakcije bioaktivnih sastavnica. Koncentracija β -ciklodekstrina i temperatura linearno su povezani s učinkovitošću ekstrakcije fenolnih sastavnica i antocijanina, pri čemu je značajniji učinak uočen promjenom koncentracije β -ciklodekstrina. Povećanjem temperature s 30°C na 50°C uočeno je povećanje sadržaja fenolnih sastavnica zbog utjecaja temperature na hidrolizu fenolnih sastavnica iz spojeva s proteinima i polisaharidima te pozitivnog učinka temperature na otapanje fenolnih sastavnica. Nadalje, povećanjem temperature dolazi do raspada teških polifenolnih lanaca u niskomolekularne, čime se povećava njihova difuzibilnost i topljivost u vodi. Povećanje temperature do 70°C dovodi do smanjenja sadržaja fenolnih sastavnica zbog polimerizacije fenolnih sastavnica koja je favorizirana pri višim temperaturama. Dodatno, pri povišenim temperaturama dolazi do raspadanja fenolnih sastavnica. Promatranjem utjecaja vremena na učinkovitost ekstrakcije uočeno je kako se povećanjem vremena povećava količina ekstrahiranih fenolnih sastavnica. Međutim, učinak

vremena nije bio značajan jer nakon određenog vremena dolazi do zasićenja otapala ekstrahiranim sastavnicama. Također, povećanjem duljine trajanja ekstrakcije može doći do smanjenja sadržaja sastavnica jer je kemijska stabilnost sastavnica smanjena uslijed povišene temperature i nepovoljnog utjecaja ultrazvučnih valova. Najveći sadržaj fenolnih sastavnica izoliran je prilikom ekstrakcije 1,8%-tnom otopinom β -ciklodekstrina. Inkluzijom polifenola u lipofilnu šupljinu β -ciklodekstrina povećava se njihova topljivost u vodi, a mijenja se permeabilnost, topljivost i bioraspoloživosti ekstrahiranih sastavnica. Ispitivan je utjecaj različitih uvjeta na sadržaj ukupnih fenola u pripremljenim ekstraktima. Najveći sadržaj polifenola od 163,09 mg GAE/g DW (eng. *dry weight basis*) ostvaren je ekstrakcijom pri 50°C u trajanju 10 minuta i koncentraciji β -ciklodekstrina od 1,8%, a učinkovitost ekstrakcije iznosila je 67,31%. Najveći sadržaj antocijanina uočen je pri ekstrakciji koja je provedena na 50°C, tijekom 25 minuta uz 0,9% β -ciklodekstrina, a iznosio je 0,76 mg C-3-gE/g DW. Promatranjem učinka istih parametara na ukupni sadržaj flavonoida i flavonola uočena je slična povezanost, pri čemu temperatura ima značajniji učinak na ekstrakcije ovih sastavnica od koncentracije β -ciklodekstrina. Najveći sadržaj ukupnih flavonoida u iznosu 104,18 mg QE/g DW i učinkovitost ekstrakcije 9,97% zabilježeni su tijekom ekstrakcije pri 50°C, 40 minuta i koncentraciji β -ciklodekstrina od 1,8%, dok su najveći sadržaj ukupnih flavonola od 88,54 mg QE/g DW i 74,70%-tna učinkovitost ekstrakcije uočeni pri ekstrakciji koja je provedena na 50°C, 40 minuta i 1,8%-tnoj koncentraciji β -ciklodekstrina. Visok sadržaj fenolnih sastavnica kore nara u ekstraktu povezuje se s njegovom visokom antioksidativnom aktivnosti. Hidroksilne skupine fenolnih sastavnica imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala i mogu služiti kao nositelji vodika ili elektrona. Topljivost polifenolnih sastavnica u vodi povećava se dodatkom β -ciklodekstrina. Povećanje topljivosti u vodi može biti uzrok njihove povećane antioksidativne aktivnosti. Najveća sposobnost hvatanja peroksidnog radikala (eng. *Hydrogen Peroxide Radical scavenging activity*) (23,06%) uočena je za ekstrakte pripremljene pri 50°C, 10min i koncentraciji β -ciklodekstrina od 1,8%, dok je najveća sposobnost hvatanja DPPH radikala (eng. *DPPH Radical scavenging activity*) (80,04%) uočena za ekstrakt pripremljen pri 50°C, 10 minuta uz 1,8%-tnu koncentraciju β -ciklodekstrina. Kao optimizirani uvjeti ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih sastavnica iz kore nara prepoznati su temperatura od 55,76°C, vrijeme 15,38 minuta i koncentracija β -ciklodekstrina od 1,8%. Ukupni sadržaj polifenola, flavonoida i flavonola u ekstraktu koji je pripremljen primjenom optimalnih uvjeta iznosio je 158,08 mg GAE/g DW, 82,31 mg QE/g DW i 69,46 mg QE/g DW s učinkovitosti ekstrakcije 65,24%, 60,36% i 58,56%, dok je ukupni sadržaj antocijanina iznosio 0,53 mg C-3-gE/g DW s učinkovitosti ekstrakcije 42,64%. Antioksidativni učinak prema radikalnu vodikovog peroksida

i DPPH iznosio je 22,93% i 74,49%. „Zelena“ tehnologija koristeći ultrazvučnu ekstrakciju i β -ciklodekstrine primjer je ekonomski i ekološki prihvatljive metode te predstavlja alternativni način ekstrakcije bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala (Kalantari i sur., 2020).

4.1.3. Ekstrakcija mikrovalnom metodom uz primjenu β -ciklodekstrina

Resveratrol, ne flavonoidni polifenol, prisutan je u različitim biljkama. Resveratrol pokazuje pozitivne učinke u prevenciji i liječenju različitih bolesti, poput prevencije melanoma ili liječenja proupalnih bolesti, primjerice psorijaze. Resveratrol je ekstrahiran iz kožice grožđa vinove loze *Vitis vinifera* te je prisutan u dvije izoforme, *trans* i *cis*-resveratrol. *Trans*-resveratrol inhibira kemijski uzrokovanu tumorigenezu kože smanjenjem stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva. Međutim, zbog loše topljivosti, kemijske nestabilnosti i loše bioraspoloživosti *trans*-resveratrola nastoje se razviti nove formulacije koje rješavaju navedene probleme. Razvitak proizvoda koji sadrže resveratrol namijenjen za topikalnu primjenu u kozmetičke i terapijske svrhe zahtjeva detaljnu optimizaciju kako bi se osigurao visok stupanj permeacije i nakupljanja u ciljnom tkivu, ali i zadržavanja resveratrola u *trans* obliku koji pokazuje veću farmakološku aktivnost. Kako bi se ispitala mogućnost pripreme novih formulacija, Moyano-Mendez i sur. (2014) istraživali su mogućnost pripreme binarnih sustava s β -ciklodekstrinom te stvaranje binarnog sustava s polietilenglikolom (PEG 15000 Da) na učinkovitost primjene resveratrola u lipofilnoj kremi. Inkluzijski kompleks β -ciklodekstrina pripremljen je primjenom mikrovalova. *Trans*-resveratrol pomiješan je s β -ciklodekstrinom u omjeru 1:1 u vodenom mediju. Nastali sadržaj tretiran je 90 sekundi mikrovalovima snage 450W te osušen u vakuumu. U prethodnim istraživanjima uočen je linearan porast topljivosti *trans*-resveratrola povećanjem koncentracije β -ciklodekstrina do 1,3%, nakon čega topljivost ostaje jednaka. *Trans*-resveratrol je od mikrokristalični prah koji se tali pri 270°C. Primjenom termalne mikroskopije pokazano je da u fizičkoj smjesi *trans*-resveratrol/ β -ciklodekstrin mikrokristali *trans*-resveratrola prijanjaju na površinu prizama β -ciklodekstrina, a nakon zagrijavanja na 270°C uočeno je taljenje djelatne tvari. No, inkluzijski kompleksi pokazuju drugačije ponašanje prilikom zagrijavanja. Uzorak se nakon zagrijavanja na 300°C tali i raspada što indirektno potvrđuje nastanak nove čvrste faze nakon tretmana resveratrola i β -ciklodekstrina mikrovalovima. Nadalje, proučavanjem FTIR spektra *trans*-resveratrol/ β -ciklodekstrin sustava zabilježeno je povećanje intenziteta karakterističnih vrpca *trans*-

resveratrola u kompleksu nastalom mikrovalnim zračenjem. Dobiveni rezultati upućuju da se stvaranjem inkluzijskog kompleksa nije utjecalo na vibracijsku slobodu veza *trans*-resveratrola. Nadalje, istraživana je protektivni učinak resveratrola na oksidacijski stres u ljudskim keratinocitima. Nakon izlaganja HaCaT stanica vodikovom peroksidu (3% v/v) došlo je do naglog povećanja stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Inkubacija HaCaT stanica s resveratrolom rezultirala je značajnim smanjenjem stvaranja ROS-a za $32,26 \pm 0,34\%$, dok je prilikom inkubacije s binarnim sustavom resveratrol/ β -ciklodekstrin došlo do smanjenja nastanka ROS-a za $61,82 \pm 0,22\%$. Temeljem dobivenih rezultata binarni sustav resveratrol/ β -ciklodekstrin je formuliran kao V/U krema te je u kliničkom ispitivanju procijenjen njegov učinak na kožu. Osim u obliku inkluzijskog kompleksa, resveratrol je u kremu dodan i u slobodnom obliku te se procjenjivala učinkovitost dviju formulacija. Dobrovoljci su svaki od pripravaka nanosili na polovicu lica, a nakon 30 dana tretmana mjerio se stupanj hidratacije, elastičnost i sjaj kože. Primjena kreme s resveratrolom u slobodnom obliku rezultirala je poboljšanjem svih praćenih parametara nakon 30 dana. Tako su stupanj hidratacije, elastičnosti i sjaj kože povećani za oko 20,53%, 49,70% i 6,17%. No, primjena kreme koja je sadržavala resveratrol u obliku inkluzijskog kompleksa pokazala se učinkovitijom te je za iste parametre stanja kože zabilježeno povećanje od otprilike 28,58%, 57,43% i 8,70%. Nadalje, kompleksacija resveratrola s β -ciklodekstrinom rezultira većom antioksidativnom aktivnosti resveratrola koja je ovisna o koncentraciji β -ciklodekstrina. Stoga se pretpostavlja kako β -ciklodekstrin štiti resveratrol od oksidacije u prisutnosti slobodnih radikala. Dodatno, prisutnost stacionarnog vodenog difuzijskog sloja može utjecati na smanjenje difuzije aktivne tvari te njihovu apsorpciju. Inkapsulacija s β -ciklodekstrinom omogućuje povećanu difuziju resveratrola kroz barijerni sloj. Iako su molekularni mehanizmi kompleksiranja resveratrola s β -ciklodekstrinom još uvijek nepoznati, rezultati ove studije ukazuju na učinkovitost resveratrola u novim formulacijama (Moyano-Mendez i sur., 2014).

4.2. Ekstrakcijski postupci primjenom derivata β -ciklodekstrina

Kemijskom modifikacijom nativnih α , β i γ -ciklodekstrina omogućen je razvitak derivata ciklodekstrina s različitim fizičko-kemijskim te biološkim svojstvima. Danas je dostupno više od 1500 različitih derivata ciklodekstrina. Najpoznatiji derivat ciklodekstrina u upotrebi jest 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP β CD). HP β CD odlikuje se izvrsnom topljivosti u vodi i sposobnošću otapanja te dobrom podnošljivošću *in vivo*. Također, odobren

je od strane FDA (eng. *Food and Drug Administration*) kao pomoćna tvar prikladna čak i za parenteralnu primjenu. Nadalje, metilirani ciklodekstrini (MCD) čest su primjer derivata ciklodekstrina od kojih je najčešće korišten RAMEB (eng. *Randomly methylated β -cyclodextrin*) koji je česta pomoćna tvar odobrena u kozmetici (Braga i Pais, 2018). U navedenom poglavlju bit će razmatrana učinkovitost i uspješnost ekstrakcije pojedinih bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala koristeći derivate β -ciklodekstrina, HP β CD i M β CD različitim ekstrakcijskim metodama.

