

# Utjecaj ciklodekstrina na bioraspoloživost hidrokstirosola, tirosoila i oleuropeina iz ekstrakta komine masline

---

Horvat, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:226368>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



**Martina Horvat**

**Utjecaj ciklodekstrina na bioraspoloživost  
hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina iz ekstrakta  
kumine masline**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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

Ovaj rad financiran je sredstvima uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost UIP-2014-09-9143 (Održivi razvoj inovacije u hrani-valorizacija otpada masline-NutriOliWa)

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na strpljenju, velikoj pomoći i korisnim savjetima prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se djelatnicima Zavoda za kemiju prehrane koji su mi pomagali i olakšali izvođenje eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji, a posebice mojoj majci bez čije potpore i požrtvornosti ne bih bila tu gdje jesam. Zahvaljujem se i svim prijateljima koji su bili uz mene za vrijeme cijelog studiranja.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Maslina .....	1
1.1.1. Kemijski sastav ploda masline i maslinovog ulja .....	1
1.1.2. Procesi proizvodnje maslinovog ulja .....	4
1.1.3. Komina masline.....	6
1.2. <i>In vitro</i> metode za određivanje bioraspoloživosti nutriceutika .....	7
1.2.1. <i>In vitro</i> modeli simulacije probave.....	7
1.2.2. Ispitivanje permeabilnosti .....	9
1.3. Ciklodekstrini .....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	14
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. Materijali .....	15
3.1.1. Uzorci za analizu .....	15
3.1.2. Kemikalije i pribor .....	16
3.1.3. Instrumenti .....	17
3.2. Metode.....	17
3.2.1. <i>In vitro</i> simulacija gastrointestinalne digestije.....	17
3.2.2. Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin Ciocalteu metodom.....	19
3.2.3. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom.....	20
3.2.4. Određivanje sadržaja oleuropeina, tirosola i hidrositirosola visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom ( <i>engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC</i> ) .....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4.1. Utjecaj probave na ukupni redukcijski potencijal ekstrakata komine masline.....	24
4.2. Određivanje ABTS antioksidacijske učinkovitosti tijekom i nakon procesa probave.	27
4.3. Određivanje količine hidrositirosola, tirosola i oleuropeina HPLC-om u različitim fazama gastrointestinalne probave.....	30
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. LITERATURA .....	37
7. SAŽETAK .....	42
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

## 1.1. Maslina

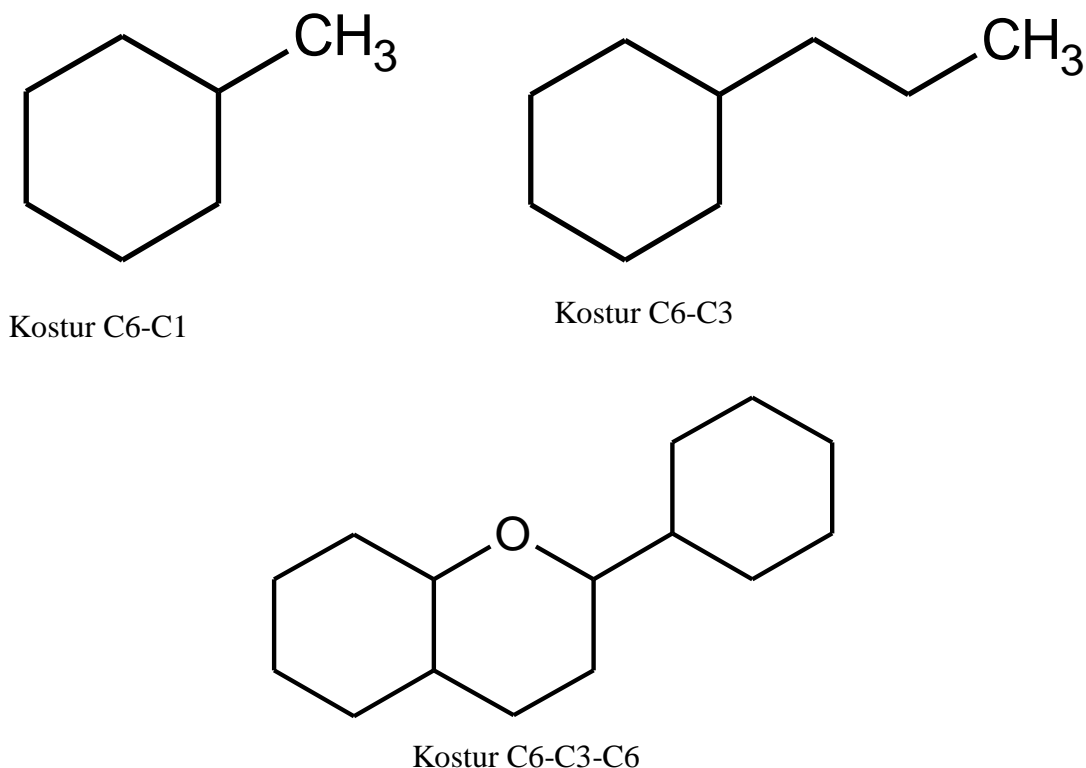
Maslina (*Olea europaea* L., Oleaceae) je vazdazelena vrsta iz porodice maslina. Stablo masline doseže visinu do 10 m, no može izrasti i više kada je zaštićeno od vjetra. Raste grmoliko te sa svojim nepravilnim rastom stabla i grana oblikuje mediteranski krajolik. Lišće je po granama razdijeljeno neparno perasto: uvijek su dva lista jedan nasuprot drugome, dok grana završava jednim listom. Listovi su mali, duguljasti i kožasti, lice lista je tamnozeleno boje, dok je naličje srebrnastosivo. U pazušcima listova smješteni su pupovi koji su šiljasti ili okrugli. Cvjetovi su žućkasto bijeli, ugodnog mirisa i u obliku grozda. Nakon cvatnje i oplodnje razvija se plod. Plod masline je ovalna koštunica. Kad je plod masline zelen, mesnati dio je gorak. Plod zelene boje i gorkog okusa dozrijevanjem prijelazi u tamnoljubičastu ili čak crnu boju te gubi gorčinu uz povećavanje sadržaja ulja. Za jelo se beru zeleni plodovi, a za ulje se beru dozreli, koji su poprimili ljubičastu boju. (Kantoci, 2006; Maleš, 2014). Maslina, koja je osjetljiva na niske temperature i zbog tog ne podnosi veliku udaljenost od mora, uzgaja se u većoj ili manjoj mjeri duž cijelog obalnog područja Mediterana. Katkad se uzgoj može odvijati i drugdje gdje klima to dopušta (Kuštrak, 2005). Vrlo dobro podnosi visoke temperature pa tako i sušu (Grdinić i Kremer, 2009). Uzgoj masline na Mediteranu traje već tisućama godina. Nedavna istraživanja ukazuju na to da je kultivacija masline započela prije pet do šest tisuća godina na Bliskom Istoku. (Kaniewski i sur., 2012). Sama biljka može doživjeti starost od preko 1000 godina, a prema nekim autorima i 2000 godina. Razlikuju se: *spp. africana* koja raste u tropskoj i južnoj Africi te jugozapadnoj Kini, *spp. Europaea*, koja je kultivirana sorta, i *spp. sylvestris* s Pirinejskog, Apeninskog i Balkanskog poluotoka, Krima, Turske, Izraela, Jordana, Sjeverozapadne Afrike i Libije. (Grdinić i Kremer, 2009)

### 1.1.1. Kemijski sastav ploda masline i maslinovog ulja

Kemijski sastav ploda masline i maslinovog ulja ovisi o više čimbenika. Najvažniji su: vrsta masline, sastav tla, klimatski uvjeti, stupanj zrelosti i vrijeme berbe.

Osnovne sastavnice ploda masline su voda, ulja, ugljikohidrati, celuloza, anorganske tvari, fenolni spojevi, organske kiseline, pigmenti i pektin. Fenolni spojevi se mogu podijeliti na hidrofilne i lipofilne spojeve. Dok su lipofilni spojevi uglavnom krezoli, hidrofilni fenoli se

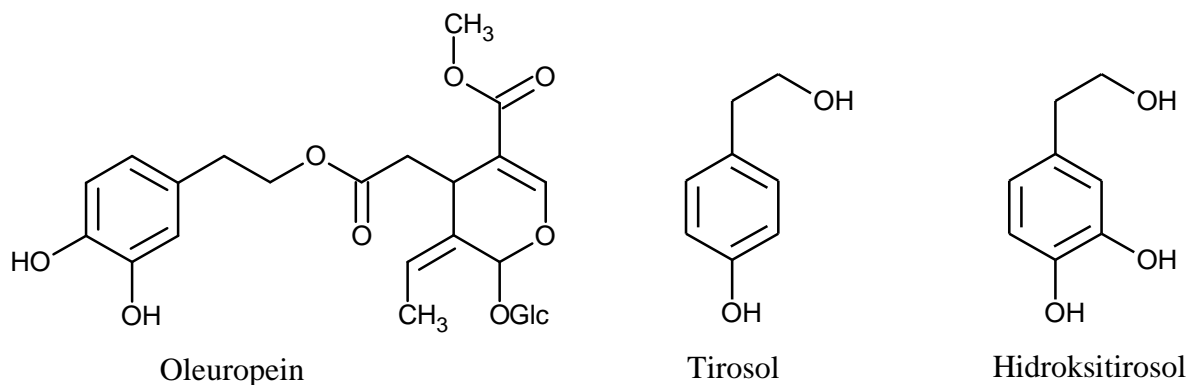
moгу podijeliti na fenolne kiseline, fenolne alkohole, flavonoide i sekoiridoide (Boskou i sur., 2005; Covas i sur., 2006). Prema strukturi, fenolni spojevi se mogu podijeliti u tri glavne skupine: prva skupina ima C6-C1 kostur (hidroksibenzojeva kiselina), C6-C3 je glavna struktura druge skupine (hidroksicimetna kiselina), dok je treća, flavonoidna, skupina složenija i ima C6-C3-C6 kostur (Slika 1.) (Kountouri i sur., 2007; Viola i Viola, 2009).



Slika 1. Prikaz C6-C1, C6-C3 i C6-C3-C6 kostura fenolnih spojeva.

