

# ORAC antioksidacijska učinkovitost različitih ekstrakata komine masline i zaštita DNA od štetnog djelovanja radikala

---

Dominko, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:081812>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Lucija Dominko

ORAC antioksidacijska učinkovitost različitih  
ekstrakata komine masline i zaštita DNA od štetnog  
djelovanja radikala

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Ovaj rad je sufinanciran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost ((UIP-2014-09-9143).

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na posvećenom vremenu, trudu i pomoći tijekom pisanja diplomskog rada. Također, zahvaljujem se i doc. dr. sc. Mariji Grdić Rajković i asistenticama Zavoda za kemiju prehrane na svojoj pomoći pri izvođenju rada.

Zahvaljujem obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju ne samo tokom pisanja ovog rada, nego i tokom cijelog studiranja.

## Kazalo

1. UVOD .....	1
1.1. Maslina .....	1
1.1.1. Komina masline .....	2
1.1.2. Fenolni spojevi u komini masline .....	3
1.2. Oksidativni stres .....	5
1.3. Metoda kidanja DNA .....	6
1.4. ORAC antioksidacijska učinkovitost.....	7
1.5. Ciklodekstrini.....	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Kemikalije i pribor.....	12
3.2. Priprema ekstrakata komine masline .....	13
3.3. Metoda kidanja DNA .....	14
3.3.1. Priprema razrjeđenja uzoraka .....	14
3.3.2. Priprema pufera za reakcijsku smjesu (PBS) .....	14
3.3.3. Priprema stock otopine radikala (AAPH).....	14
3.3.4. Priprema stock otopine standardnog antioksidansa (Trolox) .....	15
3.3.5. Priprema otopine DNA .....	15
3.3.6. Izrada pufera za elektroforezu (TAE).....	15
3.3.7. Pufer za nanošenje uzorka .....	15
3.3.8. Agaroz (0.7%).....	15
3.3.9. Priprema boje za elektroforezu .....	16
3.3.10. Priprema reakcijskih smjesa za pokus .....	16
3.3.11. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu .....	17
3.4. ORAC antioksidacijska učinkovitost.....	18
3.4.1. Fluorescein .....	19
3.4.2. Trolox.....	19
3.4.3. Uzorci.....	19
3.4.4. AAPH.....	19
3.4.5. Priprema mikrotitarske ploče.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1. Metoda kidanja DNA .....	21
4.2. ORAC antioksidacijska učinkovitost.....	26
5. ZAKLJUČCI.....	32
6. LITERATURA.....	33
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	36

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

### 1.1.Maslina

Maslina (*Olea europea* L.) je zimzelena vrsta iz porodice Oleaceae. Stablo masline doseže visinu do 10 m, dok na položajima zaštićenim od vjetra može narasti i više. Raste grmoliko, lišće je po granama pravilno razdijeljeno: uvijek su po dva lista nasuprot, a grana završava s jednim listom. U pazušcima listova smješteni su pupovi. Cvjetovi su žućkasto bijeli i ugodnog mirisa. Nakon cvatnje i oplodnje razvija se plod. Plod masline je koštunica ovalnog oblika, sastavljena od perikarpa i endokarpa. Kad je plod masline zelen, meso je gorko. Dozrijevanjem se gubi gorčina i povećava se sadržaj ulja u plodu. Za jelo se beru zeleni plodovi, a za ulje se beru dozreli, koji su poprimili ljubičastu boju. (Kantoci, 2006) Proces dobivanja maslinog ulja dijeli se u više faza. Prva faza je pranje i čišćenje plodova te nakon završetka te faze zaostaju 2 nusprodukta: lišće i vegetabilna voda. Zatim slijedi faza mljevenja i miješanja. Zbog pritiska tijekom mljevenja iz masline izlazi tekućina, koju čini ulje s vodom. (Palčić i suradnici, 2009) Nakon toga slijedi centrifugiranje. Centrifugiranje je proces odvajanja ulja iz smjese na bazi razlike u gustoći ulja, vegetabilne (biljne) vode i krutih čestica. Odvija se u horizontalnim centrifugama ili dekanterima, s dva ili tri izlaza. Ako postoje dva izlaza, voda i čvrste čestice se odvajaju zajedno, a ako su 3 izlaza, sve tri komponente se odvajaju posebno: ulje, voda i čvrsta tvar. (Brlek T. i suradnici, 2009) Nusprodukti u ovoj fazi su vegetabilna voda i komina. Zadnji korak dobivanja ulja je filtriranje. Filtriranjem se uklanjaju suspendirane čvrste tvari, čime se dobije ulje koje se dalje koristi u potrošačke svrhe. (Frankel i sur., 2013). Prosječno, na 100 kg procesiranih maslina se dobiva 35kg komine masline i 440L vegetabilne vode. (Goldsmith, 2018.)



Slika 1. Maslina-*Olea europea* L. (<http://www.inpharma.hr>)

### 1.1.1. Komina masline

Nakon proizvodnje maslinovog ulja kao jedan od nusprodukata nastaje komina masline. Sastoji se od kožice ploda, pulpe i dijelova koštice. To je tamna smjesa, intenzivnog mirisa i umjereno kiselog pH. Kemijski sastav komine masline varira ovisno o sorti masline i postupku obrade ploda masline. Kemijski sastojci su voda, lipidi, bjelančevine, ugljikohidrati i lignin. Voda se uklanja sušenjem. (Nogueira, 2015)

**Tablica 1.** Udio glavnih komponenta suhe komine masline (Nogueira, 2015)

Sastav	Udio (%)
<b>Lignin</b>	32-55
<b>Hemiceluloza</b>	27-41
<b>Celuloza</b>	14-25
<b>Masti</b>	7-19
<b>Proteini</b>	4-11
<b>Vodotopljivi ugljikohidrati</b>	1-16
<b>Vodotopljivi fenoli</b>	0,6-2

Problem kod proizvodnje maslinovog ulja je da zaostaju velike količine komine koja predstavlja veliki ekološki problem u područjima intenzivne proizvodnje maslinovog ulja. Komina masline sadrži znatan udio lignina koji otežava njenu razgradnju mikroorganizmima. Osim toga, u komini masline zaostaju spojevi kao što su fenoli, lipidi i organske kiseline. Ti se spojevi razgrađuju u fitotoksične spojeve koji su pokazali negativan učinak na vodeni sustav, populaciju mikroorganizama u tlu pa čak i na zrak. (Roig i suradnici, 2006) Ipak, komina masline također sadrži i velik broj hranjivih tvari zbog čega se može iskoristiti na različite načine. Najjednostavniji način iskorištavanja komine masline je kompostiranje, čime se dobiva kvalitetno gnojivo. Moguće ju je koristiti i kao stočnu hranu ili kao izvor energije. Dobivanje energije iz komine masline može se postići na dva načina; biokemijski – anaerobnom fermentacijom uz proizvodnju bioplina te termokemijski – zbijanjem komine u pelete i sagorijevanjem u pećima za biomasu. Energetska vrijednost komine masline (20,7 MJ/kg) je približno jednaka onoj drveta (17 MJ/kg) i ugljena (23 MJ/kg), što nam ukazuje na kominu kao visoko vrijedni energent. Međutim, sumporni dioksid(SO<sub>2</sub>) u sastavu dimnih plinova može stvarati problem ako se postrojenje gradi unutar naseljenog područja jer je neugodnog mirisa. Tada se nastali plin mora pročišćavati, što poskupljuje cijeli proces. Ipak u vrijeme kad je

fosilnog goriva sve manje i kada se sve više okreće prema novim izvorima energije komina masline se pokazala kao vrijedan izvor energije, a iskorištavanjem u te svrhe ujedno se i rješava njezin problem zbrinjavanja. (Brlek i suradnici, 2009.)

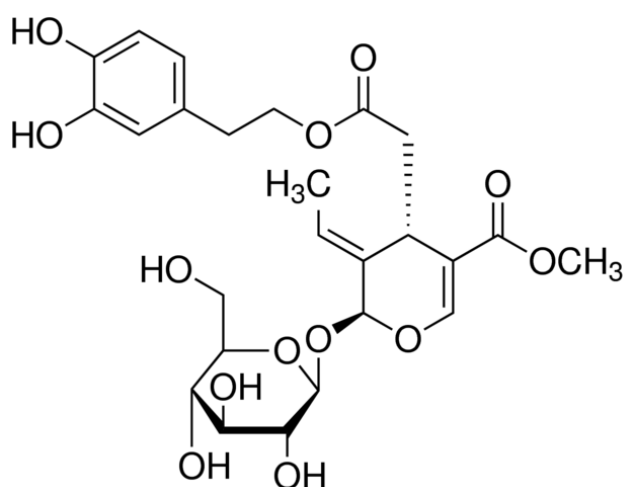


**Slika 2.** Komina masline(preuzeto iz: Nogueira,2015)

#### 1.1.2. Fenolni spojevi u komini masline

Mediteranska prehrana je povezana sa nižom incidencijom kroničnih bolesti i većim životnim vijekom. Glavni sastojak mediteranske prehrane je ekstra djevičansko maslinovo ulje. Maslinovo ulje, ali i ostatak masline, bogat je fenolnim spojevima koji se smatraju zaslužnima za navedene zdravstvene koristi. Fenolni spojevi u svim biljkama, pa tako i maslini su proizvodi sekundarnog metabolizma. Imaju najmanje jedan aromatski prsten (C6), na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa. Fenolni spojevi su biološki aktivne molekule. Najznačajniji fenolni spojevi u maslini su oleuropein, hidroksitirosol i tirosol. (Cicerale i sur., 2012) Tijekom sazrijevanja masline udio oleuropeina se smanjuje, dok se udio hidroksitirosola i tirosola povećava.

Oleuropein je ester hidroksitirosola i elenolne kiseline. Razne studije su pokazale da oleuropein posjeduje antihipertenzivna, antitrombotska, antibakterijska, antivirusna i hipoglikemijska djelovanja. Oleuropein je snažan antioksidans koji smanjuje ukupni kolesterol i trigliceride te na taj način znatno smanjuje učestalost infarkta. Nadalje, uspješno liječi doksorubicinom induciranu kardiotoksičnost inhibicijom produkata lipidne peroksidacije i smanjenjem oksidativnog stresa u kardiomiocitima. Prisutstvo oleuropeina kroz stanični životni vijek odgađa starenje i održava stanicu mlađom te ujedno uzrokuje veću stopu staničnog preživljavanja nakon oksidativnog stresa što bi moglo ukazati da na to da je oleuropein prirodni spoj koji usporava starenje.

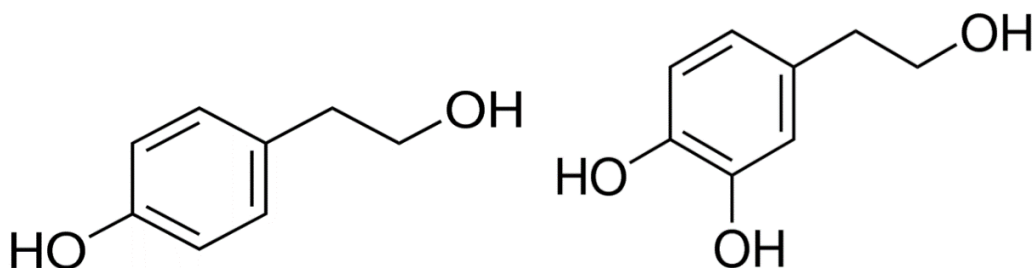


**Slika 3.** Kemijska struktura oleuropeina (preuzeto iz: <https://www.sigmaaldrich.com>)

Ostali polifenoli prisutni u komini masline; p-kumarinska kiselina, dimetiloleuropin, rutin, luteolin-7-O-glukozid, apigenin 7-O-rutinozid, apigenin 7-O-glukozid, luteolin, cijanidin 3-O-glukozid i cijanidin 3-O-rutinozid imaju ista farmakološka svojstva, iako u manjoj mjeri, kao oleuropein.