4.2.1. Ekstrakcijski postupci primjenom HP β CD

4.2.1.1. Ekstrakcija konvencionalnim metodama uz primjenu HP β CD

List masline (*Olea europaea* L.) bogat je i jeftin izvor polifenolnih sastavnica od kojih su najzastupljeniji sekoiridoidi. Glavni predstavnik sekoiridoida, oleuropein, zaslužan je za gorak okus i oštru aromu maslinovog ulja. Nadalje, oleuropein ispoljava antitumorska, antimikrobna, antiaterogena, kardioprotektivna i protuupalna svojstva, kao i mnoga druga s povoljnim učinkom na zdravlje. Alternativna, „zelena“ otapala, poput glicerola i ciklodekstrina, smanjuju toksičnost ekstrakcije, posjeduju nisku zapaljivost i smanjuju energiju sustava te su uočeni kao potencijalna otapala u procesu ekstrakcije. Mourtzinou i sur. (2016) ispitali su učinkovitost ekstrakcije i odredili optimalne uvjete prilikom ekstrakcije polifenola iz lista masline, koristeći terciarni sustav voda/glicerol/HP β CD. Usitnjeni prah lista masline pomiješan je s različitim koncentracijama vode (40-100%), glicerola (0-60%) i HP β CD (1-13%). Materijal je ekstrahiran miješanjem tijekom 180 minuta uz zagrijavanje u vodenoj kupelji pri različitim temperaturama (40, 60, 80 \pm 1°C). Ekstrakt je potom izdvojen centrifugiranjem. Rezultati istraživanja pokazali su kako su maksimalan prinos u iznosu od 54,33 mg GAE/g DW (eng. *dry weight*) i antioksidativna aktivnost od 352,72 μ mol TRE/g DW oleuropeina zabilježeni pri koncentraciji glicerola od 60%, koncentraciji HP β CD od 7% i temperaturi pri 60°C. Daljnjim ispitivanjem uočeno je kako se sadržaj polifenola smanjio ukoliko je ekstrakcija provedena pri temperaturi višoj od 70°C zbog razgradnje i/ili modifikacije polifenola te mogućih interakcija s drugim sastavnicama biljnog materijala. Nadalje, sadržaj glicerola ne bi smio prelaziti 60% jer iznad navedene koncentracije povećana viskoznost otopine ne dozvoljava otapanje ciklodekstrina. Dodatkom HP β CD dolazi do stvaranja inkluzijskog kompleksa s oleuropeinom u stehiometrijskom omjeru 1:2, pri čemu jedna molekula HP β CD

veže dvije molekule oleuropeina. Prilikom korištenja mješavine ciklodekstrina s voda/glicerol sustavom zabilježen je značajno viši prinos u odnosu na ekstrakcije mješavinom voda/glicerol bez ciklodekstrina kao kootapala, zbog istovremene ekstrakcije i inkapsulacije polifenola lista masline. Stvaranjem inkluzijskih kompleksa ciklodekstrini povećavaju topljivost u vodi ekstrahiranih sastavnica ne mijenjajući pritom fenolni profil ekstrahiranih sastavnica. Inkapsulacija polifenola HP β CD pruža mnogobrojne prednosti poput povećane učinkovitosti ekstrakcije zbog povećanja topljivosti u vodi, zaštite od oksidacije i razgradnje svjetlošću ili toplinom. Zaključno, korištenjem ciklodekstrina osigurana je ekološki prihvatljiva metoda ekstrakcije uz smanjenje korištenja petrokemikalija (Mourtzinis i sur., 2016).

Mourtzinis i sur. (2018) proveli su ekološki prihvatljivu i netoksičnu ekstrakciju polifenola iz otpada nastalog tijekom proizvodnje ulja konoplje (*Cannabis sativa* L.) vodenom otopinom HP β CD. Uzorak za ekstrakciju dobiven je hladnim tiještenjem sjemenki konoplje te naknadnim mljevenjem kako bi se dobilo brašno konoplje s česticama veličine >350 μ m. Čvrsti uzorak nusprodukta konoplje pomiješan je s otapalom koje je sadržavalo različite koncentracije ciklodekstrina (1-40%) u različitim omjerima (1/15, 2-1/5, 0 g/mL). Ekstrakcija je provedena uz miješanje pri različitim temperaturama (20-60°C) te uz različito vrijeme trajanja ekstrakcije (15-180 min). Ekstrakti su potom odvojeni centrifugom. Promatranjem utjecaja temperature na prinos polifenola i antioksidativnu aktivnost uočeno je kako povećanje temperature do 52°C dovodi do povećanja vrijednosti prinosa i antioksidativne aktivnosti zbog ubrzanog mekšanja i bubrenja materijala te povećane topljivosti i difuzivnosti ekstrahiranih sastavnica. Topljivost polifenola je endoterma proces koji je termodinamički favoriziran povećanjem temperature. No, daljnjim povećanjem temperature prinos i antioksidativna aktivnost se smanjuju zbog razgradnje polifenola, ali i zbog isparavanja otapala te veće potrošnje energije i ekstrakcije neželjenog materijala. Povećanjem temperature od 28°C do 52°C nije zabilježena značajnija promjena prinosa, zbog čega je 28°C odabrana kao optimalna temperatura s odgovarajućim prinosom, uz smanjenu potrošnju energije. Promatranjem učinka koncentracije HP β CD na prinos polifenola i antioksidativnu aktivnost, uočeno je kako je optimalna koncentracija HP β CD 32,1%. Povećanje koncentracije HP β CD omogućilo je uklapanje veće količine polifenola u šupljinu ciklodekstrina, što je dovelo do povećanja topljivosti polifenolnih sastavnica, a time i većeg prinosa i izraženije antioksidativne aktivnosti. Nadalje, vrlo je bitan korak optimizacija omjera biljnog materijala i ekstrakcijskog sredstva prilikom ekstrakcije polifenolnih sastavnica. Višak otapala nema značajnu ulogu u povećanju prinosa ekstrakcije, već može rezultirati dodatnim stvaranjem otpada. Smanjenje omjera čvrste i tekuće faze rezultira povećanom

učinkovitosti ekstrakcije zbog povećanja koncentracijskog gradijenta koji definira prijenos mase. Optimalan omjer čvrste i tekuće faze je 1/15,2 g/mL. Kako bi se dodatno promotrio učinak ciklodekstrina na učinkovitost ekstrakcije, ekstrakcija HP β CD je uspoređena s konvencionalnim ekstrakcijama metanolom, etanolom i vodom, pri jednakim uvjetima. Antioksidativna aktivnost ekstrakta s HP β CD pri optimalnim uvjetima iznosila je 12,4 μ mol TRE/g DW, što je u usporedbi s metanolom, etanolom i vodom 43, 76, odnosno 90% veća aktivnost. Zahvaljujući inkapsulaciji polifenola HP β CD, ekstrakt vodenom otopinom HP β CD pokazao je veću stabilnost, disperzibilnost i antioksidativnu sposobnost. Nadalje, korištenje ciklodekstrina omogućilo je smanjenje utroška energije, korištenje ekološki prihvatljivog otapala i ekstrakciju bez onečišćenja. Promatrajući rezultate istraživanja može se zaključiti kako se čvrsti otpad konoplje može smatrati bogatim izvorom bioaktivnih sastavnica s visokim potencijalom razvika bioaktivnih formulacija u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Mourtzinis i sur., 2018).

U mnogim dosad razmatranim istraživanjima uočeno je kako je otpad vrlo često primarni izvor materijala potrebnog za izolaciju vrijednih bioaktivnih sastavnica. Lakka i sur. (2020) također su uočili izrazitu vrijednost nusprodukata nastalih procesuiranjem kore krumpira (*Solanum tuberosum* L.). Korištenjem ciklodekstrina povećala se učinkovitost ekstrakcije i antioksidativna aktivnost, stabilnost i bioraspoloživost ekstrahiranih sastavnica te se skratilo trajanje ekstrakcijskog postupka. Ekstrakcija je provedena miješanjem uzorka s vodenom otopinom HP β CD u različitim koncentracijama (0-8 mM) pri sobnoj temperaturi ($29 \pm 2^\circ\text{C}$) na magnetskoj miješalici u trajanju od 150 minuta. pH ekstrakcijskog medija podešen je 2M NaOH nakon dodatka citrične kiseline (1 g/L). Kontrolni uzorci pripremljeni su ekstrakcijama 60%-tnim etanolom i 60%-tnim metanolom. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je odvojen centrifugiranjem te su uzorci skladišteni. Promatranjem učinka koncentracije na prinos ekstrahiranih sastavnica uočeno je kako povećanje koncentracije HP β CD do 0,5 mM rezultira značajnim povećanjem prinosa ekstrahiranih sastavnica, nakon čega ne dolazi do značajnijeg porasta prinosa, stoga se koncentracija HP β CD od 0,5 mM smatra optimalnom koncentracijom tijekom ekstrakcije kore krumpira s prinosom polifenola od $16,86 \pm 1,75$ mg ekvivalenta klorogene kiseline/g suhe mase pri pH 5,0, omjeru tekuće i čvrste faze 80 mL/g i 800 rpm. Nadalje, temperatura doseže 30°C tijekom ekstrakcije polifenolnih sastavnica. Povećanje temperature iznad 30°C ne utječe na ekstrakciju polifenola u prisutnosti HP β CD. Usporedbom prinosa polifenolnih sastavnica ekstrahiranih HP β CD s konvencionalnim otapalima uočeno je kako ekstrakcija HP β CD ostvaruje otprilike 19% veći prinos nego 60% etanol i 21% veći prinos u usporedbi s 60%

metanolom, dok su antioksidativne aktivnosti ekstrahiranih sastavnica bile slične. Zaključno, uz optimizirane uvjete prinos polifenola i antioksidativna aktivnost jednaki su, ako ne i viši ekstrakcijom vodenom otopinom HP β CD u odnosu na ekstrakciju konvencionalnim otapalima. Nedostaci ekstrakcije vodenom otopinom HP β CD koji su uočeni tijekom istraživanja su moguće interakcije i nekompatibilnost HP β CD s određenim sastavnicama hrane ili kozmetike, primjerice onima koji sadrže visok udio masti te viša cijena metode u odnosu na postupke koji uključuju jeftina konvencionalna otapala. Međutim, korištenje HP β CD predstavlja netoksičnu i ekološki prihvatljivu metodu. Nadalje, ciklodekstrini imaju status GRAS namirnica te stoga nije potreban dodatan utrošak energije i vremena na pročišćavanje i odvajanje ekstrahiranih sastavnica od ciklodekstrina, već je omogućeno trenutačno uklapanje u ciljani pripravak (Lakka i sur., 2020).