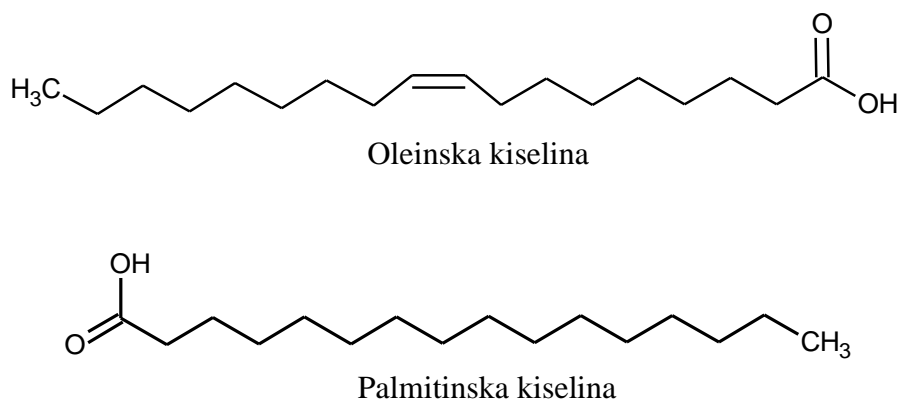
Fenolni spojevi nastali u biljkama, pa tako i u maslini, produkti su sekundarnog metabolizma te su biološki aktivne molekule. Glavni fenoli u maslini su oleuropein, hidroksitirozol, tirozol i verbaskozid (Slika 2.) (Bianchi, 2003). Flavonoidi masline su najčešće flavonolni glikozidi kao što su luteolin 7-*O*-glukozid, rutin, apigenin 7-*O*-glukozid, antocijanini, cijanidin 3-*O*-glukozid i cijanidin 3-*O*-rutinozid (Amiot i sur., 1986; Boskou i sur., 2005; Romani i sur., 1999). Oleuropein se smatra najodgovornijim spojem za gorčinu svježih zelenih plodova, no zrenjem dolazi do njegove hidrolize čime se smanjuje i gorčina ploda. Oleuropein je ester 2'-(3',4'-dihidroksifenil)etanola odnosno hidroksitirozola i elenoične kiseline. Oleuropein je glavni fenolni spoj ploda masline te mu udio u suhom plodu može biti i do 14%. Zrenjem

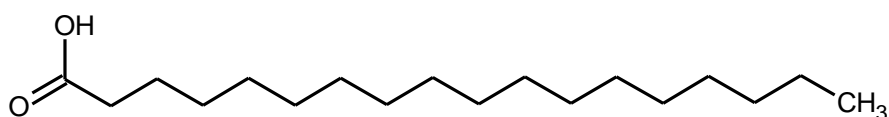
ploda smanjuje se količina oleuropeina, dok se povećava količina hidroksitirosola, produkta hidrolize oleuropeina (Bianchi, 2003; Soler-Rivas i sur., 2000). Tirosol i hidroksitirosol spadaju u skupinu jednostavnih fenola, strukturno su slični, osim što hidroksitirosol posjeduje dodatnu hidroksilnu skupinu u *meta* položaju. Zbog te dodatne hidroksilne skupine, hidroksitirosol je *o*-difenol ili katehol koji posjeduje iznimna antioksidativna svojstva te se on smatra odgovornim za farmakološke učinke fenola masline. (Tuck i Hayball, 2002; Vitali Čepo i sur., 2018)



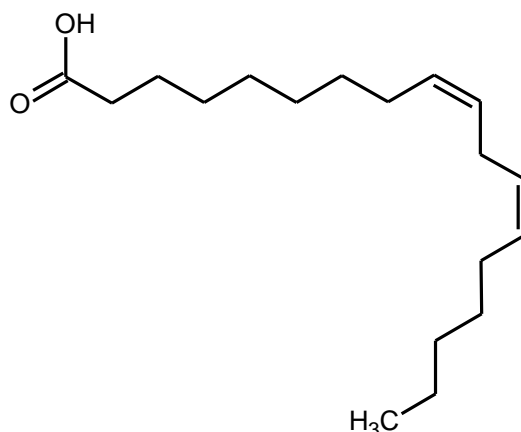
Slika 2. Prikaz struktura karakterističnih fenola ploda masline (Yüksel Aydar i sur., 2017)

Kemijski sastav maslinovog ulja nešto je drugačiji od sastava ploda masline. Sastavnice ulja mogu se podijeliti na glavne spojeve i spojeve u tragovima. Trigliceridi su glavna skupina spojeva maslinovog ulja koji čine 98-99%. Najvažnija masna kiselina koja čini trigliceride ulja je mononezasićena oleinska kiselina čiji je postotak u ulju 55-83%. Ostale masne kiseline su palmitinska, stearinska, linolna i alfa-linolenska (Slika 3.).





Stearinska kiselina



Linolna kiselina

Slika 3. Strukture oleinske, palmitinske, stearinske, linolne masne kiseline.

Spojevi u tragovima uključuju preko 230 spojeva, no njihov udio u maslinovom ulju je samo oko 2%. Glavne kemijske sastavnice su alifatski i triterpenski alkoholi, steroli, ugljikovodici i antioksidansi (fenoli i karoteni). Fenolni spojevi se mogu podijeliti na lipofilne i hidrofilne. Dok su lipofilni (tokoferoli) vrlo česti sastojci biljnih ulja, pojedini hidrofilni fenoli su specifični samo za maslinovo ulje. Sastav spojeva u tragovima mijenja se ovisno o kultivaru masline, klimi, načinu proizvodnje ulja, zrelosti plodova i uvjetima skladištenja. Njima, a posebice fenolnim spojevima, pripisuju se antioksidativna svojstva, utjecaj na okus i povoljan utjecaj na zdravlje (Calabriso i sur., 2014). Glavni fenolni spojevi u ulju masline su hidroksitirosol (glavna komponenta), tirosol, cimetna kiselina, homovanilni alkohol, homovanilna kiselina, *p*-kumarna kiselina, oleuropein, elenoična kiselina sa zatvorenim prstenom i elenoična kiselina s otvorenim prstenom. (Tuck i Hayball, 2002)

### 1.1.2. Proces proizvodnje maslinovog ulja

Ekstra djevičansko maslinovo ulje je ulje dobiveno iz ploda masline striktno mehaničkim i fizikalnim procesima kojima se kvaliteta ulja ne smanjuje. Takvo ulje, dobiveno iz visoko kvalitetnih svježih maslina, sadrži minimalnu količinu slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina (maksimalno 0,8 g slobodnih kiselina/100 g ulja), dok ulja koja



nazivamo djevičanska maslinova ulja sadrže maksimalno 2 g slobodnih kiselina/100 g ulja (Kalua i sur., 2007). Rafinirano maslinovo ulje je ono koje sadrži više slobodnih kiselina od djevičanskog te je ih je potrebno neutralizirati odnosno rafinirati. Takva ulja se često miješaju s djevičanskim maslinovim uljem zato što im nedostaju spojevi u tragovima i karakterističan okus pa se na taj način takvo ulje poboljšava (Azbar i sur., 2004; Calabriso i sur., 2014; Roselló-Soto i sur., 2015).

Koriste se tri osnovna načina proizvodnje ulja: diskontinuirani proces prešanja, trofazni kontinuirani proces ekstrakcije te dvofazni kontinuirani proces ekstrakcije. U svakom od procesa nastaje čvrsti (komina) i tekući otpad (vegetabilna voda) (Azbar i sur., 2004; Calabriso i sur., 2014; Roselló-Soto i sur., 2015).

Diskontinuirani proces prešanja je tradicionalni način proizvodnje ulja u kojem se masline peru, tiješte i gnječe uz dodatak vruće vode kako bi nastala pasta koja se preša pod visokim tlakom. Takvim postupkom iz paste izlazi mješavina vode i ulja te dekantiranjem dobivamo ulje. Prednosti u odnosu na trofazni kontinuirani proces ekstrakcije su da se koristi jeftinija oprema i potrebno je manje vode, no ona je zagađenija, proizvodnja je sporija zato što je diskontinuirana, potrebno je više zaposlenika i veća površina pogona (Azbar i sur., 2004; Calabriso i sur., 2014; Roselló-Soto i sur., 2015).

U trofaznom kontinuiranom procesu ekstrakcije masline se gnječe i miješaju uz dodatak vode. Smjesa se zatim centrifugira te nastaju tri faze: vegetabilna voda, komina i maslinovo ulje. Prednosti ovog procesa su potpuna automatizacija odnosno brža proizvodnja, manja potreba za radnicima i pogonskim prostorom te bolja kvaliteta samog ulja. Mane su skuplja oprema i korištenje najveće količine vode od svih opisanih postupaka (Azbar i sur., 2004; Calabriso i sur., 2014; Roselló-Soto i sur., 2015).

Najekološkiji način dobivanja maslinovog ulja je dvofazni kontinuirani proces ekstrakcije. Masline se gnječe i miješaju te se centrifugiraju, tako generirajući samo dvije faze, uljnu fazu i čvrstu kominu. Pozitivne strane tog procesa su korištenje puno manje količine vode i energije, no problemi se nalaze u odlaganju komine (Azbar i sur., 2004; Calabriso i sur., 2014; Roselló-Soto i sur., 2015).

Danas u proizvodnji maslinovog ulja prednjače zemlje Mediterana koje imaju dugu prošlost i tradiciju same proizvodnje. Najveći proizvođač maslinovog ulja je Španjolska (36% svjetske proizvodnje maslinovog ulja), nakon nje slijedi Italija (24% svjetske proizvodnje maslinovog ulja) i Grčka (17% svjetske proizvodnje maslinovog ulja). Te tri zemlje zajedno proizvode 77% maslinovog ulja u svijetu, no kako je sve više popularnija takozvana „mediteranska prehrana“, gdje je maslinovo ulje iznimno bitna namirnica, proizvodnja i konzumacija maslinovog ulja se širi i u ne tako tradicionalne države kao što su Sjedinjene Američke Države, Kanada, Australija, Južna Amerika i Japan (Calabriso i sur., 2014).

### **1.1.3. Komina masline**

Komina masline je, osim vegetabilne vode, ostatak nakon procesa proizvodnje maslinovog ulja. Sastoji se od dijelova masline (samljevene i iscijeđene koštice, kožice i pulpe masline) i vode. Komina je crna gusta smjesa intenzivnog mirisa i umjereno kiselog pH. Osim vode, u većoj mjeri se sastoji od lignina, hemiceluloze, celuloze, ostataka ulja, dok u manjoj količini sadrži proteine, ugljikohidrate topljive u vodi i hidrofilne fenole. Vlažnost samog nusprodukta ovisi o načinu proizvodnje ulja, točnije o količini dodane vode tijekom procesa. Problem zbrinjavanja komine je, osim što nastaju velike količine tijekom proizvodnje ulja (od 1000 kg maslina dvofaznim kontinuiranim procesom ekstrakcije nastaje oko 800 kg komine), da se ne može jednostavno rasuti po polju zbog svoje fitotoksičnosti. Isto tako, sadrži i značajnu količinu ulja te polifenole. Prije odlaganja komine, potrebno ju je adekvatno procesuirati, što stvara dodatni ekološki problem i ekonomski teret proizvođaču. Danas se manja količina komine koristi kao gnojivo, biomasa ili kao hrana za životinje, no velika većina ostaje neiskorištena. Dok u ulje ulazi samo 2% svih fenola ploda masline, ostatak se zadržava u komini. Zbog značajne količine zaostalih fenola u komini masline, pojavljuje se ideja njenog iskorištavanja u obliku dodataka prehrani, preparata za unaprjeđenje zdravlja ili kao izvor antioksidansa pri proizvodnji hrane. Fenoli masline pokazuju blagotvorne učinke na zdravlje kao što su antioksidativni, protuupalni, kardioprotektivni, neuroprotektivni, antikancerogeni i hipoglikemijski učinak. Kako je komina vrlo jeftin, širokodostupan i neiskorišteni nusprodukt, sve je više zanimljiva kao izvor fenola (Aliakbarian i sur., 2011; De Bruno i sur., 2018; Nogueira, 2015; Roselló-Soto i sur., 2015; Vitali Čepo i sur., 2018).