Hidroksitirosol i tirosol su strukturno slični fenoli supstituirani na *para* položaju s hidroksietilnim lancom. Hidroksitirosol ima dodatnu OH skupinu na benzenskom dijelu na položaju pored druge OH skupine i stoga je *orto*-difenol ili katehol. Takva strukturna modifikacija rezultira velikim razlikama u osjetljivosti na oksidaciju i antioksidacijsku moć pa je hidroksitirosol bolji antioksidans od tirosola. Tirosol i hidroksitirosol pokazali su potencijal u smanjivanju nefrotoksičnosti ciklosporina, prevenciji mikro i makrovaskularnih komplikacija u dijabetesu, potiskivanju upalnog odgovora, ali isto tako u smanjivanju učestalosti ateroskleroze i mnoge vrste karcinoma. (Preedy i Watson, 2010)





**Slika 4.** Kemijske strukture tirozola i hidroksitirozola (preuzeto iz: <https://www.sigmaaldrich.com>)

**Tablica 2.** Fenolni spojevi u komini masline (Nogueira, 2015)

Skupina	Ime fenolnog spoja
<i>Feniletanoidi</i>	Oleuropein
	hidroksitirozol
	Tirosol
<i>Derivati cimetne kiseline</i>	ferulinska kiselina
	kavska kiselina
	p-kumarinska kiselina
<i>Derivati benzojeve kiseline</i>	3,4-dihidroksifenilacetinska kiselina
	4-hidroksibenzojeva kiselina
<i>Benzenedioli</i>	Katehol
	metil-katehol
<i>Flavonoidi</i>	cinarozid(luteolin-7-O-glukozid)
	apigetrin(apigenin-7-O-glukozid)
	Kvercetin
	rutin(kvercetin-3-O-rutinozid)
<i>Antocijani</i>	krizantemin(cijanidin-3-glukozid)
	antirinin(cijanidin-3-rutinozid)

## 1.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres, koji nastaje zbog povećane produkcije reaktivnih kisikovih i dušikovih specija ili zbog smanjenja u produkciji antioksidansa može prouzročiti oštećenje staničnih lipida, proteina ili DNA inhibirajući njihovu normalnu funkciju. Oštećenjem DNA nastaju

mutacije, oksidacijom proteini gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji pri čemu nastaju reaktivni aldehidi. (<https://www.irb.hr>) Zbog takvog učinka oksidativni stres povezan je sa nastankom nekih patoloških stanja kao što su kardiovaskularne, neurodegenerativne i zloćudne bolesti te sa procesom starenja. Prema nekim istraživanjima prehrana bogata antioksidansima se pokazala učinkovitom u smanjenju rizika od nastanka takvih patoloških stanja. Zbog toga, sve se intenzivnije istražuju pozitivni fiziološki učinci prirodnih produkata, pogotovo onih koji se često konzumiraju u svakodnevnoj prehrani. Postoje različite *in vitro* metode kojima se mjeri antioksidacijski potencijal prirodnih produkata, biljaka i hrane među kojima je koja je jedna od najčešće korištenih ORAC antioksidacijska učinkovitost (López-Alarcóna i Denicolab, 2013)

### **1.3. Metoda kidanja DNA**

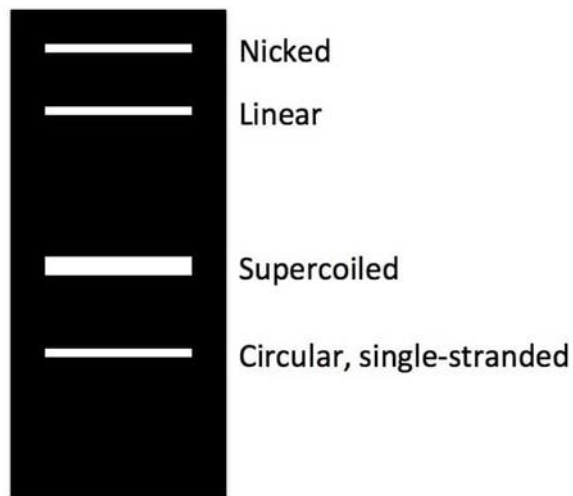
Dijelovi DNA dužine u rasponu od 50 parova baza pa do nekoliko milijuna baznih parova mogu se odvojiti pomoću elektroforeze na agaroznom gelu. Brzina migracije fragmenata ovisi osim o njihovoj veličini i o koncentraciji agaroze koja se koristi za pripremu gela. Koncentracija agaroze je obrnuto proporcionalna brzini migracije DNA fragmenata, tj. što je manja koncentracija agaroze to je veća brzina migracije DNA fragmenata i obrnuto. Za odjeljivanje vrlo malih fragmenata DNA koriste se gelovi s visokim postotkom agaroze (do 2%). Veliki fragmenti bolje se odjeljuju na niskopostotnim agaroznim gelovima (0.3-0.7%). Međutim, na pokretljivost utječe i oblik molekule DNA (linearna, cirkularna, superuzvojnica). Kada je plazmidna DNA izolirana i putuje, na agaroznom gelu pojavljuju se 2, 3, 4 ili više vrpca. Uobičajeno, većina izolirane DNA će biti superuzvojnica DNA, ali se pojavljuju i ostali oblici. (Piljac, 2006)

Superuzvojnica DNA je nativna konformacija pronađena *in vivo* i nastaje kada se dodatno uvijanje uvodi u dvostruku spiralnu uzvojnica. Superuzvojnica DNA migrira brže od predviđenog u agaroznom gelu zbog svoje konformacije jer zbog dodatnog uvijanja zauzima manje volumena. Superuzvojnica DNA je željena vrsta kod izoliranja plazmidne DNA.

Tijekom replikacije, stanične topozomeraze kidaju jedan lanac DNA uzvojnice i opuštaju superheličku napetost, čime polimeraze stječu pristup DNA. Takva opuštena DNA je još uvijek u kružnom obliku ali nema dodatno uvijanje kao što ima superuzvojnica i zbog toga je najsporiji migrirajući oblik u agaroznom gelu. Linearna DNA nastaje kada se spiralnoj DNA pomoću

restriksijskih enzima pokidaju oba lanca na istom mjestu. Linearna DNA uobičajeno migrira između opuštene i superuzvojnice DNA.

U alkalnim uvjetima dolazi do kidanja vodikovih veza pa su plazmidi denaturirani, iako kovalentne veze ostaju netaknute. Kada se opet uspostavi neutralan pH dolazi do ponovnog stvaranja vodikovih veza i formiranja superuzvojnice. Ipak, kada su uvjeti preoštri, tj. kada je alkalna liza prevelika, DNA se nepovratno denaturira i u cirkularnom obliku migrira ispred svih drugih oblika plazmida u gelu. (<https://bitesizebio.com>)

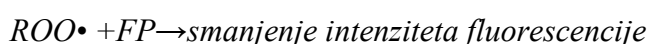
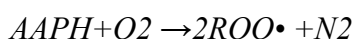


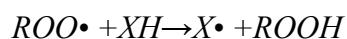
**Slika 5.** Oblici DNA na agaroznom gelu (preuzeto iz: <https://bitesizebio.com>)

DNA metoda mjeri antiradikalnu učinkovitost uzorka s obzirom na njegovu sposobnost da inhibira kidanje dvostruke uzvojnice DNA (superuzvojnica DNA) uzrokovano djelovanjem slobodnog radikala (AAPH). Što je uzorak bolji antioksidans to veći udio DNA ostaje u formi superuzvojnice, a manje nastaje ostalih oblika DNA.

#### 1.4. ORAC antioksidacijska učinkovitost

ORAC (kapacitet apsorpcije kisikovih radikala) metoda je jedna od najkorištenijih metoda za mjerenje antioksidacijskog potencijala. ORAC metoda je integralna metoda koja se temelji na sljedećim reakcijama:



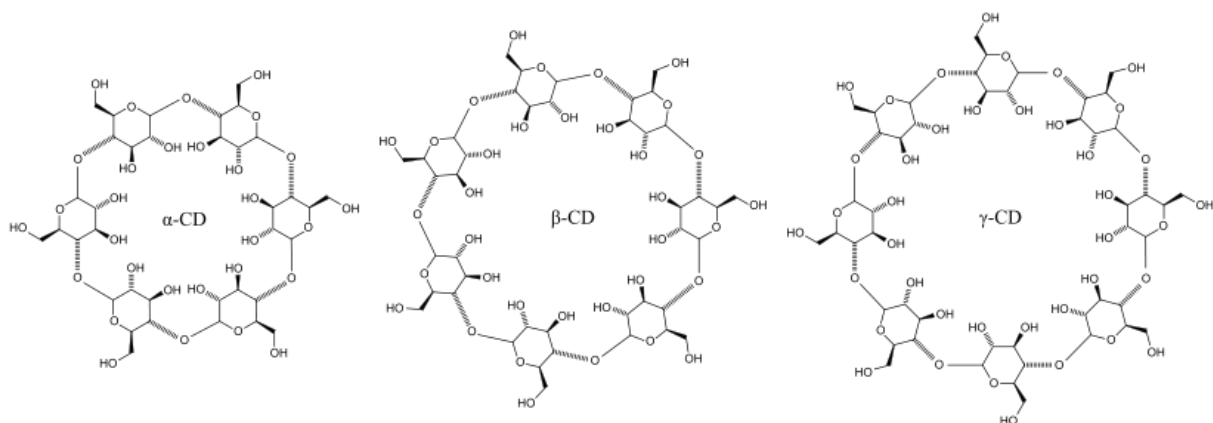


$2ROO\bullet \rightarrow$ ne-radikalni produkti

Gdje je AAPH, azo spoj punog naziva 2,2'-azobis (2-amidinopropan)-dihidroklorid, izvor peroksilnog radikala;  $ROO\bullet$ , tj. u prisutstvu kisika AAPH stvara peroksilni radikal. Inkubacija fluorescentne probe (FP) sa AAPH uzrokuje oksidaciju probe čime ona prelazi u nefluorescentni oblik i time dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije. Kod koinkubacije AAPH, fluorescentne probe i antioksidansa (XH), antioksidans je donor vodika, te on daje svoj vodik peroksilnom radikalumu pri čemu peroksilni radikal prelazi u manje reaktivni oblik. Manjak peroksilnog radikala uzrokuje smanjivanje oksidacije fluorescentne probe, a time ujedno i odgađanje smanjenja intenziteta fluorescencije (López-Alarcóna i Denicolab, 2013). Uzimajući u obzir prethodno navedene reakcije, za ORAC antioksidacijsku učinkovitost očekuje se da će biti neovisna o odabranoj fluorescentnoj probi iako istraživanja pokazuju da selekcija ciljne molekule može utjecati značajno na ORAC antioksidacijsku učinkovitost. U ranijim istraživanjima kao ciljna molekula upotrebljavao se B-fikoeritrin, protein izoliran iz crvene alge *Porphyridium cruentum*. Međutim, upotreba B-fikoeritrina u mjerenju antioksidacijskog potencijala imala je brojne nedostatke uključujući varijabilnost u reakciji na puno peroksilnih radikala, što je dovelo do nedosljednosti u rezultatima analize. Također, B-fikoeritrin postaje fotonestabilan nakon izlaganja svjetlosti i ulazi u interakcije sa polifenolima, što daje lažno niže vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. (Zhong, Shahidi, 2015) Od 2001. godine kao ciljna molekula koristi se fluorescein koji je fotostabilan, jeftin i ne stupa u interakciju s polifenolom. (López-Alarcóna i Denicolab, 2013) U ORAC metodi antioksidacijski kapacitet se izračunava pomoću površine ispod krivulje (AUC) i kinetičkog profila potrošnje ciljne molekule. Vrijednosti površine ispod krivulje se uobičajeno uspoređuju sa galnom kiselinom ili Troloxom (vodotopljivi oblik vitamina E) omogućujući određivanje ORAC antioksidacijske učinkovitosti uspoređivanjem sa navedenim referentnih spojevima. Rezultati se iskazuju u mikromolovima Trolox ekvivalenta (TE) po litri ili gramu uzorka ( $\mu\text{mol TE/g}$  ili  $\mu\text{mol TE/L}$ ) (Prior i sur. 2005)

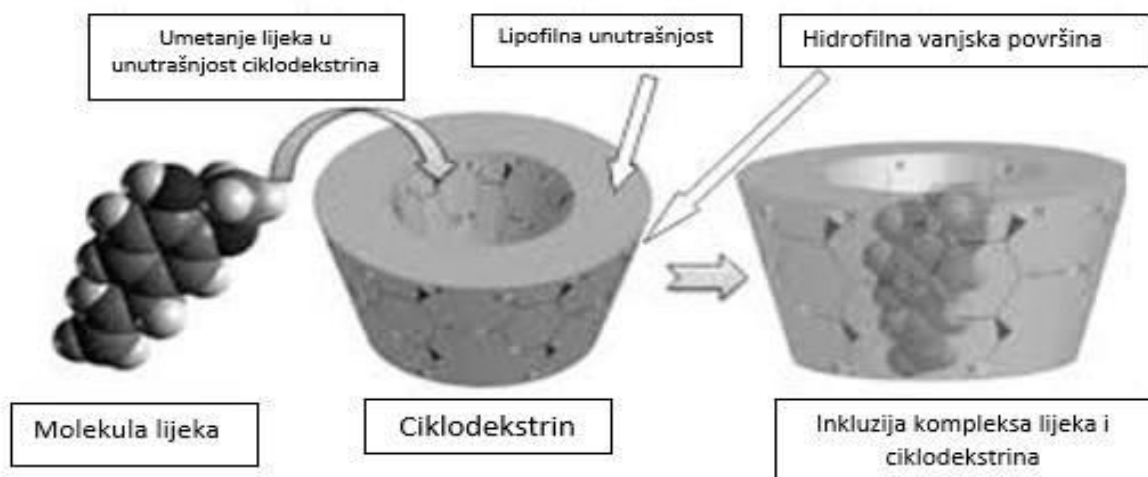
### 1.5. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi koji sadrže barem 6 D-(+) glukopiranoznih jedinica povezanih sa  $\alpha$ -(1,4) glukozidnom vezom. Tri prirodna ciklodektrina  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (sa 6, 7, ili 8 glukopiranoznih jedinica) proizvode se procesom fermentacije iz škroba pomoću bakterijskih kultura i razlikuju se u veličini prstena i topljivosti. (Barel i suradnici, 2009).



