Optimizacija kombiniranog postupka ultrazvučne ekstrakcije i enkapsulacije za ekstrakciju polifenola masline

Trgovčević, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:165155

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Maja Trgovčević

Optimizacija kombiniranog postupka ultrazvučne ekstrakcije i enkapsulacije za ekstrakciju polifenola masline

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

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.

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali - Čepo, na posvećenom vremenu, znanju i stručnim savjetima kojima mi je pomogla u uspješnoj izradi ovog diplomskog rada i izv. prof. dr.sc. Mariu Jugu za pomoć u provođenju eksperimentalnog dijela ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima što su mi omogućili školovanje i poticali me na rad, a posebnu zahvalu upućujem djedu i baki na velikoj podršci tijekom studiranja i vjeri u moj uspjeh.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Maslina 2

1.1.1 Izgled biljke, stanište, rasprostranjenost 2

1.1.2 Komina 3

1.1.3 Prerada ploda masline 4

1.1.4 Biološki učinci polifenola 7

1.2 Ultrazvučna ekstrakcija 9

1.2.1 Ultrazvuk- mehanizam i djelovanje 9

1.2.2 Ekstrakcija 10

1.3 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 11

2. OBRAZLOŽENJE TEME 13

3. MATERIJALI I METODE 15

3.1 Materijali 16

3.1.1 Kemikalije 16

3.1.2 Radni instrumenti i oprema 16

3.1.3 Uzorci komine 17

3.2 METODE 17

3.2.1 Plan istraživanja 18

3.2.2 Uklanjanje lipidnih komponenata metodom po Soxhletu 19

3.2.3 Određivanje ukupnih fenola Folin- Ciocalteu metodom 20

3.2.4 Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom 21

3.2.5 Klasična ekstrakcija komine 22

3.2.6 Ultrazvučna ekstrakcija komine 22

3.2.7 Identifikacija oleuropeina primjenom tekućinske kromatografijoe visoke djelotvornosti 23

3.2.8 Statistička analiza 24

4. REZULTATI I RASPRAVA 25

4.1 Usporedba učinkovitosti klasične i ultrazvučne ekstrakcije 26

4.2 Utjecaj odmašćivanja na udiofenolnih komponenata i antiradikalni učinak 26

4.3 Utjecaj promjeneomjera mase uzorka i volumena otapala na prinos ultrazvučnog postupka ekstrakcije 28

4.4 Utjecaj enkapsulacije ciklodekstrinimana prinos ultrazvučne ekstrakcije 29

4.5 Utjecaj otapala na iskorištenje ultrazvučne ekstrakcije 32

4.6 Utjecaj ciklodekstrina na koncentracije oleuropeina u ekstraktima komine 33

5. ZAKLJUČCI 35

6. LITERATURA 38

7. SAŽETAK 40

1. UVOD

1.1 Maslina

Stablo masline počinje donositi plodove između 5 i 10 godina starosti i sazrijeva oko dvadesete godine. Potrebno je 4 - 10 kilograma maslina za proizvodnju jedne litre maslinovog ulja. Nakon 100- 150 godina produkcija se počinje smanjivati. Starost stabala utječe samo na kvantitetu, ne i na kvalitetu maslinovog ulja. Branje plodova vrši se ručno udaranjem stabla fleksibilnim produženim štapom pri čemu masline padaju na šatorsko platno ili pomoću mehaničkih vibracija. Neke vrste maslina mogu se brati u listopadu kada su još zelene, dok druge vrste mogu biti ostavljene do veljače kada su na vrhuncu zrelosti i pune ulja. Masline su obično prešane unutar 24 sata ako je toplo vrijeme. Ako je hladnije, prešanje se može odgoditi do 72 sata nakon branja.

1.1.1 Izgled biljke, stanište, rasprostranjenost

Maslina je dugovječno, vazdazeleno, 8 – 12 metara visoko drvo, vrlo kvrgavo i nepravilno povijena s mnoštvom grana. Ponegdje naraste i do 20 m. Listovi su duguljasti, kožasti, s gornje strane tamnozeleni, a s donje srebrnasti. Bijeli su cvjetovi u uspravnim grozdovima, a izbijaju iz lisnih pazušaca, obično u travnju. Plod je zelena ovalna koštunica, dužine 2 – 3 cm, koja mijenja boju od zelene, crvenkaste, do tamnomodre, gotovo crne.

Maslina je osjetljiva na niske temperature pa ne podnosi veliku udaljenost od mora. Pitoma se maslina uzgaja u većoj ili manjoj mjeri duž cijelog obalnog područja, a katkad sporadično i drugdje, ako to klimatski uvjeti dopuštaju. Maslina voli umjerenu klimu pa gornja granica vertikalnog rasprostranjenja ovisi o klimatskim čimbenicima. U sjevernoj Dalmaciji maslina doseže 100 – 150 m, u srednjoj 200 – 250 m, a u okolici Dubrovnika sve do 400 m visine nad morem. U posebno povoljnim klimatskim uvjetima raste i do 1000 m, ali i više; na Etni do 2200 m, a na Sierri Nevadi i do 4200 m.

Maslina je kao uzgojna kultura poznata u oko 1000 varijeteta, čije morfološke i anatomske osobine ovise o sastavu tla i klimi.

Pretpostavlja se da masline potječe iz Palestine, odnosno Male Azije. Maslinu se može slijediti duboko u antiku. Iz egipatske je medicine poznato da se maslina uzgaja još u 17. stoljeću prije Krista, a bila je sigurno poznata i semitskim narodima. Postoji pisani podatak da su se za vrijeme XX. Dinastije u Egiptu uvelike uzgajale masline. Na otoku Kreti su postojale kulture već 3500. godine prije Krista i s njega se maslina proširila po Sredozemlju. Maslina raste polagano i može doživjeti duboku starost – i 2000 godina.

Naziv *olea* izvodi se od „elaia“ imena za stablo masline u starih Grka. Maslinovo se ulje nazivalo „elaion“. Rimski je naziv „olea“ i „oleum“, a plod su nazivali „oliva“. Stari su Grci maslinovo ulje jako cijenili i njime mazali i tijelo. I Rimljani su također veoma cijenili maslinu.

Na istočnoj obali Sredozemnog mora i u južnim predjelima središnje Azije maslina raste samoniklo.

Uzgoj je masline danas rasprostranjen u Grčkoj, Španjolskoj, Portugalu, južnoj Francuskoj, Italiji, ali i u Maroku, Kaliforniji, Floridi, Meksiku i Argentini. Isusovci su prenijeli maslinu u Kaliforniju i Meksiko. I u južnoj Australiji postoje brojni nasadi maslina koji daju bogate berbe.

U nas su maslinici rasprostranjeni najvećim dijelom po otocima i na uskom priobalju. Uzgajaju se domaće, ali i strane sorte maslina. Imaju lokalne nazive, npr. na otoku Korčuli: oblica ili orkula (to je stolna i uljna maslina), nazivaju je još i debela i krupna, zatim drobnica i lastovka. U dubrovačkom području najčešća je levantinka, mezanica i uljarica. Ima i drugih naziva: plominka, dužica, plemenita bjelica i kosmača. Strane sorte su iz Italije i Francuske (Nocelara del belice, Nocelara Etnea, Nocelara Messinese, Grossa di Spagna, Bosana, Ghemal i druge).

Danas se u svijetu daje prednost onim sortama masline koje su prikladne za dobivanje ulja i za konzerviranje jela. Takva je naša sorta oblica, koja je u sortimentu maslina na području Dalmacije zastupljena s oko 80 % (Kuštrak, 2005)

1.1.2 Komina

Komina masline je čvrsti nusprodukt dobiven ekstrakcijom maslinovog ulja. Čine ju kožica, pulpa i koštica masline. Komina sadrži još male količine ulja, tzv. ulje komine masline koja se može odvojiti od komine u daljnjim procesima. Koštice se mogu odvojiti od komine zbog korištenja kao biogoriva.

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

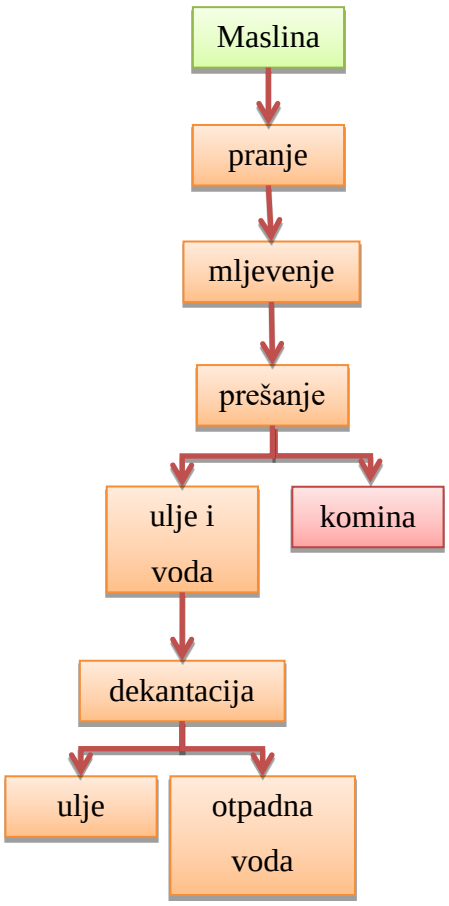


Slika 1. Komina masline

1.1.3 Prerada ploda masline

Ekstrakcija maslinovog ulja postiže se kontinuiranim (centrifugiranje) ili diskontinuiranim procesom (prešanje) u tradicionalnim mlinovima ili modernim jedinicama. Pritom nastaju tri frakcije: čvrsti ostatak i dvije tekuće faze (ulje i otpadna voda). Karakterizacija ovih dvaju nusprodukta pokazuje da su sastavljeni uglavnom od fenolnih komponenata, ugljikohidrata, organskih kiselina i minerala, različito distribuiranih ovisno o korištenom procesu ekstrakcije. Voda se koristi u nekim koracima kako bi istisnula većinu ulja iz masline. Kad se plod masline zgnječi, dobivena kaša izmiješa se i homogenizira kako bi se povećao postotak dostupnog ulja i olakšala koalescencija i aglomeracija malih kapljica ulja i time omogućila separacija ulja i vodene faze. Diskontinuirani proces prešanja je najstariji proces i najrasprostranjenija je metoda obrade masline za dobivanje ulja. Poslije mljevenja, kaša maslina se razmazuje po vlaknastim diskovima koji su poredani jedan na vrh drugog i onda umetnuti u prešu. Ti diskovi su tradicionalno napravljeni od konoplje ili kokosovih vlakana, ali danas se izrađuju od sintetskih vlakana radi lakšeg čišćenja i održavanja. Prešanje se primjenjuje na diskove zbog zbijanja čvrstog ostatka i cijeđenja tekuće faze (ulje i voda). Mala količina vode dodaje se radi lakšeg odvajanja ulja od ostatka tekuće faze. Čvrsta faza koja se zove komina masline sadrži pulpu, kožicu, koštice i vodu. Ova smjesa nusprodukta zajedno s emulzijom koja sadrži ulje odvaja se od otpadne vode dekantacijom. Prednosti ove metode su jeftina oprema i tehnička jednostavnost procesa. Također, zbog dodavanja male količine vode, producira se mali volumen otpadne vode prerađivačkog postrojenja. S druge