4.2.2. Ekstrakcijski postupci primjenom M β CD

4.2.2.1. Ekstrakcija konvencionalnim metodama uz primjenu M β CD

Matična mliječ produkt je pčela bogat proteinima, vitaminima i fenolnim sastavnicama koji su prirodni antioksidansi te pridonose nutritivnoj i funkcionalnoj vrijednosti matične mliječi. Danas se matična mliječ sve intenzivnije koristi, zbog njene sposobnosti suzbijanja reaktivnih kisikovih vrsta te prevencije i liječenja različitih bolesti poput karcinoma, dijabetesa, hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti. Kowalski i Lukaszewicz (2017) ispitali su i optimizirali ekstrakciju bioaktivnih sastavnica iz matične mliječi koristeći reaktivnu ekstrakcijsku tehniku. Reaktivna ekstrakcijska tehnika obuhvaća proces u kojem je prijenos mase dodatno pojačan koristeći mehanizam koji uključuje reverzibilnu reakciju između ekstrahiranih sastavnica i kemijskih sastavnica koje su sadržane u ekstraktantu ili su njegov dio. Jedna od navedenih reakcija može biti i reakcija stvaranja inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinom. U istraživanju je korišten RMCD (eng. *Randomly methylated cyclodextrin*) otopljen u vodi, etanolu te mješavini vode i etanola. U prvom koraku, istražen je učinak četiri neovisna faktora; koncentracije RMCD (0-15 mmol/L), koncentracije etanola (0-97%), temperature (30-60°C) i vremena ekstrakcije (1-24h) na učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih sastavnica iz matične mliječi. U idućem eksperimentu, izvedena je ekstrakcija jednakom koncentracijom RMCD pri jednakoj temperaturi i duljini trajanja ekstrakcije, ali je ekstrakcija izvedena u vodi ili 97%-tnom etanolu. U svim navedenim eksperimentima korišteno je 2 g uzorka matične mliječi i 20

mL otapala. Uočeno je kako najznačajniji učinak na učinkovitost ekstrakcije pokazuje koncentracija alkohola i duljina trajanja ekstrakcije. Razlog veće ovisnosti učinkovitosti ekstrakcije o koncentraciji alkohola jest zbog niže dielektrične konstante alkohola od vode, a samim time i niže polarnosti. Niža polarnost alkohola omogućuje nepolarnim sastavnicama matične mliječi učinkovitiju ekstrakciju nego vodeni sustavi. Nadalje, uočeno je kako prisutnost RMCD statistički značajno utječe na povećanje prinosa sadržaja fenolnih sastavnica. Međutim, iako se povećanjem koncentracije RMCD i produljenjem trajanja ekstrakcije povećao ukupni sadržaj fenolnih sastavnica, antioksidativna aktivnost ekstrahiranih sastavnica se smanjila. Ovaj fenomen može se objasniti promatrajući geometriju nastalog kompleksa između ciklodekstrina i bioaktivnih sastavnica. Fenolne sastavnice stvaranjem kompleksa povećavaju ukupni sadržaj fenola određen analitičkom metodom, no postaju manje dostupne za uklanjanje slobodnih radikala. Stoga, prisutnost ciklodekstrina povećava topljivost fenolnih sastavnica, no nastali kompleks ispoljava manju aktivnost zbog ometanja funkcionalnih skupina bioaktivnih sastavnica od strane ciklodekstrina. Nadalje, proučavani su rezultati ekstrakcija bioaktivnih sastavnica iz matične mliječi korištenjem vodene i etanolne otopine RMCD. U slučaju ekstrakcije vodenom otopinom RMCD uočeno je kako koncentracija RMCD ima ključan učinak na ukupni sadržaj polifenola te anti-radikalnu aktivnost ekstrakta. Ukoliko se izostavi otapalo niske polarnosti, inkapsulacija ciklodekstrinima glavna je pokretačka snaga prijenosa mase organskih sastavnica niske polarnosti iz uzorka matične mliječi u otopinu. Stoga se korištenje ciklodekstrina prilikom ekstrakcije bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala pokazalo kao izvrsna metoda ekstrakcije ukoliko organsko otapalo nije moguće koristiti. Nadalje, za razliku od etanola, RMCD može zaštititi antioksidativne sastavnice stvaranjem inkluzijskog kompleksa te spriječiti njihovu preranu oksidaciju. Proučavanjem učinka etanolne otopine RMCD na ukupni sadržaj fenola, uočeno je kako koncentracija RMCD nema značajnu ulogu na povećanje sadržaja fenolnih sastavnica. Preliminarna istraživanja ukazuju kako velika količina molekula etanola prisutnih u sustavu sprečavaju nastanak inkluzijskih kompleksa između šupljine RMCD i sastavnica matične mliječi. Reaktivna ekstrakcija antioksidativnih sastavnica iz matične mliječi koristeći RMCD može se smatrati novom i originalnom tehnikom povećanja prinosa bioaktivnih sastavnica u procesu ekstrakcije (Kowalski i Lukasiewicz, 2017).

Dosad je već ustanovljeno kako se biomasa zaostala iz agrokulturalnog i prehrambenog sektora ne bi smjela tretirati kao otpad, već kao izvor bioaktivnih sastavnica, kemikalija i goriva. Mediteranske države suočavaju se sa širokim spektrom problema povezanih s otpadom nastalim u industrijskom procesu. Primjerice, nepravilno tretiran otpad nastao preradom maslina jedan

je od primarnih ekoloških problema država u kojima je proizvodnja maslinovog ulja bitna gospodarska grana. Stoga se sve više stvaraju nove strategije koje omogućuju obnavljanje biljnih sastavnica iz otpada nastao procesom prerade biljnog materijala. Danas se sve više okreće zelenim, ekološki prihvatljivim metodama ekstrakcije bioaktivnih sastavnica kako bi se maksimalno smanjilo zagađenje i korištenje toksičnih otapala te spriječio dodatni nastanak otpada. List masline (*Olea europaea* L.) standardni je ostatak nastao procesuiranjem maslina. Bogat je polifenolima s potencijalnim farmakološkim učincima. Athanasiadis i sur. (2018) ispitali su učinkovitost ekstrakcije polifenola iz lista masline, koristeći kombinaciju metil- β -ciklodekstrina (M β CD) s jakim eutektičkim otapalom na bazi glicerola. Jako eutektičko otapalo sastavljeno je od jeftinih, netoksičnih prirodnih sastojaka, poput šećera, organskih kiselina i soli. Njegove karakteristike uključuju nizak tlak pare, nezapaljivost te dobro otapanje u vodi što ga čini idealnim i ekološki prihvatljivim otapalom. Jako eutektičko otapalo u istraživanju pripravljeno je korištenjem glicerola koji predstavlja donora vodikove veze i glicina koji predstavlja akceptora vodikove veze u molarnom omjeru 7:1:3 s vodom. 80%-tna vodena otopina jakog eutektičkog otapala korištena je za ekstrakciju. Ekstrakcija je provedena miješanjem praha lista masline s jakim eutektičkim otapalom i M β CD na magnetskoj miješalici u trajanju od 180 minuta. Ekstrakt je potom odvojen centrifugom. Procjenjuje se da je najviši prinos polifenola u iznosu od $116,65 \pm 3,60$ mg GAE/g DW ostvaren koristeći koncentraciju M β CD od 9%, omjer tekuće-čvrsto 40 mL/g i temperaturu od 51°C. Nadalje, proučavanjem rezultata studije uočeno je kako je korištenjem jakog eutektičkog otapala (DES) i M β CD tijekom ekstrakcije bio potreban niži omjer tekuće i čvrste faze za razliku od ekstrakcije konvencionalnim otapalima gdje je optimalan odnos tekuće i čvrste faze iznosio 2-3 puta više. Ova spoznaja omogućuje korištenje manje količine opreme te smanjuje trošak ekstrakcijskog postupka. Optimalna temperatura ekstrakcije iznosi 51°C te se iznad navedene temperature učinkovitost ekstrakcije smanjuje. Povećanjem temperature do 51°C povećava se stupanj difuzije te se smanjuje viskoznost otopine čime se povećava učinkovitost ekstrakcije, no daljnjim povećanjem temperature može doći do pucanja vodikovih veza u jakom eutektičkom otapalu čime je ekstrakcija onemogućena. Ekstrakcija u DES/M β CD sustavu dovela je do 5,7% višeg prinosa u odnosu na ekstrakciju DES te 17,8% viši prinos nego ekstrakcija etanolom. Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti uočeno je kako je antioksidativna aktivnost DES/M β CD ekstrakta 4,3% niža od aktivnosti DES ekstrakta. Iako razlika u međusobnoj antioksidativnoj aktivnosti nije statistički značajna, oba ekstrakta pokazala su 40-43% veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na antioksidativnu aktivnost etanolnog ekstrakta. Povećanje antioksidativne aktivnosti ne mora biti rezultat isključivo povećanja koncentracije ekstrahiranih polifenola,

nego i njihove interakcije s ciklodekstrinima. Inkapsulacijom polifenolnih sastavnica i M β CD nastaju kompleksi različite stabilnosti. Dakle, u ekstraktu jakog eutektičkog otapala nisu svi kompleksi polifenola s M β CD jednako stabilni što posljedično može ugroziti njihovu antioksidativnu aktivnost. Općenito, što su polifenolne sastavnice hidrofobnije, inkluzijski kompleksi s polifenolnih sastavnica s M β CD su stabilniji. Dodatno, različitoj antioksidativnoj aktivnosti može pridonijeti i orijentacija inkapsuliranih molekula u šupljini M β CD. Zaključno, prilikom karakterizacije ekstrakta uočeno je kako su DES/M β CD i DES ekstrakti imali identičan kromatografski profil polifenolnih sastavnica čime se može zaključiti kako M β CD nije smanjio selektivnost prilikom ekstrakcije, već dodatno povećao prinos ekstrakcije (Athanasiadis i sur., 2018).

4.2.2.2. Ekstrakcija ultrazvučnom i mikrovalnom metodom uz primjenu M β CD

Podanak kurkume (*Curcuma domestica* L.) cijenjen je diljem svijeta zbog svojih pozitivnih učinaka na zdravlje čovjeka. Kurkuminoide sadržani u podanku kurkume posjeduju hepatoprotektivni, antimikrobni, antitumorski i hipoglikemijski učinak. No usprkos biološkim učincima kurkuminoide, njihova upotreba je ograničena zbog niske topljivosti u vodi i posljedično loše biorasploživosti kurkuminoide. Nadalje, postojeće konvencionalne metode ekstrakcije kurkuminoide zahtijevaju značajan utrošak vremena i velike količine otapala. Navedeni razlozi ukazuju na potrebu za učinkovitijom i ekološki prihvatljivijom metodom ekstrakcije. Posebna pozornost pridaje se ultrazvučnoj i mikrovalnoj ekstrakciji kurkuminoide uz pomoć metil- β -ciklodekstrina (M β CD) čime se ostvaruje ne samo ekonomska dobit, već i niži rizik razgradnje i oksidacije ekstrahiranih bioaktivnih sastavnica. Nadalje, kompleksacija bioaktivnih sastavnica ciklodekstrinima povećava njihovu topljivost u vodi, stabilnost i biorasploživost uz eliminaciju negativnih značajki ekstrahiranih sastavnica poput neugodnog mirisa i/ili okusa. Hadi i sur. (2015) istražili su mogućnost ekstrakcije kurkumina (C), demetoksikurkumina (DMC) i bisdemetoksikurkumina (BDMC) iz podanka kurkume koristeći ultrazvučnu i mikrovalnu ekstrakciju posredovanu M β CD koji je karakteriziran asimetričnom strukturom i povećanom topljivosti u vodi. Ultrazvučna ekstrakcija temelji se na mehaničkom djelovanju akustičnih kavitacija koje dovode do rupture staničnih stijenki biljnog materijala, čime se povećava prijenos mase i prodiranje otapala u biljni materijal te posljedično osigurava povećan prinos uz kraću duljinu trajanja ekstrakcije. Ultrazvučna ekstrakcija u istraživanju provedena je koristeći ultrazvučnu kupelj na frekvenciji od 20 kHz i snazi od 55 W. Osušeni