**Slika 6.** Kemijska struktura ciklodekstrina (preuzeto iz: Šimić, 2015)

Zbog konformacije stolca glukopiranoznih jedinica, ciklodekstrini imaju oblik krnjeg stošca. Hidroksilne skupine su orijentirane prema van, s time da su zbog smanjene rotacije  $\alpha$ -(1,4) veza primarne hidroksilne skupine usmjerene prema užem rubu stošca, a sekundarne prema širem rubu. (Jug i Bećirević-Lačan, 2008) U unutrašnjosti ciklodekstrina se nalazi hidrofoban skelet ugljika glukopiranoznih jedinica, što je ključna značajka ciklodekstrina jer omogućuje stvaranje uklopljenih spojeva, inkluzija. Prilikom stvaranja inkluzija obično dolazi do interakcije samo jedne molekule sa šupljinom ciklodekstrina. Razne ne-kovalentne sile, kao što su Van der Waalsove, vodikove, elektrostatske interakcije i druge odgovorne su za stvaranje stabilnog kompleksa. Formiranje inkluzije može se smatrati kao 'kapsuliranje' molekule lijeka, ili barem labilnog dijela molekule. Inkapsuliranje štiti molekulu lijeka od napada različitih reaktivnih molekula i na taj način smanjuje brzinu hidrolize, oksidacije, pregradnje, racemizacije i čak enzimske razgradnje. Također, ciklodekstrini mogu smanjiti fotodegradaciju različitih lijekova osjetljivih na svjetlost. Osim zaštite molekule unutar šupljine ciklodekstrini mogu promijeniti i neželjena svojstva same molekule kao što je neugodan okus, slaba bioraspoloživost ili slaba topljivost u vodi. Mnoge su tehnike korištene za stvaranje CD kompleksa, a neke od njih su ko-precipitacija, metode vlažnog ili suhog miješanja, metode grijanja ili ekstruzije.



**Slika 7.** Ilustracija inkluzijskog kompleksa (preuzeto iz: Sharma i Baldi, 2014)

Prirodni ciklodekstrini mogu se modificirati čime se može povećati ili smanjiti njihova topljivost. Modifikacija 2- ili 3-hidroksilne skupine dovodi do poremećaja u vodikovoj vezi koja se pojavljuje oko prstena ciklodekstrina. Zbog poremećaja omogućeno je više interakcija tih hidroksilnih skupina s molekulama vode, što rezultira promjenom topljivosti, npr. metilirani ciklodekstrin pokazuje do 50 puta veću topljivost u vodi od nesupstituiranog ciklodekstrina. (Shimpi, 2005)

Ciklodekstrini se u farmaciji koriste za optimiziranje lokalne i sistemske terapije lijeka, koja može uključivati oralnu, nazalnu, okularnu, dermalnu ili pak parentalnu primjenu lijeka. Sa toksikološkog aspekta, zbog velike molarne mase i hidrofobnosti prirodni ciklodekstrini teško penetriraju preko lipofilne biološke membrane. Zbog toga je samo 1-3% doze ciklodekstrina absorbirano u gastrointestinalnom sustavu dok je dermalna, nazalna i okularna bioraspoloživost još manja. Zbog te slabe gastrointestinalne apsorpcije istraživanja su pokazala da je oralno unesen ciklodekstrin praktički netoksičan. (Jug i Bećirević-Lačan, 2008)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Tijekom proizvodnje maslinovog ulja kao jedan od nusprodukata nastaje i komina masline. Komina masline sadrži znatan udio lignina koji otežava njenu razgradnju te fitotoksične spojeve koji su pokazali negativan učinak na vodeni sustav, populaciju mikroorganizama u tlu i zrak. Ipak, komina masline također sadrži i značajne količine različitih bioaktivnih spojeva koje se mogu iskoristiti na različite načine. Polifenoli (oleuropein, hidroksitirosol i tirosol) koji se nalaze u komini dokazano su korisni u prevenciji mikro i makrovaskularnih komplikacija u dijabetesu, supresiji upalnog odgovora, smanjivanju učestalosti ateroskleroze i mnogih vrsta karcinoma. Zbog visokog sadržaja spomenutih sastavnica, komina masline se počinje prepoznavati kao vrijedan prirodan produkt s visokim potencijalom iskorištavanja u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Cilj ovog rada je odrediti antioksidacijsku učinkovitost različitih ekstrakata komine masline (nativnog i inkapsuliranih različitim ciklodekstrinima) primjenom različitih *in vitro* pristupa za određivanje antioksidacijske učinkovitosti. U tu svrhu korištena je metoda kidanja DNA koja mjeri učinkovitost ekstrakta komine masline u zaštiti bioloških molekula od djelovanja peroksilnih radikala (konkretno, kidanje dvostruke uzvojnice DNA). Antiradikalna učinkovitost ekstrakata komine masline protiv kisikovih radikala određena je ORAC metodom koja prati učinkovitost antioksidansa kroz duži vremenski period što je čini superiornom u odnosu na niz ostalih *in vitro* metoda koje mjere antioksidacijski potencijal u jednoj točki.

Dobiveni rezultati značajno će doprinjeti trenutnim saznanjima o antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakta komine masline te mogućnostima primjene inkapsulacije ciklodekstrinima u poboljšanju svojstava završnog produkta.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kemikalije i pribor

- pBR322 Plazmid DNA izoliran iz Escherichie coli RRI, čuvan na temperaturi 2-8 °C (Sigma, Missouri, SAD)
- Nasumično metilirani β-ciklodekstrin (RAMEB) (Sigma, Missouri, SAD)
- Hidroksipropil β-ciklodekstrin (HPβCD) (Sigma, Missouri, SAD)
- 2-(6-hidroksi-3-okso-(3H)-ksanten-9-il) benzojeva kiselina-fluorescein (Sigma, Missouri, SAD)
- Fosfatni pufer za reakcijsku smjesu-PBS (Sigma, Missouri, SAD)
- (±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina –Trolox (Sigma, Missouri, SAD)
- 2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihidroklorid- AAPH (Sigma, Missouri, SAD)
- Deionizirana voda (18 mΩ) Millipore-MiliQ system za pročišćivanje vode (Merck, New Jersey, USA)
- Eppendorf epruvete od 2mL za uzorke
- Analitička vaga (Mettler-Toledo, SAD)
- Vortex miješalica, tip VTX -3000L (LMS, Tokio, Japan)
- Multikanalna pipeta Rainin Crux (Mettler-Toledo, SAD)



**Slika 8.** Multikanalna pipeta Rainin Crux (preuzeto iz: <http://www.crux.hr>)

- Agarozni gel (Kemig, Hrvatska)
- GelRed® boja za gel elektroforezu (Biotium, Fremont, USA)
- Image Quant LAS 500 –uređaj za kvantificiranje DANN bendova (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA)
- Čitač mikrotitarskih ploča, VictorX3, (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD)





**Slika 9.** Čitač mikrotitarskih ploča, VictorX3 (preuzeto iz: <http://www.perkinelmer.com> )

### **3.2. Priprema ekstrakata komine masline**

Uzorak komine masline je uzet iz dvofaznog mlina nakon proizvodnje maslinovog ulja. Svježi uzorak je smrznut na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  čime se onemogućilo raspadanje vrijednih sastavnica. Nakon odmrzavanja, uzorak se sušio 24 h u termostatu na  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  u velikim Petrijevim zdjelicama. Da bi se uklonile koštice i homogenizirao uzorak, komina je usitnjena u tarioniku i mlincu i prosijana kroz sito veličine pora  $0,8\text{ }\mu\text{m}$ . Homogenizirana komina se nakon toga odmašćivala pomoću Soxhlet uređaja i petroletera tijekom 2 sata. Na taj način uklonjena je uljna komponenta uzorka koja bi ometala daljnju analizu. Nakon toga slijedila je ekstrakcija korisnih supstancija iz uzorka. Ekstrakcija se provodila u vodenoj kupelji, 2 sata na  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , brzinom 110 okretaja u minuti i sa 60 postotnim etanolom kao otapalom. Potom se uzorak filtrirao i u tikvici uparavao na  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  čime se uklonio etanol. Zadnji korak u pripremi uzorka komine masline je bilo sušenje uzorka liofilizacijom tijekom 48 h čime smo dobili nativni uzorak. Osim nativnog uzorka pripremljeni su i uzorci u koje su dodani dvije različite vrste ciklodekstrina: hidroksipropil  $\beta$  (HPB) i nasumično metilirani  $\beta$  (Randomly Methylated  $\beta$ -cyclodextrine -RAMEB).

**Tablica 3.** Sastav različitih uzorka ekstrakata komine masline

Oznaka uzorka	Vrsta ciklodekstrina	Masena koncentracija komine (g/L)	Masena koncentracija ciklodekstrina (g/L)
<b>NAT</b>	-	20	0
<b>HPB</b>	Hidroksipropil $\beta$	20	8
<b>RAMEB</b>	Nasumično metilirani $\beta$	20	8

### 3.3. Metoda kidanja DNA

#### 3.3.1. Priprema razrjeđenja uzoraka

Iz postojeće stock otopine uzoraka koncentracije 5000  $\mu\text{g/mL}$  naprave se 2 nove stock otopine koncentracije 1000  $\mu\text{g/mL}$  (A) i 100  $\mu\text{g/mL}$  (B) tako da se stock otopina koncentracije 5000  $\mu\text{g/mL}$  razrjeđuje fosfatnim puferom. Stock otopine A i B koriste se za izradu mjernih otopina. Volumeni uzoraka koji se dodaju u reakcijsku smjesu su izračunati i prikazani u Tablici 4.

**Tablica 4.** Priprema razrjeđenja uzoraka iz stock otopina

C1 ( $\mu\text{g/mL}$ ) stock uzorka	V1 uzorka ( $\mu\text{L}$ )	C2 ( $\mu\text{g/mL}$ ) u reakcijskoj smjesi)	V2 ( $\mu\text{L}$ ) reakcijske smjese
<b>1000</b>	2,5	250	10
<b>1000</b>	0,5	50	10
<b>100</b>	1	10	10
<b>100</b>	0,2	2	10

#### 3.3.2. Priprema pufera za reakcijsku smjesu (PBS)

Na analitičkoj vagi izvaže se 0.26 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 42.17 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , te 8.71 g NaCl te se pomiješa sa 800 mL deionizirane vode. Nakon miješanja pH otopine se podese na 7.4 i volumen se nadopuni sa deioniziranom vodom do 1000 mL. U konačnici se dobije pufer koncentracije 10mM.

#### 3.3.3. Priprema stock otopine radikala (AAPH)

Da bi se dobila stock otopina koncentracije 50 mmol/L potrebno je otopiti 13.6 mg AAPH u 1 mL PBS-a. Koncentracija u reakcijskoj smjesi treba biti 10 mmol/L; dakle u reakcijsku smjesu ukupnog volumena 10  $\mu\text{L}$  ide 2  $\mu\text{L}$  50 mmol/L AAPH. Stock otopinu radikala potrebno je pripremiti svježe svaki dan prije pokusa.

### 3.3.4. Priprema stock otopine standardnog antioksidansa (Trolox)

Ishodna otopina izrađuje se otapanjem 2,5 mg Troloxa u 1mL etanola. Stock otopina Troloxa koncentracije 250 µg/mL pripremi se razrijeđenjem ishodne otopine Troloxa 2,5 mg/mL. Stock otopina radi se razrijeđivanjem sa fosfatnim puferom. Volumeni stock otopine Troloxa koji se dodaju u reakcijsku smjesu prikazani su u Tablici 5.

**Tablica 5.** Koncentracijski raspon Trolox-a u reakcijskim otopinama

Trolox (µg/mL) u ishodnoj otopini	Trolox (µL)	Reakcijska smjesa (µL)	Trolox(µg/mL) u reakcijskoj smjesi)
250	2	10	50
250	1	10	25
250	0,4	10	10
250	0,2	10	5
250	0,1	10	2,5

### 3.3.5. Priprema otopine DNA

Liofilizirani prašak DNA se otopi u takvom volumenu PBS-a da se dobije otopina DNA koncentracije 50 ng/mL (jedna A260 jedinica odgovara cca 50 µg DNA). U reakcijsku smjesu od 10 µL ide 4 µL DNA; dakle koncentracija DNA u reakcijskoj smjesi je 20 ng/mL. Otopina DNA stabilna je neko vrijeme na 4°C (oko mjesec dana), a neutrošenu DNA potrebno je alikvotirati i zamrznuti.

### 3.3.6. Izrada pufera za elektroforezu (TAE)

Pufer za elektroforezu priprema se tako da se pomiješa 0.04 mol/L Tris HCl, 5 mmol/L natrijevog acetata te 0.04 mmol/L EDTA. pH se podesi na 7.9 .

### 3.3.7. Pufer za nanošenje uzorka

Pufer za nanošenje uzorka priprema se na način da se 2,5 g/L bromfenol plavila pomiješa sa 400 g/L saharoze te se miješanjem otopi u deioniziranoj vodi.

### 3.3.8. Agaroz (0.7%)

Zagrijavanjem je potrebno potpuno otopiti 0.7 g agaroze u 100 mL pufera za elektroforezu. Pripremljena agaroz se hladi na oko 50°C, te se nakon hlađenja izlijeva u kadicu u koju se stavljaju „češljici“ kako agaroz ne bi iscurila iz kadice.