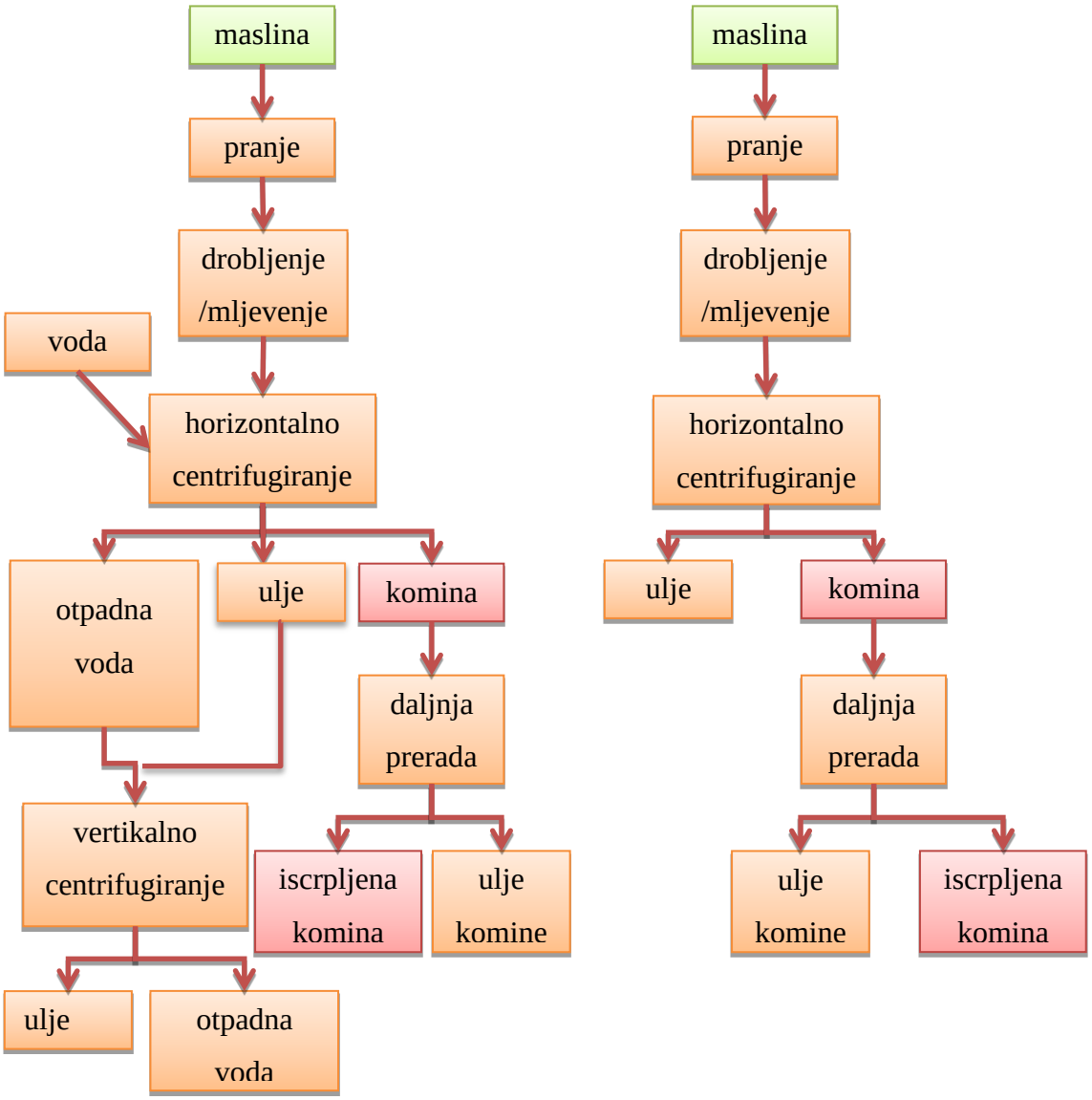
strane, postoje i nedostaci ovog proces kao što su diskontinuiranost procesa i visoki troškovi ljudske snage. Isto tako, proizvedena otpadna voda (OMW) ima veliku potrošnju kisika u odnosu na OMW proizveden drugim procesima. Do prije približno 30 godina, skoro svo ulje se dobivalo prešanjem. Iako su ekonomski razlozi gurnuli tradicionalne mlinove prema postupnom napuštanju, ovaj je proces ipak još u uporabi. U novije vrijeme, tradicionalni diskontinuirani proces prešanja ustupio je mjesto kontinuiranom procesu koji koristi trofazni sustav, a kasnije i dvofazni.



Slika 2. Shematski prikaz tradicionalnog procesa prerade

Proces kontinuirane ekstrakcije maslinovog ulja koristi industrijsku posudu za odvajanje svih faza centrifugiranjem. Odvajanje se temelji na razlikama u gustoći komponenata kaše (maslinovo ulje, voda i netopljivi ostaci). Posuda se, s manjim modifikacijama, može koristiti i u trofaznom i u dvofaznom sustavu ekstrakcije. Kod kontinuiranog procesa trofaznog sustava dodaje se vruća voda u korak centrifugiranja (1.25 – 1.75 puta više u usporedbi s ekstrakcijom prešanjem) što rezultira stvaranjem većih količina otpadne vode (80 – 120 L/100 kg maslina). Trofazni sustav generira tri frakcije: čvrsti ostatak (komina) i dvije tekuće faze (ulje i OMW). Ovaj proces ima brojne prednosti, kao što su potpuna automatizacija

procesa, bolja kvaliteta ulja i manji zahtjev za prostorom, ali također ima i neke nedostatke poput potrošnje velikih količina vode i energije, velik izlaz OMW-a i skupa montaža. Trofazni sustav, bez obzira na visoku potrošnju vode, još uvijek je najšire korištena metoda za proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja, osobito u zemljama koje proizvode velike količine maslinovog ulja u kratkom vremenu. Posljednjih nekoliko godina sve više se uvodi trofazni sustav u Italij, Grčkoj i Portugalu. U Grčkoj oko 70% svih mlinova za proizvodnju maslinovog ulja sada koristi trofazni sustav. Kako bi se smanjio volumen OMW-a, a time i reduciralo ispiranje fenola, proces dvofazne ekstrakcije istraživan je 1990-ih godina. Korištenjem ove tehnologije, kaša masline je odvojena unutar dvije faze: maslinovo ulje i „vlažna“ komina. Vlažna komina dobivena ovim procesom je polukruti nusprodukt koji dalje može biti reprocesuiran daljnjom ekstrakcijom ulja te se tako povećava prinos. Postoje dva tipa ulja komine: ulje ekstrahirano korištenjem tradicionalnih otapala i ulje dobiveno pomoću ekstrakcije centrifugiranjem (sekundarno centrifugiranje). Dvofazni sustav poznat je pod nazivom „ekološka“ posuda zbog redukcije potrošnje vode. Ipak, dobivenom otpadnom vodom (10L/100kg maslina) teško je upravljati jer je zagađivačko opterećenje mnogo koncentriranije. Tijekom zadnjih desetak godina, dvofazni sustav postao je dominantan u Španjolskoj gdje približno 90% mlinova koristi ovu tehnologiju. Također je široko primjenjivan i u Hrvatskoj, ali u ostalim zemljama proizvođačima nije prihvaćeno uglavnomzbog problema s rukovanjem otpadnih voda.



Slika 3. Shematski prikaz trofaznog (lijevo) i dvofaznog procesa (desno)

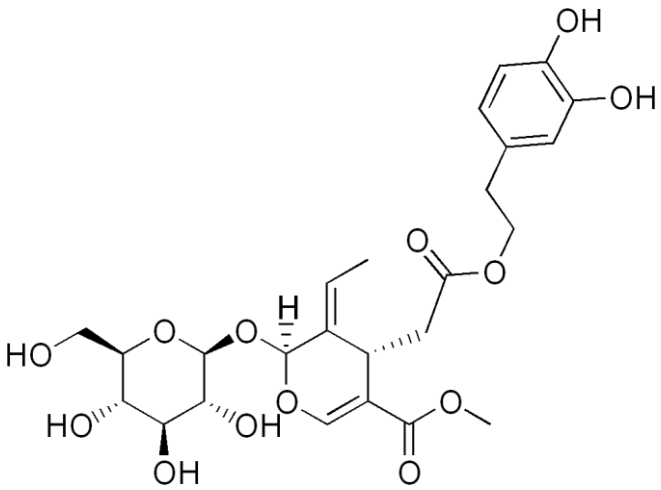
1.1.4 Biološki učinci polifenola

Fenolne komponente uključuju organske tvari koje imaju aromatski prsten s jednom ili više supstituiranih hidroksilnih grupa i funkcionalnim bočnim lancem. Prirodne fenolne komponente uključuju jednostavne molekule, kao što su fenolne kiseline i visokopolimerizirane komponente poput tanina. Najčešće su fenolne komponente konjugirane s različitim šećernim molekulama (mono-, di- ili oligosaharidi), organskim kiselinama i lipidima (mastima) ili s drugim fenolima preko hidroksilnih grupa ili, manje često, preko aromatskog ugljikovog atoma. Fenoli su odgovorni za obojenje voća i povrća, štite biljku od oboljenja i UV zračenja i pomažu prevenirati oštećenje sjemena dok ne prokliju. Glavne

skupine fenolnih komponenata su fenolne kiseline, sekoiridoidi i flavonoidi. Oni su koncentrirani u nusproduktima proizvodnog procesa ulja prema njihovoj polarnosti. Glavne fenolne sastavnice komine su tirosol, hidroksitirosol i oleuropein. Sva tri spoja slične su strukture. Hidroksitirosol i tirosol su strukturno identični izuzev što hidroksitirosol ima jednu dodatnu hidroksilnu skupinu u meta položaju. Oleuropein je ester koji sadrži hidroksitirosol vezan s elenolnom kiselinom.

Oleuropein

Oleuropein je glavna fenolna komponenta masline koja se u najvećoj količini nalazi u neprerađenom plodu i listu masline. Tijekom sazrijevanja ploda ili kao rezultat prerade u proizvodnji ulja, kemijske i enzimske reakcije koje se odvijaju reduciraju koncentraciju oleuropeina i povećavaju razinu hidroksitirosola- razgradnog produkta oleuropeina. Oleuropein osim antioksidativnih, antiaterogenih (Manna i sur., 2004, Visioli i Galli, 2001), antitumorskih (Hamdi i Castellon, 2005), protuupalnih (Visioli i sur., 1998) i antimikrobnih svojstava (Bisignano i sur., 1999) ima i važna ulogu u sprječavanju oksidacije lipoproteina (Visioli i Galli, 2002, 2006). Također, pokazuje i kardioprotektivne efekte kod akutne kardiotoksičnosti uzrokovane adriamicinom (Andreadou i sur., 2009). Neuroprotektivno djelovanje ostvaruje formiranjem nekovalentnog kompleksa s Aβ-peptidom koji je ključni triger nekoliko degenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest (Panza i sur., 2004). Kemijska struktura oleuropeina prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Kemijska struktura oleuropeina

1.2 Ultrazvučna ekstrakcija

1.2.1 Ultrazvuk- mehanizam i djelovanje

U današnje vrijeme istraživanje ultrazvuka se višestruko povećalo zbog njegove široke primjene kao metode ne-toplinske obrade. Metode koje su se donedavno koristile za ekstrakciju, poput ekstrakcije otapalima, vrućom vodom, lužinama i sl., mogu uzrokovati degradaciju željenih komponenti zbog visokih temperatura, dugog vremena ekstrakcije ili loše određenih sigurnosnih kriterija tijekom zračenja. Primjena ultrazvuka ranije je bila uglavnom ograničena na čišćenje i emulgiranje dok se danas otkrivaju prednosti uporabe ultrazvuka na različitim područjima, poput kristalizacije, sušenja, ekstrakcije, filtracije, zamrzavanja, homogenizacije, sterilizacije, degradacije itd. (Fairbanks, 2001; Mason, 1992; Povey, 1998). Ako je primijenjena frekvencija visoka, govorimo o dijagnostičkom ultrazvuku niske energije, a ako je frekvencija niska, govorimo o ultrazvuku visoke energije. Dijagnostički ultrazvuk, tj. ultrazvuk niskog intenziteta (intenzitet manji od 1 W/cm^2) djeluje u frekvencijskom rasponu od 2 MHz na više (Mason i Luche, 1996). On ne uzrokuje fizičke ni kemijske promjene u svojstvima medija na koji je primijenjen te se zato smatra neinvazivnom tehnikom. Ultrazvuk visokog intenziteta s rasponom frekvencije od 20 do 100 kHz (Povey i Mason, 1998, Villamiel i de Jong 2000, Režek Jambrak i sur., 2010) te visokih intenziteta (u rasponu od 1 do 1000 W/cm^2) može uzrokovati fizičke promjene materijala te određene kemijske reakcije u materijalima na kojima je primijenjen.