prah kurkume najprije je namočen vodom tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi te je potom izložen ultrazvučnim valovima. Ekstrahirane sastavnice odvojene su centrifugom i uparene do suhog u vodenoj kupelji pri 50°C. Inkluzijski kompleksi podanka kurkume s M β CD u omjeru 1:3 pripremljeni su metodama koprecipitacije, gnječenja i fizičke mješavine. Uzorak podanka kurkume na isti je način pripremljen za ispitivanje učinkovitosti ekstrakcije mikrovalnom metodom posredovan M β CD. Nakon namakanja osušenog praha kurkume vodom, uzorak je ozračen mikrovalovima snage 700 W u trajanju od 1 minute s dvominutnim pauzama kako bi se temperatura sustava održala ispod 100°C. Ekstrakt je potom centrifugiran te uparen do suhog u vodenoj kupelji pri 50°C. Inkluzijski kompleksi podanka kurkume s M β CD u omjeru 1:2 također su pripremljeni metodama koprecipitacije, gnječenja i fizičke mješavine. Istraživanjem učinka ultrazvuka i mikrovalova na učinkovitost ekstrakcije uočeno je kako amplituda tijekom ultrazvučne ekstrakcije te veličina čestica, duljina trajanja ekstrakcije, volumen otapala i temperatura tijekom oba ispitivanja značajno utječu na prinos ekstrakcijskog postupka. Povećanjem amplitude ultrazvučnih valova dolazi do rupture staničnog zida te se povećava količina difundiranih sastavnica biljnog materijala i interakcija ekstrakcijskog otapala i bioaktivnih sastavnica što rezultira povećanom količinom ekstrahiranih sastavnica. Nadalje, promatranjem povezanosti veličine čestica s prinosom kurkuminoida, uočeno je kako manja veličina čestica osigurava veću dodirnu površinu između otapala i biljnog materijala, čime se povećava stopa ekstrakcije i prinos ekstrahiranih sastavnica. Također, finije čestice dozvoljavaju dublje prodiranje ultrazvučnih i mikrovalnih valova. Duljina trajanja ekstrakcije, odnosno vrijeme zagrijavanja uzorka posebice je važna prilikom ekstrakcije mikrovalovima. Mikrovalovi uzrokuju rupturu stanične strukture čime se omogućuje učinkovitija ekstrakcija. Međutim, ukoliko se ekstrakcija mikrovalovima nastavi, ruptura stanice posljedično uzrokuje dislokaciju kurkuminoida u stanicama kao i moguću razgradnju termolabilnih sastavnica zbog visokih temperatura koje mogu nastati tijekom zračenja čime se prinos tijekom ekstrakcije smanjuje. Povećanjem volumena ekstrakcijskog sredstva povećava se prinos kurkuminoida. Prilikom mikrovalne ekstrakcije uočeno je kako veći udio ekstrakcijskog otapala rezultira nižim prinosima za razliku od konvencionalnih ekstrakcija, zbog nejednake raspodjele i izloženosti biljnog materijala mikrovalovima. Povećanjem temperature povećava se topljivost sastavnica i sposobnost difuzije čime se povećava sposobnost ekstrakcije. Pri visokim temperaturama površinska napetost i viskoznost otapala se smanjuju čime se povećava sposobnost otapanja i močenje uzorka. Međutim, prekomjernim povećanjem temperature učinkovitost ekstrakcije se smanjuje zbog degradacije termolabilnih sastavnica i isparavanja lako hlapljivih sastavnica iz biljnog materijala. Dijagrami fazne topljivosti kurkumina pokazali su kako se kurkumin

uspješno uklapa u šupljinu M β CD u stehiometrijskom omjeru 1:1. Također je uočeno povećanje topljivosti kurkuminoida povećanjem koncentracije M β CD do 200 mM zbog prisutnosti metilne skupine koja produljuje hidrofobnu regiju ciklodekstrinske šupljine i stabilizira nastanak inkluzijskog kompleksa kurkuminoida i M β CD. Rezultati FTIR analize ultrazvučnog ekstrakta podanka kurkumina i M β CD pripremljenog metodama koprecipitacije, gnječenja i fizičke mješavine pokazali su kako je karbonilna grupa M β CD uključena u nastajanje kompleksa kurkuminoida iz podanka kurkume. Također, uočen je nastanak jače veze metodom gnječenja i fizičkom metodom te se i zbog jednostavnosti samih metoda smatraju boljim metodama za inkapsulaciju kurkuminoida iz podanka kurkume. Rezultati ATR (eng. *Attenuated total reflectance*) analize pokazali su kako je inkluzijski kompleks podanka kurkume i M β CD nastao ekstrakcijom mikrovalovima pripremljen metodama koprecipitacije, gnječenja i fizičke mješavine nastao interakcijom kurkuminoida s karbonilnom skupinom ciklodekstrina, pri čemu je jača interakcija nastala pripremanjem inkluzijskih kompleksa metodom gnječenja i fizičkom mješavinom. Dodatno, nastanak inkluzijskog kompleksa dokazan je i elektronskom skenirajućom mikroskopijom pri čemu je ustanovljena agregacija nastalih kompleksa nepravilne strukture i nestanak strukture izvornog materijala uz nemogućnost identifikacije ishodišnih sastavnica nastalih kompleksa. Ultrazvučna i mikrovalna ekstrakcija smatraju se jednostavnijim, bržim i učinkovitijim metodama u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije kurkuminoida iz podanka kurkume. Ultrazvučna i mikrovalna ekstrakcija povećavaju učinkovitost i smanjuju duljinu trajanja ekstrakcijskog procesa, čime je osigurana ekonomična, ekološki prihvatljiva i sigurna metoda (Hadi i sur., 2015a; Hadi i sur., 2015b).

4.3. Usporedba ekstrakcija različitim ciklodekstrinima

Brojne studije dosad ukazale su na velik terapijski potencijal flavonoida, naglašavajući njihovo antioksidativno i protuupalno djelovanje. Polifenolne sastavnice sadržane su velikim dijelom u komini jabuke koja se sastoji od kore, sjemenki, kaliksa, stabljike i mekog tkiva. Polifenolne sastavnice čine flavonoidi i polifenolne kiseline, posebice klorogenska te epikatehin i floridzin. Nadalje, kora jabuke dobar je izvor specifičnih flavonola poput kvercetinskih glikozida. Unatoč velikoj zdravstvenoj vrijednosti polifenolnih sastavnica komine jabuke, velik dio odlaze se kao otpad što predstavlja velik ekološki izazov. Konvencionalni ekstrakcijski procesi zahtijevaju velik utrošak vremena i organska otapala koja mogu ograničiti upotrebu biljnog materijala u hrani. Također, konvencionalni proces ekstrakcije može dovesti do

razgradnje bioaktivnih sastavnica čime se smanjuje njihova učinkovitost. Upravo iz navedenih razloga danas se sve više okreće pronalasku ekološki prihvatljivijih, učinkovitijih i jeftinijih metoda. Parmar i sur. (2015) ispitali su učinkovitost ekstrakcije ukupnih polifenola iz komine jabuke (*Malus domestica* L.) koristeći α -, β -, γ -ciklodekstrin te dva derivata β -ciklodekstrina: hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP β CD) i nasumično metilirani- β -ciklodekstrin (RM β CD). Rezultate su usporedili s onima ostvarenim ekstrakcijom organskim otapalom uz pomoć ultrazvučnih valova. Otopine ciklodekstrina pripremljene su otapanjem količine ciklodekstrina u odgovarajućem volumenu deionizirane vode uz zagrijavanje i protresanje na vodenoj kupelji pri 55°C do potpunog otapanja. Koncentracija svake otopine ciklodekstrina iznosila je 0,025 mol/L. Usitnjeni prah komine jabuke pomiješan je s otopinama ciklodekstrina te su uzorci pohranjeni u inkubator pri 60°C tijekom 24 h. Paralelno je provedena ekstrakcija organskim otapalom gdje je uzorak komine jabuke pomiješan 70%-tnim i 100%-tnim metanolom te je mješavina izložena ultrazvučnim valovima u trajanju od 15 minuta u tri ciklusa s pauzama od 10 minuta. Ekstrakt je potom odvojen centrifugom. Uspoređujući prinos ekstrakcija pet različitih ciklodekstrina, uočeno je kako je najviši prinos od 165 mg ukupnih polifenola/100 g suhe tvari ostvaren ekstrakcijom β -ciklodekstrinom, dok je ekstrakcija s γ - i α -ciklodekstrinom rezultirala nešto nižim prinosom ukupnih polifenola. Ekstrakcijski prinos katehina i epikatehina bio je 35-40% viši ekstrakcijom β -ciklodekstrinom u odnosu na ekstrakcije α - i γ -ciklodekstrinom te usporediv s ekstraktima pripremljenim s 70% i 100%-tnim metanolom. Ekstrakcija RM β CD rezultirala je većim prinosom flavanola u odnosu na ostale ispitivane ciklodekstrine, dok je ekstrakcija HP β CD najmanje učinkovita, ekstrahirajući samo 10% količine flavanola i 12% fenolnih kiselina ekstrahiranih β -ciklodekstrinom. Koncentracija flavonola, primjerice kvercetinских glikozida, posebno je praćena u ovom istraživanju zbog svojih antioksidativnih, antidijabetičkih i neuroprotektivnih svojstava. Ekstrakcijski prinos ukupnih flavonola bio je 19-40% viši ekstrakcijom β -ciklodekstrinom u odnosu na ekstrakcije ostalim derivatima. Ekstrakcije α - i γ -ciklodekstrinima rezultirale su sličnim prinosom flavonola od 60-61,4 mg/100g DM, dok su ekstrakcije HP β CD i RM β CD pokazale najniži prinos, što ukazuje na njihovu neučinkovitost u ekstrakciji flavonola. Uspoređujući ciklodekstrinske ekstrakte s onima pripremljenim korištenjem organskog otapala, uočeno je kako je ekstrakcija β -ciklodekstrinom rezultirala ekstrakcijom upola manje količine ukupnih flavonola u odnosu na pripremljene metanolne ekstrakte. Usporedbom učinkovitosti ekstrakcije α -, β - i γ -ciklodekstrinima uočeno je kako β -ciklodekstrin ekstrahira značajno veću količinu flavanola u odnosu na ostale derivate. Uočene razlike mogu se povezati s različitim dimenzijama centralnih šupljina (volumen iznosi 0,174, 0,262, 0,427 nm³ za α -, β - i γ -

ciklodekstrin). Izboru β -ciklodekstrina kao optimalnog derivata za izolaciju polifenola komine jabuke uz veliku učinkovitost pridonosi i njegov GRAS status (Parmar i sur., 2015).