## **1.2. *In vitro* metode za određivanje bioraspoloživosti nutriceutika**

### **1.2.1. *In vitro* modeli simulacije probave**

Ljudska probava je vrlo komplicirani proces razgradnje i apsorpcije nutrijenata koje tijelu služe za rast, normalnu funkciju stanica te su izvor energije. Procese u gastrointestinalnom traktu možemo podijeliti u dvije kategorije, iako se oni odvijaju istodobno. To su mehanička razgradnja, kojom se komadi hrane degradiraju na manje komadiće te na enzimatsku razgradnju, kojom se složeniji spojevi, odnosno makromolekule, razgrađuju na manje molekule koje se lakše mogu apsorbirati u sistemsku cirkulaciju. Na postotak apsorpcije komponenata hrane, nutriceutika ili lijekova utječu upravo ti procesi u probavi. Kako bismo odredili bioraspoloživost spojeva od interesa, najtočniji model bi bio *in vivo* ispitivanje ljudske probave, no kako je to tehnički zahtjevno i skupo te uključuje etička ograničenja, koriste se *in vitro* metode. Takve metode trebaju strogo oponašati fiziološke procese te biti fleksibilne i točne, a rezultati reproducibilni (Guerra i sur., 2012). *In vitro* simulacije probave mogu se na temelju svoje kompleksnosti podijeliti na statične i dinamične modele.

#### **1.2.1.1. Statični model simulacije probave**

Stanični modeli simulacije probave su najčešće korištene metode u ispitivanju biodostupnosti spojeva. Simulacija probave je u tim modelima podijeljena na dvije faze, gastričnu i intestinalnu, a odvajaju se u istom odjeljku. Gastrična faza se odvija tako da pomiješamo homogeniziranu hranu, enzim želuca pepsin, namjestimo pH na 1 – 2 i temperaturu na 37°C. Pri tim uvjetima, ovisno o uzorku i metodi, reakcija se provodi 1 do 3 sata. Nakon toga slijedi intestinalna faza u istom odjeljku. Kako bi nalikovala ljudskoj probavi, u smjesu je potrebno dodati enzime gušterače sa ili bez žučnih soli te namjestiti pH na 6 do 7. Ovisno o ispitivanim spojevima, metoda se prilagođava te postoji puno statičnih modela za točno određenu primjenu. Nekoliko ih je razvijeno za ispitivanje probavljivosti proteina i škroba te biodostupnosti karotenoida i polutanata. Sam postupak je jeftin, praktičan te je moguće brzo i lako obraditi više uzoraka istovremeno. No unatoč svim prednostima, njima se ne može reproducirati dinamični fiziološki odgovor tijela na bolus hrane, kao što je konstantno mijenjanje pH u traktu, lučenje enzima kao odgovor na bolus hrane ili gastrično pražnjenje, što se može dinamičnim modelom simulacije probave. Isto tako, koristi se mehanička miješalica (konstantno miješanje) koja ne oponaša peristaltiku gastrointestinalnog trakta. Zbog velikog broja različitih metoda za *in vitro* simulaciju probave, često se javljaju

nedosljednosti u rezultatima pa se zbog toga pojavila potreba za definiranjem i standardiziranjem statičnog modela *in vitro* digestije pogodne za hranu. Nekolicina znanstvenika unutar međunarodne mreže „The COST action INFOGEST“, koja se bavi proučavanjem razgradnje hrane u probavnom sustavu, predložila je standardiziranu statičnu *in vitro* metodu kojom bi rezultati dobiveni tom metodom bili međusobno usporedivi. (Alminger i sur., 2014; Guerra i sur., 2012; Minekus i sur., 2014)

#### **1.2.1.2. Dinamični modeli simulacije probave**

Dinamični modeli simulacije su bili razvijeni iz razloga što statični modeli ne mogu adekvatno simulirati dinamiku probavnog sustava kao što je gastrično pražnjenje, peristaltika, konstantna promjena pH od usta, želuca pa sve do crijeva te prilagođeno lučenje enzima. Iako ti modeli najbliže reproduciraju uvjete u gastrointestinalnom traktu, oni su vrlo skupi, što zbog opreme, što zbog skupih materijala, enzima i probavnih tekućina te je potrebno uložiti više rada i vremena. Više vrsta modela je razvijeno za različite potrebe eksperimenata te su osnovni modeli navedeni u ovom odjeljku.

U svrhu proučavanja i simuliranja uvjeta u želucu, razvijeni su različiti dinamični gastrični modeli (engl. *The Dynamic Gastric Model*, DGM). Takvi modeli, na temelju *in vivo* podataka, točnije reproduciraju progresivno snižavanje pH u želucu dodatkom HCl, lučenje pepsina, gastrično pražnjenje i regijsku specifičnost želuca. Aparatura se sastoji od dva povezana dijela. Prvi dio predstavlja tijelo želuca gdje se ispitivana smjesa ili hrana miješa s gastričnim izlučevinama. Drugi dio predstavlja antrum koji simulira fizičku snagu želuca i miješanje bolusa. U konačnici aparatura završava ventilom kroz koji prolaze manji komadi bolusa dok se veći vraćaju natrag u prvi dio aparature na dodatnu razgradnju. Zbog svoje kompleksnosti, takav model se koristi kako bi se potvrdili rezultati statičnih modela i detaljnije proučila gastrična probava, no izvorno se dizajnirala za ispitivanje utjecaja prve faze digestije na biodostupnost i stanje nutrijenata po dolasku u tanko crijevo.

Kako DGM ispravno ne reproducira peristaltiku želuca, osmišljen je drugi model, ljudski gastrični simulator (engl. *The Human Gastric Simulator*, HGS), koji se sastoji od fleksibilnih komora sačinjenih od lateksa. Takvim načinom se točnije reproduciraju peristaltične kretnje želuca koje su ključne za ispitivanje biodostupnosti različitih spojeva, pa tako i značajnih spojeva iz biljaka koji se često nalaze u vlaknastom materijalu.

U svim navedenim modelima, ispituje se utjecaj želuca na bolus hrane što nam daje samo djelomični uvid u probavu. Kako bismo u potpunosti istražili biodostupnost i razgradnju spojeva od interesa, potrebno je uključiti sve dijelove probavnog sustava zajedno s stvarnim trajanjem tog procesa. U tu svrhu, razvijeni su dinamični modeli s dva ili više odjeljaka. Većina modela s dva odjeljka simulira dva glavna dijela probave, želudac i tanko crijevo, računalno kontrolirajući uvjete kao što su temperatura, pH promjene, gastrično pražnjenje, lučenje pepsina, enzima gušterače i žučnih soli. Jedan od najtočnijih *in vitro* modela *in vivo* probave je TIM-1 (engl. *TNO Gastro-Intestinal Model 1*) koji sadrži 4 različita odjeljka, koji predstavljaju želudac, dvanaesnik, jejunum i ileum. U svim odjeljcima se regulira temperatura, promjena pH, pražnjenje želuca, tranzitno vrijeme, peristaltika, lučenje probavnih sokova i pasivna apsorpcija malih molekula pomoću dijalize. Kako probava u debelom crijevo često nije zanemariva i značajna, u ispitivanju biodostupnosti potrebno je uključiti i taj korak u modele. Iz tog se razloga razvio TIM-2 model, koji uz gastrični i duodenalni dio sadrži i odjeljak koji oponaša debelo crijevo i u njemu se odvija fermentacija koja je često vrlo značajna za polifenole. (Alminger i sur., 2014; Guerra i sur., 2012)

### **1.2.2. Ispitivanje permeabilnosti**

Oralni put primjene lijekova je glavni put primjene, najviše odgovara pacijentima te je najmanje invazivan. Iz tog je razloga pri istraživanju lijekova potrebno odrediti apsorpciju lijeka u sistemski krvotok, odnosno permeabilnost lijeka kroz epitel (Berben i sur., 2018). Zbog velike važnosti te informacije za lijek kandidat, formulirano je više načina ispitivanja permeabilnosti u *in vitro* uvjetima, od kojih su osnovne skupine navedene u ovom poglavlju. Većina lijekova se primarno apsorbira iz probavnog sustava pasivnom difuzijom, potaknuta koncentracijskim gradijentom. (Sun i sur., 2017)

#### **1.2.2.1. Celulozne membrane**

Celulozne odnosno dijalizacijske membrane su jednostavne umjetne membrane bez dodanih lipida. Otvori pora su im dovoljno veliki da prolaze molekule veličine do 12 – 14 kDa te su na taj način nepropusne za micelarne ili koloidne strukture. Koriste se kao *in vitro* zamjena za epitel crijeva te ispitivanje permeabilnosti, odnosno predviđanje bioraspoloživosti širokog raspona spojeva. Metode ispitivanja intestinalne permeabilnosti koja se koristi za slabo vodotopive lijekove te čija veličina pora isključuje molekule veće od 2 kDa zove se AMI-sustav (engl. *Artificial Membrane Insert-system*). To je regenerirana celulozna membrana

napeta između dva plastična prstena bez fosfolipida. Kako bi se omogućilo istraživanje utjecaja sluzi na permeabilnost, predstavljeni su i oblici AMI-sustava koji sadrži dodatnu membranu te u međuprostoru tih membrana se nalazi sluz gustoće i koncentracije bliske *in vivo* uvjetima. Ta dodatna membrana ima dovoljnu veličinu pora da ne ometa prolazak molekula već samo da sluz zadržava na mjestu. Bitan nam je utjecaj sluzi zato što ona može djelovati i kao skladište za mukoadhezivne nanočestice, a može i drastično utjecati na apsorpciju lipofilnih spojeva. Pozitivne strane takvih celuloznih membrana su visoki kapacitet i brzo dobivanje rezultata pasivne intestinalne permeabilnosti te niska cijena i kratko vrijeme pripreme. (Berben i sur., 2018)

#### **1.2.2.2. Biomimetičke membrane (PAMPA, PVPA, Permeapad™)**

Uz dijalizacijske membrane, i biomimetičke membrane spadaju u permeacijske sustave bez stanica, no one za razliku od dijalizacijskih sadrže fosfolipide. Trenutno dostupne biomimetičke membrane su PAMPA, PVPA i Permeapad™ membrane. (Berben i sur., 2018)