### 3.3.9. Priprema boje za elektroforezu

10 µL GelRed-a se pomiješa s 1 mL 6x pufera za nanošenje uzorka. Boja i pufer se čuvaju na sobnoj temperaturi zaštićeni od svjetla. Pri nižim temperaturama, GelRed se istaloži. Homogenizira se zagrijavanjem do 50 °C i vorteksiranjem. Kako bi se dobili oštri bandovi, preporučena količina DNA koja se nanosi na gel ne bi smjela prelaziti 200 ng. Također, GelRed utječe na mobilnost i ukoliko je potrebno precizno određivanje veličine fragmenata ili je potrebno njihovo visoko razlučivanje, preporuča se bojanje nakon završene elektroforeze.

### 3.3.10. Priprema reakcijskih smjesa za pokus

Reakcijske smjese pripremaju se u Eppendorficama prema tablici. Svaka smjesa ima ukupni volumen 10 mL. Trolox koji se koristi je otopina koncentracije 250 µg/mL. Uzorak koji je označen slovom A koncentracije je 1000 µg/ml, a uzorak označen slovom B 100 µg/mL. Najprije se pipetira PBS, potom uzorak/Trolox, pa AAPH i na kraju DNA. Nakon dodatka reagensa reakcijska smjesa se kratko miješa pomoću Vortex miješalice i onda kratko centrifugira kako bi se spriječilo da ne bude ostataka reakcijske smjese po stijenjkama reakcijske posude. Eppendorf kivete se nakon toga inkubiraju na 37 °C slijedeća 2 sata uz miješanje na 350 rpm. Nakon završetka inkubacije reakcijske smjese se nanose na agarozni gel pomoću pipete. Shema nanošenja reakcijskih smjesa na agarozni gel prikazana je u Tablici 6.

**Tablica 6.** Shema pripreme mjernih otopina

	µg/mL (reakcijska smjesa)							µg/mL (reakcijska smjesa)											
	KO N	S P	ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	ST 5	NAT 1	NAT 2	NAT 3	NAT 4	HP B1	HP B2	HP B3	HP B4	RAM EB1	RAM EB2	RAM EB3	RAM EB4
PBS	6	4	2	3	3.6	3.8	3.9	1.5	3.5	3	3.8	1.5	3.5	3	3.8	1.5	3.5	3	3.8
AAPH	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
TROLOX	0	0	2	1	0.4	0.2	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UZORAK	0	0	0	0	0	0	0	2,5A	0,5A	1B	0,2B	2,5 A	0,5 A	1B	0,2 B	2,5A	0,5A	1B	0,2B
DNA	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

*A* – uzorak koncentracije 1000 µg/ml

*B* – uzorak koncentracije 100 µg/mL

*NAT* – uzorak bez ciklodekstrina

*HPB* – uzorak sa dodatkom hidroksipropil β-ciklodekstrina

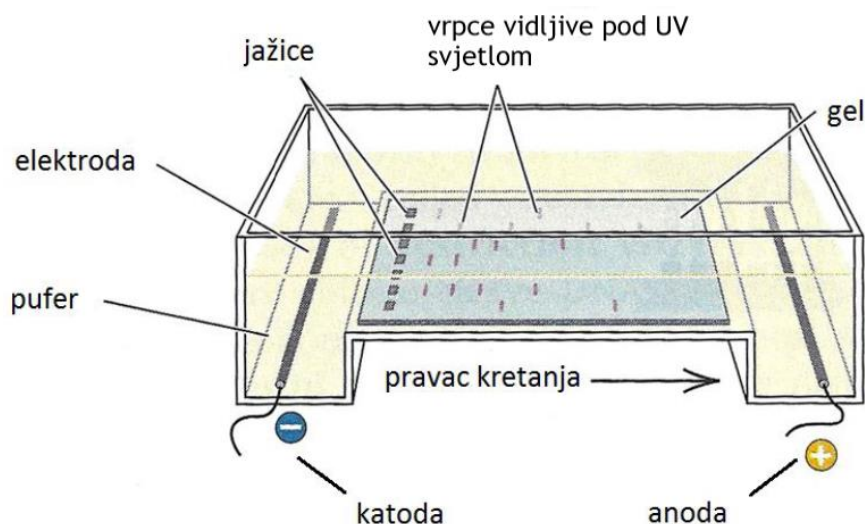
*RAMEB* – uzorak sa dodatkom nasumično metiliranog β-ciklodekstrina

*Trolox* – otopina koncentracije 250 µg/mL

### 3.3.11. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu

Agaroz je visoko pročišćeni prirodni polisaharid koji se dobiva iz agara. Gel od agaroze nastaje hlađenjem vodene otopine agaroze pripremljene otapanjem agaroze u obliku bijelog praha u kipućoj vodi. Pri hlađenju na određenim dijelovima jedinica agaroze nastaju odsječci s dvostrukom uzvojnicom. Time se umrežavaju molekule i nastaju vlaknaste polimerne strukture. Između polimernih vlakana, u porama, zadržava se voda odnosno otopina elektrolita i tako nastaje gel. Veličina pora u gelu ovisi o koncentraciji agaroze. (Piljac, Elektroforeza, 2006..)

Fragmenti dvolančane DNA kod neutralnog pH nose negativan naboj i dobro se odjeljuju elektroforezom na agaroznom gelu. Elektroforetska pokretljivost ovisi o veličini fragmenata i uglavnom je neovisna o nukleotidnom sastavu. Međutim, na pokretljivost utječe i oblik molekule DNA (linearna, cirkularna, superuzvojnica). Za odjeljivanje vrlo malih fragmenata DNA koriste se gelovi s visokim postotkom agaroze (do 2%). Veliki fragmenti bolje se odjeljuju na niskopostotnim agaroznim gelovima (0.3-0.7%). Prije ulijevanja pripremljene agaroze u kadicu za elektroforezu se postavljaju pregrade kako bi se spriječilo izlijevanje otopine agaroze prije polimerizacije. Pomoću kapalice doda se malo otopine agaroze uz rubove pregrada kako bi se provjerilo da li otopina agaroze negdje curi. Nakon nekoliko minuta ulijeva se topla otopina agaroze u kadicu za elektroforezu te se postavlja „češalj” koji omogućava formiranje jažica za nanošenje uzoraka. Nakon što se gel polimerizira (oko 30 minuta), „češalj” se uklanja te se dodaje toliko pufera da prekrije gel (1-2 mm iznad gela). Uzorci se pripremaju tako da se na parafilmu izmiješa reakcijska smjesa ukupnog volumena 10  $\mu\text{L}$  sa 4  $\mu\text{L}$  boje. Nakon što su uzorci pomiješani sa bojom nanose se u jažice na gelu i provodi se elektroforeza pri naponu od 120V u trajanju od 45 min (ostali parametri se postave na maksimalne vrijednosti da bi se napon održavao konstantnim). Nakon elektroforeze gel se gleda pod izvorom UV svjetla.



**Slika 10.** Elektroforeza DNA na agaroznom gelu (preuzeto iz:<https://www.researchgate.net>)

### 3.4. ORAC antioksidacijska učinkovitost

ORAC (kapacitet apsorpcije radikala kisika) mjeri sposobnost antioksidansa da inhibira oksidaciju uzrokovanu peroksilnim radikalom i mjeri je ukupnog antioksidacijskog kapaciteta. Peroksilni radikal reagira s fluorescentnom probom, mijenjajući intenzitet fluorescencije tj. povećava brzinu pada fluorescencije. U prisutnosti antioksidacijskog spoja (smjese antioksidansa) smanjenje fluorescencije je inhibirano. Test se provodi u mikrotitarskoj ploči s 96 jažica te može trajati od pola sata do nekoliko sati. Mikrotitarska pločica se stavlja u uređaj za mjerenje fluorescencije koji mjeri pad fluorescencije. Ova analiza je jedinstvena po tome što se prati dinamička promjena fluorescencije sonde tijekom vremena koja se izračunava računanjem površine ispod krivulje pada fluorescencije (AUC). Rezultat se dobiva izračunavanjem područja ispod fluorescentne krivulje, i izražava se kao ekvivalent od mikromola Trolox-a po mL ili po gramu. Za izračunavanje rezultata koristi se sljedeća formula:

$$AC = \frac{AUC_{uzorka} - AUC_{slijepa\ proba}}{AUC_{trolox} - AUC_{slijepa\ proba}} * C_{trolox}$$

U formuli AC predstavlja antioksidacijski kapacitet,  $AUC_{uzorak}$  predstavlja površinu ispod krivulje smjese uzorka, AAPH i fluorescentne probe (fluorescein),  $AUC_{slijepa\ proba}$  površinu ispod krivulje smjese fluoresceina i fosfatnog pufera,  $AUC_{Trolox}$  površinu ispod krivulje

Trolox, a  $c_{\text{Trolox}}$  predstavlja koncentraciju otopine Troloxa. ORAC analiza mjeri sposobnost antioksidansa da ugasi slobodne radikale donacijom vodika i stoga je mjera i općeg i specifičnog antioksidacijskog djelovanja. (Litescu i sur., 2014)

#### 3.4.1. Fluorescein

Otopina fluoresceina se pripremi tako da se 125  $\mu\text{L}$  stocka fluoresceina koncentracije 1 mM ulije u tikvicu od 25 mL i nadopuni fosfatnim puferom.

#### 3.4.2. Trolox

Otopine Troloxa pripremaju se u rasponu koncentracija od 3,125 do 100  $\mu\text{M}$  na način da se pomiješaju određeni volumeni otopine Troloxa i fosfatnog pufera kao što je prikazano u Tablici 7.

**Tablica 7.** Priprema otopine Troloxa

Trolox		Fosfatni pufer
<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	10 $\mu\text{L}$ stock otopine Troloxa	990 $\mu\text{L}$
<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	500 $\mu\text{L}$ otopine Troloxa konc. 100 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{L}$
<b>25 <math>\mu\text{M}</math></b>	500 $\mu\text{L}$ otopine Troloxa konc. 50 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{L}$
<b>12,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	500 $\mu\text{L}$ otopine Troloxa konc. 25 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{L}$
<b>6,25 <math>\mu\text{M}</math></b>	500 $\mu\text{L}$ otopine Troloxa konc. 12,5 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{L}$
<b>3,125 <math>\mu\text{M}</math></b>	500 $\mu\text{L}$ otopine Troloxa konc. 6,25 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{L}$

#### 3.4.3. Uzorci

Da bi iz uzorka koncentracije 1 mg/mL dobili uzorke koncentracije 0,125 mg/mL miješa se 63  $\mu\text{L}$  stock otopine uzorka i 441  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera. Nakon toga uzorci se razrjeđuju 400x sa fosfatnim puferom.

#### 3.4.4. AAPH

U falkon epruvetu odvaži se 203,4 mg AAPH te otopi u 5 mL fosfatnog pufera.

#### 3.4.5. Priprema mikrotitarske ploče

Nakon što su svi reagensi pripremljeni, u 40 jažica mikrotitarske ploče dodaje se 150  $\mu\text{L}$  fluoresceina pri čemu se izbjegavaju jažice na krajevima zbog temperaturne razlike. U pokusu

se koristi multikanalna pipeta kako bi se skratilo vrijeme potrebno da se pojedina otopina stavlja zasebno u svaku jažicu. Nakon toga se u 5 jažica dodaje 25  $\mu$ L fosfatnog pufera što predstavlja slijepu probu, u tri jažice koje su označene slovom F po 50  $\mu$ L pufera, a u ostatak jažica dodaje se ili 25  $\mu$ L otopine Troloxa ili 25  $\mu$ L otopine uzorka. Uređaj za mjerenje fluorescencije se podesi na pokretanje fluorescentnog kinetičkog očitavanja uz eksitacijsku valnu duljinu od 485 nm i emisijsku valnu duljinu od 535 nm. Temperatura ispitivanja se podesi na 37°C. Mjerenje intenziteta fluorescencije se mjeri 13 puta pri čemu se na početku svakog mjerenja pločica protrese 7 sekundi i između svakog mjerenja se radi pauza od 290 sekunda. Mikrotitarska pločica se zatim stavlja u uređaj i zagrijava 10 minuta nakon čega se vadi van i brzo pomoću multikanalne pipete stavlja 25  $\mu$ L AAPH u sve jažice osim u one koje su označene sa F nakon čega slijedi proces mjerenja prema prethodno napisanom protokolu. Raspored reakcijskih smjesa za ORAC pokus prikazan je u Tablici 8.