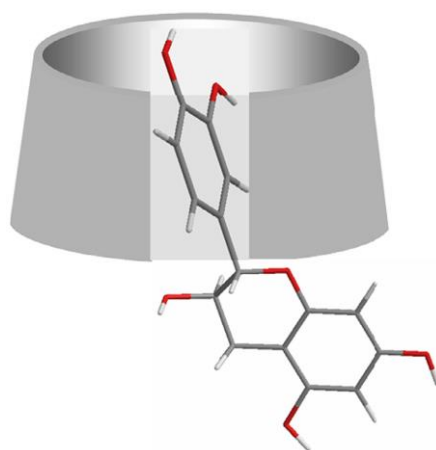
Podanak japanskog dvornika (*Polygonum cuspidatum* L.) ima veliki terapijski potencijal zahvaljujući antikancerogenom, antibakterijskom i antivirusnom djelovanju svojih sastavnica. Bogat je hidrofilnim stilbenima, posebice epikatehinom, reverastrolom i polidatinom, kao i hidrofobnim sastavnicama poput emodina, fisciona, torakrizona i njihovih glikozida. Za njihovu ekstrakciju Gao i sur. (2016) primijenili su vodene otopine različitih ciklodekstrina. Potrebne količine ciklodekstrina otopljene su u pročišćenoj vodi uz zagrijavanje i miješanje te su korištene kao ekstrakcijsko sredstvo. Odabir prikladnog ekstrakcijskog otapala jedan je od najbitnijih čimbenika prilikom ekstrakcije bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala. Nativni ciklodekstrini (α -, β -, γ -ciklodekstrin) i njihovi derivati poput hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP β CD), hidroksietil- β -ciklodekstrina (HE β CD), metil- β -ciklodekstrina (M β CD) i glikozil- β -ciklodekstrina (G β CD) istraženi su kao potencijalna ekstrakcijska otapala podanka japanskog dvornika. Ekstrakcija je provedena korištenjem četiri različite tehnike: zagrijavanjem uz refluks, ultrazvučnom ekstrakcijom, ekstrakcijom mikrovalovima te ultrazvučnom ekstrakcijom koja je potpomognuta mikrovalovima. Eksperimentalni uvjeti tijekom ekstrakcije bili su: koncentracija ciklodekstrina od 1%, omjer čvrste i tekuće faze 1:20 g/mL, temperatura 80°C te vrijeme ekstrakcije od 10 minuta. Promatranjem kromatografskih površina polidatina, resveratrola, emodin-8-O- β -glukozida i emodina ekstrahiranih vodenim otopinama sedam različitih ciklodekstrina uočeno je kako ekstrakcije β -ciklodekstrinom i njegovim derivatima daju veći prinos polidatina i resveratrola, dok je najveća količina emodin-8-O- β -glukozida i emodina ekstrahirana γ -ciklodekstrinom. Sposobnost ekstrakcije ciklodekstrina posljedica je različitog afiniteta šupljine ciklodekstrina i ekstrahiranih sastavnica. β -ciklodekstrin sastavljen je od sedam glukopiranoznih jedinica rezultirajući manjom šupljinom i boljim vezanjem manjih molekula poput resveratrola, dok je γ -ciklodekstrin sastavljen od osam glukopiranoznih jedinica i veće šupljine čime je omogućeno uklapanje emodina. Ekstrakcija HP β CD značajno je povećala prinos polidatina, resveratrola, emodin-8-O- β -glukozida i emodina u odnosu na β -ciklodekstrin, najvjerojatnije zbog prisutnosti hidroksipropilnih supstituenata. Nadalje, HP β CD ima bolju topljivost u vodi (50g/100g vode) u odnosu na β -ciklodekstrin (1,8g/100g vode) te ga je lakše sintetizirati u odnosu na γ -ciklodekstrin (Gao i sur., 2016).

Fenolne kiseline i flavonoidi glavne su sastavnice žižule (*Ziziphus jujuba*, L.) odgovorne za antioksidativni, protuupalni, hepatoprotektivan, antitrombotički i neuroprotektivan učinak.

Zhu i sur. (2016) proučavali su učinkovitost ekstrakcije osam fenolnih sastavnica iz ploda žižule koristeći različite ciklodekstrine. Uočeno je kako je odabir odgovarajućeg ciklodekstrina jedan od ključnih parametara povećanja prinosa te učinkovitosti i selektivnosti procesa ekstrakcije sastavnica iz ploda žižule. Tijekom istraživanja korišteno je šest ciklodekstrina različitih veličina šupljine i funkcionalnih skupina, uključujući α -, β -, γ -ciklodekstrin, M β CD, HP β CD i NH₂ β CD. Prilikom nastanka inkluzijskih kompleksa, dolazi do interakcija između ciklodekstrina i ekstrahiranih sastavnica uključujući hidrofobne interakcije između benzenskog prstena fenolnih sastavnica i unutarne šupljine ciklodekstrina. Nadalje, stvaraju se vodikove veze između atoma kisika ciklodekstrina i vodikovih atoma fenolnih sastavnica te van der Waalsove veze. Uočeno je kako je učinkovitost ekstrakcije β -ciklodekstrinom veća nego ekstrakcija koristeći α - i γ -ciklodekstrine. β -ciklodekstrin posjeduje najveći hidrofobni karakter zbog kojeg može učinkovitije stupati u interakciju s fenolnim sastavnicama te posljedično rezultirati višim prinosom ekstrakcije. Nadalje, uspoređujući učinkovitost ekstrakcije derivatima β -ciklodekstrina promatrajući rezultate kromatografske analize, uočeno je kako su površine pikova ekstrahiranih sastavnica značajno više kod ekstrakta s M β CD zbog njegovog visokog hidrofobnog karaktera, posebice za katehin, epikatehin i rutin čije konstante stabilnosti tada iznose 2092 M⁻¹ za katehin, 1397 M⁻¹ za epikatehin te 884 M⁻¹ za rutin. Katehin, epikatehin i rutin su flavonoidi koji su hidrofobniji u odnosu na fenolne kiseline te se lakše uklapaju u unutarnju šupljinu M β CD stvarajući stabilne komplekse. Zbog toga je M β CD ciklodekstrin izbora za ekstrakciju polifenola žižule (Zhu i sur., 2016).

Diamanti i sur. (2017) istraživali su potencijal primjene ciklodekstrina u povećanju učinkovitosti vodene ekstrakcije ploda nara (*Punica granatum*, L.). Vodene otopine ciklodekstrina smatraju se alternativnim, „zelenim“ otapalima zbog sposobnosti stvaranja inkluzijskih kompleksa s nepolarnim sastavnicama biljnog materijala te njihove ekstrakcije, bez korištenja štetnih otapala. Nastanak inkluzijskih kompleksa termodinamički je favoriziran proces koji dovodi do smanjenja ukupne energije sustava. U istraživanju je provedena ekstrakcija ploda nara koristeći Timatic poluautomatski ekstraktor te deionizirana voda, 1,8%-tna vodena otopina β -ciklodekstrina i 7,2%-tna vodena otopina HP β CD. Tijekom procesa ekstrakcije bili su postavljeni navedeni uvjeti: volumen otapala 1 L, omjer ekstrakcijskog otapala i uzorka 10:1, duljina trajanja kompresije od 5 minuta, duljina trajanja dekompresije od 6 minuta, 33 ciklusa, minimalni tlak od 6 bara te ukupna duljina trajanja ekstrakcije od 363 minute pri temperaturi od 25°C. Dodatno je provedena ekstrakcija osušene kore i osušenih sjemenki nara metanolom koristeći ultrazvučne valove. Prinos ekstrakata nara izračunat iz

razlike mase ekstrakcijskog otapala prije i nakon ekstrakcije iznosio je 87, 89 i 88% za ekstrakciju vodom, vodenom otopinom β -ciklodekstrina i vodenom otopinom HP β CD. Tijekom stvaranja inkluzijskih kompleksa s bioaktivnim sastavnicama iz biljnog materijala, β -ciklodekstrin je korišten u količini u kojoj je dostignuta njegova maksimalna topljivost u vodi (1,8% w/w). Kako bi se dodatno obogatio sustav otapala ciklodekstrinima, HP β CD je korišten u višim koncentracijama (7,2% w/w) s obzirom na njegovu bolju topljivost u vodi. Ukupni sadržaj polifenola ekstrahiran deioniziranom vodom iznosio je $42,16 \pm 3,89$ mg GAE/g DM, dok je ekstrakcija vodenim otopinama β -ciklodekstrina i HP β CD rezultirala povećanjem prinosa polifenola od 38% tijekom ekstrakcije β -ciklodekstrinom ($58,70 \pm 2,44$ mg GAE/g DM) te 69% tijekom ekstrakcije HP β CD ($71,70 \pm 2,52$ mg GAE/g DM) u odnosu na ekstrakciju vodom. Nadalje, promatrajući antioksidativnu aktivnost ekstrahiranih sastavnica uočeno je kako je sposobnost hvatanja slobodnih radikala iznosila 83% i 86% ekstrakcijama vodenim otopinama β -ciklodekstrina i HP β CD, dok je antioksidativna aktivnost tijekom ekstrakcije deioniziranom vodom iznosila 75%. Viši prinos polifenola i antioksidativna aktivnost upućuje na povećanu učinkovitost ekstrakcije polifenolnih sastavnica inkapsulacijom s ciklodekstrinima, u omjeru 1:1. U mnogim istraživanjima uočeno je kako tijekom nastanka inkluzijskog kompleksa dolazi do uklapanja mono- i dihidroksiliranog B prstena resveratrola, epikatehina, (+)-katehina i kvercetina te trihidroksiliranog prstena epigalokatehin galata i galne kiseline u šupljinu ciklodekstrina, dok se ostatak molekule nalazi izvan šupljine ciklodekstrina, kao što je prikazano na Slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz inkluzije polifenola u šupljinu β -CD (preuzeto i prilagođeno iz (Diamanti i sur., 2017) uz dopuštenje izdavača)

Ciklodekstrini povećavaju učinkovitost ekstrakcije polifenolnih sastavnica i omogućuju ekstrakciju bez korištenja visokih temperatura i tlakova uz posljedično smanjenje ukupne potrošnje energije. Stoga, navedena metoda predstavlja ekološki i ekonomski prihvatljivu alternativnu metodu ekstrakcije bez korištenja toksičnih organskih otapala (Diamanti i sur., 2017).

Korijen biljke kuzu (*Pueraria lobata*, L.) tradicionalni je kineski lijek za liječenje prehlade, visokog krvnog tlaka i dijabetesa. Sadrži bioaktivne tvari poput flavonoidnih glikozida (puerarin, daidzin i genistin) i flavonoidnih aglikona (daidzein i genistein) koji se povezuju s antipiretičkim, protuupalnim, kardioprotektivnim i antioksidativnim učinkom. Topljivost flavonoida u vodi je izrazito niska, stoga se sve više okreće novim načinima povećanja topljivosti flavonoida kako bi se unaprijedila njihova bioraspoloživost. Feng i sur. (2019) proučavali su učinkovitost ekstrakcije flavonoida koristeći različite ciklodekstrine (β -, γ -ciklodekstrin, HP β CD, HP γ CD, CM β CD i SBE β CD). Usitnjeni korijen kuzu biljke i otopina ciklodekstrina pomiješani su u vodi u omjeru 20:1. Svi uzorci su namočeni kroz 1 h te su nakon stavljeni u proces dekocije u trajanju od 2 h. Vodena ekstrakcija pripravljena je na jednak način, bez dodatka ciklodekstrina. Ekstrahirane otopine pojedinih ciklodekstrina odvojene su i analizirane primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Rezultati analize pokazuju kako je površina pika svake flavonoidne sastavnice značajno veća u ekstraktima s ciklodekstrinima u odnosu na one pripravljene ekstrakcijom s vodom, što ukazuje na povećanje učinkovitosti ekstrakcije koristeći ciklodekstrine. Nadalje, proučavanjem učinka ciklodekstrina na povećanje topljivosti flavonoida uočeno je kako SBE β CD ima najveću sposobnost otapanja flavonoida, nakon čega slijedi HP β CD > CM β CD > HP γ CD > γ - > β -ciklodekstrin. SBE β CD pokazao je najveći učinak na topljivost genisteina i daidzina, HP γ CD na topljivost daidzeina, dok je HP β CD pokazao najveći učinak na topljivost puerarina i genistina. Također, rezultati PCA (eng. *Principal Component Analysis*) i CP-ANN (eng. *Counter-Propagation Artificial Neural Networks*) analiza ukazali su kako ciklodekstrini iste skupine pokazuju jednak učinak na topljivost flavonoidnih sastavnica. Primjerice, HP β CD i HP γ CD pripadaju skupini derivata ciklodekstrina topljivih u vodi te imaju sličan učinak na topljivost ekstrahiranih sastavnica, dok različiti derivati pokazuju različit učinak, u redosljedu: ionski derivati ciklodekstrina > vodotopljivi derivati ciklodekstrina > nativni ciklodekstrini. Uspoređujući flavonoidne glikozide i aglikone, uočeno je kako je sposobnost interakcije aglikona s ciklodekstrinima veća u odnosu na glikozide te je solubilizacijski učinak jači na sastavnice slabo topljive u vodi. SBE β CD pokazao je neselektivnu sposobnost uklapanja flavonoidnih sastavnica, uključujući i

flavonoide teško topljive u vodi. Zaključno, različite klase ciklodekstrina imaju različitu sposobnost povećanja učinkovitosti ekstrakcije ovisno o vrsti ekstrahiranih flavonoidnih sastavnica, stoga je potreban odabir odgovarajućeg ciklodekstrina za ekstrakciju željenih bioaktivnih sastavnica (Feng i sur., 2019).