PAMPA (engl. *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*) membrane se sastoje od filtera impregniranog lipidnom smjesom koja odgovara sastavu lipida kod sisavaca te organskim otapalom. Primarno služi za ispitivanje pasivne permeabilnosti i to izričito transcelularnog transporta. Obično su to mikrotitarske ploče s 96 jažica čiji su donorski i akceptorski dijelovi ispunjeni puferiranom vodenom otopinom. Inicijalna PAMPA membrana je kao lipidnu frakciju sadržavala 10% dodecilnu otopinu lecitina iz jajeta, što je smjesa lipida s fosfatidilkolinom, fosfatidiletanolaminom, fosfatidilinozitolom i kolesterolom. Danas su dostupne različite varijacije lipidnog sastava. Pozitivne strane PAMPA membrana su relativna niska cijena metode, mogućnost provedbe puno ispitivanja u kratkom vremenu, dostupnost membrana različitog lipidnog sastava te dobro predviđanje permeabilnosti. Neke od loših strana su da predviđa samo određenu vrstu apsorpcije, da može apsorbirati i zadržati lipofilne spojeve te da apsorpcija ovisi o sastavu lipida i pH otopina donora i akceptora. Kako membrana ne sadrži fizičku barijeru koja bi zadržavala lipidni sloj, pri ispitivanjima je moguće njegovo raspadanje i emulzifikacija u medij. Kako permeabilnost ionizabilnih spojeva kod PAMPA membrana uvelike ovisi o pH i pKa spoja koji se ispituje te kako pH probavnog sustava varira između pH 6 do 8, za ispitivanje permeabilnosti najčešće se koristi taj raspon pH. Neki istraživači koriste raspon pH 4 do 7,4 kako bi se i baze i kiseline primjereno ispitale dok drugi koristi raspon pH 4 do 9 te zajedno s pKa spojeva utvrđuju optimalni pH za ispitivanje permeabilnosti pojedinog spoja. Kod PAMPA membrana se može

promijeniti puno faktora, kao na primjer različiti sastav membrane, vrijeme trajanja eksperimenta, pH itd. Iz tog je razloga teško uspoređivati rezultate dobivene u različitim laboratorijima te je potrebna standardizacija i validacija metode kako bi rezultati bili međusobno usporedivi. (Berben i sur., 2018; Ehrhardt i Kim, 2007; Sun i sur., 2017)

PVPA (engl. *Phospholipid Vesicle-based Permeation Assay*) membrana je *in vitro* metoda koja sadrži liposome kao barijeru s filterom kao bazom, gdje liposomi oponašaju fosfolipidni dvosloj intestinalnih stanica. PVPA membrana služi za ispitivanje pasivne permeabilnosti lijekova, pri čemu se lipidni sastav može mijenjati, no izvorna PVPA membrana se sastoji od fosfolipida jajeta te u većoj mjeri sadrži fosfatidilkolin koji se nalazi i u intestinalnom epitelu. Jedna od varijacija PVPA membrane s promijenjenim lipidnim sastavom bolje oponaša ljudski epitel, ne samo sastavom lipida, već i negativnim nabojem koji mu daje kolesterol. Ona sadrži 26,5% fosfatidilkolina, 26,5% fosfatidilinozitola, 7% fosfatidilserina i 30% kolesterola. Mucin i sluz su sastavni dio barijere permeabilnosti spojeva te svojom hidrofilnošću smanjuju permeabilnost hidrofobnih spojeva, dok svojom strukturom vrše diskriminaciju spojeva određene veličine. Iz tog se razloga razvila varijacija PVPA membrane sa sluzi. Očekivano, permeabilnost uz sloj sluzi na liposomima se smanjila. PVPA membrana je u ispitivanjima pokazala dobro predviđanje permeabilnosti lijekova jednako kao i Caco-2 model i modificirane PAMPA membrane (PAMPA-DS model), dok se pokazala boljom od računalnih programa koji predviđaju apsorpciju. (Berben i sur., 2018).

Permeapad™ je relativno nova metoda ispitivanja permeabilnosti predstavljena 2015. godine. Sastoji se od dvije umjetne membrane između kojih se nalazi sloj fosfolipida, odnosno fosfatidilkolina iz soje. Stavljanjem membrane u vodeno okruženje, lipidni sloj prelazi u dvoslojne sfere razdvojene vodom tako oponašajući stanice, a vezikule su dovoljno blizu da oponašaju morfologiju tkiva. Membrane, koje omeđuju lipidni dio, onemogućavaju eroziju vezikularnog sloja. Ispitivanjem permeabilnosti, Permeapad™ je pokazao dobru linearnu korelaciju permeabilnosti s podacima dobivenim PAMPA membranama i Caco-2 stanicama. *In vitro* metode su općenito slabo otporne na promjene pH koje se događaju u gastrointestinalnom traktu, no Permeapad™ pokazuje dobru otpornost i zadržani integritet membrane pri ispitivanju permeabilnosti kod različitih pH. Isto tako, Permeapad™ pokazuje dobru stabilnost tijekom skladištenja. (Berben i sur., 2018)

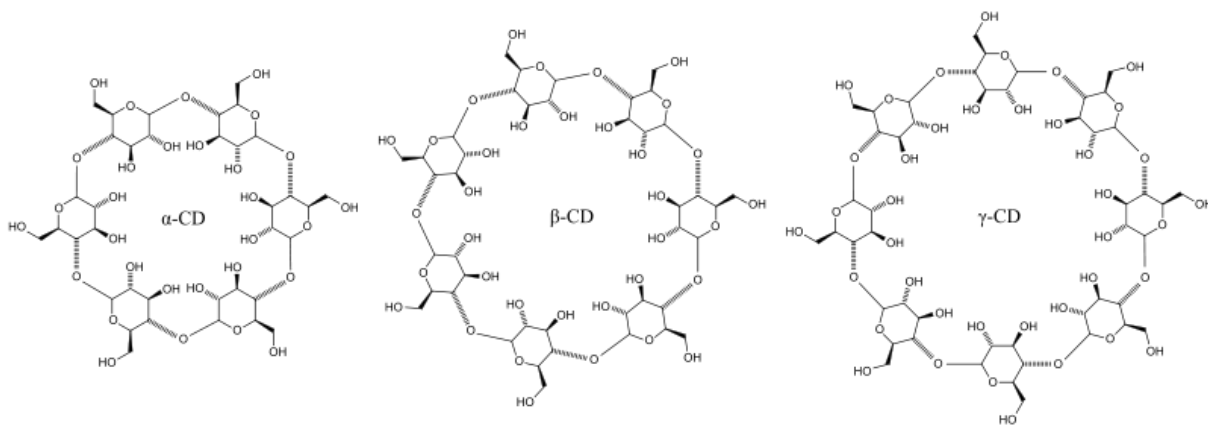
### 1.2.2.3. Kulture stanice (Caco-2 i MDCK stanični modeli)

Primarne kulture stanica enterocita ne pokazuje svojstvo polarnosti apikalne i bazolateralne strane te se ne mogu koristiti kod ispitivanja permeabilnosti, već se za ovo koriste stanice karcinoma koje konstantno rastu i pokazuju to svojstvo. Koristi se više staničnih linija, od kojih su najpoznatije Caco-2 stanična linija humanog kolorektalnog adenokarcinoma i MDCK stanična linija pasjeg karcinoma epitelnih stanica bubrega. Najčešći model ispitivanja permeabilnosti za oralne lijekove je Caco-2 stanična linija. Između donorskog i akceptorskog odjeljka nalazi se monosloj stanica karcinoma na permeabilnim filterima čija je najveća prednost ta da stanice eksprimiraju transportne proteine pa se uz pasivni može istraživati i aktivni transport. Caco-2 stanice se spontano diferenciraju u kulturi stanica u stanični monosloj polariziranih enterocita s apikalnom i bazolateralnom stranom, a imaju razvijene međustanične čvrste spojeve, efluksne transportere te transportne sustave za aminokiseline, žučne soli, kobalamin i dipeptide. Nedostaci su ti što nedostaju CYP3A4 enzim, koji u velikoj mjeri sudjeluje u metabolizmu spojeva, i sloj sluzi i mucina te su neke komponente hrane inkompatibilne sa stanicama. Isto tako, postoji velika varijabilnost između rezultata provedenih istom metodom. Metoda je također dugotrajna te je njena priprema skupa. Osim primjene u ispitivanju permeabilnosti, Caco-2 stanične linije se koriste i kod istraživanja mehanizma apsorpcije lijekova, identifikacije supstrata, inhibitora ili induktora transportera i enzima. (Artursson i Karlsson, 1991; Artursson i sur., 2002; Berben i sur., 2018; Di Cagno i sur., 2015; Ehrhardt i Kim, 2007; Sun i sur., 2008)

### 1.3. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini su skupina cikličkih oligosaharida koji sadrže glukopiranozne jedinice međusobno povezane  $\alpha$ -(1,4) vezama, a nastaju bakteriološkom razgradnjom škroba. Tri su prirodne vrste ciklodekstrina,  $\alpha$ -ciklodekstrin,  $\beta$ -ciklodekstrin i  $\gamma$ -ciklodekstrin, koji sadrže redom 6, 7 i 8 *D*-glukopiranoznih jedinica. Ciklodekstrini su strukture krnjeg stošca sa središnjom šupljinom gdje je vanjski dio pretežito hidrofilan dok su u unutarnju šupljinu okrenute hidrofobne skupine (Slika 4.).