Ultrazvuk visokog intenziteta može se stvoriti na različite načine, pokretanjem tekućine, mlazom plina ili, na najčešće upotrebljavan način, pomoću električne snage. Generator pretvara napon istosmjerne struje u visoke frekvencije od cca 25 kHz (25000 ciklusa po sekundi) električne energije. Električna ili mehanička energija se pretvara u energiju zvuka pomoću ultrazvučnih pretvarača. Takvi elektroakustični sustavi su uglavnom piezoelektrični (Mason, 1998), ili rijetko magnetnostriktivni pretvornici. Piezoelektrični kristali se šire i kontrahiraju u promjenjivom električnom polju. Uslijed privlačenja polariziranih molekula dolazi do pojave mehaničkih vibracija koje se pojačavaju na pojačalu te se ultrazvučni valovi sondom emitiraju u medij. Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij dolazi do nastanka longitudinalnih valova, što dovodi do stvaranja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995, Povey i Mason, 1998). Dolazi do formiranja milijuna mikroskopskih mjehurića (šupljina), koji se proširuju pod utjecajem negativnog tlaka, a potom naglo implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka. Za pretvarače je bitno odsustvo zraka u sondi,

zbog vrlo niske akustičke impedancije i visoke akustične apsorpcije zraka, koji dovode do gubitka akustične energije (Gallego- Juarez, 1998). Ultrazvučne zrake mogu biti usmjerene geometrijski; primjerice pomoću leća ili sa sfernim zakrivljenim sondama te elektroničkim putem; podešavanjem relativne faze elementa u područje sonde („faznom polju“). S dinamičkim prilagođavanjem elektronskih signala do elemenata u faznom polju, zrake mogu biti raspoređene na različitim lokacijama, a odstupanja zbog strukture tkiva mogu se ispraviti.

1.2.2 Ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima. Za vrijeme mirovanja odvija se prijenos mase, tj. otopljene tvari prelaze iz uzorka u otapalo. Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi ekstrakcije, površini uzorka izloženog otapalu, viskoznosti otapala i volumnom protoku otapala. Iz tih razloga, pogodno je provođenje ekstrakcije pri višim temperaturama zbog ubrzavanja procesa ekstrakcije, jer dolazi do povećanja brzine otapanja komponente, kao i brzine difuzije komponente u volumen otapala (Raso i sur., 1995). Ipak, temperature rijetko prelaze 100 °C jer u takvim uvjetima često dolazi do razgradnje željene supstance ili ekstrakcije nepoželjnih tvari.

Budući da je brzina prijenosa mase direktno proporcionalna površini uzorka, prije ekstrakcije se uzorak usitnjava do određenog stupnja i homogenizira. Viskoznost otapala mora biti dovoljno niska da otapalo može lako proći sloj krutih čestica, a također veći protok otapala smanjuje granični sloj između koncentrirane otopine i površine čestica, a time povećava brzinu ekstrakcije. Izbor otapala za ekstrakciju ovisi o vrsti i svojstvima komponente koju se želi ekstrahirati.

Ultrazvuk visoke snage, uslijed djelovanja kavitacije na stanične stjenke omogućuje veće prodiranje otapala u materijal te povećava prijenos mase. Uslijed pucanja stanične stjenke dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice (Vinatoru, 2001). Na taj način se ubrzava ekstrakcija te se povećava njena efikasnost. Ultrazvučnom ekstrakcijom možemo povećati ekstrakciju određenih komponenti, kao što su polifenoli (Springett, 2001), antocijani (Springett, 2001), aromatske tvari (Vinatoru, 2001), polisaharidi (Ebringerova i Hromadkova, 1997), ulja (Chemat i sur., 2004) i drugi funkcionalni spojevi (Balachandran i sur., 2006).

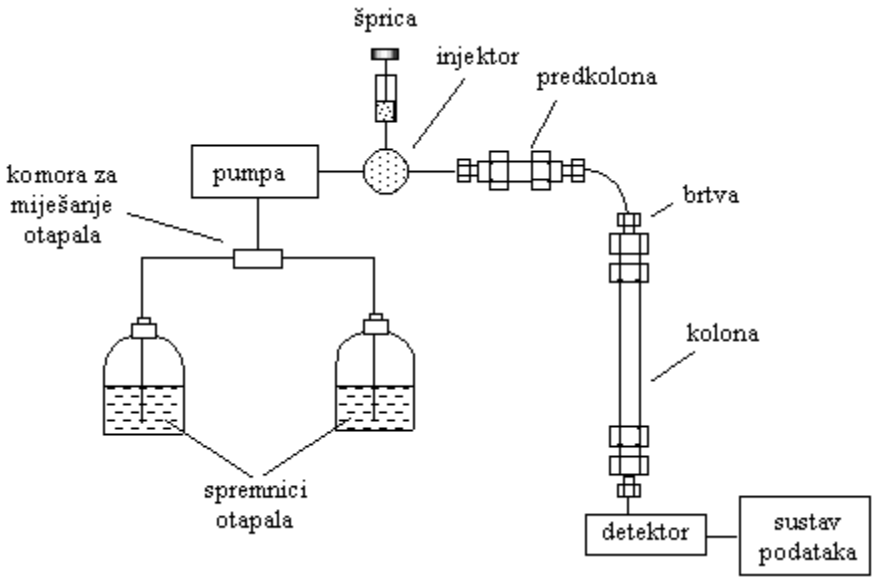
1.3 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Moderna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti razvila se iz kolonske kromatografije poboljšanjem svojstava sorbensa u koloni, tj. povećanjem njihove aktivne površine i poboljšanjem površinskih svojstava. Povećanje površine sorbensa postiglo se njihovim usitnjavanjem i pripremom poroznih zrna. Smanjivanje veličine zrna vodilo je otežavanju protoka kroz kolonu pa je bilo nužno na vrhu kolone primjenjivati pritisak da bi otapalo teklo i odvijao se kromatografski proces. Prvo ime tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti bilo je visokotlačna tekućinska kromatografija (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC). Poslije je ustanovljeno da otpor protoka ovisi o pakiranju kolone, odnosno o rasponu veličine zrna koja se rabe za kromatografiju. Modernim tehnikama separacije zrna sorbensa s obzirom na veličinu uspjelo se pakirati kolone zrnima malog raspona u veličini pa su i pritisci smanjeni tako da danas postoje tzv. „Modern pressure“ LC (Liquid Chromatography) i „Low pressure“ LC sa svojstvima visoke djelotvornosti, te tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (High Performance Liquid Chromatography) (Štraus, Stavljenić – Rukavina, Plavšić, 1997).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High performance liquid chromatograhy, HPLC) je metoda odjeljivanja u kojoj tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čelićnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze (veličine 3 – 10 μm) noseći sastavnice uzorka. Molekule uzorka putuju niz kolonu, pri čemu se uspostavlja ravnoteža između mobilne i stacionarne faze. Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze, a može se temeljiti na razdiobi, adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli prema veličini čestica te stereokemijskim interakcijama. Tekućinski kromatograf uključuje sustav za unošenje uzorka (1 – 200 μL), spremnike mobilne faze i sustav za obradu otapala (uklanjanje otopljenih plinova), crpku za visoke tlakove, kolonu i detektor (Slika 7.). Pumpa služi ubacivanju pokretne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom (0,1-10 ml/min) u kolonu. Uzorak se unosi automatskim sklopom za uzorkovanje, ili ručno mikrolitarskom špricom kroz 6-kanalni ventil u sustav za injektiranje tzv. petlju u kojoj se održava tlak. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sobom nosi uzorak na kolonu. Kratka predkolona (“guard column” ili zaštitna kolona) ili predkolonski filter postavljaju se ispred analitičke kolone da bi je sačuvali od netopljivih i topljivih onečišćenja iz uzorka; npr. tvari koje se ireverzibilno vežu na stacionarnu fazu odnosno čvrste čestice. Ova kolona je kraća od analitičke i obično punjena istim materijalom kao i analitička kolona. Analitička kolona je

najčešće cijev izrađena iz nehrđajućeg čelika, duljine 250 ili 150 mm, a unutarnjeg dijametra 4,6 mm, punjena česticama veličine 3,5 ili 5 μm.

Odijeljene sastavnice uzorka se najčešće dokazuju apsorpcijom u određenom UV području. Detektori s diodnim nizom (diode array detector) (HPLC-DAD) omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/Vis: apsorbancija se snima u ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini.



Slika 5. Shematski prikaz sustava HPLC

U tekućinskoj kromatografiji postoje različite stacionarne faze. U *kromatografiji obrnutih faza* najčešće se upotrebljavaju nepolarne stacionarne faze oktadecilsilil i oktilsilil silikagel. U *kromatografiji normalnih faza* najčešće se primjenjuje nemodificirani silikagel kao polarna stacionarna faza.

Mobilnu fazu najčešće čini smjesa otapala različite polarnosti. U kromatografskom postupku može se primijeniti *izokratična eluacija* nepromijenjenim sastavom mobilne faze ili *gradijentna eluacija* tijekom koje se mijenja sastav mobilne faze. Prije kromatografskog postupka nužno je iz mobilne faze ukloniti otopljene plinove i profiltrirati je, kako bi se odstranile čestice veće od 0,45 μm (Nigović i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Danas, približno 900 milijuna stabla masline pokriva preko 10 milijuna hektara površine širom svijeta, od kojih je 98% zastupljeno u mediteranskom zaljevu. Svako stablo masline proizvede 15 do 40 kg ulja godišnje, ovisno o klimatskim uvjetima. Maslinovo ulje jedno je od najšire upotrebljavanih jestivihulja. Industrija maslinovog ulja ima i ekonomsku i socijalnu važnost, posebice u mediteranskom području, gdje je smještenoviše od 98% svjetske proizvodnje. Industrija maslinovog ulja generira velike količine dva nusprodukta- čvrstog ostatka i otpadne vode. Oba nusprodukta su štetna za okoliš jer sadrže visoke koncentracije polifenola i sumporovih spojeva što štetno djeluje na mikrobnu populaciju u tlu, vodeni ekosustav i zrak. S druge strane neki od polifenola prisutnih u komini masline imaju dokazana antioksidacijska, antiproliferativna i protuupalna svojstva te se izoliraju iz lista i ploda masline i koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Razvojem prikladnog procesa ekstrakcije tih bioaktivnih spojeva iz komine i formulacije stabilnog, tehnološki prihvatljivog produkta dobiva se proizvod dodane vrijednosti te se ostvaruje i ekonomska i ekološka korist. Najveći izazov u tom procesu je razviti ekološki prihvatljiv postupak ekstrakcije koji će ostvariti visok prinos željenih supstancija, uz što manji utrošak energije, vremena i ekstrakcijskog sredstva. Cilj ovog rada je razviti metodu ultrazvučne ekstrakcije sondom za ekstrakciju polifenola komine masline kojom će se smanjiti trajanje ekstrakcije i utrošak otapala u odnosu na postojeće klasične ekstrakcijske postupke. U svrhu dodatnog poboljšanja prinosa polifenola te antioksidacijske učinkovitosti dobivenog ekstrakta, ispitat će se mogućnosti korištenja farmaceutskih ekscipijensa poput β- i γ- ciklodekstrina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

- Etanol, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Petroleter, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev karbonat, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu fenol reagens, Fluka, Buchs, Švicarska
- Diamino-2,2`-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) – ABTS (Sigma, St. Luis, SAD)
- Galna kiselina (Fluka, Buchs, Švicarska)
- β-ciklodekstrin (β-CD): Wacker Chemie GMBH, Njemačka
- γ-ciklodekstrin (γ-CD): Wacker Chemie GMBH, Njemačka
- destilirana voda (HPLC stupanj čistoće)
- $K_2S_2O_8$, p.a., Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- Acetronitril HPLC stupnja čistoće(Fluka, Buchs, Švicarska)
- Metanol HPLC stupnja čistoće(Sigma, St. Luis, SAD)
- Standard oleuropeina (Sigma, St. Luis, SAD)

3.1.2 Radni instrumenti i oprema

- Sustav za visokorazdijelnu tekućinsku kromatografiju sa DAD detektorom, serija Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA)
- Kolona za kromatografiju RP C18 (250 x 4.6 mm, ID 5 μm) (Agilent Technologies, USA)
- UV-VIS spektrometar UV 4-100, ATI Unicam, Cambridge, Velika Britanija
- Laboratorijska centrifuga Centric 322A, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- Laboratorijska centrifuga Kendro, Heraeus, Njemačka
- Laboratorijska peć, Over industrijska elektronika, Sv. Nedjelja, Hrvatska
- Soxhlet aparatura, Behr Labortechnik, Düsseldorf, Njemačka
- Vortex miješalica, tip VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan
- Termostatirana kupelj s mućkalicom, tip 1086, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Njemačka
- Liofilizator, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka

- Analitička vaga,Metler Toledo AB265S

3.1.3 Uzorci komine

Komina masline mješavina je komina masline iz više uljara RH, prikupljena tijekom jeseni/zime 2014./2015. godine.