Xie i sur. (2019) istraživali su učinak ekstrakcije „zelenim“ vodenim otopinama β -ciklodekstrina i HP β CD na prinos fenolnih sastavnica, posebice antocijanina dudu (*Morus*, L.) koji su zaslužni za hepatoprotektivan, antibakterijski, antioksidativni i hipolipemički učinak. Homogena smjesa jednake količine ploda duda i destilirane vode pomiješana je s destiliranom vodom, 70% vodenom otopinom etanola te vodenim otopinama β -ciklodekstrina i HP β CD koncentracije 20 g/L. Ekstrakcija je provedena na vodenoj kupelji pri 60°C uz miješanje u trajanju od 4 h, nakon čega je tekući ekstrakt odvojen centrifugom. Rezultati analize pokazali su kako se učinkovitost ekstrakcije fenolnih sastavnica povećala za 6,8-32,0% koristeći ekstrakciju posredovanu HP β CD u odnosu na ekstrakciju destiliranom vodom. Nadalje, učinkovitost ekstrakcije vodenom otopinom etanola povećala se za 5,6-27,9% te 3,8-15,5% ekstrakcijom β -ciklodekstrinom. HP β CD je derivat β -ciklodekstrina koji ima povećanu topljivost u vodi te je uočeno kako HP β CD pokazuje veću sposobnost uklapanja fenolnih sastavnica, čime se postiže veća topljivost inkapsuliranih sastavnica u odnosu na β -ciklodekstrin. Antocijanini su jedni od najvažnijih bioaktivnih sastavnica ploda duda. Istraživanjem učinka različitih ekstrakcijskih otapala na ukupni sadržaj antocijanina, uočeno je kako korištenje ciklodekstrina povećava ukupni sadržaj antocijanina u odnosu na ekstrakciju vodom ili etanolom. Štoviše, korištenjem HP β CD ukupni sadržaj antocijanina povećao se za 30,7-59,7% u odnosu na ekstrakciju vodom te 31,5-42,1% korištenjem β -ciklodekstrina, dok je ekstrakcija etanolom povećala ukupni sadržaj antocijanina za 7,3-37,3% u odnosu na ekstrakciju vodom. Proučavanjem antioksidativne aktivnosti, odnosno sposobnosti fenolnih sastavnica u hvatanju slobodnih radikala, uočeno je kako su sva otapala povećala antioksidativnu aktivnost ekstrahiranih sastavnica u odnosu na ekstrakciju vodom. Nadalje, uočena je proporcionalna povezanost antioksidativne aktivnosti i ukupnog sadržaja ekstrahiranih antocijanina, iz čega se može zaključiti kako su antocijanini velikom dijelom zaslužni za antioksidativnu aktivnost pripremljenih ekstrakata. Rezultati FTIR analize i molekularnog modeliranja potvrdili su uspješno uklapanje fenolnih sastavnica i antocijanina u šupljinu ciklodekstrina uz stvaranje intermolekularnih vodikovih veza, pri čemu je konformacija održavana 4 vodikovim vezama: dvjema vodikovim vezama između glukoziida C3G i glikozidnog kisika β -ciklodekstrina te dvjema vodikovim vezama kroz hidroksilne grupe

prstena A. Međutim, iako je ekstrakcija vodenom otopinom HP β CD rezultirala višim ukupnim sadržajem i antioksidativnom aktivnosti antocijanina, u daljnjem istraživanju prednost se dala ekstrakciji nativnim β -ciklodekstrinom zbog njegovog GRAS statusa, niže cijene i lakše dostupnosti. Korištenje vodene otopine ciklodekstrina predstavlja novu alternativnu tehniku ekstrakcije antocijanina iz biljnog materijala (Xie i sur., 2019).

Podanak tufulinga (*Similax glabra*, L.) prehrambena je namirnica i sastojak tradicionalne kineske medicine. Glavne bioaktivne sastavnice poput flavonoida, uključujući astilbin, neoastilbin, neoisoastilbin, isoastilbin, engeletin i isoengeletin zaslužne su za njegovo protuupalno, imunomodulatorno, antitumorsko i hipoglikemijsko djelovanje. Zbog izrazito velike potrošnje energije, organskih otapala i vremena utrošenog tijekom konvencionalnog procesa ekstrakcije, Zhang i sur. (2019) usredotočili su se na razvitak ekološki prihvatljive metode koristeći jeftinu i sigurnu vodenu otopinu ciklodekstrina. Uzorak podanka tufulinga pomiješan je s vodenim otopinama α -, β - i γ -ciklodekstrina u rastućim koncentracijama (0,5, 1, 1,5%). Mješavina je mehanički protresena pri 25°C u trajanju od 30 minuta. Analizom je utvrđeno kako je dodatak β - i γ -ciklodekstrina značajno povećao prinos ukupnih flavonoida stvaranjem inkluzijskih kompleksa između flavonoida i ciklodekstrina, čime je povećana topljivost flavonoida u vodi. Konstante stabilnosti nastalih kompleksa između astilbina i β - i γ -ciklodekstrina iznose 2305,9 i 995,2 M⁻¹. Nadalje, uočeno je povećanje topljivosti od 7,58 i 6,71 puta dodatkom 5 mM vodene otopine β - i γ -ciklodekstrina. Međutim, α -ciklodekstrin nije pokazao učinak na ekstrakciju ukupnih flavonoida. Uočene razlike tijekom ekstrakcija bioaktivnih sastavnica mogu se pripisati različitoj veličini šupljine ciklodekstrina, čiji promjeri iznose 0,49, 0,62 i 0,79 nm za α -, β - i γ -ciklodekstrin. Rezultati istraživanja pokazuju kako dimenzije centralne šupljine α -ciklodekstrina nisu dostatne za inkluziju astilbina. Međutim, usprkos povećanju prinosa ukupnih flavonoida dodatkom ciklodekstrina, učinkovitost ekstrakcije i dalje ostaje niža od ekstrakcije 50%-tnim etanolom. Koristeći 1%-tne otopine β - i γ -ciklodekstrina količina ekstrahiranih flavonoida iznosila je 23,25 i 23,47 mg, dok je tijekom ekstrakcije 50%-tnim etanolom iznosila 24,1 mg. Nadalje, iako je ekstrakcija γ -ciklodekstrinom rezultirala višim prinosom flavonoida u odnosu na ekstrakciju β -ciklodekstrinom, zbog niže cijene β -ciklodekstrina on je odabran kao derivat za daljnji razvoj i optimizaciju postupka ekstrakcije (Zhang i sur., 2019).

Kadulja je biljka visoke farmakološke aktivnosti, pripisane glavnim sastavnicama biljke poput terpenoida i fenolnih kiselina te flavonoidnim sastavnicama. Velika biološka značajnost kadulje potakla je razvoj velikog broja tehnika ekstrakcije polifenolnih sastavnica od kojih

većina zahtjeva korištenje hlapljivih i toksičnih otapala koja se moraju dodatnim postupcima odvojiti od ekstrakcijskog produkta. Međutim, iako organska otapala posjeduju odličnu sposobnost otapanja i ekstrakcije polifenola, njihovo korištenje predstavlja ozbiljnu ekološku zabrinutost te se danas sve više razvijaju ekološki prihvatljive i sigurne metode koje se temelje na smanjenju troškova ekstrakcijskog postupka te smanjenju utrošene energije, toksičnih i hlapljivih otapala. Korištenje vodene otopine ciklodekstrina smatra se novom, ekološki prihvatljivom metodom te predstavlja prekretnicu u ekstrakciji bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala. Grigorakis i sur. (2020) istražili su učinak različitih ciklodekstrina poput β -ciklodekstrina, HP β CD i M β CD na sposobnost ekstrakcije polifenolnih sastavnica iz grčke kadulje (*Salvia fruticosa*, L.). Usitnjeni prah kadulje ekstrahiran je vodenim otopinama β -ciklodekstrina, HP β CD i M β CD. pH je podešen 1%-tnom otopinom limunske kiseline. Ekstrakcije su provedene na sobnoj temperaturi ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) u trajanju od 180 minuta, uz miješanje. Ekstrakt je potom odvojen centrifugom. Korištenje vodene otopine ciklodekstrina uzrokovalo je značajno veći prinos polifenolnih sastavnica u odnosu na ekstrakciju čistom vodom, pri čemu je prinos M β CD bio veći za 22,06%, prinos HP β CD za 19,32% te 11,28% veći prinos ekstrakcijom β -ciklodekstrinom u odnosu na ekstrakciju vodom. Dobiveni rezultati ukazuju kako priroda ciklodekstrina ima ključnu ulogu u ekstrakciji bioaktivnih sastavnica. Najveća učinkovitost ekstrakcije uočena je kod M β CD gdje dolazi do najjačih interakcija između polifenola kadulje i M β CD u odnosu na ostale ciklodekstrine korištene u istraživanju. Nadalje, kako bi se dodatno procijenila učinkovitost ekstrakcije polifenola ciklodekstrinima, promatrano je povećanje prinosa dvaju glavnih sastavnica kadulje, luteolin 7-O-glukuronida i ružmarinske kiseline. Rezultati analize pokazali su kako je ekstrakcija M β CD uzrokovala povećanje prinosa luteolin 7-O-glukuronida od 7,7% u odnosu na ekstrakciju β -ciklodekstrinom te 34,4% u odnosu na HP β CD. Međutim, ekstrakcija β -ciklodekstrinom rezultirala je 10,1% većim prinosom ružmarinske kiseline u odnosu na M β CD te 13,3% većim u odnosu na HP β CD. Navedeni rezultati ukazuju kako strukturne različitosti ciklodekstrina utječu na selektivnost prema različitim polifenolima. Uočeno je kako je u navedenim slučajevima HP β CD bio najmanje učinkovit te kako bi se u budućim istraživanjima ekstrakcije polifenola poput flavonoidnih glikozida i ružmarinske kiseline posredovanoj ciklodekstrinima trebalo razmatrati korištenje M β CD i β -ciklodekstrina kao ekstrakcijskih otapala (Grigorakis i sur., 2020).

5. ZAKLJUČCI

Globalno prihvaćanje i korištenje biljnog materijala u prehrambene, ali i medicinske svrhe danas eksponencijalno raste. Biljke koje posjeduju terapijska svojstva jedne su od najbogatijih izvora lijekova tradicionalne i moderne medicine, nutraceutika i dodataka prehrani. Polifenolne sastavnice sveprisutne su u biljnom materijalu i zaslužne za mnogobrojne terapijske učinke poput antikancerogenog, antioksidativnog, kardioprotektivnog, ali i mnogih drugih. Međutim, zbog njihove slabe topljivosti u vodi i loše biorasploživosti, uz osjetljivost na svjetlost, toplinu ili oksidaciju na zraku, vrlo često ostaju neiskorišten dio biljnog materijala. Nadalje, konvencionalna ekstrakcija bioaktivnih sastavnica uključuje korištenje organskih otapala s izvrsnom sposobnošću ekstrakcije bioaktivnih sastavnica. No, korištenje organskih otapala povezano je s mnogobrojnim ekološkim pitanjima zbog njihove toksičnosti i nepovoljnog utjecaja na okoliš. Tu su i ekonomska pitanja troškova samih postupaka ekstrakcije te potrebe za ulaganjem velikih količina energije i novca u njihovo uklanjanje iz konačnog produkta.