Slika 4. Struktura  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ciklodekstrina

U takvu hidrofobnu šupljinu mogu se umetnuti male lipofilne molekule ili dijelovi velikih lipofilnih molekula te će im se na taj način promijeniti intrinzična svojstva. Samo kompleksiranje ciklodekstrina molekulama lijeka je spontani događaj. Kad ciklodekstrin dodamo u vodenu otopinu, molekule vode uđu u lipofilnu šupljinu ciklodekstrina, no kada se pojavi manje polarna molekula, ona će zamijeniti molekule vode u šupljini i nastat će kompleks molekule i ciklodekstrina, uobičajeno u omjeru 1:1. Na taj način dolazi do zamjene molekula vode s lipofilijom molekulom ili dijelom molekule što je termodinamički povoljnije. Pri tom procesu ne dolazi do kidanja niti stvaranja kovalentnih veza, a kompleks u otopini je u dinamičkoj ravnoteži. Iskorištavanje prirodnih ciklodekstrina često je ograničeno njihovim nedostacima:  $\alpha$ -ciklodekstrin ima vrlo malenu lipofilnu šupljinu,  $\beta$ -ciklodekstrin je slabo topljiv u vodi, a  $\gamma$ -ciklodekstrin je nisko produktivan. Zbog tog se prirodni ciklodekstrini modificiraju reakcijama s hidroksilnim skupinama u derivate kao što su metil- $\beta$ -ciklodekstrin, metil- $\gamma$ -ciklodekstrin ili hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin. Kompleksi ciklodekstrina ili derivata ciklodekstrina i lijekova se često koriste u farmaceutskoj tehnologiji kako bi povećali topljivost lijekova, poboljšali organoleptička svojstva, smanjili nuspojave lijeka, promijenili agregatno stanje spoja te povećali bioraspoloživost i stabilnost lijeka. Oralnom primjenom ciklodekstrini su u potpunosti netoksični te se u farmaceutskoj tehnologiji smatraju pomoćnim tvarima. (Muankaew i Loftsson, 2018; Sharma i Baldi, 2016)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Komina masline zaostaje u velikim količinama nakon proizvodnje maslinovog ulja te je bogat alternativni izvor biološki aktivnih polifenola koje inače nalazimo u maslinovom ulju. Ekstrakti komine masline bi se stoga mogli koristiti kao nutraceutici u funkcionalnoj hrani i dodacima prehrani. Pri tom je važno razviti takve ekstrakcijske postupke koji će osigurati visoke prinose biološki aktivnih spojeva, a tijekom formulacije suhih ekstrakata važno je postići zadovoljavajuća organoleptička svojstva i stabilnost. Kako bi se osigurala željena kvaliteta dobivenih ekstrakata nužno je korištenje različitih farmaceutskih ekscipijensa. Cilj ovog rada je istražiti utjecaj različitih vrsta ciklodekstrina ( $\beta$ -ciklodekstrin, hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin,  $\gamma$ -ciklodekstrin, nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin) na prinose biološki aktivnih spojeva u suhim ekstraktima komine masline kao i na njihovu gastrointestinalnu stabilnost i biodostupnost kao temeljne odrednice njihove biološke aktivnosti.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Uzorci za analizu

Uzorci za analizu su dobiveni iz komine masline koja je uzeta iz dvofaznog mlina nakon proizvodnje maslinovog ulja. Svježa komina je unutar nekoliko sati od proizvodnje smrznuta na  $-20^{\circ}\text{C}$  kako bi se onemogućila razgradnja vrijednih sastavnica. Nakon toga komina je podvrgnuta sušenju na  $60^{\circ}\text{C}$  tijekom 24 sata kako bi se uklonila voda. Komina se zatim usitnila u tarioniku i mlincu, a zatim prosijavala kroz sito s otvorima promjera 0,8 mm. Na taj način se uzorak homogenizirao i uklonile su se koštice. Kako uljna komponenta komine ne bi ometala daljnju analizu, uzorak se odmastio pomoću Soxhlet uređaja tijekom 2 sata. Komina se zatim ekstrahirala u vodenoj kupelji 2 sata na  $70^{\circ}\text{C}$  s 60% etanolom kako bi se ekstrahirale korisne supstancije iz uzorka. Nakon filtriranja i alikvotiranja u tikvice za uparavanje, uzorak se uparavao na  $50^{\circ}\text{C}$  na 60 mbar kako bi se uklonio etanol koji onemogućava liofilizaciju i smrzavanje uzorka na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Krajnji korak je liofilizacija uzorka kroz 48 sati kako bi se uklonili ostaci vode pri niskoj temperaturi. Prilikom ekstrakcije u 4 od 5 različitih uzoraka dodani različiti ciklodekstrini u koncentracijama opisanih u tablicu 1.

Tablica 1. Vrste i koncentracije ciklodekstrina u različitim uzorcima korištenih u analizi

Oznaka uzorka	Vrsta ciklodekstrina	Masena koncentracija komine (g/L)	Masena koncentracija ciklodekstrina (g/L)
NE	-	20	0
$\beta\text{CD}+\text{NE}$	$\beta$ -ciklodekstrin	20	8
$\text{HP}\beta+\text{NE}$	hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin	20	8
$\gamma\text{CD}+\text{NE}$	$\gamma$ -ciklodekstrin	20	8
RAMEB+NE	nasumično metilirani $\beta$ -ciklodekstrin	20	8

### 3.1.2. Kemikalije i pribor

- Multikanalna pipeta Rainin Crux, Mettler, Toledo, SAD
- Pepsin (iz svinjske gastrične mukoze),  $\geq 500 \text{ U mg}^{-1}$  Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Pankreatin (iz svinjskog pankreasa), 4×USP, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Žučne soli, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Natrijev klorid, Almas trade, Zagreb, Hrvatska
- Kloridna kiselina, Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Natrijev hidrogenkarbonat, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka
- Membrana za dijalizu MWCO 6-8 kDa (engl. *molecular weight cut-off*, MWCO), Spectrum Laboratories, Inc., USA
- Filteri (promjer pora: 0,45  $\mu\text{m}$ ), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Natrijev karbonat, Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu fenol reagens, Fluka, Buchs, Švicarska
- Diamino-2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ); HPLC stupnja čistoće  $\geq 99,93\%$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ); HPLC stupnja čistoće  $\geq 99,93\%$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Octena kiselina p.a.,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  (konc. 99,5%), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrij-acetat  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Petroleter, Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska
- Mast za pomašćivanje, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Ulje za vakuum pumpu, Leybond, Köln, Njemačka
- Ependorf kivete
- Falcon kivete
- Viale 1,5mL, LLG Labwere, Meckenheim, Njemačka
- Mikropipete

### 3.1.3. Instrumenti

- Čitač mikrotitarskih ploča Viktor™ X3 (Perkin Elmer, Waltham, Sjedinjene Američke Države)
- Termostatirana tresilica Environmental Shaker – Incubator ES-20/60 (Biosan, Riga, Latvija)
- Vortex Mixer Uzusio VTX-3000L (LMS, Brigachtal, Njemačka)
- pH metar 702 SM Titrino (Metrohm AG, Herisau, Švicarska)
- Analitička vaga, AB265-S (Mettler Toledo, Columbus, Ohio)
- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s fluorescentnim detektorom (HPLC-FLD, engl. *High-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detector*) (IET LTD, Mundelein, SAD)
- Termostat (INKO, Zagreb, Hrvatska)
- Soxhlet aparatura (INKO, Zagreb, Hrvatska)
- Metalna sita (Beuth, Berlin, Njemačka)
- Liofilizator (Christ, Osterode am Harz, Njemačka)
- Vakuum pumpa (Leybold GmbH, Köln, Njemačka)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. *In vitro* simulacija gastrointestinalne digestije

Priprema gastrične otopine:

Za pripremu 100 mL gastrične otopine potrebno je otopiti malo ultračiste vode (miliQ-H<sub>2</sub>O) u čaši, izvagati 0,1 g pepsina (1 mg mL<sup>-1</sup>) i 0,2 g NaCl (2 mg mL<sup>-1</sup>). Sve prenijeti u odmjernu tikvicu od 100 mL, dodati 30 mL 0,1 M HCl te dopuniti miliQ-H<sub>2</sub>O do oznake. pH bi trebao biti oko 1,6.

Priprema otopine pankreatin-žučne soli:

Za pripremu 20 mL otopine potrebno je u malo miliQ-H<sub>2</sub>O otopiti 16 mg pankreatina (0,8 mg mL<sup>-1</sup>) i 40 mg žučnih soli (2 mg mL<sup>-1</sup>). Sve prenijeti u odmjernu tikvicu od 20 mL te nadopuniti miliQ-H<sub>2</sub>O do oznake.

Priprema 10 mmol otopine pufera (engl. *phosphate buffered saline*, PBS)

Za pripremu 1000 mL otopine pufera potrebno je u malo miliQ-H<sub>2</sub>O otopiti 0,26 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,17 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O i 8,71 g NaCl. Sve je potrebno prenijeti u odmjernu tikvicu od 1000 mL te nadopuniti s otprilike 800 mL miliQ-H<sub>2</sub>O. pH je potrebno podesiti na 7,4 te nadopuniti volumen tikvice s miliQ-H<sub>2</sub>O do oznake.

Svaki uzorak se analizira u duplikatu. Kao slijepa proba koristi se otopina bez uzorka koja prolazi kroz sve faze gastrointestinalne digestije kao i otopina s uzorkom.

Za simulaciju gastrične (želučane) faze u Falcon kivetu od 50 mL odvaže se oko 250 mg uzoraka ekstrakta komine. Na uzorak je zatim potrebno otpipetirati 11,3 mL gastrične otopine. Falcon kivete je potrebno postaviti vodoravno. Kako bi se spriječilo curenje uzorka, bitno je za inkubaciju koristiti još nekorištene Falcon kivete i oblijepiti rub parafilmom. Gastrična inkubacija se provodi 2 sata na temperaturi od 37°C uz protresanje reakcijske smjese (100 oscilacija po minuti). Nakon inkubacije, Falcon kivete treba staviti na led. Za analizu je potrebno otpipetirati 2 mL uzorka u čaše od 5 mL te profiltrirati kroz filtere s veličinom pora 0,45 μm u staklene vijale. S obzirom da se radi o vodenim ekstraktima koristimo PES filtre. Neposredno prije uzimanja alikvota, uzorak je potrebno vorteksirati kako bi u trenutku uzimanja alikvota bio što više homogen.

Za simulaciju intestinalne faze u preostalu otopinu nakon gastrične inkubacije (9,3 mL) otpipetira se 2,167 mL otopine pankreatin-žučne soli. Membrane za dijalizu (duljina membrane u kojoj je tekućina je oko 8 cm, ostaviti sa svake strane po 1 cm da se može zavezati) se napune s 1 mL NaHCO<sub>3</sub> (1 M) i stave u čiste, unaprijed pripremljene i označene Falcon kivete od 15 mL. Napunjene membrane potrebno je uroniti u otopinu uzorka dobivenu nakon gastrične inkubacije. Reakcijske smjese se stave na inkubaciju na isti način kao i za gastričnu digestiju. Po završetku inkubacije Falcon kivete se stave na led.

Membrane za dijalizu se izvade iz Falcon kiveta pincetom i kratko urone u miliQ-H<sub>2</sub>O. Potom se vrlo kratko stave na staničevinu da se osuše, membrana se prereže čistim škarama te se sadržaj prelije u čaše od 5 mL (nakon što se jedan kraj membrane odreže škarama). Zatim je potrebno iz čaše špricom uzeti uzorak i profiltrirati kroz filtere pora 0,45 μm u vijale. Dobiveni ekstrakti se koristi za analize Folin Ciocalteu (FC), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) i Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC). Otopini izvan membrana se izmjeri pH, a zatim se doda 250 μL HCl (5 M). Zakiseljeni uzorci se

profiltriraju kroz filtre od 0,45 µm u čiste Falcon kivete od 15 mL. Dobiveni ekstrakti se koriste za analize FC, TEAC i HPLC. Frakcije dobivene nakon gastrične i intestinalne digestije te dijalizabilne frakcije (iz membrane za dijalizu) potrebno je primjereno skladištiti u zamrzivaču. Dobivenim frakcijama određujemo antioksidativni potencijal TEAC i FC metodama.