Komina je pohranjena u zamrznutom stanju; u obliku tankih ploča prosječne mase oko 100 g. Priprema ispitivanih uzoraka započela je odmrzavanjem, prebacivanjem u velike petrijeve zdjelice i sušenjem u laboratorijskoj peći tijekom 36 sati na 50 °C. Osušena komina je usitnjena, nakon čega je prosijana kroz sito poroziteta 1.25 mm. Na taj su način uklonjene koštice masline. Osušena i usitnjena komina potom je odmašćena petroleterom tijekom 2.5 sata (metodom po Soxhlet-u) te ponovno usitnjena, homogenizirana i prosijana kroz sito poroziteta 1.25mm. Dobivena osušena, prosijana, odmašćena komina masline korištena je za sva daljnja istraživanja (slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz pripreme uzorka

3.2 METODE

Polifenoli iz uzorka komine masline ekstrahiranisu primjenom prethodno optimiranog postupka klasične ekstrakcije i primjenom ultrazvuka, a zatimje udio polifenola određen Folin- Ciocalteu metodom(Singleton i Rossi, 1961) uz neke modifikacije.

Sposobnost hvatanja radikala određena je TEAC testom (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)(Sanchez-Moreno, 2002).Odmašćivanje uzoraka je provedeno metodom po Soxhletu. Identifikacija aktivnih komponenata (oleuropein) provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

3.2.1 Plan istraživanja

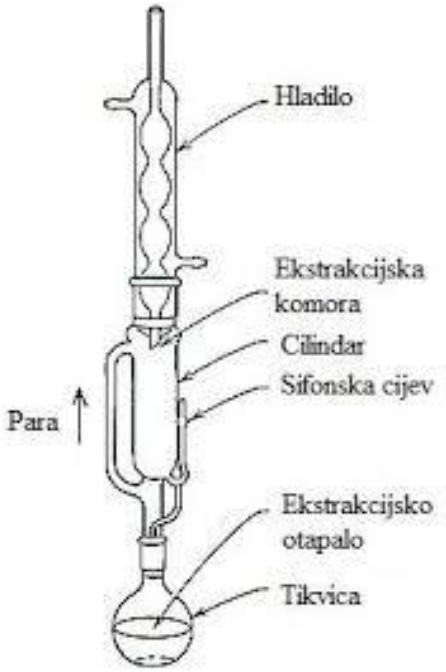
U prvom dijelu istraživanja uspoređeni su ukupni prinosi polifenola dobiveni nakon primjene klasične i ultrazvučne ekstrakcije komine. U dobivenim ekstraktima određen je udio fenolnih komponenata Folin – Ciocalteu metodom. Kako u komini zaostaje određen udio masne faze (ulje komine) koji "razrijeđuje" završni produkt (s obzirom na to da su istraživani bioaktivni polifenoli uglavnom topljivi u vodenoj fazi) i zamućuje dobivene tekuće ekstrakte (jer nastaju mutne izrazito stabilne emulzije čime se bitno otežava analiza njihovog sastava) istražen je utjecaj odmašćivanja komine kao predkoraka u postupku ekstrakcije polifenola. Odmašćivanje je provedeno metodom po Soxhletu, a zatim je taj odmašćeni uzorak ekstrahiran sa 60%-tnim etanolom ultrazvučnim postupkom. Takav ekstrakt je dalje ispitivan Folin- Ciocalteu i TEAC metodom.

Nakon toga, dodatno je ispitan utjecaj različitih omjera masa uzorka i volumena ekstrakcijskog sredstva (60%-tnog etanola) na prinos ultrazvučnog postupka ekstrakcije. Ekstrahirani su redom omjeri 1:100, 2:100 i 3:40, a zatim je određen sadržaj fenola i antiradikalni učinak svakog ekstrakta.

Budući da se pokazalo da se liofilizacijom ne može dobiti stabilan organoleptički prihvatljiv produkt u slijedećoj fazi pokusa istražen je utjecaj kombinacije ultrazvučne ekstrakcije i kompleksacije ciklodekstrinima na prinose polifenola i organoleptičke karakteristike završnih ekstrakata.Ekstrkacijskom sredstvu su prije ekstrakcije dodani ciklodekstrini,ekstraktu je otparen etanol, potom se liofilizira i liofilizat otopi u etanolu. Dio ekstrakta se koristi za HPLC određivanje udjela oleuropeina, a dio za određivanje sadržaja fenola i ispitivanje antiradikalnog učinka.

S obzirom na činjenicu da određenim spojevima nakon stvaranja inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima poboljšava topljivost u vodi, u posljednjem ispitivanju istražene su mogućnosti primjene ciklodekstrina i čiste vode kao ekstrakcijskog sredstva, kako bi se dobio potpuno "zeleni" postupak ekstrakcije.

3.2.2 Uklanjanje lipidnih komponenata metodom po Soxhletu



Slika 7. Aparatura po Soxhletu

4 grama uzorka odvaže se u papirnatu odmašćenu čahuru. Čahura se pokrije slojem odmašćene vate i stavi u srednji dio Soxhletovog aparata- ekstraktor (Slika 7.), zatim spoji s hladilom i ekstrakcijskom tikvicom, koja je s nekoliko staklenih kuglica prethodno sušena 1 sat na 105 °C, ohlađena u eksikatoru pola sata i odvagnuta. Kroz hladilo, preko lijevka, u ekstraktor se ulije toliko otapala da cjelokupna količina ne prelazi ¾ volumena tikvice. Kroz hladilo aparature pusti se struja vode i započne se sa zagrijavanjem otapala u tikvici. Zbog zapaljivosti otapala tikvica se zagrijava na pješčanoj kupelji. Za kvantitativnu ekstrakciju u slučaju uzoraka komine bilo je potrebno 2 sata. Kraj ekstrakcije određen je testom masne mrlje: kap otapala iz ekstrakta ispusti se na filter papir i ako na papiru nakon hlapljenja otapala ne ostane masna mrlja, ekstrakcija je završena. Izvadi se čahura s uzorkom, aparat ponovno zatvori i otapalo predestilira iz tikvice u ekstraktor iz kojeg se prije prelijevanja u tikvicu odlije. Tikvica se suši jedan sat na 105 °C i nakon pola sata hlađenja u eksikatoru važe. Udio masti izračuna se prema sljedećoj formuli:

$$\text{udio masti (\%)} = \frac{(b-a)}{c}\ x\ 100$$

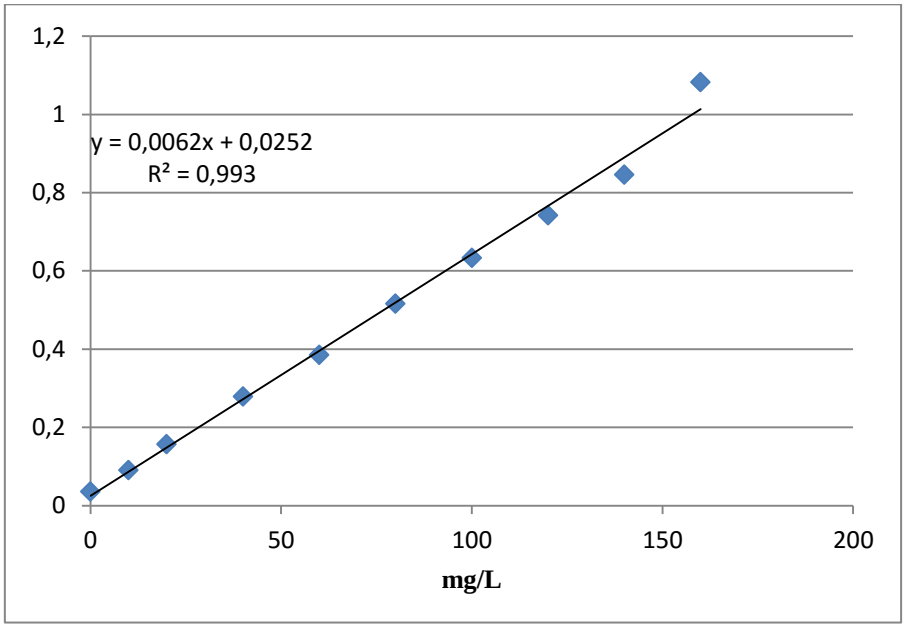
a= masa prazne ekstrakcijske tikvice s kuglicama za vrenje izražena u gramima

b= masa tikvice s masti izražena u gramima

c= odvaga uzorka izražena u gramima

3.2.3 Određivanje ukupnih fenola Folin- Ciocalteu metodom

Udio fenola u analiziranim uzorcima određen je Folin- Ciocalteu metodom. To je spektrofotometrijska metoda kojom se kvantificiraju ukupne reducirajuće komponente u uzorku što daje dobru kvantitativnu procjenu sadržaja polifenola u uzorku. Folin- Ciocalteu reagens stupa u reakciju s fenolnim skupinama ekstrahiranih spojeva pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorpcije na 725 nm valne duljine. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je udjelu sastavnica uzorka fenolne strukture. Pomoću baždarnog dijagrama izračunaju se koncentracije polifenola i izraze kao ekvivalenti galne kiseline. Za dobivanje baždarnog dijagrama s galnom kiselinom potrebno je izraditi otopinu galne kiseline koncentracije 0.4 mg/ml te napraviti koncentracijski niz 0-160 µg/ml (Slika 8.)



Slika 8. Baždarni dijagram s galnomkiselinom za određivanje ukupnih fenola

Nakon provedenog postupka ekstrakcije, ekstrakti se filtriraju kroz gusti filterpapir i razrijede. Mjerne otopine izrađuju se miješanjem 200 µl razrijeđenog ekstrakta, 1,35 ml destilirane vode te 150 µl Folin-Ciocalteu reagensa. Reakcijske smjese se dobro promućkaju i nakon 5 minuta doda se 1,5 ml 6% (w/v) natrijevog karbonata. Boja se razvija na 50 °C 30 minuta. Nakon toga uzorci se ohlade pod mlazom tekuće vode i apsorbancija svake otopine mjeri se

na valnoj duljini od 725 nm. Kao slijepa proba koristi se mjerna otopina pripremljena s dodatkom ekstrakcijskog sredstva umjesto uzorka.