Sigurnost, ekološki i ekonomski razlozi potaknuli su okretanje novim, alternativnim metodama ekstrakcije koje su jeftine i ekološki prihvatljive. Jedna od takvih alternativnih metoda ekstrakcije je ekstrakcija posredovana ciklodekstrinima. Nativni α -, β - i γ -ciklodekstrini dobivaju se iz škroba enzimskim djelovanjem te se razlikuju u promjeru šupljine zbog koje posjeduju različitu sposobnost uklapanja molekula različitih veličina. Uklapanje bioaktivnih sastavnica u hidrofobnu šupljinu ciklodekstrina odvija se posredstvom različitih interakcija poput hidrofobnih interakcija, vodikovih veza i van der Waalsovih interakcija. Nastankom inkluzijskog kompleksa povećana je topljivost bioaktivnih sastavnica u vodi, a samim time i njihova biorasploživost te učinkovitost ekstrakcije uz smanjenje duljine trajanja ekstrakcijskog postupka. Nadalje, kemijskim modifikacijama nativnih ciklodekstrina dobivaju se derivati ciklodekstrina, primjerice derivati ciklodekstrina povećane topljivosti u vodi poput HP β CD ili ionski derivati poput SBE β CD, kojima je omogućeno selektivno kompleksiranje bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala, a samim time i njihova selektivna ekstrakcija. Također, rezultati brojnih analiza pokazali su kako je β -ciklodekstrin najzastupljeniji ciklodekstrin korišten tijekom ekstrakcije bioaktivnih sastavnica, zbog svoje dobre topljivosti u vodi, optimalne veličine šupljine, ali i niske cijene i dobre dostupnosti ciklodekstrina. Dodatno, β -ciklodekstrin ima status GRAS (eng. *Generally recognized as safe*) sastojka što mu daje prednost pred ostalim derivatima. Za razliku od organskih otapala, ekstrakcija ciklodekstrinima ne zahtjeva naknadno uklanjanje zaostalih otapala čime se smanjuje duljina trajanja i cijena ekstrakcijskog procesa.

Ekstrakcija posredovana ciklodekstrinima kvalitativno i kvantitativno povećava učinkovitost ekstrakcije polifenolnih sastavnica iz biljnog materijala. Proces ekstrakcije ciklodekstrinima ovisi o postavljenim uvjetima ekstrakcije poput vrste ciklodekstrina, koncentracije ciklodekstrina, temperature i duljine trajanja ekstrakcijskog postupka te o ekstrakcijskoj tehnici. Zaključno, postoji mogućnost ekstrakcije ciklodekstrinima u kombinaciji s drugim ekološki prihvatljivim i učinkovitim ekstrakcijskim tehnikama, poput ultrazvučne ekstrakcije, mikrovalne ekstrakcije, ekstrakcije superkritičnim fluidom i mnogim drugim, čime se dodatno povećava učinkovitost ekstrakcije uz smanjenje duljine trajanja i utrošene energije.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ATR - eng. *Attenuated total reflectance* analiza

BDMC – bisdemetoksikurkumin

C – kurkumin

C3G – cijanidin-3-O-glukozid

CM β CD – karboksimetil- β -ciklodekstrin

CP-ANN – eng. *Counter-Propagation Artificial Neural Networks*

Da – dalton

DES – jako eutektično otapalo

DLS – eng. *Dynamic light scattering*

DMC - demetoksikurkumin

DPPH – eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

EEBP – etanolni ekstrakt *Bryophyllum pinnatum*

eNOS – endotelna sintaza dušikovog oksida

FDA – eng. *Food and Drug Administration*

FRAP – eng. *ferric reducing antioxidant power*

FTIR – eng. *Fourier-transform infrared* spektroskopija

G β CD – glukoza- β -ciklodekstrin

GRAS – eng. *Generally recognized as safe*

HaCaT – eng. *Cultured Human Keratinocyte*

HE β CD – hidroksietil- β -ciklodekstrin

HP β CD – hidroksipropil- β -ciklodekstrin

HP γ CD – hidroksipropil- γ -ciklodekstrin

ICAM-1 – eng. *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IL-6 i -8 – interleukin-6 i -8

IC₅₀ – koncentracija lijeka pri kojoj dolazi do 50% maksimalnog učinka

kHz – kiloherz, mjerna jedinica za frekvenciju

M β CD – metilirani β -ciklodekstrin

MPO – mijeloperoksidaza

μ MTE – mikromolarni ekvivalent Trolox po mililitru

μ mol TRE/g DW – mikromolarni ekvivalent Troloxa po gramu suhe mase

mg C3G/g DW – miligrami ekvivalenta cijanidin-3-O-glukozida po gramu suhe mase

mg GAE/g DM (DW) – miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase

mg GAE/mL – miligrami ekvivalenta galne kiseline po mililitru

mg QE/g DW – miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase

NH₂βCD – amino-β-ciklodekstrin

PCA - eng. *Principal Component Analysis*

PEG – polietilenglikol

RAMEB – nasumično metiliran β-ciklodekstrin

ROS – reaktivni kisikovi spojevi

SBEβCD – sulfobutileter-β-ciklodekstrin

TNFα – eng. *Tumor necrosis factor α*

UAE – eng. *Ultrasound assisted extraction*

UV – ultraljubičasto zračenje

UV/VIS spektroskopija – ultraljubičasta/vidljiva spektroskopija

W – vat, mjerna jedinica za snagu

7. LITERATURA

Abubakar, A.R., Haque, M., Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioall Sci*, 2020, 12 (1), 1-10.

Athanasiadis, V., Grigorakis, S., Lalas, S., Makris, D.P., Methyl β -cyclodextrin as a booster for the extraction for *Olea europaea* leaf polyphenols with a bio-based deep eutectic solvent. *Biomass Conv Bioref*, 2018, 8 (2), 345-355.

Binello, A., Cravotto, G., Boffa, L., Stevanato, L., Bellumori, M., Innocenti, M., Mulinacci, N., Efficient and selective green extraction of polyphenols from lemon balm. *C R Chimie*, 2017, 20 (9-10), 921-926.

Braga, S.S., Pais, J., Getting under the skin: Cyclodextrin inclusion for the controlled delivery of active substances to the dermis. U: Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications. Grumezescu, A.M., Elsevier Inc., 2018, 407-449.

Bubalo, M.C., Radošević, K., Radojèić Redovniković, I., Halambek, J., Vorkapić-Furaè, I., Gaurina, V., Srèek, J., Ionske kapljevine - Razvoj i izazovi industrijske primjene. *Kem Ind*, 2014, 63 (5-6), 163-171.

Cai, R., Yuan, Y., Cui, L., Wang, Z., Yue, T., Cyclodextrin-assisted extraction of phenolic compounds: Current research and future prospects. *Trends Food Sci Technol*, 2018, 79, 19-27.

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

Dai, Q., Liu, S., Jin, H., Jiang, Y., Xia, T., Effects of Additive β -Cyclodextrin on the Performances of Green Tea Infusion. *J Chem*, 2019, 1-7.

el Darra, N., Rajha, H.N., Debs, E., Saleh, F., El-Ghazzawi, I., Louka, N., Maroun, R.G., Comparative Study between Ethanolic and β -Cyclodextrin Assisted Extraction of Polyphenols from Peach Pomace. *Int J Food Sci*, 2018, 1-9.

Diamanti, A.C., Igoumenidis, P.E., Mourtzinis, I., Yannakopoulou, K., Karathanos, V.T., Green extraction of polyphenols from whole pomegranate fruit using cyclodextrins. *Food Chem*, 2017, 214, 61-66.

Ekor, M., The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol*, 2014, 4 (177), 1-10.

- Favre, L.C., dos Santos, C., López-Fernández, M.P., Mazzobre, M.F., Buera, M. del P., Optimization of β -cyclodextrin-based extraction of antioxidant and anti-browning activities from thyme leaves by response surface methodology. *Food Chem*, 2018, 265, 86-95.
- Feng, T., Liu, F., Sun, L., Huo, H., Ren, X., Wang, M., Associated-extraction efficiency of six cyclodextrins on various flavonoids in *Puerariae lobatae radix*. *Molecules*, 2019, 24, 1-10.
- Gao, F., Zhou, T., Hu, Y., Lan, L., Heyden, Y. vander, Crommen, J., Lu, G., Fan, G., Cyclodextrin-based ultrasonic-assisted microwave extraction and HPLC-PDA-ESI-ITMSn separation and identification of hydrophilic and hydrophobic components of *Polygonum cuspidatum*: A green, rapid and effective process. *Ind Crops Prod*, 2016, 80, 59-69.
- Grigorakis, S., Benchennouf, A., Halahlah, A., Makris, D.P., High-performance green extraction of polyphenolic antioxidants from *salvia fruticosa* using cyclodextrins: Optimization, kinetics, and composition. *Appl Sci*, 2020, 10 (3447), 1-16.
- Hadi, B.J., Sanagi, M.M., Aboul-Enein, H.Y., Ibrahim, W.A.W., Jamil, S., Mu'azu, M.A., Microwave-Assisted Extraction of Methyl β -Cyclodextrin-Complexed Curcumin from Turmeric Rhizome Oleoresin. *Food Anal Methods*, 2015a, 8, 2447-2456.
- Hadi, B.J., Sanagi, M.M., Wan Ibrahim, W.A., Jamil, S., AbdullahiMu'azu, M., Aboul-Enein, H.Y., Ultrasonic-Assisted Extraction of Curcumin Complexed with Methyl- β -Cyclodextrin. *Food Anal Methods*, 2015b, 8, 1373-1381.
- Kalantari, S., Roufegarinejad, L., Pirsá, S., Gharekhani, M., Green extraction of bioactive compounds of pomegranate peel using β -Cyclodextrin and ultrasound. *Main Group Chem*, 2020, 19 (1), 61-80.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Mourtzinis, I., Troullidou, E., Chiou, A., Karathanos, V.T., Encapsulation of complex extracts in β -cyclodextrin: An application to propolis ethanolic extract. *J Microencapsulation*, 2009, 26 (7), 603-613.
- Kemppainen, L.M., Kemppainen, T.T., Reippainen, J.A., Salmenniemi, S.T., Vuolanto, P.H., Use of complementary and alternative medicine in Europe: Health-related and sociodemographic determinants. *Scand J Public Health*, 2018, 46, 448-455.
- Kowalski, S., Lukasiewicz, M., Application of randomly methylated cyclodextrin in extraction of antioxidant-like compounds from bee bread. *J Food Nutr Res*, 2017, 56 (2), 121-128.
- Lakka, A., Lalas, S., Makris, D.P., Development of a low-temperature and high-performance green extraction process for the recovery of polyphenolic phytochemicals from waste potato peels using hydroxypropyl β -cyclodextrin. *Appl Sci*, 2020, 10 (3611), 1-12.

Lanna, E.G., Bittencourt, V.C.E., Moreira, A.M.S., da Silva, J.G., Sousa, O.V., Denadai, Â.M.L., Physicochemical characterization and biological activities of the ethanol extract of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken incorporated in β -cyclodextrin. *J Inclusion Phenom Macrocylic Chem*, 2016, 85 (3-4), 247-259.

Leonti, M., Verpoorte, R., Traditional Mediterranean and European herbal medicines. *J Ethnopharmacol*, 2017, 199, 161-167.

Mourtzinis, I., Anastasopoulou, E., Petrou, A., Grigorakis, S., Makris, D., Biliaderis, C.G., Optimization of a green extraction method for the recovery of polyphenols from olive leaf using cyclodextrins and glycerin as co-solvents. *J Food Sci Technol*, 2016, 53 (11), 3939-3947.