### **3.2.2. Određivanje ukupnog reduksijskog potencijala Folin Ciocalteu metodom**

Za određivanje ukupnog reduksijskog potencijala u otopinama se koristi Folin-Ciocalteu (FC) metoda (Singleton i Rossi, 1965), modificirana od strane Gao i suradnika (Gao i sur., 2002). Ova metoda se temelji na prijenosu elektrona s reducirajućih spojeva na kompleks molibdena i volframa nepoznate strukture koji iz žute boje prelazi u plavu. Takvo plavo obojenje, koje je proporcionalno udjelu reduksijskih komponenti uzorka, možemo detektirati spektrofotometrijski na 750 – 765 nm. Hidroksilne skupine fenolnih spojeva imaju reduktivna svojstva te im se ovom metodom može izmjeriti koncentracija, no sam FC reagens nije specifičan samo za fenolne spojeve, nego može biti reduciran i brojnim ne-fenolnim spojevima. Tako rezultat Folin-Ciocalteu metode ne govori o ukupnom sadržaju fenola već o ukupnom reduksijskom potencijalu uzorka. Kao referentni spoj uobičajeno se koristi galna kiselina te se i rezultati izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (GAE, engl. *Gallic Acid Equivalence*). (Prior i sur., 2005; Singleton i sur., 1999)

Ova metoda je prikladna za određivanje antioksidativnog kapaciteta u uzorcima hrane. Relativno je jednostavna i reproducibilna, reagens je komercijalno dostupan, a cijeli postupak standardiziran. Apsorbancija plavog kompleksa, zahvaljujući dužim valnim duljinama, je manje ometana interferencijama matriksa. S druge strane, originalna metoda je dugotrajna i nepodobna da rutinsku analizu, a pošto se odvija u vodenim uvjetima, nije prigodna za lipofilne spojeve ili uzorke. (Magalhaes i sur., 2008)

## Kemikalije i reagensi

Za pripremu 100 mL 6% otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  potrebno je izvagati 6 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i otopiti u miliQ- $\text{H}_2\text{O}$ . Otopinu je potrebno zagrijati na plameniku, ohladiti te kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 100 mL te istu nadopuniti do oznake. Komercijalni FC reagens se razrijedi destiliranom vodom u omjeru 1:1 na dan analize.

Nakon razrjeđenja uzorka 60 puta, stavi se po 100  $\mu\text{L}$  u jažice mikrotitarske pločice. Nakon toga se dodaje 20  $\mu\text{L}$  razrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa te uz stanku od 5 minuta se dodaje 100  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (6%). Apsorbancija se mjeri spektrofotometrijski pri 750 nm nakon inkubacije na 50°C kroz 30 minuta. Dobivena jednadžba pravca iznosi:  $y = 0,2442x + 0,025$  ( $\mu\text{g GAE/mL}$ ).

### 3.2.3. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

TEAC (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*) je metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta smjese na temelju sposobnosti antioksidansa u uzorku da neutralizira 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat ( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ).  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  je dugoživi radikal kation koji ima apsorpcijske maksimume na 414, 645, 734 i 815 nm. Neutralizacijom pomoću antioksidansa otopina gubi boju te je smanjenje apsorpcije proporcionalno antioksidacijskom kapacitetu uzorka. Najčešće korišteno vrijeme reakcije je u rasponu od 1 do 30 minuta dok je valna duljina detekcije 734 nm zbog najmanjih interferencija drugih komponenti koje apsorbiraju na toj valnoj duljini. Kao referentni spoj najčešće se koristi Trolox<sup>®</sup>, prema čemu je metoda i dobila ime, no mogu se upotrebljavati razni antioksidansi, kao što su askorbinska kiselina, butilhidroksotoluol, rutin ili galna kiselina. U našem slučaju kao referentni spoj korišten je Trolox<sup>®</sup> pa su rezultati izražavani kao ekvivalenti Troloxa (TE). Metoda nije tehnički zahtjevna, što dozvoljava njeno korištenje u rutinskim mjerenjima (Re i sur., 1999).  $\text{ABTS}$  radikal je topljiv u vodi i u organskim otapalima pa se može koristiti za određivanje antioksidacijskih kapaciteta i hidrofilnih i hidrofobnih spojeva. Kritika ove metode ide na račun  $\text{ABTS}$  radikala koji nije biološka molekula niti ga nalazimo u biološkim sustavima. (Magalhaes i sur., 2008; Miller i sur., 1993)



Za pripremu stock otopina ABTS radikala jedna tableta od 10 mg ABTS se otopi u 2,8 mL destilirane vode te se pomiješa s jednakim volumenom (2,8 mL) otopine  $K_2S_2O_8$  (2,45 mM).

Za pripremu 10 mL 2,45 mM otopine  $K_2S_2O_8$  potrebno je izvagati 6,62 mg  $K_2S_2O_8$ , prenijeti u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuniti je do oznake.

Otopina ABTS radikala koja se koristi u ispitivanju se dobiva razrjeđenjem stock otopine ABTS. Za pripremu te otopine uzme se 800  $\mu$ L stock otopine ABTS radikala koja se pomiješa s 50 mL destilirane vode. Apsorbancija takve otopine se mora provjeriti te pri 405 nm treba iznositi 0,7 – 0,8.

Uzorak se adekvatno razrijedi. U jažice mikrotitarske pločice se pipetira 20  $\mu$ L razrijeđenog uzorka i 220  $\mu$ L otopine ABTS radikala te se mjeri apsorbancija pri 405 nm. Dobivena jednadžba pravca je iznosila:  $y = 1,7397x - 1,2901$  (mg TE/L)

#### 1.3.4. **Određivanje sadržaja oleuropeina, tirosola i hidroksitirosola visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (engl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*)**

Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC) je tehnika odjeljivanja analita koja uključuje injektiranje tekućeg uzorka na kolonu ispunjenu česticama nepokretne faze. Analit prolazi kolonom pod velikim tlakom nošen tekućom pokretnom fazom. Kolona je najčešće izrađena od čelika, a čestice nepokretne faze su veličine od 3 do 10  $\mu$ m. Odjeljivanje se temelji na različitim fizikalnim i/ili kemijskim interakcijama između molekula analita i molekula nepokretne faze, no najčešće su to adsorpcija, ionska izmjena i molekulsko isključivanje na temelju veličine spoja. Kad je nepokretna faza tekućina adsorbirana na čvrstu tvar ili kemijski vezana za čvrsti nosač, tada se odijeljivanje temelji na dinamici adsorpcije i desorpcije analita s nepokretne faze. S obzirom na polarnost pokretne i nepokretne faze, kromatografsku tehniku dijelimo na kromatografiju normalnih faza, gdje se koristi polarna nepokretna faza i nepolarna pokretna faza te, najčešće korištenu, kromatografiju obrnutih faza, gdje se koristi nepolarna nepokretna faza i polarna pokretna faza. Kao pokretna faza, najčešće se koristi smjesa otapala kako bi se osiguralo optimalno odijeljivanje, a sastav pokretne faze se tijekom postupka može mijenjati te tako dijelimo kromatografiju na izokratnu (sastav pokretne faze ostaje nepromijenjen tijekom cijelog postupka) i gradijentnu (sastav pokretne faze se mijenja tijekom postupka kromatografije čime se postiže brže i bolje

odijeljivanje). Nepokretne faze u kromatografiji obrnutih faza su najčešće oktadecilsilan i oktilsilan. Osnovni dijelovi HPLC uređaja su spremnici pokretne faze, pumpa za stvaranje visokog tlaka, injektor za ubrizgavanje analita, sustav za obradu otapala, kolona i detektor. Detektori omogućavaju uočavanje odijeljenih komponenta uzorka te tako daju neophodne podatke provedene analize. Najčešće korišteni detektori s HPLC uređajem su UV/Vis detektor, fluorescencijski detektor, detektor temeljen na kondukciji, detektor temeljen na refraktivnom indeksu i maseni spektrometar.

Priprema pokretne faze u HPLC metodi:

Pokretna faza u ovoj HPLC metodi je acetatni pufer pH 5 koji se priprema miješanjem octene kiseline i otopine natrijevog acetata. Octena kiselina koncentracije 0,1 M se priprema na način da se u odmjernu tikvicu od 1 L stavi 5,75 mL koncentrirane octene kiseline i tikvica se nadopuni miliQ-H<sub>2</sub>O do oznake. Za pripremu otopine natrijevog acetata od 1,0 M potrebno je izvagati 8,2 g natrijevog acetata, otopiti ga u miliQ-H<sub>2</sub>O, prenijeti u odmjernu tikvicu od 1 L te nadopuniti tikvicu do oznake miliQ-H<sub>2</sub>O. Potrebno je pomiješati 1 L otopine natrijevog acetata (1 M) i 0,5 L octene kiseline (1 M) te izmjeriti pH pufera pH-metrom. Potrebno je namjestiti pH da bude 5 pomoću octene kiseline (1 M) ili otopine natrijevog acetata (1 M). Pufer se profiltrira filterom od celuloze-acetata (promjer pora: 0,45 µm) te je takav spreman za daljnje korištenje u HPLC metodi.

Priprema standardnih otopina hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina:

Za pripremu standardne otopine hidroksitirosola od 2 mg/mL potrebno je otopiti 10 mg standarda hidroksitirosola u 5 mL DMSO.

Za pripremu standardne otopine tirosola od 2 mg/mL potrebno je otopiti 10 mg standarda tirosola u 5 mL DMSO.

Za pripremu standardne otopine oleuropeina od 2 mg/mL potrebno je otopiti 10 mg standarda oleuropeina u 5 mL DMSO.

U kromatografskom postupku primijenjena je obrnuto fazna C-18 kolona. Gradijentni program pokretne faze je prikazan u Tablici 2. Pokretna faza A je acetatni pufer pH 5, a pokretna faza B je acetonitril HPLC čistoće. Brzina protoka podešena je na 1 mL/min. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20  $\mu$ L, a temperatura kolone bila je održavana na sobnoj temperaturi. Nakon stabiliziranja instrumenta i postizanja radnih uvjeta, injektirani su uzorci.

Tablica 2. Gradijentni elucijski program obrnuto fazne HPLC identifikacije i određivanja oleuropeina, hidroksitirosola i tirosola.