3.2.4 Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

TEAC test (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) je metoda određivanja antioksidativne aktivnosti koja mjeri sposobnost uzorka da hvata/neutralizira $ABTS^{\bullet+}$ radikal kation. $ABTS^{\bullet+}$ radikal generira se direktno u stabilnom obliku koristeći kalijev persulfat kao oksidacijsko sredstvo (Re i sur.,1999). Nastali radikal apsorbira na 732 nm, a nakon što se pomiješa s antioksidansom u reakcijskom mediju dolazi do pada apsorbancije na toj valnoj duljini kao posljedice reakcije između radikala i antioksidansa. Kao standard se obično koristi Trolox (vodotopljiv oblik vitamina E) pa se metoda naziva TEAC (Troloxu ekvivalentan antioksidativni kapacitet), a rezultati se izražavaju kao Trolox ekvivalenti, odnosno kao koncentracija Trolox otopine (mmol/L) s ekvivalentnom antioksidativnom aktivnošću kao i 1.0 mmol/L otopine tvari koja se ispituje (Sanchez-Moreno, 2002).

Za pripremu otopine radikala potrebno je prethodno pripremiti 7 mM otopinu ABTS stock otopine i 2,45 mM otopinu kalijevog persulfata nakon čega se otopine ABTS-a i kalijevog persulfata pomiješaju u jednakim omjerima. Pri tome trenutno počinje stvaranje $ABTS^{\bullet+}$koje se očituje nastankom zeleno plavog obojenja. Reakcija je završena tek nakon više od 6 sati. Zato je otopinu potrebno držati 12 sati u mraku do postizanja konačnog intenziteta boje. Nakon 12 sati otopina se razrijedi tako da njena apsorbancija bude 0,700±0,02 i dalje koristi za izradu mjerne otopine.

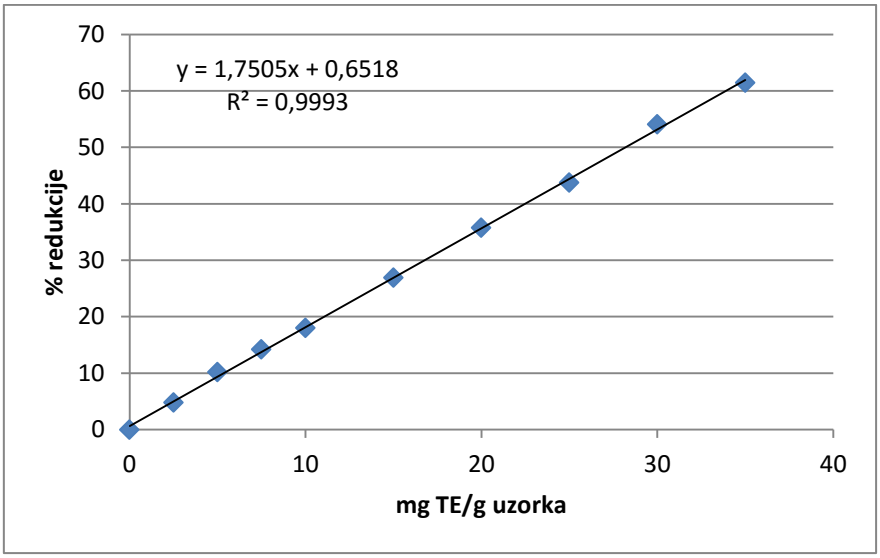
Mjerna otopina izrađuje se miješanjem 150 µL otopine adekvatno razrijeđenog ekstrakta i 1,75 mL otopine $ABTS^{\bullet+}$radikala, a apsorpbancija se mjeri u trenutku t=0 s i t=180 s. Kako je apsorbanciju u vremenu t=0 s nemoguće izmjeriti vrijednost se aproksimira mjerenjem apsorbancije reakcijske smjese koja sadrži 150 µL ekstrakcijskog sredstva i 1,75 mL otopine $ABTS^{\bullet+}$radikala. Iz izmjerenih apsorbancija, pomoću formule se izračuna postotak redukcije boje ispitivane otopine (% redukcije):

$$\text{postotak redukcije (\%)} = \frac{A(0) - A(3min)}{A(3min)} x100$$

A(0) – apsorbancija slijepe probe, maksimalna količina $ABTS^{\bullet+}$

A (3 min)– apsorbancija radne otopine nakon 3 minute

Postotak redukcije boje odnosno gašenja $ABTS^{\bullet+}$ mjera je antioksidativne aktivnosti ispitivane otopine. Preko jednadžbe pravca baždarnog dijagrama prikazanog na Slici 9. rezultati mjerenja uzoraka izraze se kao miligrami ekvivalenta Trolox-a na 1 gram uzorka.



Slika 9. Baždarni dijagram s Troloxom za određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala TEAC – testom

3.2.5 Klasična ekstrakcija komine

Prema prethodno optimiranom postupku, 500 mg uzorka komine ekstrahira se u Falcon kiveti s 25 ml 60%-tnog etanola. Ekstrakcija se provodi na termostatiranoj vodenoj kupelji s mućkalicom na 70 °C kroz 2 sata na 100 rpm.

3.2.6 Ultrazvučna ekstrakcija komine

Uvjeti ultrazvučne ekstrakcije obzirom na debljinu sonde, trajanje ekstrakcije, korištenje pulsnog ili kontinuiranog ultrazvuka te utjecaj temperature prethodno su optimirani (sonda debljine 12 mm, 15 min, amplituda 100%i uz temperaturno ograničenje od 120 °C). Za dobivanje ultrazvučnih ekstrakata koji su dalje ispitivani FC i TEAC metodom korišteni su različiti omjeri uzorka i otapala, različita otapala (etanol ili voda) te su u zadnjem koraku dodani ekscipijensi (β- i γ-ciklodekstrini). Za usporebu s klasičnom ekstrakcijom i ispitivanje utjecaja odmašćivanja u analizu je uzeto 4 g uzorka i 200 ml etanola. Ti su ekstrakti zatim

centrifugirani10 minuta na 10 000 g pri temperaturi od 4 °C, razrijeđeni 4 puta i analizirani FC i TEAC metodom kako je opisano u poglavljima 3.2.3. i 3.2.4. Nakon toga, istražen je utjecaj promjene omjera mase uzorka i volumena etanola te su u tu svrhu korištene odvage od 2, 4 i 15 grama u 200ml. Ekstrakti dobiveni ultrazvučnim postupkom se centrifugiraju i potom razrjeđuju redom 2, 4 i 20 puta za ispitivanje udjela fenola. U idućem koraku su u ekstrakte dodani ekscipijensi (β- i γ-ciklodekstrini). U ispitivanju s 60%-tnim etanolom kao ekstrakcijskim sredstvom korištena je odvaga od 2 grama uzorka i 1,6 grama β-ciklodekstrina, odnosno γ-ciklodekstrina. Od 200 ml centrifugiranog ekstrakta (10 minuta; 10 000g, 4 °C) dobivenog ultrazvučnom ekstrakcijom uzme se 50 ml i prenese u prethodno tariranu tikvicu s okruglim dnom i upari se etanol na rotavaporu. Vodeni ostatak u tikivici se zamrzne i liofilizira. Sušenje uzorka smrzavanjem provedeno je na temperaturi kondenzora od -50 °C i tlaku od 0.2 mBar-a. Prije procesa sušenja uzorci su smrznuti na temperaturi od -18 °C. Određena masa liofilizata se otopi u 5 ml vode te razrjeđuje 50 puta za određivanje fenola, odnosno 100 puta za analizu TEAC metodom te koristi nerazrijeđena za HPLC analizu. Odvaga liofilizata koja se otapa se prilagođava s obzirom na maseni udio ekscipijensa u liofilizatu (kako bi masa čistog ekstrakta u svakoj odvazi bila jednaka).

3.2.7 Identifikacija oleuropeina primjenom tekućinske kromatografijoe visoke djelotvornosti

Za analizu oleuropeina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti korišteni su liofilizirani ekstrakti komine.

Separacija i identifikacija oleuropeina provedena je na Agilent 1200 kromatografskom sustavu korištenjem binarne pumpe i obrnuto fazne C18 kolone (dimenzija 4,6 x 250 mm i veličine čestica 5μm). Gradijentna eluacija korištena na način kako je prikazano u Tablici 1. Kao otapalo A korišten je 0.05 M acetatni pufer (pH=5), a kao otapalo B acetonitril. Protok mobilne faze podešen je na 1 ml/min, a temperature kolone na 40 °C.

Tablica 1. Program gradijentne eluacije aktivnih komponenti

vrijeme (min)	otapalo A (%)	otapalo (B%)	protok (ml/min)
0	90	10	1
4	80	20	1
8	40	60	1
11	30	70	1
15	90	10	1

UV spektar oleuropeina snimljen je pomoću DAD sustava (*diode array detection*), a maksimum apsorbancijeza oleuropein je očitan na valnoj duljini od 240 nm. Identifikacija pika provedena je usporedbom vremena zaostajanja (t_R) ispitivanih supstancija s vrijednostima vremena zaostajanja za standarde. Za obradu podataka korišten je softver Agilent Chem Station s OpenLAB CDS 3D UV nadogradnjom.

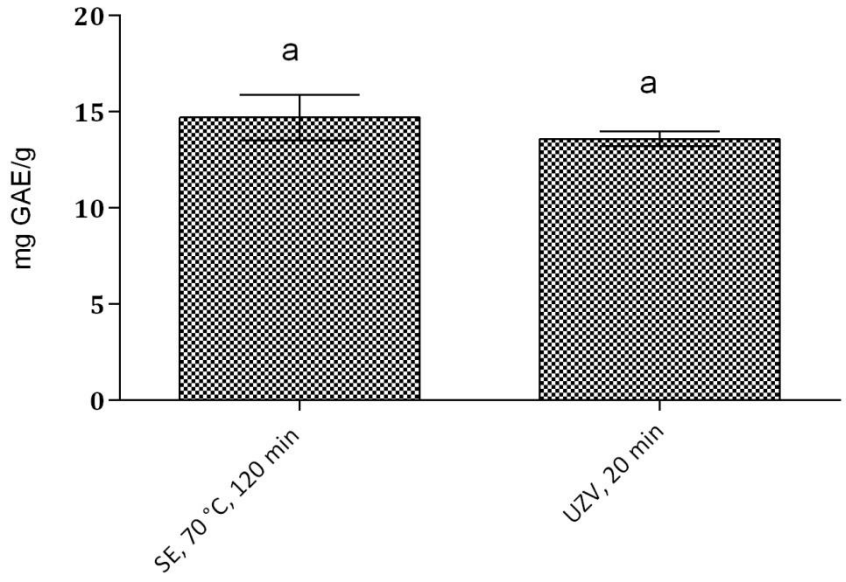
3.2.8 Statistička analiza

Sva mjerenja provedena su u duplikatu ili triplikatu. Za analizu dobivenih podataka i izradu grafičkih prikaza korišten je GraphPad Prism 6.0 programski paket. U statističkoj obradi podataka korišteni su parametrijski testovi: rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija, a za usporedbu uzoraka korišten je Studentov t-test ili jednosmjerna analiza varijance sa Dunettovim *post hoc* testom. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost za $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Usporedba učinkovitosti klasične i ultrazvučne ekstrakcije

Za usporedbu klasične i ultrazvučne ekstrakcije komine korišten je omjer mase uzorka i ekstrakcijskog sredstva 1:50, a kao ekstrakcijsko sredstvo korišten je 60%-tni etanol. Udio ukupnih fenola u uzorku nakon klasične ekstrakcijeiznosio je 14.69 ± 1.18 mg GAE/g, a u uzorku nakon ultrazvučne ekstrakcije sadržaj fenola iznosi 13.04 ± 0.88 mg GAE/g (Slika 10). Nakon provedene statističke analize dobivenih rezultata može se zaključiti da nema statistički značajne razlike u sadržaju fenola u ekstraktima dobivenim klasičnom, odnosno ultrazvučnom ekstrakcijom ($p>0.05$), što znači da je ultrazvučnom ekstrakcijom moguće ostvariti isti prinos fenola, ali u značajno kraćem vremenu.