**Tablica 8.** Shema za ORAC pokus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>		T50	T100	T100	T100	T100	NAT	NAT	NAT	NAT	T25	
<b>B</b>		T50	RAMEB	RAMEB	RAMEB	RAMEB	HPB	HPB	HPB	HPB	T25	
<b>C</b>		T50	T12,5	T12,5	T12,5	T12,5	T6,25	T6,25	T6,25	T6,25	T25	
<b>D</b>		T50	F	F	F	SP	SP	SP	SP	SP	T25	
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>												

*T100 - Trolox koncentracije 100  $\mu$ g/mL + fluorescein + AAPH, T50 - Trolox koncentracije 50  $\mu$ g/mL + fluorescein + AAPH  
T25 - Trolox koncentracije 25  $\mu$ g/mL + fluorescein + AAPH, T12,5 - Trolox koncentracije 12,5  $\mu$ g/mL + fluorescein + AAPH  
T6,25 - Trolox koncentracije 6,25  $\mu$ g/mL + fluorescein + AAPH, NAT - uzorak bez ciklodekstrina + fluorescein + AAPH  
HPB - uzorak sa dodatkom hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina + fluorescein + AAPH  
RAMEB - uzorak sa dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina + fluorescein + AAPH  
F - fluorescein + fosfatni pufer, SP - slijepa proba (fosfatni pufer + fluorescein + AAPH)*

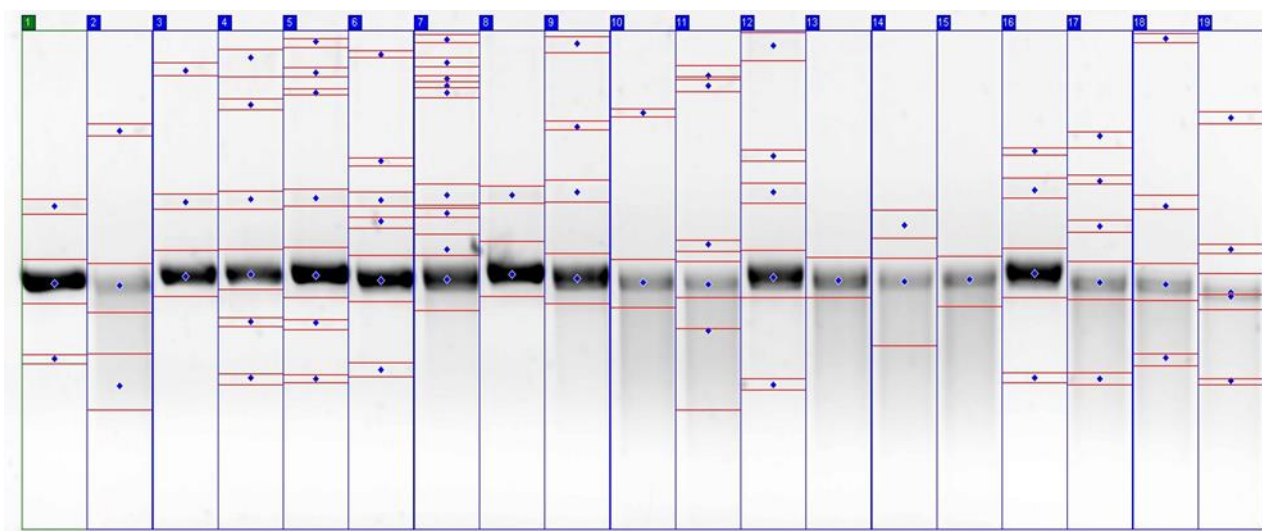
Nakon obavljenog pokusa uređaj za mjerenje fluorescencije Victor daje podatke o izmjerenoj fluorescenciji nakon svakog kruga mjerenja. Svi podaci se prikazuju u pivot tablici. Izmjerena fluorescencija se preračunava u postotak intenziteta fluorescencije s time da se smatra da je prva fluorescencija koju je izmjerio uređaj za mjerenje 100%-tna, a zadnja fluorescencija 0%-tna. Tablica sa postocima izmjerene fluorescencije se prebacuje u program GraphPad koji služi za izračunavanje površine ispod krivulje. Od svih površina ispod krivulja izračunava se njihova srednja vrijednost tj. AUC. Od svake površine ispod krivulje (AUC-a) oduzima se površina ispod krivulje slijepa probe te se dobiva nAUC.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

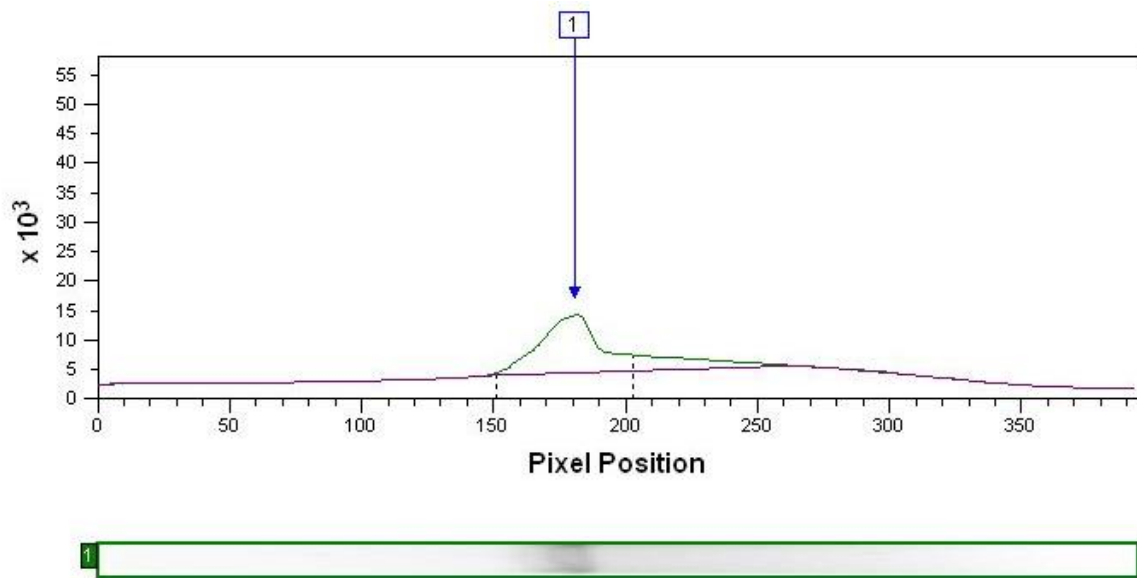
### 4.1. Metoda kidanja DNA

Nakon gel elektroforeze agarozni gel se gleda u tamnoj komori pod UV svjetlom. Pod UV svjetlom vide se vrpce nativne DNA, kao i vrpce ostalih oblika DNA. Ovisno o tome koliko je nativne DNA sačuvano ili razgrađeno zbog djelovanja peroksilnog radikala vrpca nativne DNA se vidi kao tamnija ili svjetlija mrlja. Tamnija mrlja znači da je više nativne DNA ostalo sačuvano dok svjetlija mrlja znači da je nativna DNA djelomično ili potpuno razgrađena zbog djelovanja peroksilnog radikala.



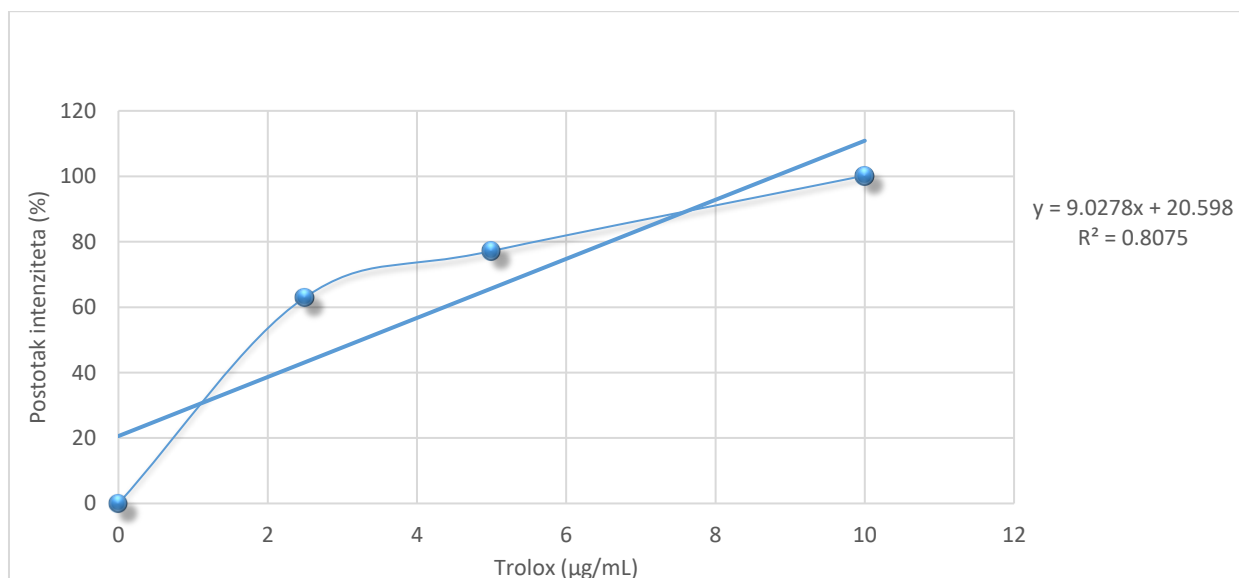
**Slika 11.** Vrpce DNA dobiveni gel elektroforezom prikazani pod UV svjetlom

Iako se pojedine vrpce mogu usporediti vizualno prema nijansi benda, za dobivanje jasnih rezultata i bolje uspoređivanje se pomoću programa Image Quant i uz pripadajući softver vizualiziraju i kvantificiraju bendovi. Slikanje se vrši na automatskim postavkama kao i kvantifikacija DNA u obliku superuzvojnice. Ako se žele kvantificirati i ostali oblici DNA, kvantifikacija se mora izvršiti ručno jer vrpce superuzvojnice imaju puno jači signal od ostalih pa ih program ne može detektirati automatski. Image Quant je program koji sam može odrediti područje mjerenja te automatski oduzeti prisutan intenzitet pozadine pa rezultati koji se dobiju predstavljaju točan intenzitet vrpce. Kao što se vidi na Slici 12. crvena linija predstavlja intenzitet pozadine, dok zelena linija predstavlja intenzitet vrpce, a signal se očitava u onoj točki gdje je najveća razlika između intenziteta pozadine i intenziteta vrpce (označeno sa brojem 1 na Slici 12).

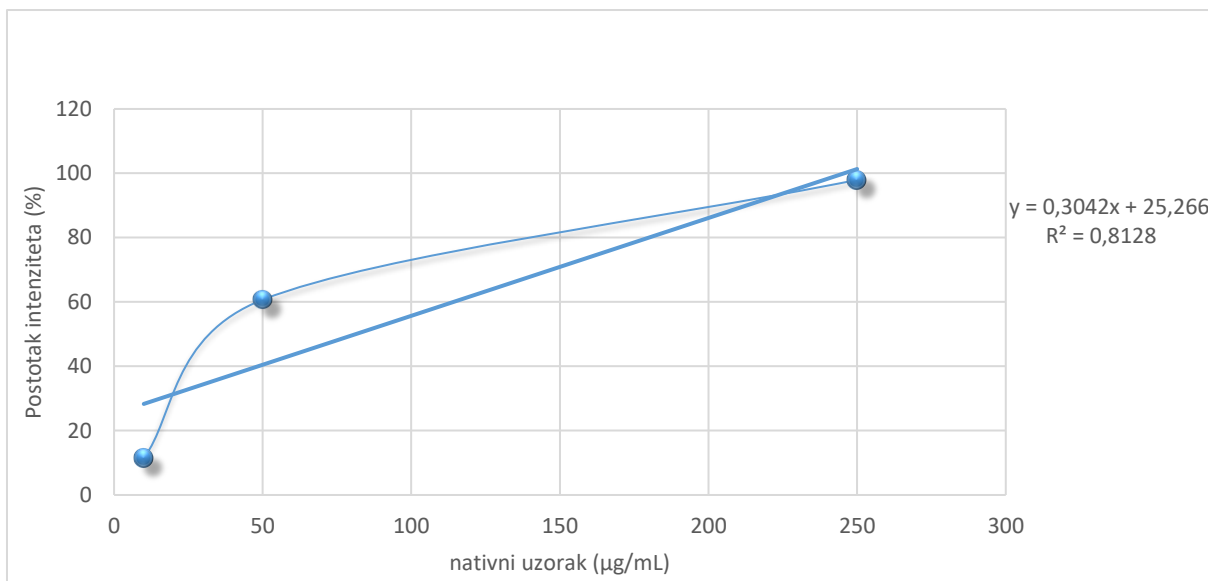


**Slika 12.** Intenzitet pozadine i benda

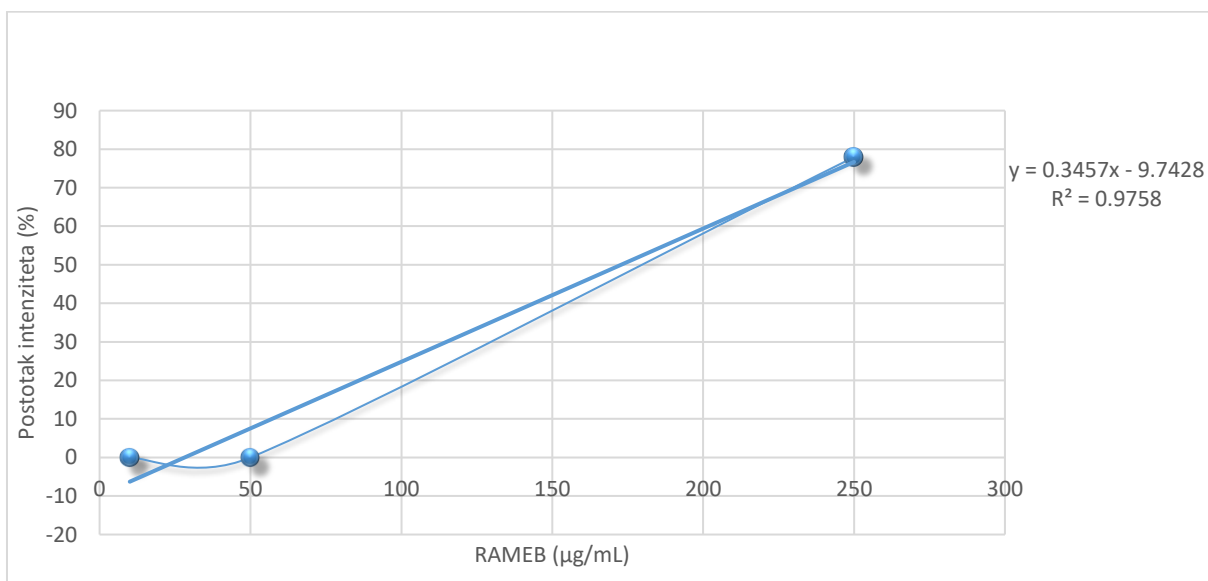
Nakon što smo od početnih rezultata intenziteta vrpce (koji predstavljaju ukupan intenzitet u koji je uključen i intenzitet pozadine) oduzeli intenzitet pozadine dobiveni rezultati se preračunavaju u postotke tako da se intenzitet vrpce podijeli sa intenzitetom kontrole te pomnoži sa 100. Rezultati se prikazuju u zasebnim grafovima za Trolox i za svaki od uzoraka ekstrakata komine masline gdje x-os predstavlja koncentraciju reakcijske smjese, a y-os postotak intenziteta vrpce.