Mourtzinis, I., Menexis, N., Iakovidis, D., Makris, D.P., Goula, A., A green extraction process to recover polyphenols from byproducts of hemp oil processing. *Recycling*, 2018, 3 (15), 1-15.

Moyano-Mendez, J.R., Fabbrocini, G., de Stefano, D., Mazzella, C., Mayol, L., Scognamiglio, I., Carnuccio, R., Ayala, F., la Rotonda, M.I., de Rosa, G., Enhanced antioxidant effect of trans-resveratrol: Potential of binary systems with polyethylene glycol and cyclodextrin. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40 (10), 1300-1307.

Msomi, N.Z., Simelane, M.B.C., Herbal medicine. *Intechopen*, 2020, 215-227.

Mura, M., Palmieri, D., Garella, D., di Stilo, A., Perego, P., Cravotto, G., Palombo, D., Simultaneous ultrasound-assisted water extraction and β -cyclodextrin encapsulation of polyphenols from *Mangifera indica* stem bark in counteracting TNF α -induced endothelial dysfunction. *Nat Prod Res*, 2015, 29 (17), 1657-1663.

Nn, A., A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*, 2015, 4 (3), 3-8.

Pandey, A., Tripathi, S., Pandey, C.A., Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *J Pharmacogn Phytochem*, 2014, 2 (5), 115-119.

Parmar, I., Sharma, S., Rupasinghe, H.P.V., Optimization of β -cyclodextrin-based flavonol extraction from apple pomace using response surface methodology. *J Food Sci Technol*, 2015, 52, 2202-2210.

Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., Henriques, M., Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr Polym*, 2014, 101, 121-135.

Rahmam, S., Naim, M.N., Ng, E., Mokhtar, M.N., Bakar, N.F.A., Encapsulation of bioactive compound from extracted jasmine flower using β -Cyclodextrin via electrospray. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, 2016, 36, 1-9.

Rajha, H.N., Chacar, S., Afif, C., Vorobiev, E., Louka, N., Maroun, R.G., β -Cyclodextrin-Assisted Extraction of Polyphenols from Vine Shoot Cultivars. *J of Agric Food Chem*, 2015, 63, 3387-3393.

Roselló-Soto, E., Galanakis, C. M., Brnčić, M., Orlie, V., Trujillo, F. J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari, B. K., Barba, F. J., Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends Food Sci Technol*, 2015, 42, 134-149.

Su, Z., Qin, Y., Zhang, K., Bi, Y., Kong, F., Inclusion Complex of Exocarpium Citri Grandis Essential Oil with β -Cyclodextrin: Characterization, Stability, and Antioxidant Activity. *J Food Sci*, 2019, 84 (6), 1592-1599.

Suvarna, V., Gujar, P., Murahari, M., Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88, 1122-1144.

Tutunchi, P., Roufegarinejad, L., Hamishehkar, H., Alizadeh, A., Extraction of red beet extract with β -cyclodextrin-enhanced ultrasound assisted extraction: A strategy for enhancing the extraction efficacy of bioactive compounds and their stability in food models. *Food Chem*, 2019, 297, 1-9.

Wang, L., Zhou, Y., Wang, Y., Qin, Y., Liu, B., Bai, M., Two green approaches for extraction of dihydromyricetin from Chinese vine tea using β -Cyclodextrin-based and ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction methods. *Food Bioprod Process*, 2019, 116, 1-9.

Welz, A.N., Emberger-Klein, A., Menrad, K., Why people use herbal medicine: Insights from a focus-group study in Germany. *BMC Complementary Altern Med*, 2018, 18 (92), 1-9.

Welz, A.N., Emberger-Klein, A., Menrad, K., The importance of herbal medicine use in the German health-care system: Prevalence, usage pattern, and influencing factors. *BMC Health Serv Res*, 2019, 19 (952), 1-11.

Xie, J., Xu, Y., Shishir, M.R.I., Zheng, X., Chen, W., Green extraction of mulberry anthocyanin with improved stability using β -cyclodextrin. *J Sci Food Agric*, 2019, 99, 2494-2503.

Zhang, L., Zheng, D., Zhang, Q.F., Purification of total flavonoids from *Rhizoma Smilacis Glabrae* through cyclodextrin-assisted extraction and resin adsorption. *Food Sci Nutr*, 2019, 7, 449-456.

Zhu, Q.Y., Zhang, Q.Y., Cao, J., Cao, W., Xu, J.J., Peng, L.Q., Cyclodextrin-assisted liquid-solid extraction for determination of the composition of jujube fruit using ultrahigh performance liquid chromatography with electrochemical detection and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 2016, 213, 485-493.

8. SAŽETAK

Bioaktivne sastavnice iz biljnog materijala, prvenstveno polifenoli, dobivaju sve veću pozornost zbog svojih funkcionalnih i bioloških učinaka na zdravlje čovjeka. Konvencionalne metode ekstrakcije bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala uključuju korištenje organskih otapala odgovornih za ekološko onečišćenje i nepovoljno djelovanje na zdravlje pojedinca. Ekstrakcija posredovana ciklodekstrinima nova je, „zelena“ i alternativna metoda ekstrakcije kojom se izbjegava korištenje štetnih i skupih organskih otapala. Ekstrakcija ciklodekstrinima temelji se na nastanku inkluzijskih kompleksa s bioaktivnim sastavnicama čime se povećava njihova topljivost u ekstrakcijskom sredstvu, a samim time i učinkovitost ekstrakcije. Primjenom ciklodekstrina dolazi do skraćivanja duljine trajanja ekstrakcijskog postupka, osiguravanja kemijske stabilnosti sastavnica tijekom ekstrakcije kao i povećanja antioksidativne aktivnosti izoliranih sastavnica. Završetkom ekstrakcijskog postupka nije potrebno uklanjanje ciklodekstrina, čime je osigurano smanjenje utroška energije, vremena i novca u odnosu na ekstrakciju konvencionalnim otapalima. Ovaj rad razmatra ključne parametre uključene u proces ekstrakcije ciklodekstrinima: tip ciklodekstrina, koncentracija ciklodekstrina, temperatura i duljina trajanja ekstrakcijskog postupka te tehnika ekstrakcije. Promatranjem učinka različitih ciklodekstrina na prinos i antioksidativnu aktivnost bioaktivnih sastavnica tijekom ekstrakcije uočeno je kako β -ciklodekstrin i njegovi derivati pokazuju najbolju sposobnost inkapsulacije bioaktivnih sastavnica. Istražene su i sažete koristi ostvarene ekstrakcijom bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala koristeći ciklodekstrine.

SUMMARY

Bioactive compounds from plant material, such as polyphenols, received increasing attention due to their functional and biological effects on human health. Conventional extraction methods of bioactive components from plant material include the use of organic solvents responsible for environmental pollution and toxic effects on individual health. Cyclodextrin extraction is a new, "green" and alternative extraction technology that avoids the use of harmful and expensive organic solvents. Extraction with cyclodextrins is based on the formation of inclusion complexes with bioactive compounds, which increases their solubility in the extraction solvent and thereby enhances the extraction efficiency. Furthermore, the use of cyclodextrin results in a shorter extraction process, accomplished with enhanced chemical stability and antioxidant activity of the isolated compounds. It is not necessary to remove cyclodextrins upon the completion of the extraction process, thus providing a reduction in energy, time and money consumption compared to extraction with conventional solvents. This paper considers the key parameters involved in the cyclodextrin extraction process: cyclodextrin type, cyclodextrin concentration, temperature and duration of the extraction process and applied extraction techniques. By analyzing the effect of different cyclodextrins on the yield and antioxidant activity of bioactive compounds during extraction, it was observed that β -cyclodextrin and its derivatives show the best ability to encapsulate bioactive components. The benefits of extracting bioactive components from plant material using cyclodextrins have been investigated and summarized.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

PRIMJENA CIKLODEKSTRINA U EKSTRAKCIJI BIOAKTIVNIH SASTAVNICA IZ BILJNOG MATERIJALA

Josipa Regović

SAŽETAK

Bioaktivne sastavnice iz biljnog materijala, prvenstveno polifenoli, dobivaju sve veću pozornost zbog svojih funkcionalnih i bioloških učinaka na zdravlje čovjeka. Konvencionalne metode ekstrakcije bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala uključuju korištenje organskih otapala odgovornih za ekološko onečišćenje i nepovoljno djelovanje na zdravlje pojedinca. Ekstrakcija posredovana ciklodekstrinima nova je, „zelena“ i alternativna metoda ekstrakcije kojom se izbjegava korištenje štetnih i skupih organskih otapala. Ekstrakcija ciklodekstrinima temelji se na nastanku inkluzijskih kompleksa s bioaktivnim sastavnicama čime se povećava njihova topljivost u ekstrakcijskom sredstvu, a samim time i učinkovitost ekstrakcije. Primjenom ciklodekstrina dolazi do skraćenja duljine trajanja ekstrakcijskog postupka, osiguravanja kemijske stabilnosti sastavnica tijekom ekstrakcije kao i povećanja antioksidativne aktivnosti izoliranih sastavnica. Završetkom ekstrakcijskog postupka nije potrebno uklanjanje ciklodekstrina, čime je osigurano smanjenje utroška energije, vremena i novca u odnosu na ekstrakciju konvencionalnim otapalima. Ovaj rad razmatra ključne parametre uključene u proces ekstrakcije ciklodekstrinima: tip ciklodekstrina, koncentracija ciklodekstrina, temperatura i duljina trajanja ekstrakcijskog postupka te tehnika ekstrakcije. Promatranjem učinka različitih ciklodekstrina na prinos i antioksidativnu aktivnost bioaktivnih sastavnica tijekom ekstrakcije uočeno je kako β -ciklodekstrin i njegovi derivati pokazuju najbolju sposobnost inkapsulacije bioaktivnih sastavnica. Istražene su i sažete koristi ostvarene ekstrakcijom bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala koristeći ciklodekstrine.

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

Rad sadrži: 52 stranice, 3 grafička prikaza i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ciklodekstrin, ekstrakcija, polifenoli, alternativna metoda, inkapsulacija

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

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

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

Dr. sc. Marijana Zovko Končić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

APPLICATION OF CYCLODEXTRINS IN EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANT MATERIAL

Josipa Regović

SUMMARY

Bioactive compounds from plant material, such as polyphenols, received increasing attention due to their functional and biological effects on human health. Conventional extraction methods of bioactive components from plant material include the use of organic solvents responsible for environmental pollution and toxic effects on individual health. Cyclodextrin extraction is a new, "green" and alternative extraction technology that avoids the use of harmful and expensive organic solvents. Extraction with cyclodextrins is based on the formation of inclusion complexes with bioactive compounds, which increases their solubility in the extraction solvent and thereby enhances the extraction efficiency. Furthermore, the use of cyclodextrin results in a shorter extraction process, accomplished with enhanced chemical stability and antioxidant activity of the isolated compounds. It is not necessary to remove cyclodextrins upon the completion of the extraction process, thus providing a reduction in energy, time and money consumption compared to extraction with conventional solvents. This paper considers the key parameters involved in the cyclodextrin extraction process: cyclodextrin type, cyclodextrin concentration, temperature and duration of the extraction process and applied extraction techniques. By analyzing the effect of different cyclodextrins on the yield and antioxidant activity of bioactive compounds during extraction, it was observed that β -cyclodextrin and its derivatives show the best ability to encapsulate bioactive components. The benefits of extracting bioactive components from plant material using cyclodextrins have been investigated and summarized.

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

Thesis includes: 52 pages, 3 figures and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cyclodextrin, extraction, polyphenols, alternative method, encapsulation

Mentor: **Mario Jug, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mario Jug, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

Marijana Zovko Končić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2021.