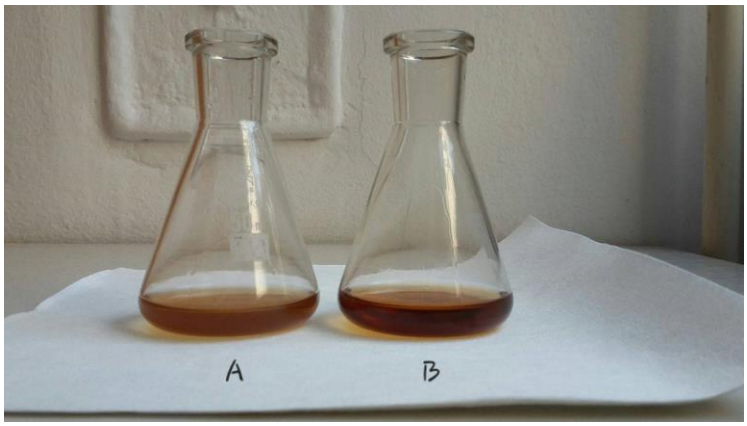


Slika 10. Usporedba klasične i ultrazvučne ekstrakcije. Skupovi podataka označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ($p>0.05$)

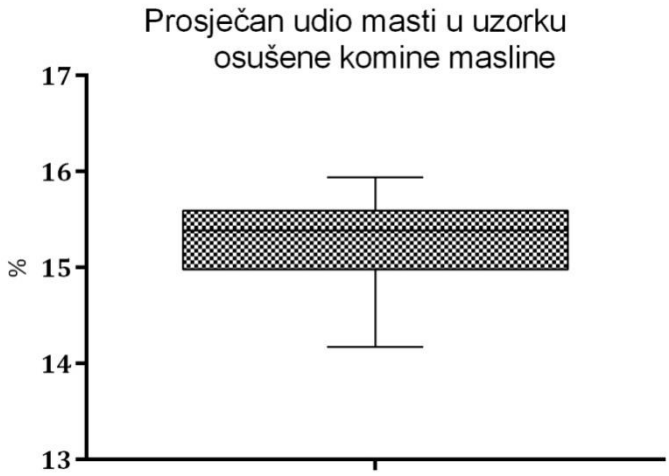
4.2 Utjecaj odmašćivanja na udiofenolnih komponenata i antiradikalni učinak

Ultrazvučnom ekstrakcijom uzorka komine masline dobije se izrazito mutan ekstrakt; vjerojatno zbog emulgatorskog učinka lipidne frakcije nastaje emulzija koja je vrlo stabilna te ni nakon dugotrajnog centrifugiranja na velikim brzinama ni filtriranja nije moguće dobiti bistru otopinu pogodnu za spektrofotometrijska i kromatografska ispitivanja. Iz tog razloga provedeno je odmašćivanje uzorka komine masline te je istražen utjecaj uklanjanja lipidne frakcije na udio fenolnih komponenata i antiradikalnu učinkovitost dobivenog ekstrakta. Razlika u bistrini ekstrakata originalnog (A) i odmašćenog uzorka (B) prikazana je na Slici

11. Udio masti u analiziranim uzorcima kretao se od 14.16 do 18.19 %, a prosječan udio masi bio je 15.61% (Slika 12).



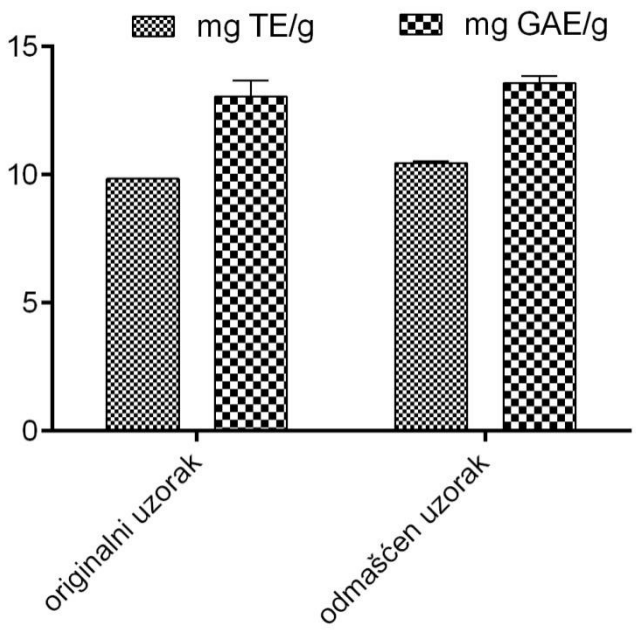
Slika 11.Razlika u bistrini ekstrakata odmašćenog i originalnog uzorka



Slika 12.Prosječan udio masti u uzorku

Rezultati istraživanja utjecaja uklanjanja lipidne frakcije prikazani su na Slici 13. Udio fenola u neodmašćenom uzorku iznosi 13,04 mg, a u odmašćenom uzorku 13,57 mg GAE. Antiradikalni učinak izražen kao mg Trolox ekvivalenata (TE) iznosi 9,85 mg za neodmašćeni uzorak, odnosno 10,44 mg za odmašćeni uzorak. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da postupak odmašćivanja statistički ne utječe značajno na udio fenola i antiradikalni učinak uzorka, a da pritom možemo dobiti bistri ekstrakt s kojim možemo vršiti

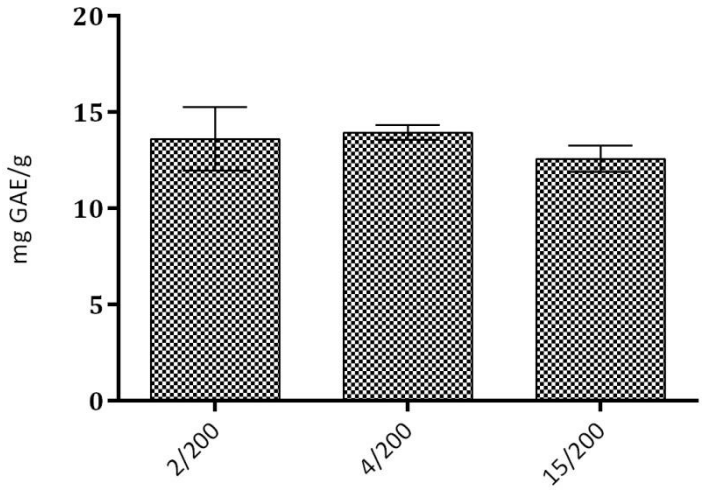
sprektrofotometrijska i kromatografska ispitivanja. Budući da je većina polifenola iz masline topljiva u vodi, očekivano je da će gubici odmašćivanjem biti mali.



Slika 13. Sadržaj fenolnih komponenata u odmašćenom i originalnom uzorku ekstrahiranom ultrazvučnom ekstrakcijom

4.3 Utjecaj promjene omjera mase uzorka i volumena otapala na prinos ultrazvučnog postupka ekstrakcije

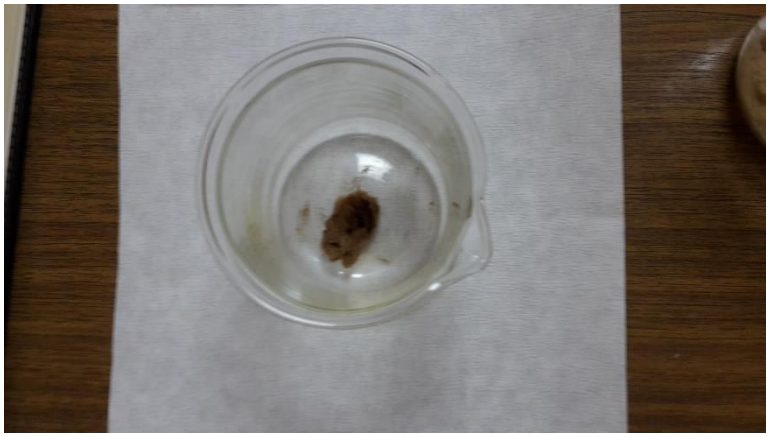
U svrhu istraživanja utjecaja omjera mase uzorka i volumena otapala na prinos ekstrakcijskog postupka, a s krajnjim ciljem smanjenja količine ekstrakcijskog sredstva, istražena su tri različita omjera mase komine i volumena 60%-tnog etanola (Slika 14.), redom 1:100, 2:100 i 3:40. Rezultati istraživanja pokazuju da se smanjenjem omjera mase uzorka i volumena otapala ne utječe bitno na ukupno iskorištenje postupka, što nije slučaj kod klasične ekstrakcije (Filipović-Grčić, 2014). Drugim riječima, ultrazvučna ekstrakcija omogućuje značajno manji utrošak otapala, a da se pritom dobije isti prinos polifenola kao kod klasične ekstrakcije.



Slika 14. Ispitivanje utjecaja različitog omjera mase uzorka i volumena otapala na sadržaj fenola

4.4 Utjecaj enkapsulacije ciklodekstrinima na prinos ultrazvučne ekstrakcije

Liofilizacijom ekstrakta komine dobivenog bez korištenja farmaceutskih nosača dobije se izrazito higroskopan, ljepljiv i gumast produkt (Slika 15). S ciljem zadovoljavanja tehnoloških parametara konačnog produkta, kao pomoćne tvari tijekom ekstrakcije nužno je u ekstrakcijsko sredstvo dodati pogodne farmaceutske nosače koji, osim na tehnološka svojstva, mogu utjecati i na prinose aktivnih tvari u dobivenom ekstraktu.U slučaju ekstrakta komine masline dodatkom β- i γ- ciklodekstrina u ekstrakcijsko sredstvo dobiveni su praškasti uzorci, značajno boljih organoleptičkih svojstava, prikazani na Slici 16., i 17.



Slika 15. Suhi ekstrakt komine bez dodatka ciklodekstrina



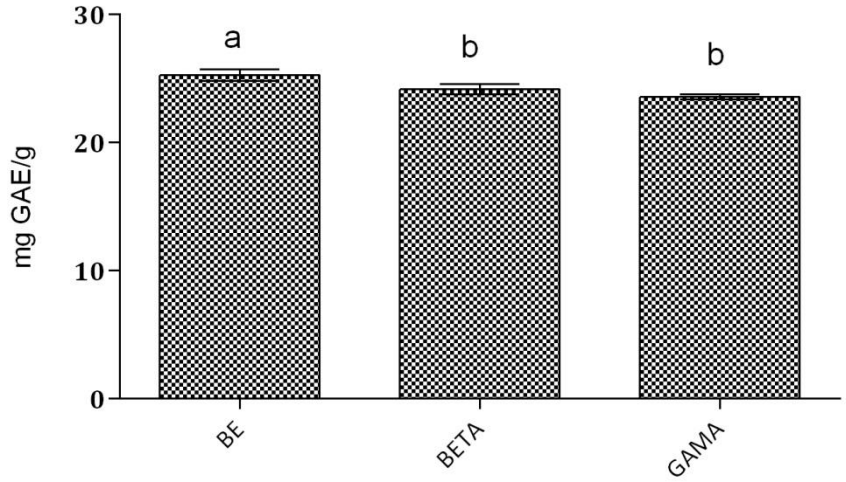
Slika 16.Suhi ekstrakt komine s dodatkom β-ciklodekstrina