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)	Brzina protoka pokretnefaze (mL/min)
0	90	10	1
4	80	20	1
8	40	60	1
11	30	70	1
15	90	10	1
20	90	10	1

Kromatogrami za hidroksitirosol i tirosol snimljeni su pri  $\lambda=280$  nm, a za oleuropein pri  $\lambda=240$  nm (na valnim duljinama prethodno određenih maksimuma apsorbancije ispitivanih sastavnica) uz pomoć detektora s nizom fotodioda (DAD). Identifikacija eluiranih pikova provedena je u usporedbi s retencijskim vremenom i UV spektrom standarda. Sadržaj oleuropeina, hidroksitirosola i tirosola u analiziranim uzorcima određen je iz izmjerene površine pika uz pomoć kalibracijskih krivulja s pripadajućim jednadžbama.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Utjecaj probave na ukupni redukcijski potencijal ekstrakata komine masline

Za svaki analizirani uzorak određen je udio polifenola prema prethodno opisanoj Folin-Ciocalteu metodi. Koristeći jednadžbu pravca dobivenu iz baždarnog dijagrama galne kiseline, za svaku izmjerenu apsorbanciju izračunata je koncentracija ekvivalenta galne kiseline kao mjera ukupnih reducirajućih tvari (polifenola) u uzorku. Pomoću izračunatih količina polifenola u svakoj frakciji izražena je količina polifenola u miligramima galne kiseline na 100 grama čiste komine u ekstraktu (mg GAE/100 g) (Tablica 3).

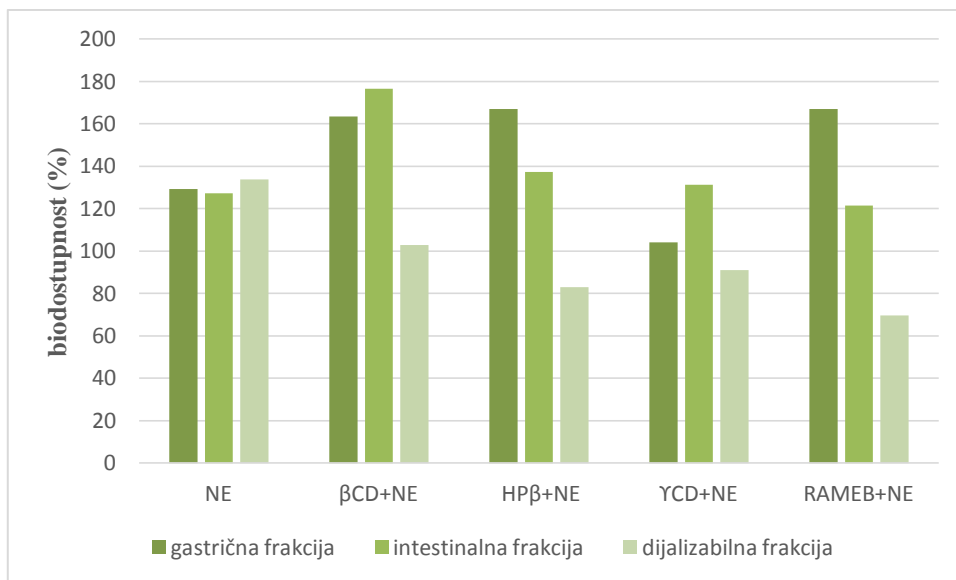
Iz rezultata se može primijetiti kako se količina polifenola, odnosno redukcijski potencijal uzoraka ekstrakta komine masline povećava tijekom probave, neovisno o prisustvu i vrsti ciklodekstrina u uzorku. Nakon gastrične digestije, najveći porast redukcijskog potencijala ostvaruje uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina, a iznosi 189,9 mg GAE/100 g. Najmanji porast zabilježen kod uzoraka s ciklodekstrinima je bio uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina, a iznosi 157,3 mg GAE/100 g. Tijekom intestinalne faze probave, najveći porast izmjeren je u topljivoj frakciji uzorka s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina (190,1 mg GAE/100 g), a najmanji uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina (60,6 mg GAE/100 g uzorka). Za dijalizabilnu frakciju su te vrijednosti 291,8 mg GAE/100 g uzorka kod nativnog uzorka i 197,5 mg GAE/100 g kod uzorka s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina. Chen i suradnici, (2014) su utvrdili da se količina različitih vrsta polifenola iz biljaka povećava tijekom gastrične faze *in vitro* digestije. S obzirom da su polifenoli često osjetljivi na alkalne uvjete, njihova se količina nakon intestinalne digestije smanjuje zbog povišenja pH u toj fazi, pri čemu dolazi do smanjenja redukcijskog kapaciteta nakon *in vitro* digestije. Međutim, moguće je da se polifenolne komponente u alkalnim uvjetima razgrađuju u spojeve drugačijih kemijskih i bioloških svojstava, uz zadržavanje antioksidacijske aktivnosti (Chen i sur., 2014). Kako je veliki dio polifenolnih spojeva u nativnom ekstraktu u obliku glikozida, tijekom probave dolazi i do hidrolize glikozidnih veza, pri čemu se polifenoli glikozidi razgrađuju na aglikone i šećere. Neke od šećernih komponenti su potentni reducensi te tako doprinose porastu redukcijskog potencijala polifenola komine masline (Georgè i sur., 2005).

Tablica 3. Ukupna količina polifenola u različitim koracima digestije. Količine su korigirane obzirom na udio CD u ekstraktu komine.

Uzorak	Ukupna količina polifenola u uzorku prije digestije (mg GAE/100g ekstrakta)	Količina polifenola u gastričnom digestu (mg GAE/100g ekstrakta)	Količina topljivih polifenola (u intestinalnom digestu) (mg GAE/100g ekstrakta)	Količina dijalizabilnih polifenola (mg GAE/100g ekstrakta)
NE	281,0	363,2	357,5	291,8
$\beta$ CD+NE	248,0	405,2	438,1	255,0
HP $\beta$ +NE	243,6	407,0	334,4	202,4
$\gamma$ CD+NE	244,2	408,9	320,7	222,2
RAMEB+NE	283,8	473,7	344,4	197,5

NE – nativni uzorak;  $\beta$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina; HP $\beta$ +NE – uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina;  $\gamma$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina; RAMEB+NE – uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina.

Sukladno tome povećava se i biodostupnost polifenola tijekom digestije (Slika 5). Najveću biodostupnost gastrične frakcije ima uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina, koja iznosi 167,1%, a kod topljive frakcije nakon intestinalne faze je to uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina (176,7%). To je u skladu s prijašnjim istraživanjima o utjecaju ciklodekstrina na uzorku komine masline ili lijeka (Vitali Čepo i sur., 2014; Laza-Knoerr i sur., 2010) koja pokazuju značajno povećanje polifenolnog sadržaja, antioksidativne aktivnosti i biodostupnosti polifenola, odnosno biodostupnosti lijeka kad se uzorak prethodno kompleksira ciklodekstrinima. Najveću biodostupnost dijalizabilnog dijela uzorka nakon intestinalne faze pokazuje nativni uzorak te je vidljiv negativni učinak ciklodekstrina na dijalizabilnost polifenola. Samo je dio intestinalne frakcije dostupan za apsorpciju. Od 30,7% do 42,7% frakcije nije dijalizabilno te odlazi u debelo crijevo gdje može utjecati na stjenku crijeva i crijevnu mikrofloru. Prijašnja istraživanja su pokazala kako unos maslinovog ulja smanjuje incidenciju karcinoma kolona te da fenoli iz maslinovog ulja posjeduju antibakterijsko djelovanje (Tripoli i sur., 2005, Armstrong i Doll, 1975).



NE – nativni uzorak;  $\beta$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina; HP $\beta$ +NE – uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina; YCD+NE – uzorak s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina; RAMEB+NE – uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina.

Slika 5. Biodostupnost različitih uzoraka ekstrakta komine masline.

## 4.2. Određivanje ABTS antioksidacijske učinkovitosti tijekom i nakon procesa probave.

Promjene antiradikalne učinkovitosti ekstrakata komine masline tijekom *in vitro* simulacije probave praćene su korištenjem TEAC metode.

Za svaki analizirani uzorak izmjerena je apsorbancija u dva paralelna određivanja pa je, prema prethodno navedenoj formuli, izračunat postotak gašenja apsorbancije ( $\Delta A$ ). Korištenjem jednadžbe pravca dobivene iz baždarnog dijagrama ovisnosti postotka gašenja apsorbancije ABTS radikala o koncentraciji uzorka izračunate su vrijednosti antioksidacijskog potencijala i izražene kao ekvivalenti Trolox®-a za svaku pojedinu frakciju. Prethodno opisanim računom i korekcijom rezultata obzirom na udio ciklodekstrina u pojedinim ekstraktima dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4.

Kako se količina antioksidansa tijekom probave ne smanjuje značajno ni u jednom uzorku, može se zaključiti da su antioksidansi komine masline stabilni u gastrointestinalnom sustavu. Nakon završetka cjelokupnog procesa probave, količina antioksidansa se povećala u svim uzorcima osim u uzorku s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina, gdje je razlika antioksidativnog potencijala prije i nakon digestije 0,8 mg Trolox®-a na 100 g ekstrakta (mg TE/100 g). Najveći pozitivni porast antiradikalne aktivnosti utvrđen je kod nativnog uzorka te uzorka s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina, a oba iznose 1,5 mg TE/100 g. Kod uzoraka s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina i  $\gamma$ -ciklodekstrina utjecaj probave na antioksidacijski potencijal je manji (redom 0,1 i 0,2 mg TE/100g). Zbog utjecaja probavnih enzima i promjena pH kroz gastrointestinalni sustav na matriks ekstrakta dolazi do porasta antiradikalne aktivnosti. Kako su antioksidansi komine masline s antiradikalim učinkom, osim u obliku aglikona, prisutni i u makromolekulskim kompleksima, razgradnjom tih kompleksa tijekom probave dolazi do porasta antiradikalne aktivnosti. Jednake rezultate postižu i znanstvenici koji su istraživali koncentraciju polifenola grožđa tijekom *in vitro* digestije (Tagliazucchi i sur., 2010).