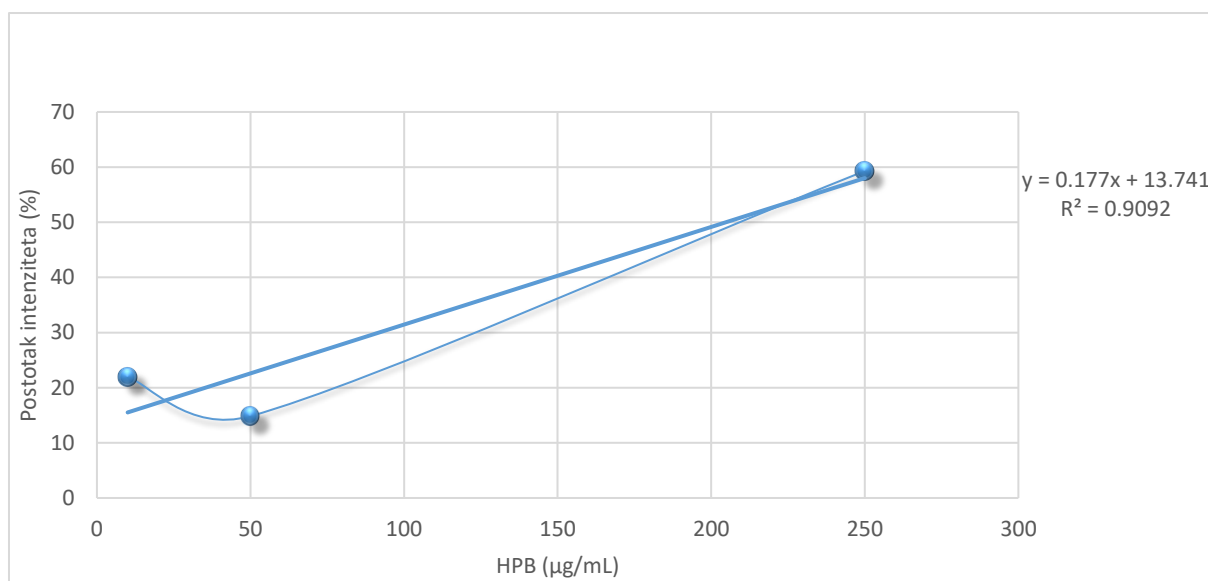
**Slika 13.** Grafički prikaz ovisnosti postotka native DNA o koncentraciji Troloxa u reakcijskoj smjesi



**Slika 14.** Grafički prikaz ovisnosti koncentracija nativnog uzorka o postotku intenziteta vrpce



**Slika 15.** Grafički prikaz ovisnosti koncentracija RAMEB-a o postotku intenziteta vrpce



**Slika 16.** Grafički prikaz ovisnosti koncentracija HPB o postotku intenziteta vrpce

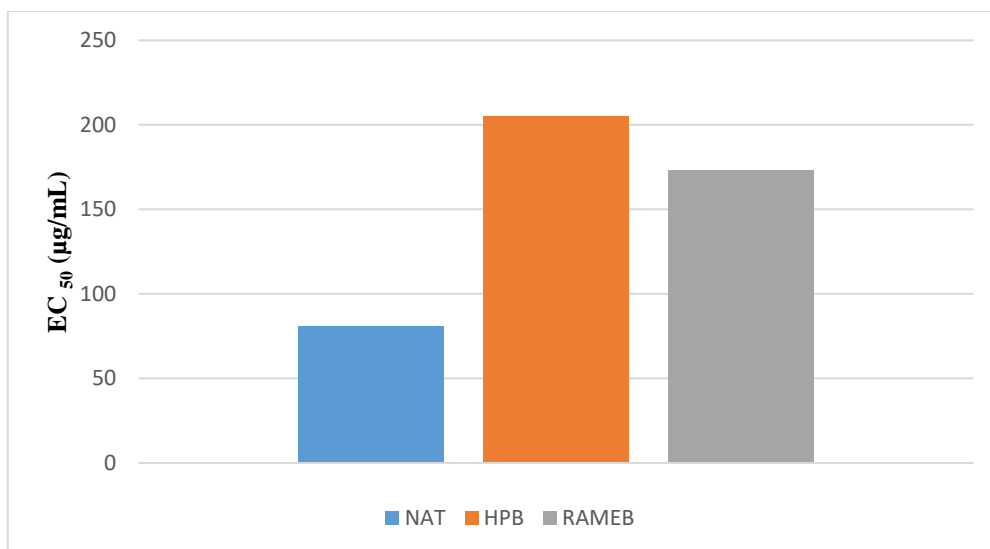
Za svaki uzorak izračuna se jednadžba pravca koja je potrebna da bi se mogao dobiti  $EC_{50}$ .  $EC_{50}$  označava koncentraciju uzorka pri kojem je očuvano 50% native DNA. Dobiva se prema sljedećoj formuli:

$$EC_{50} = (50 - \text{odsječak na } y\text{-osi}) - \text{nagib krivulje}$$

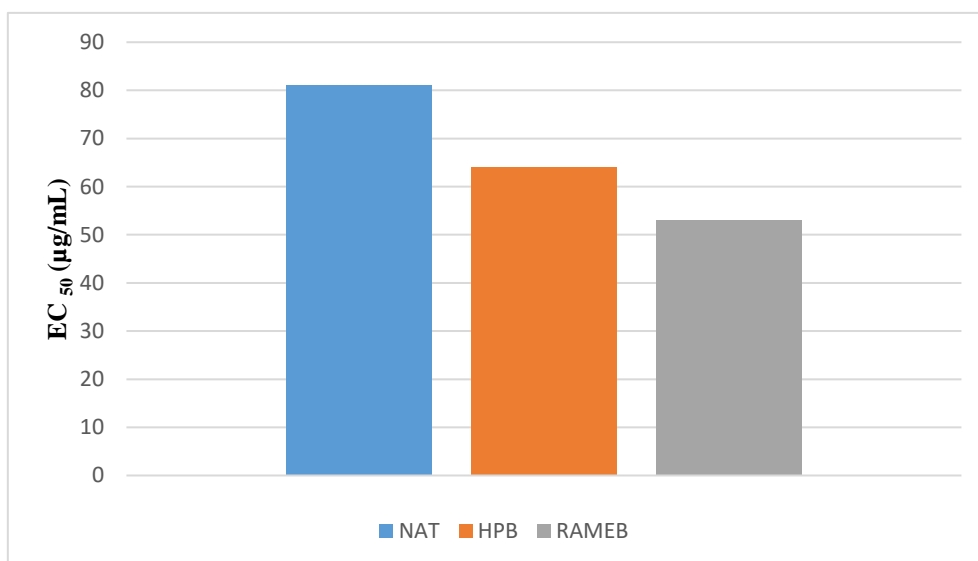
S obzirom da je u nativnom uzorku (uzorak bez dodatka ciklodekstrina) najviši udio komine, a u HPB i RAMEB uzorcima manji udio komine zbog dodatka ciklodekstrina rezultati  $EC_{50}$  se moraju preračunati tako da se dobije  $EC_{50}$  komine u uzorku.  $EC_{50}$  uzorka izražava se na masu suhog produkta. Prema prvim rezultatima, bez preračunavanja  $EC_{50}$ , rezultati pokazuju da nativni uzorak ima najmanji  $EC_{50}$  što bi značilo da je ujedno i najbolji antioksidans što je i logično jer sadrži najveći postotak komine masline tj. najveći udio polifenola antioksidacijskog djelovanja.  $EC_{50}$  čistog ekstrakta komine u uzorku se izračunava tako da se prethodno dobiveni  $EC_{50}$  množi sa udjelom komine u uzorku.

Nakon preračunavanja, rezultati pokazuju da je  $EC_{50}$  nativnog uzorka najveći, a najmanji  $EC_{50}$  ima RAMEB. S obzirom da  $EC_{50}$  označava koncentraciju uzorka koja je potrebna da se očuva 50% native uzvojnice DNA, što je manja koncentracija potrebna to je uzorak bolji antioksidans tj. ima veću sposobnost očuvanja DNA od slobodnih radikala. Prema tome zaključuje se da je RAMEB uzorak najbolji antioksidans pošto je potrebna najmanja koncentracija da se očuva nativna DNA. Kao drugi najbolji antioksidans pokazao se HPB, a najlošiji od tri navedena je nativni uzorak. S obzirom da su ciklodekstrini dodani kako bi inkapsulirali ekstrakt komine

masline te ga na taj način dodatno zaštitili od radikala rezultat koji pokazuje da su uzorci koji su bili inkapsulirani pomoću ciklodekstrina bolji antioksidansi od nativnog uzorka bez ciklodekstrina je očekivani.



**Slika 17.** Prikaz EC<sub>50</sub> uzoraka izraženo na masu suhog produkta



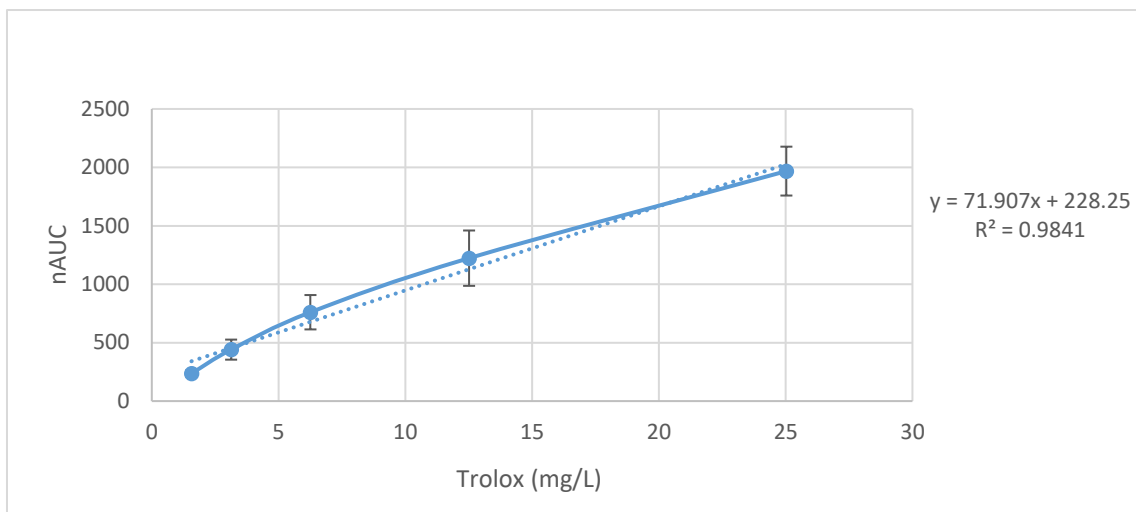
**Slika 18.** Prikaz EC<sub>50</sub> izraženo na masu čistog ekstrakta komine

Rađena su slična istraživanja koja su koristila metodu kidanja DNA kao dokaz za potencijalno antioksidacijsko djelovanje različitih ekstrakata; Suksomtip i Pongsamart (2008) koristili su metanolni ekstrakt sjemenke tajlandske Tamarindus indice L. koji sadrži polifenole; (-) epikatehine te su zaključili da prisutnost visoke koncentracije ekstrakta (1 mg/ml) ima sličan učinak kao što ima i Trolox koncentracije 0.5 µg/mL tj. da može zadržati plazmidnu DNA u

svom izvornom obliku. U nekim istraživanjima rađene su modifikacije samog ekstrakta te se uspoređivao modificiran i nemodificiran ekstrakt. Primjer modifikacije ekstrakata u svrhu poboljšanja svojstva je i primjena ciklodekstrina. Hill i suradnici (2013) uspoređivali su svojstva čistih eteričnih ulja i inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina i eteričnih ulja. Stvaranje inkluzijskih kompleksa potvrdili su pretražnom diferencijalnom kalorimetrijom. Inkluzijski kompleksi sa ciklodekstrinom povećali su topljivost eteričnih ulja u vodi, zaštitili od oksidacije i poboljšali antimikrobne sposobnosti eteričnih ulja. Još jedan od primjera je istraživanje Kima i suradnika (2009) koji su koristili ekstrakt *Citrus grandis* L. koji sadrži visoki sadržaj flavanona u obliku glikozida. Flavanoni su konvertirani u svoje aglikone i hidroksilirani pomoću *Aspergillus saitoi*. Antioksidacijski kapacitet analiziran je korištenjem kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) i metodom kidanja DNA. Uzorak koncentracije 10 µg/mL tretiran sa *A. saitoi* 4 dana pokazao je najveći zaštitni učinak na oštećenje DNA uzrokovano peroksilnim radikalom među testiranim uzorcima sugerirajući da modifikacija flavanonskih aglikonskih ekstrakata *Citrusa grandisa* s *A. saitoi* povećava antioksidacijski učinak.