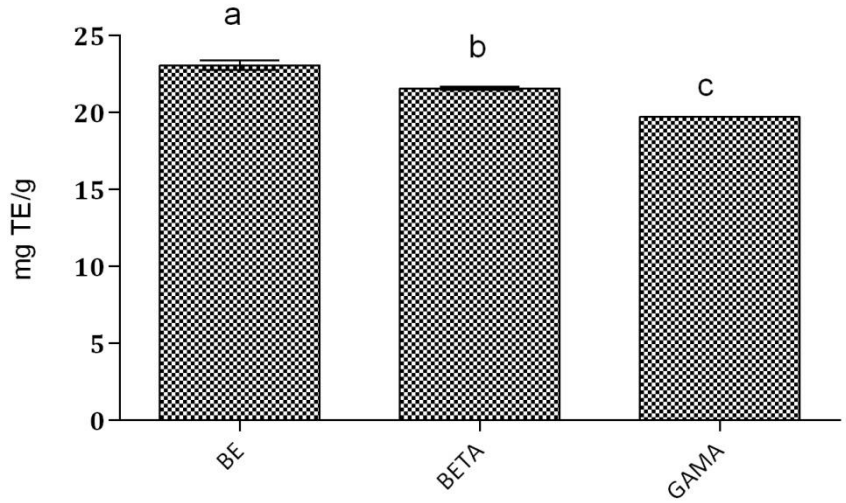
Slika 17. Suhi ekstrakt komine s dodatkom ɣ-ciklodekstrina

Rezultati utjecaja ciklodekstrina na prinose polifenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata komine prikazani su na Slikama 18. i 19. Statistička obrada rezultata ukazuje na to da β- i γ-ciklodekstrini statistički utječu na udio fenola i antiradikalni učinak na način da smanjuju udio fenola i antioksidativnu aktivnost. Iako su uočene razlike statistički značajne, radi se o vrlo malim razlikama u prinosima: 25.23 mg/g komine u ekstraktima bez ekscipijensa napram 24.14 odnosno 23.53 mg/g u ekstraktima s β- odnosno ɣ- ciklodekstrinom. Dobiveni rezultat je u skladu s očekivanjem s obzirom na rezultate prethodno provedenih studija (Munin i Edwards-Levy, 2011) koji pokazuju da enkapsulacija prirodnih fenolnih komponenata pruža značajnu zaštitu protiv drastičnih uvjeta kao što su oksidacija i termalna razgradnja čime se doprinosi trajnosti enkapsuliranog aktivnog sastojka. Provedena je i studija inkapsulacije ekstrakta lista masline s β-ciklodekstrinima koja je potvrdila nastajanje inkulzivnog

kompleksa s β-CD nakon miješanja komponenata u vodenom mediju i naknadnim sušenjem raspršivanjem (Fang i Bhandari, 2010). U toj studiji antioksidativna aktivnost dobivenih ekstrakata povećana je stvaranjem inkluzijskih kompleksa, što može biti posljedica zaštite polifenola od brze oksidacije pomoću slobodnih radikala. U našoj studiji potvrđen je pozitivan učinak ciklodekstrina na organoleptička svojstva dobivenog suhog ekstrakta. Također, intenzivan miris sirovog ekstrakta značajno je ublažen dodatkom ciklodekstrina u ekstrakcijsko sredstvo što je u skladu s dostupnim literaturnim podacima (Munin i Edwards-Levy, 2011). Izostanak djelovanja ciklodekstrina na povećanje prinosa može se objasniti odličnom topljivošću polifenola masline u 60%-tnom etanolu te prisutnošću glikozidnih oblika fenola u uzorku što otežava uklapanje u šupljinu samog ciklodekstrina. Što se tiče termoprotektivnog učinka, bitno je napomenuti da polifenoli komine masline nisu posebno termonestabilni te su samim time otporni i na povišene temperature (tijekom ekstrakcije) i smrzavanje (tijekom postupka sušenja).



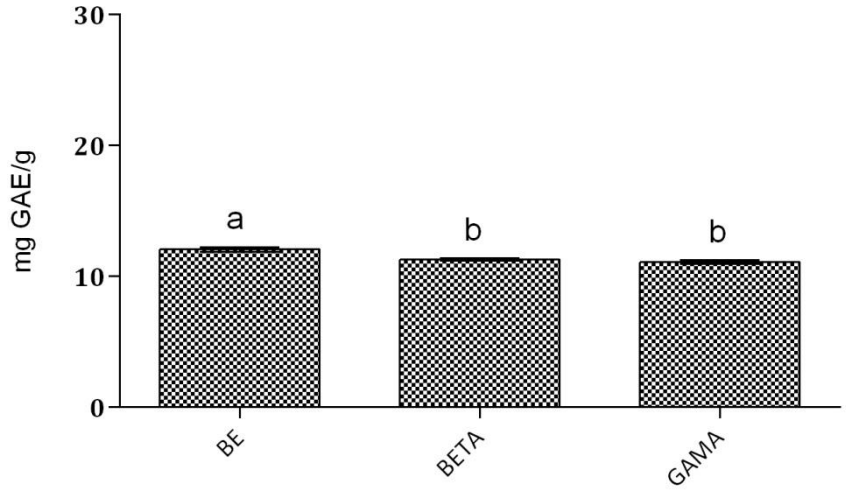
Slika 18. Utjecaj ciklodekstrina na sadržaj fenola u etanolnom mediju



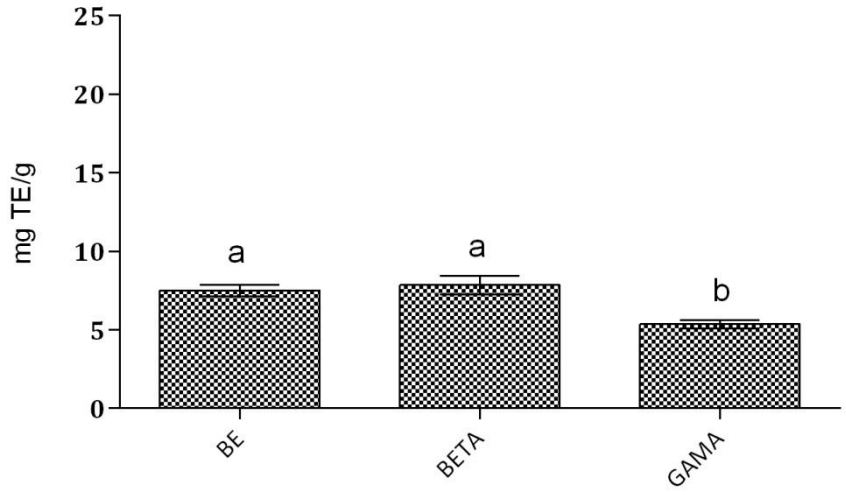
Slika 19. Utjecaj ciklodekstrina na antioksidacijski potencijal u etanolnom mediju

4.5 Utjecaj otapala na iskorištenje ultrazvučne ekstrakcije

U ovom ispitivanju umjesto 60%-tnog etanola kao ekstrakcijskog sredstva korištena je voda. Naime, ciklodekstrini su poznati kao farmaceutski ekscipijensi koji mogu bitno poboljšati topljivost nekih djelomično topljivih spojeva u vodi. Cilj istraživanja bio je istražiti učinkovitost ciklodekstrina u čistom vodenom mediju te mogućnost zamjene organskog otapala poput etanola s čistom vodom. Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 20. i 21.



Slika 20. Utjecaj vode kao ekstrakcijskog sredstva na sadržaj fenola

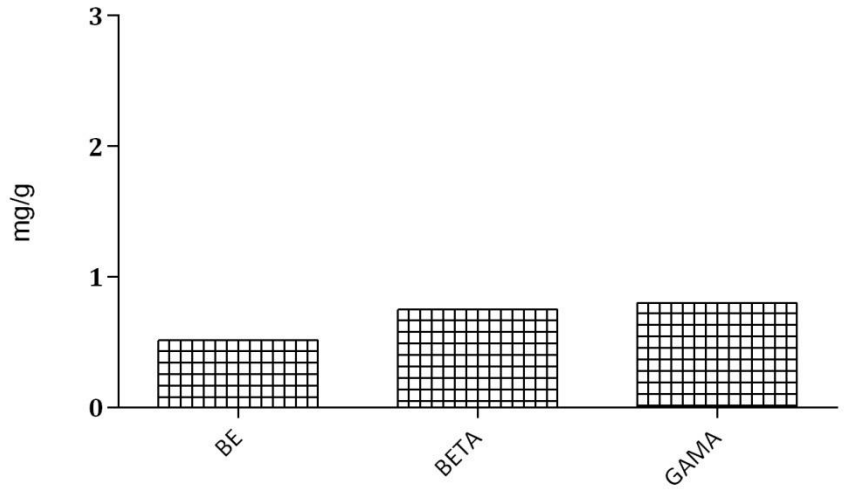


Slika 21. Utjecaj vode kao ekstrakcijskog sredstva na antioksidacijski potencijal

Pri usporedbi rezultata prikazanih na Slikama 23. i 24. vidljivo je da i β- i γ-CD smanjuju udio fenola, a samo γ-CD smanjuje antioksidacijski potencijal. Dodatkom β-CD u vodeni medij zadržavaju se antioksidativna svojstva ekstrakta. Međutim, ako se usporede rezultati dobiveni za etanolni (slika 18. i 19.) i vodeni ekstrakt (slika 20. i 21.) utjecaj promjene otapala je višestruko značajniji. Udio fenola u vodenom mediju je dvostruko manji u odnosu na ekstrakt s etanolom. Utjecaj vode na antioksidacijski potencijal još je veći nego na udio fenola. Voda smanjuje antioksidativnu aktivnost fenola trostruko. Dakle, zamjena etanola kao otapala za vodu pokazuje negativan utjecaj na željena svojstva.

4.6 Utjecaj ciklodekstrina na koncentracije oleuropeina u ekstraktima komine

Nakon što su odabrani najpogodniji ekstrakcijski uvjeti HPLC metoda je primijenjena za identifikaciju i kvantifikaciju glavne biološki aktivne komponenate komine masline - oleuropeina. Identifikacija je provedena snimanjem UV/VIS spektra i usporedbom vremena zadržavanja analita u proizvodu s vremenima zadržavanja u spektru smjese standarda. Koncentracija analita izračuna se iz integrirane površine pika na kromatogramu pomoću kalibracijskog pravca dobivenog za smjesu standarda. Za ispitivanje su korišteni etanolni ekstrakti dobiveni kako je to opisano u postupku 3.2.6. Slika 22. prikazuje koncentracije oleuropeina u ekstraktu bez ciklodekstrina, s β-CD i s γ-CD.



Slika 22. Koncentracije oleuropeina u ekstraktima sa i bez ciklodekstrina

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se korištenjem ciklodekstrina u kombinaciji sa ultrazvučnom ekstrakcijom povećava prinos oleuropeina u ekstraktu. S obzirom na to da je oleuropein u komini zastupljen u puno nižim koncentracijama od nekih drugih fenolnih komponenti kao što su hidroksitirosol, *trans*-cinamična kiselina, tirosol, vanilinska kiselina, p-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina i ferulična kiselina (Deeb et al., 2012) opaženi pozitivni učinak nije bilo moguće primijetiti promatranjem udjela ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima. Razlog značajno višim prinosima oleuropeina vjerojatno je stvaranje inkluzijskih kompleksa s β- i ɣ-ciklodekstrinom što je u skladu sa dostupnim literaturnim podacima. Na taj način, molekula oleuropeina, koja razgradnjom daje hidroksitirosol, štiti se tijekom procesa ekstrakcije i sušenja.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog diplomskog rada cilj je bio optimizirati uvjete ultrazvučne ekstrakcije i ispitati utjecaj enkapsulacije ciklodekstrinima na prinose polifenola u ekstraktu komine masline. U ekstraktima je određivan udio fenola Folin- Ciocalteu metodom i antiradikalni učinak TEAC-metodom. Također, ispitan je i utjecaj uklanjanja lipidnih komponenata metodom po Soxhletu na udio polifenola i antiradikalni učinak u svrhu dobivanja bistrog ekstrakta pogodnog za daljnja ispitivanja. Iz rezultata ispitivanja može se zaključiti sljedeće:

- Odmaščivanjem komine ne utječe se značajno na udio polifenola u uzorku stoga se ono predlaže se kao predkorak u obradi sirovine jer se sirovina na taj način „ukoncentrirava“ i dobivaju se čišći ekstrakti
- Ultrazvučna ekstrakcija ostvaruje isti prinos polifenola kao i konvencionalna, ali u puno kraćem vremenu (20 minuta ultrazvučne ekstrakcije u odnosu na 120 minuta klasične ekstrakcije)
- Primjenom ultrazvučne ekstrakcije bitno se smanjuje količina potrebnog otapala za ekstrakciju; isti prinosi dobivaju se sa 7-8 puta manjom količinom ekstrakcijskog sredstva
- Liofilizati ekstrakata komine nezadovoljavajućih organoleptičkih svojstava, dobije se izrazito higroskopan, ljepljiv i gumast produkt, neugodnog mirisa, nepogodan za druga ispitivanja
- Dodatkom ciklodekstrinau ekstrakcijsko sredstvo bitno se poboljšavaju organoleptička svojstva suhog ekstrakta i ublažava se intenzivan miris sirovog ekstrakta
- Statistička obrada rezultata ukazuje na to da dodatak β- i γ-ciklodekstrina u ekstrakcijsko sredstvo negativno utječe na udio ukupnih fenola i antiradikalni učinak; ipak radi se o statistički značajnom, ali apsolutno vrlo malom smanjenju udjela polifenola. To se može objasniti odličnom topljivošću polifenola masline u 60%-tnom etanolu (bez obziran na prisutnost ciklodektrina) te prisutnošću glikozidnih oblika fenola u uzorku što otežava uklapanje u šupljinu samog ciklodekstrina
- Korištenjem ciklodekstrina u kombinaciji s ultrazvučnom ekstrakcijom značajno se povećava prinos oleuropeina kao glavnog biološki aktivnog polifenola masline. Razlog većim prinosima oleuropeina vjerojatno je stvaranje inkluzijskih kompleksa sa β- i ɣ-ciklodekstrinom. Na taj način molekula se štiti tijekom procesa ekstrakcije i sušenja. S obzirom na to da je oleuropein u komini zastupljen u puno nižim koncentracijama od nekih drugih fenolnih komponenti opaženi pozitivni učinak nije bilo moguće primijetiti promatranjem udjela ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima.

- Iako ciklodekstrini poboljšavaju topljivost nekih kemijskih tvari u vodi, dodatkom ciklodekstrina u vodu kao ekstrakcijsko sredstvo nisu bitno povećani prinosi fenola te su bili značajno manji od onih dobivenih korištenjem 60%-tnog etanola kao ekstrakcijskog sredstva. Izostanak učinka može se objasniti činjenicom da su u komini masline polifenoli prisutni uglavnom u obliku glikozida čime se ometa stvaranje inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima.

6. LITERATURA

- Ahmad A. Deeb, Manar K. Fayyad, and Mahmoud A. Alawi. Separation of Polyphenols from Jordanian Olive Oil Mill Wastewater. Chromatography Research International, 2012, 1-7.
- Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P. Valorization of olive oil solid waste using high pressure – high temperature reactor. *Food Chem*, 2011, 704-705.
- Burattini S, salucci S, Baldassarri V, Accorsi A, Piatti E, Madrona A, Espartero J, Candiracci M, Zappia G, Falcieri E. Anti-apoptotic activity of hydroksytyrosol and hydroxytyrosyl laurate. *Food and Chem Tox*, 2013, 248-256.
- Cardoso SM, Falcão SI, Peres AM, Domingues MRM. Oleuropien/ligstroside isomers and their derivates in Portuguese olive mill wastewaters. *Food Chem*, 2011, 291-292.
- Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F, Michaud P. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization. *Process Biochem*, 2013, 1532-1535.
- Drmić, Režek Jambrak. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2010, 22-32
- Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds, 2011.,http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857059/, pristupljeno 29.08.2016.
- Encapsulation of olive leaf extract in beta-cyclodextrin, 2007., http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=olive+extract+cyclodextrins,pristupljeno 29.08.2016.
- Kuštrak D. Farmakognozija-fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing, Tehnička knjiga. 2005, str. 192-193.
- Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova- praktikum. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 106-107.
- Regional Energy Agency of Central Macedonia. Market of Olive Residues for Energy. 2008, 5, 9.
- Vedrina Dragojević I, Šebečić B. Biokemija prehrane- osnovni sastojci i energetska vrijednost namirnica. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2007, str. 96-97.

7. SAŽETAK

Posljednjih desetljeća, kako se sve više razvijaju izolacijski i identifikacijski postupci tako i biljke koje su se prije koristile isključivo kao namirnice sada služe kao izvor tvari s farmakološkim svojstvima. Maslina (Olea europea, Oleacae) je izvor ulja koje se koristi u ljudskoj prehrani još od davnih vremena, a posebice području Mediterana gdje se nalaze brojni maslinici. Sve veća popularnost maslinovog ulja zbog pozitivnih učinaka na zdravlje povezana je s povećanjem količine krutog otpada. Razvojem prikladnog procesa ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz krutog otpada (komine masline) i formulacije stabilnog, tehnološki prihvatljivog produkta ostvaruje se ekonomska i ekološka korist.Cilj ovog rada bio je razviti prikladan proces ekstrakcije polifenola iz komine i formulirati stabilni, tehnološki prihvatljiv produkt optimizacijom kombiniranog postupka ultrazvučne ekstrakcije i enkapsulacije ciklodekstrinima. Rezultati isptivanja govore da je ultrazvučnom ekstrakcijom moguće ostvariti isti prinos polifenola kao i kod klasične, ali u značajno kraćem vremenu i s manjim utroškom otapala. Odmašćivanjem komine prije postupka ekstrakcije može se dobiti bistar ekstrakt pogodan za daljnja ispitivanja, a bez značajnih gubitaka polifenola. Dodavanjem ciklodekstrina u ekstrakcijsko sredstvo bitno su poboljšana organoleptička svojstva liofiliziranog ekstrakta bez značajnog utjecaja na udio fenola i antiradikalni učinak. Ciklodekstrini značajno povećavaju prinos oleuropeina, glavnog biološki aktivnog polifenola masline. Razlog većim prinosima oleuropeina vjerojatno je stvaranje inkluzijskih kompleksa s β- i ɣ-ciklodekstrinom čime se molekula štiti tijekom procesa ekstrakcije i sušenja.

SUMMARY

For the last several decades, with the development of isolation and identification processes, plants previously used only as food are now being used as sources of pharmacologically active compounds. The olive has been a source of oil in human nutrition since ancient times, especially in the Mediterranean region. The increased production, consumption and popularity of olive oil has resulted in significant increase of solid waste remaining after oil production. By developing an appropriate, sustainable process of extraction of bioactive compounds from the solid waste and formulating a stable, technologically acceptable product, the economical and ecological benefits can be achieved. The goal of this thesis was to develop efficient and sustainable process for extraction of polyphenols from olive pomace and to formulate stable, technologically acceptable product. For that purpose, optimized processes of ultrasound assisted extraction was combined with encapsulation with cyclodextrins. The results showed that by ultrasound assisted extraction significantly lower amounts of extraction solvent are needed and the time of extraction is significantly shortened in comparisson to classic solvent extraction. By removing lipid component from pomace, we can get a clear extract that can be used for further examination without significant loss of polyphenols. By adding cyclodextrin to the extraction solvent organoleptic characteristics of lyophilized extracts were improved, without significant impact on polyphenolic yields and antiradical efficiency. Applied combination of ultrasound assisted extraction and cyclodextrin encapsulation significantly increased the content of oleuropein, the main active biological polyfenol of olive, in obtained extracts. The reason for higher oleuropein yields is probably the formation of inclusion complexes with β- and γ-cyclodextrin. In that way the molecule is protected from degradation during the process of extraction and drying.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

OPTIMIZACIJA KOMBINIRANOG POSTUPKA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE I ENKAPSULACIJE ZA EKSTRAKCIJU POLIFENOLA MASLINE

Maja Trgovčević

SAŽETAK

Posljednjih desetljeća, kako se sve više razvijaju izolacijski i identifikacijski postupci tako i biljke koje su se prije koristile isključivo kao namirnice sada služe kao izvor tvari s farmakološkim svojstvima. Maslina (Olea europea, Oleacae) je izvor ulja koje se koristi u ljudskoj prehrani još od davnih vremena, a posebice području Mediterana gdje se nalaze brojni maslinici. Sve veća popularnost maslinovog ulja zbog pozitivnih učinaka na zdravlje povezana je s povećanjem količine krutog otpada. Razvojem prikladnog procesa ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz krutog otpada (komine masline) i formulacije stabilnog, tehnološki prihvatljivog produkta ostvaruje se ekonomska i ekološka korist. Cilj ovog rada bio je razviti prikladan proces ekstrakcije polifenola iz komine i formulirati stabilni, tehnološki prihvatljiv produkt optimizacijom kombiniranog postupka ultrazvučne ekstrakcije i enkapsulacije ciklodekstrinima. Rezultati isptivanja govore da je ultrazvučnom ekstrakcijom moguće ostvariti isti prinos polifenola kao i kod klasične, ali u značajno kraćem vremenu i s manjim utroškom otapala. Odmašćivanjem komine prije postupka ekstrakcije može se dobiti bistar ekstrakt pogodan za daljnja ispitivanja, a bez značajnih gubitaka polifenola. Dodavanjem ciklodekstrina u ekstrakcijsko sredstvo bitno su poboljšana organoleptička svojstva liofiliziranog ekstrakta bez značajnog utjecaja na udio fenola i antiradikalni učinak. Ciklodekstrini značajno povećavaju prinos oleuropeina, glavnog biološki aktivnog polifenola masline. Razlog većim prinosima oleuropeina vjerojatno je stvaranje inkluzijskih kompleksa s β- i ɣ-ciklodekstrinom čime se molekula štiti tijekom procesa ekstrakcije i sušenja.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 22 grafička prikaza, 1 tablica i 12 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ultrazvučna ekstrakcija, komina, oleuropein, ciklodekstrini

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali-Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Mario Jug, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Marija Grdić Rajković, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2016.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

COMBINATION OF ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION AND ENCAPSULATION FOR THE EXTRACTION OF OLIVE POMACE POLYPHENOLS

Maja Trgovčević

SUMMARY

For the last several decades, with the development of isolation and identification processes, plants previously used only as food are now being used as sources of pharmacologically active compounds. The olive has been a source of oil in human nutrition since ancient times, especially in the Mediterranean region. The increased production, consumption and popularity of olive oil has resulted in significant increase of solid waste remaining after oil production. By developing an appropriate, sustainable process of extraction of bioactive compounds from the solid waste and formulating a stable, technologically acceptable product, the economical and ecological benefits can be achieved. The goal of this thesis was to develop efficient and sustainable process for extraction of polyphenols from olive pomace and to formulate stable, technologically acceptable product. For that purpose, optimized processes of ultrasound assisted extraction was combined with encapsulation with cyclodextrins. The results showed that by ultrasonund assisted extraction significantly lower amounts of extraction solvent are needed and the time of extraction is significantly shortened in comparisson to classic solvent extraction.. By removing lipid component from pomace, we can get a clear extract that can be used for further examination without significant loss of polyphenols. By adding cyclodextrin to the extraction solvent organoleptic characteristics of lyophilized extracts were improved, without significant impact on polyphenolic yields and antiradical efficiency. Applied combination of ultrasound assisted extraction and cyclodextrin encapsulation significantly increased the content of oleuropein, the main active biological polyfenol of olive, in obtained extracts. The reason for higher oleuropein yields is probably the formation of inclusion complexes with β- and γ-cyclodextrin. In that way the molecule is protected from degradation during the process of extraction and drying.

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

Thesis includes: 43 pages, 22 figures, 1 tables and 12 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ultrasonic extraction, pomace, oleuropein, cyclodextrins

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

Reviewers: **Dubravka Vitali-Čepo**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Jug, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marija Grdić Rajković, **Ph.D.** *Assistant Professor* ,University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2016.