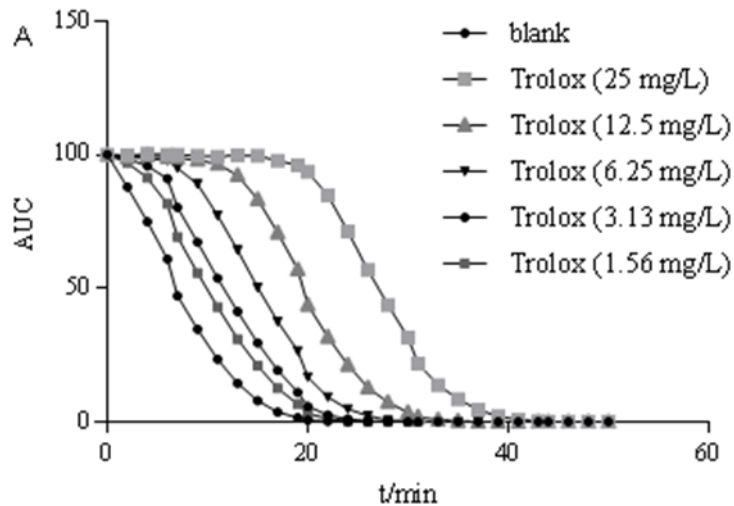
#### **4.2. ORAC antioksidacijska učinkovitost**

Na Slici 19. možemo vidjeti da se sa povećanjem koncentracije Troloxa povećava i površina ispod krivulje (nAUC) tj. da je koncentracija Troloxa proporcionalna površini ispod krivulje. Trolox je antioksidans koji sprječava da peroksidni radikal reagira sa fluorescentnom probom i na taj način smanjuje intenzitet fluorescencije probe. Što je veća koncentracija Troloxa to je njegovo antioksidacijsko djelovanje jače i to će on više reagirati sa peroksilnim radikalom pri čemu će peroksilni radikal prelaziti u manje reaktivni oblik te će intenzitet fluorescencije biti veći, a samim time i izmjerena površina ispod krivulje.



**Slika 19.** Grafički prikaz ovisnosti srednjih vrijednosti površine ispod krivulje o koncentraciji Trolox-a (kalibracijska krivulja)

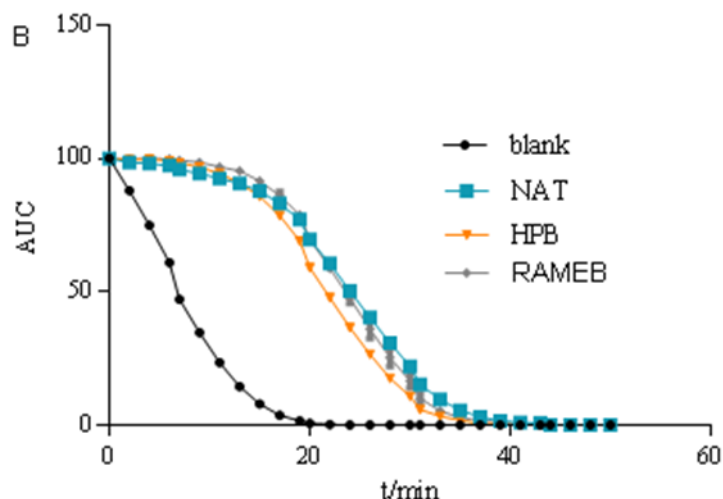
Kao što možemo vidjeti na Slici 20. gdje je prikazana površina ispod krivulje (AUC) u postotcima intenziteta na y-osi te vrijeme u minutama na x-osi sa vremenom se smanjuje postotak intenziteta fluorescencije. S obzirom da su koncentracije Troloxa poznate možemo saznati kakva je ovisnost koncentracije Troloxa o intenzitetu fluorescencije. Kod različitih koncentracija Troloxa dolazi do različitog pada intenziteta u vremenu. Kod svih koncentracija do pada intenziteta ne dolazi odmah nego nakon nekoliko minuta dok kod slijepe probe do pada intenziteta dolazi odmah zato što slijepe proba ne sadrži antioksidans koji bi odgodio djelovanje peroksilnog radikala. Također, kod slijepe probe u kraćem vremenu dolazi do potpunog gubitka fluorescencije nego kod Troloxa. Do potpunog gubitka fluorescencije kod različitih koncentracija Troloxa dolazi između 20. i 40. minute pokusa. Kod većih koncentracija Troloxa dolazi do duljeg odgađanja početnog pada intenziteta fluorescencije tj. što je veća koncentracija Troloxa to će krivulja dulje biti ravna.



**Slika 20.** Krivulja fluorescencije različitih koncentracija Troloxa i slijepe probe

Kod krivulje fluorescencije uzoraka ekstrakata komine masline (Slika 21.) na kojoj je također prikazana površina ispod krivulje (AUC) u postotcima intenziteta na y-osi te vrijeme u minutama na x-osi sa vremenom primjećuje se isti oblik krivulje kao i kod krivulje fluorescencije različitih koncentracija Troloxa prikazanoj na Slici 20. Sa vremenom postotak intenziteta fluorescencije se smanjuje kod svakog od različitih uzorka sa kominom masline. Kod slijepe probe događa se isto kao i u prethodnom mjerenju; zbog nedostataka antioksidansa intenzitet počinje padati odmah nakon mjerenja. Zbog odgođenog pada intenziteta može se zaključiti da ekstrakti komine masline sadrže antioksidacijsku komponentu koja sprječava djelovanje peroksilnog radikala i određeno vrijeme zadržava intenzitet fluorescencije. S obzirom da kod Troloxa jačina antioksidacijskog djelovanja ovisi o koncentraciji; što je veća koncentracija to će Trolox biti bolji antioksidans može se očekivati da će i u ovom slučaju uzorak sa najviše antioksidacijske komponente imati najduže odgođen pad intenziteta fluorescencije. Također, možemo primijetiti da je kod uzoraka ekstrakata komine masline, za razliku od uzoraka Troloxa kod kojih je do potpunog pada intenziteta fluorescencije došlo između 20. i 40. minute, do potpunog gašenja intenziteta došlo kasnije; između 35. i 40. minute.





NAT – uzorak bez ciklodekstrina

HPB – uzorak sa dodatkom hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrina

RAMEB – uzorak sa dodatkom nasumično metilirano  $\beta$ -ciklodekstrina

**Slika 21.** Krivulja fluorescencije uzoraka ekstrakata komine masline i slijepe probe

Da bi mogli međusobno uspoređivati antioksidacijski potencijal ekstrakata komine masline u nativnom obliku i kada je on uklopljen u ciklodekstrine kao što su hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrin i nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin potrebno je izraziti uzorke u ekvivalentima standardnog antioksidansa Troloxa. Za izračunavanje ekvivalenta Troloxa potrebna je jednadžba kalibracijske krivulje (Slika 19) i srednja vrijednost površina ispod krivulja (nAUC). Ekvivalent Troloxa se izračunava pomoću sljedeće formule:

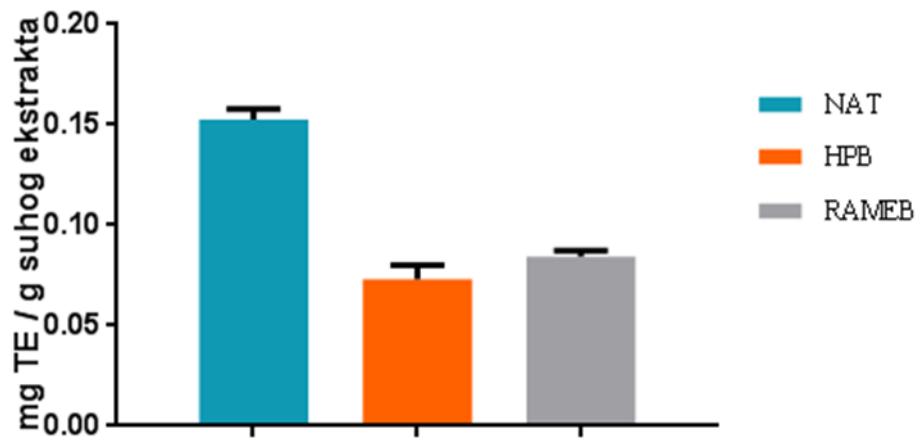
$$mgTE/mL = \frac{nAUC_{uzorka} - odsječak\ na\ y -\ osi}{nagib\ krivulje}$$

Kada se uvrste brojevi kalibracijske krivulje i mL preračunaju u L dobije se sljedeća jednadžba:

$$mgTE/L = \frac{nAUC_{uzorka} - 228,25}{71907}$$

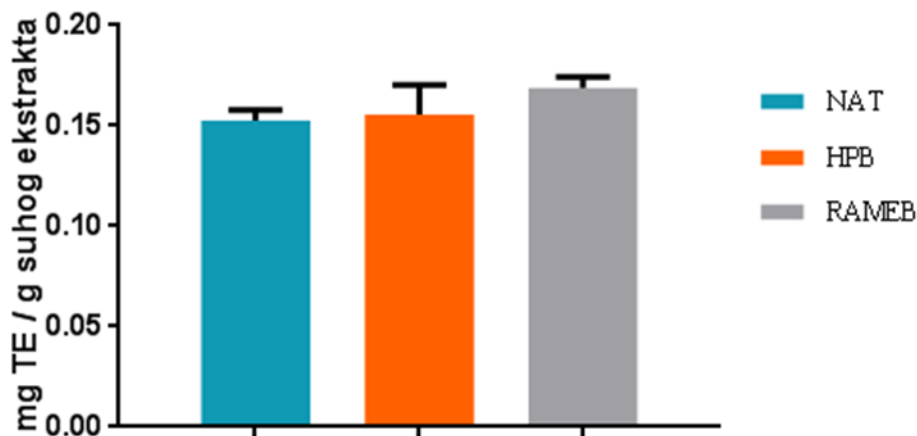
Dobivene rezultate dijelimo sa koncentracijom razrijeđenog uzorka. Na Slici 22. možemo vidjeti da prema prvim rezultatima, koji prikazuju antioksidacijsku aktivnost izraženu na masu suhog produkta, najviše mg Trolox ekvivalenta sadrži nativni uzorak prema čemu bi nativni

uzorak bio najjači antioksidans, dok HPB ima najmanje mg TE prema čemu bi on imao najslabiji antioksidacijski potencijal.



**Slika 22.** Antioksidacijska aktivnost određena metodom kidanja DNA izražena na masu suhog produkta

Da bi dobili mg TE/L po gramu komine u uzorku dobiveni rezultati se pomnože sa udjelom komine u uzorku tj. s obzirom da u nativnom uzorku nije bilo dodano ciklodekstrina nativni uzorak se pomnoži sa 1, a uzorci sa hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrinom i nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrinom se pomnože sa 0,31 jer su sadržavali 31% komine.



**Slika 23.** Antioksidacijska aktivnost određena metodom kidanja DNA izražena na čistog ekstrakta komine

Nakon preračunavanja antioksidacijska aktivnost izražena je na čisti ekstrakt komine. Rezultati prikazani na Slici 23. pokazuju da najveću antioksidacijsku učinkovitost ima RAMEB, drugu

po redu HPB, a najmanju NAT. Ciklodekstrini svojom sposobnošću uklopljavanja molekule štite ekstrakt komine masline tj. polifenolne spojeve koje on sadrži istovremeno omogućavajući da ti polifenolni spojevi zaštićuju fluorescein od peroksilnog radikala. Dokazano je da ekstrakt komine masline sadrži spojeve koji imaju antioksidacijski učinak kao što to ima i Trolox. Iako za određivanje antioksidacijske učinkovitosti postoji mnogo različitih metoda, ORAC metoda jedna je od najkorištenijih (López-Alarcóna i Denicolab, 2013). Thaipong i suradnici (2006) koristili su ABTS, DPPH, FRAP i ORAC testove za mjerenje antioksidacijske aktivnosti u metanolnom ekstraktu egzotičnog voća guave. Rezultati koje su dobili ORAC metodom ne samo da pokazuju antioksidacijski učinak ekstrakata guave nego i to da su rezultati usporedivi sa rezultatima dobivenim drugim metodama.

Prema našim saznanjima, ovo je prvi pokušaj određivanja antioksidacijske učinkovitosti različitih ekstrakata komine masline (nativnog i inkapsuliranih različitim ciklodekstrinima) primjenom metode kidanja DNA i ORAC metode. Do sada koristile su se neke druge metode kao što je model za uklanjanje stabilnog radikala DPPH. Korišteni su ekstrakti komine masline iz dva različita područja Italije. Opaženo je značajno uklanjanje slobodnih radikala kod oba ekstrakata te da učinak ovisi o količini polifenola koji je izmjeren Folin–Ciocalteu metodom; što više polifenola ekstrakt sadrži to je bolji antioksidacijski učinak (Cioffi i suradnici, 2010).

## 5. ZAKLJUČCI

- Komina maslina tj. polifenoli (oleuropein, hidroksitirosol i tirosol) koje ona sadrži pokazali su učinkovitost u zaštiti bioloških molekula od djelovanja peroksilnih radikala u metodi kidanja DNA te antiradikalnu učinkovitost protiv kisikovih radikala u ORAC metodi.
- Dodatak ciklodekstrina značajno utječe na antioksidacijske aktivnosti polifenola i u metodi kidanja DNA i u ORAC metodi. Ciklodekstrini svojom sposobnošću uklopljavanja molekule štite ekstrakt komine masline tj. polifenolne spojeve koje on sadrži i na taj način pospješuju njihovu antioksidacijsku aktivnost.
- U metodi kidanja DNA kao najbolji uzorak pokazao se uzorak sa dodatkom nasumično metiliranog ciklodekstrina (RAMEB) jer je imao najmanji EC50 tj. bila je potrebna najmanja koncentracija uzorka da se očuva nativna DNA. Najlošiji od triju uzoraka pokazao se nativni uzorak (uzorak bez dodatka ciklodekstrina).
- ORAC metoda dala je jednake rezultate; uzorak sa nasumično metiliranim ciklodekstrinom pokazao je najveću antiradikalnu učinkovitost, drugu po redu uzorak s dodatkom hidroksipropil ciklodekstrina, a najmanju nativni uzorak.
- Inkapsulacija nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom se može smatrati najboljim izborom od tri navedena za buduće korištenje ekstrakata komine masline u svrhu postizanja najbolje antioksidacijske zaštite.

## 6. LITERATURA

- Brlek T, Voća N, Krička T, Jurišić V. Komina masline kao izvor energije. *Glasnik Zaštite Bilja*, 32(3), 2009, 13-18.
- Cicerale S, Lucas, LJ, Keast RSJ. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol.* 2012, 23, 129–135.
- Cioffia G, Pesca MS, Caprarisa P, Braca A, Severino L, Tommasia N. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, Volume 121, 2010, 105-111
- Evaluation of transgenic *Campanula carpatica* plants, Ordinary apparatus used for gel electrophoresis, 2014., <https://www.researchgate.net>, pristupljeno 21.4.2018.
- Frankel E, Bakhouché A, Lozano-Sanchez J, Segura Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2013 5179–5188
- Goldsmith C, Vuonga Q, Stathopoulos C, Roach P, Scarlett C. Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace. *LWT- Food science and technology* Volume 89, March 2018, 284-290
- Hidroksitirosol, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/3hydroxytyrosol154161059760111?lang=en&region=HR>, pristupljeno 17.5.2018.
- Hill LE, Gomes C, Taylor TM. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *Food Science and Technology*, Volume 51, 2013, 86-93
- How to Identify Supercoils, Nicks and Circles in Plasmid Preps, 2014., <https://bitesizebio.com>, pristupljeno 17.3.2018.
- Jug M, Bećirević-Laćan M. Cyclodextrin-based pharmaceutical. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti: Medicinske znanosti*, (499=32), 2008, str. 9-26.
- Kantoci D. Maslina. *Glasnik Zaštite Bilja*, 29(6), 2006, 4-14.
- Kim GN, Shin JG, Jang HD. Antioxidant and antidiabetic activity of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saitoi*. *Food Chemistry*, Volume 117, 2009, 35-41
- Laboratorij za oksidacijski stres, Institut Ruđer Bošković <https://www.irb.hr>, pristupljeno 20.7.2018.

- Laboratorio Professionalizzante di Spettroscopia, <https://slideplayer.it/slide/568347/> pristupljeno 17.5.2018.
- Litescu SD, Eremia SA, Tache A, Vasilescu I, Radu GL. The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages Antioxidant Properties. Processing and Impact on Antioxidants in Beverages, Victor Preedy, Academic press 2014, Str. 245-251
- López-Alarcón C, Denicolab A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, Volume 763, 2013, 1-10
- Maibach H, Barel OA, Paye M. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Third Edition, 2009 str. 792-794
- Maslina - priča prošlosti za lijek budućnosti, 2014., <http://www.inpharma.hr/> , pristupljeno 14.2.2018.
- Multikanalne mehaničke pipete <http://www.crux.hr/xls-multikanalne-mehanicke-pipete/> pristupljeno 27.7.2018.
- Nogueira F. Valorization of olive pomace through combination of biocatalysis with supercritical fluid technology. Dizertacija, Fakultet znanosti i tehnologije Sveučilišta u Lisabonu, Lisabon, 2015
- Oleuropein, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/12247?lang=en&region=HR> , pristupljeno 17.5.2018.
- Palčić I, Benčić Đ, Moslavac T. Mogućnosti zbrinjavanje vegetabilne vode nastale procesom ekstrakcije maslinovog ulja. *Glasnik Zaštite Bilja*, 32(6), 2009, 116-131.
- Piljac I. *Elektroforeza*. Media print, Tiskara Hrastić, Zagreb, 2006
- Preedy V, Watson R. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. 1st Edition, Academic Press, 2010.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplement. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 52, 4290-4302
- Roeg A, Cayuela ML, Sánchez-Monedero MA. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, Volume 26, Issue 9, 2006, 960-969
- Shahidi F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Woodhead Publishing, 2015, str. 287–333

- Sharma N, Baldi A. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug delivery* Volume 23, 2014. 729-747
- Shimpi S, Chauhan B, Shimpi P. Cyclodextrins: Application in different routes of drug administration. *Acta Pharmaceutica*, 55(2), 2005, 139-156.
- Suksomtip M, Pongsamart S. Protective effect against oxidation of human low-density lipoprotein and plasmid DNA strand scission of Tamarind seed coat extract in vitro *Food Science and Technology* 41, 2008, 2002-2007.
- Šimić S. Izolacija antioksidativnih sastavnica biljke *Medicago sativa L.* primjenom ciklodestrina. Zagreb, 2015, str. 7-8.
- Thaiponga K, Boonprakoba U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 2006, 669–675
- Tirosol, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/24hydroxyphenylethanol1381650194011?lang=en&region=HR> , pristupljeno 17.5.2018.
- VICTOR Multilabel Plate Reader, <http://www.perkinelmer.com>, pristupljeno 27.7.2018.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Tijekom proizvodnje maslinovog ulja kao jedan od nusprodukata nastaje i komina masline. Komina je štetna za okoliš, ali ujedno sadrži polifenole (oleuropein, hidroksitirozol i tirozol) koji su pokazali antioksidacijske, protuupalne, hipoglikemijske i mnoge druge zdravstveno pozitivne učinke. Zbog toga, komina masline se počinje prepoznavati kao vrijedan prirodan produkt s visokim potencijalom iskorištavanja u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Cilj ovog rada je odrediti antioksidacijsku učinkovitost različitih ekstrakata komine masline (nativnog i inkapsuliranih različitim ciklodekstrinima) primjenom različitih *in vitro* pristupa kao što je metoda kidanja DNA i ORAC metoda. Zaključeno je da komina masline sadrži polifenolne spojeve koji štite biološke molekule od djelovanja peroksilnih radikala te postižu antiradikalnu učinkovitost protiv kisikovih radikala. Dodatak ciklodekstrina pospješuje antioksidacijsku aktivnost polifenola i u metodi kidanja DNA i u ORAC metodi. U obje metode kao najbolji uzorak se pokazao uzorak sa nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom, drugi po redu hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrin, a najlošiji nativni uzorak zbog čega se dodatak nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina može smatrati najboljim izborom od tri navedena za buduće korištenje ekstrakata komine masline u svrhu postizanja najbolje antioksidacijske učinkovitosti.



Major byproduct remaining after the production process of olive oil is olive pomace. It is harmful to the environment, but it also contains polyphenols (oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol) which have shown antioxidative, anti-inflammatory, hypoglycemic and many other health-positive effects. Therefore, olive pomace is becoming recognized as a valuable natural product with high potential for exploitation in the pharmaceutical and food industry. The aim of this study was to determine the antioxidant efficacy of different extracts of olive pomace (native and encapsulated by various cyclodextrins) by using two *in vitro* approaches: the DNA scission inhibition and ORAC antioxidant activity. It has been concluded that olive pomace contains polyphenolic compounds that protect biological molecules from peroxy radicals and achieve shows oxygen radical- scavenging activity. The addition of cyclodextrin enhances the antioxidant activity of polyphenols in both applied methods; in both cases, extract encapsulated with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin showed the highest antioxidant activity. Hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin sample has proven to be the second best alternative, with the least preferable native sample. Application of randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin can be considered the best choice for the future use of olive pomace extracts as antioxidative ingredients.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### ORAC ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST RAZLIČITIH EKSTRAKATA KOMINE MASLINE I ZAŠTITA DNA OD ŠTETNOG DJELOVANJA RADIKALA

Lucija Dominko

#### SAŽETAK

Tijekom proizvodnje maslinovog ulja kao jedan od nusprodukata nastaje i komina masline. Komina je štetna za okoliš, ali ujedno sadrži polifenole (oleuropein, hidroksitirozol i tirozol) koji su pokazali antioksidacijske, protuupalne, hipoglikemijske i mnoge druge zdravstveno pozitivne učinke. Zbog toga, komina masline se počinje prepoznavati kao vrijedan prirodan produkt s visokim potencijalom iskorištavanja u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Cilj ovog rada je odrediti antioksidacijsku učinkovitost različitih ekstrakata komine masline (nativnog i inkapsuliranih različitim ciklodekstrinima) primjenom različitih *in vitro* pristupa kao što je metoda kidanja DNA i ORAC metoda. Zaključeno je da komina masline sadrži polifenolne spojeve koji štite biološke molekule od djelovanja peroksilnih radikala te postižu antiradikalnu učinkovitost protiv kisikovih radikala. Dodatak ciklodekstrina pospješuje antioksidacijsku aktivnost polifenola i u metodi kidanja DNA i u ORAC metodi. U obje metode kao najbolji uzorak se pokazao uzorak sa nasumično metiliranim  $\beta$ -ciklodekstrinom, drugi po redu hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrin, a najlošiji nativni uzorak zbog čega se dodatak nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina može smatrati najboljim izborom od tri navedena za buduće korištenje ekstrakata komine masline u svrhu postizanja najbolje antioksidacijske učinkovitosti.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 23 grafičkih prikaza, 8 tablica i 34 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Komina masline, ciklodekstrini, ORAC antioksidacijska učinkovitost, metoda kidanja DNA

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

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

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

**Dr. sc. Lovorka Vujić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2018.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### ORAC ANTIOXIDANT EFFECTIVENESS OF DIFFERENT OLIVE POMACE EXTRACTS AND PROTECTION OF DNA FROM RADICAL DAMAGE

Lucija Dominko

#### SUMMARY

Major byproduct remaining after the production process of olive oil is olive pomace. It is harmful to the environment, but it also contains polyphenols (oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol) which have shown antioxidative, anti-inflammatory, hypoglycemic and many other health-positive effects. Therefore, olive pomace is becoming recognized as a valuable natural product with high potential for exploitation in the pharmaceutical and food industry. The aim of this study was to determine the antioxidant efficacy of different extracts of olive pomace (native and encapsulated by various cyclodextrins) by using two *in vitro* approaches: the DNA scission inhibition and ORAC antioxidant activity. It has been concluded that olive pomace contains polyphenolic compounds that protect biological molecules from peroxy radicals and achieve shows oxygen radical- scavenging activity. The addition of cyclodextrin enhances the antioxidant activity of polyphenols in both applied methods; in both cases, extract encapsulated with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin showed the highest antioxidant activity. Hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin sample has proven to be the second best alternative, with the least preferable native sample. Application of randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin can be considered the best choice for the future use of olive pomace extracts as antioxidative ingredients.

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

Thesis includes: 37 pages, 23 figures, 8 tables and 34 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Olive pomace, cyclodextrins, ORAC antioxidant effectiveness, DNA scission inhibition

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

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

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

**Lovorka Vujić, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: August 2018.