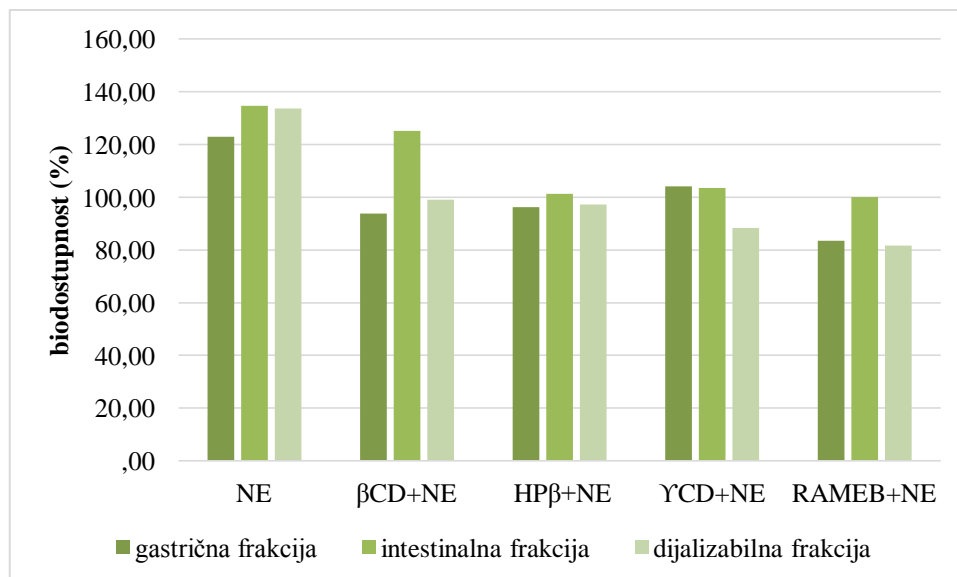
Tablica 4. Promjene antiradikalne aktivnosti ekstrakata komine masline tijekom procesa probave

Uzorak	Ukupni antioksidacijski potencijal(mg TE/100g ekstrakta)*	Antioksidacijski potencijal gastrične frakcije (mgTE/100g ekstrakta)*	Antioksidacijski potencijal intestinalne frakcije (mgTE/100g ekstrakta)*	Antioksidacijski potencijal dijalizabilne frakcije (mg TE/100g ekstrakta)*
NE	4,5	5,6	6,1	4,8
$\beta$ CD+NE	6,1	5,7	7,6	6,0
HP $\beta$ +NE	6,2	6,0	6,3	6,1
$\gamma$ CD+NE	6,3	5,7	6,5	5,5
RAMEB+NE	7,4	6,2	6,6	6,1

NE – nativni uzorak;  $\beta$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina; HP $\beta$ +NE – uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina;  $\gamma$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina; RAMEB+NE – uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina. \*rezultati su izraženi na masu ekstrakta korigiranu na udio ciklodekstrina u ekstraktu

Biodostupnost (%) spojeva s antiradikalnim učinkom tijekom različitih faza probave grafički je prikazana na Slici 6. Biodostupnost antioksidansa u gastričnoj frakciji najveća je kod nativnog uzorka, gdje iznosi 122,9%, dok je najmanja kod uzorka s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina, gdje iznosi 83,4%. Iz navedenog se može zaključiti da prisutnost ciklodekstrina štiti navedene spojeve od razgradnje uzrokovane djelovanjem kiseline i pepsina. Obzirom da razgradnjom kompleksnih spojeva polifenolnog tipa dolazi do porasta antioksidacijske aktivnosti (jer razgradnjom nastaju opet aktivni spojevi), porast antioksidacijske učinkovitosti najveći je kod nativnog uzorka. Biodostupnost antioksidansa i u intestinalnoj frakciji najveća je kod nativnog uzorka gdje iznosi 134,7%, dok je najmanja kod uzorka s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina gdje iznosi 100,1%. Prisutnost ciklodekstrina u uzorku smanjuje biodostupnost antioksidansa tijekom digestije u odnosu na nativni uzorak, a posebice se taj utjecaj uočava kod nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina. Gotovo je cijela intestinalna frakcija nativnog uzorka raspoloživa za apsorpciju (razlika od 0,7%), dok se kod uzoraka s dodatkom ciklodekstrina biodostupnost smanjuje od 14,8% do 20,9%. Jedina iznimka je uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina gdje ta razlika iznosi 4,0%. Frakcija koja ne prolazi dijalizacijsku membranu odlazi u debelo crijevo gdje je u mogućnosti utjecati na stjenku crijeva i crijevnu mikrofloru. Prijašnja istraživanja su pokazala kako unos maslinovog ulja smanjuje incidenciju karcinoma kolona te da fenoli iz maslinovog ulja posjeduju antibakterijsko djelovanje. (Tripoli i sur., 2005, Armstrong i Doll, 1975)





NE – nativni uzorak;  $\beta$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina; HP $\beta$ +NE – uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina;  $\gamma$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina; RAMEB+NE – uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina.

Slika 6. Biodostupnost Trolox® ekvivalenata različitih uzoraka ekstrakta komine masline.

### 4.3. Određivanje količine hidroksitirosola, tirosole i oleuropeina HPLC-om u različitim fazama gastrointestinalne probave

Udio oleuropeina, hidroksitirosola i tirosole u analiziranim uzorcima određen je HPLC metodom iz izmjerenih površina pikova, uz pomoć kalibracijskih krivulja s pripadajućim jednadžbama. Udjeli hidroksitirosola, tirosole i oleuropeina u različitim probavim frakcijama izraženi su u  $\mu\text{g}/100$  mg uzorka i prikazani u tablicama 5, 6 i 7.

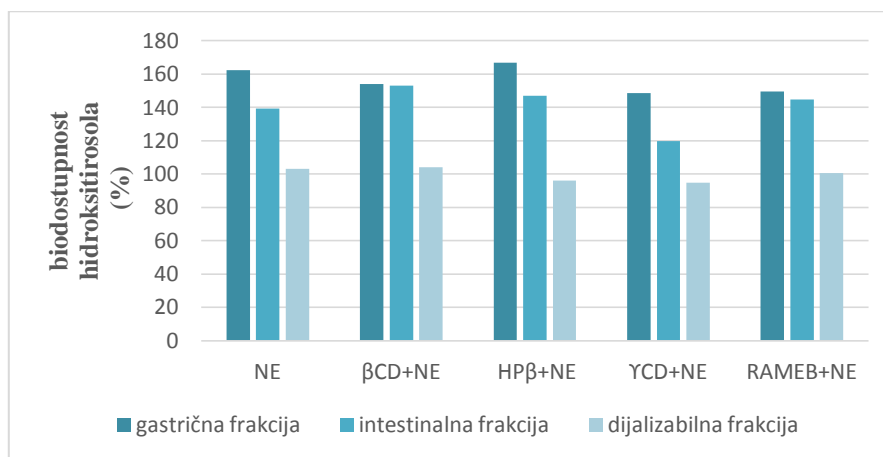
Udio hidroksitirosola u nativnom uzorku prije digestije iznosio je  $78,4 \mu\text{g}/100$  mg, dok je udio u uzorcima s dodanim ciklodekstrinima viši te se kreće od  $106,2$  do  $108,7 \mu\text{g}/100$  mg što ukazuje na činjenicu da ciklodektrini povećavaju prinos hidroksitirosola tijekom ekstrakcije. Tijekom simulacije probave, udio hidroksitirosola u svim uzorcima raste. Najveći je porast koncentracije hidroksitirosola uočena u uzorku s hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinom, gdje nakon gastične digestije koncentracija poraste sa  $107,1 \mu\text{g}/100$  mg na  $178,9 \mu\text{g}/100$  mg. I u ostalim uzorcima s dodanim ciklodekstrinima, udio hidroksitirosola je veći od udjela u nativnom uzorku. Nakon intestinalne digestije, udio mu se smanjuje, ali samo za  $19,3\%$  kod uzorka s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina do  $0,6\%$  kod uzorka s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina. Slične podatke dobivaju i znanstvenici pri određivanju prinosa polifenola, ujedno i hidroksitirosola, gdje se primjenom ciklodekstrina u formulaciji ekstrakta povisuje prinos polifenola masline (Albahari i sur., 2018).

Tablica 5. Udio hidroksitirosola u različitim fazama digestije.

Uzorak	Ukupna količina hidroksitirosola u uzorku ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*	Količina hidroksitirosola u gastičnom digestu ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*	Količina topljivog hidroksitirosola u uzorku ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*	Količina dijalizabilnog hidroksitirosola u uzorku ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*
NE	78,4	127,3	109,3	81,0
$\beta\text{CD}+\text{NE}$	108,5	167,2	166,2	113,0
$\text{HP}\beta+\text{NE}$	107,1	178,9	157,4	102,9
$\gamma\text{CD}+\text{NE}$	108,7	161,4	130,3	103,2
$\text{RAMEB}+\text{NE}$	106,2	158,9	153,7	106,8

NE – nativni uzorak;  $\beta\text{CD}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina;  $\text{HP}\beta+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina;  $\gamma\text{CD}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina;  $\text{RAMEB}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina. \*rezultati su izraženi na masu ekstrakta korigiranu na udio ciklodekstrina u ekstraktu

Biodostupnost hidroksitirosola (Slika 7.) je iznad 100% (od 148,6% kod  $\gamma$ -ciklodekstrina nakon gastrične digestije do 167,0% kod uzorka s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina), najvjerojatnije zato što se oslobađa iz kompleksnog matriksa hidrolizom u kiselom uz nastajanje aglikona hidroksitirosola. Jednake rezultate pokazuje i prijašnje istraživanje digestije polifenola maslinovog ulja gdje je dokazano da se u gastričnoj fazi efektivno povećava relativna količina hidroksitirosola (Corona i sur., 2006). Ujedno prijašnja istraživanja pokazuju da se oleuropein razgrađuje na više metabolita od kojih je jedan hidroksitirosol što također povećava udio hidroksitirosola u uzorcima (Corona i sur., 2006). Unatoč tome, nije cijela frakcija hidroksitirosola biodostupna za apsorpciju. Čak 50,9% hidroksitirosola kod uzorka s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina odlazi u debelo crijevo, dok je najveća biodostupnost kod uzorka s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina, gdje 25,0% nije biodostupno za apsorpciju u tankom crijevu. Iz tih rezultata vidljivo je da je hidroksitirosol najzastupljeniji od tri zasebno poučavana spoja. Stabilan je tijekom probave, no uočava se utjecaj različitih ciklodekstrina na dijalizabilnost.



NE – nativni uzorak;  $\beta$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina; HP $\beta$ +NE – uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina;  $\gamma$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina; RAMEB+NE – uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina.

Slika 7. Biodostupnost hidroksitirosola u različitim frakcijama uzorka komine masline.

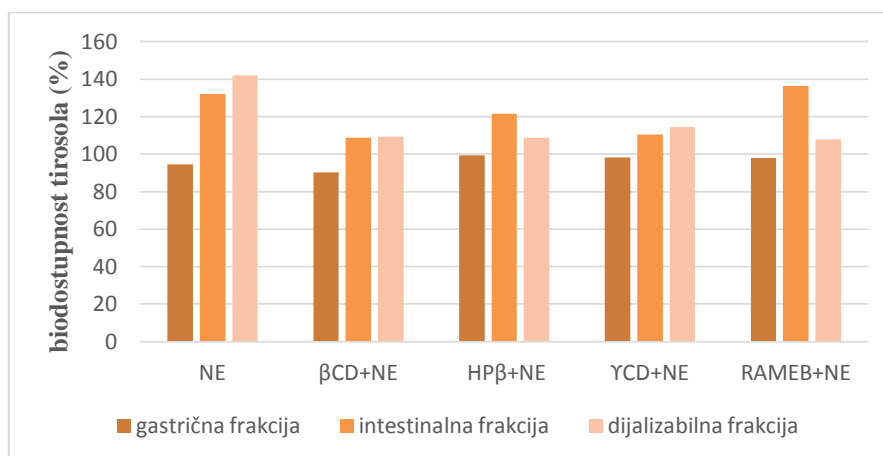
Udio tirosola u nativnom uzorku bez dodatka ciklodekstrina prije početka digestije iznosi 20,7  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ , dok u uzorcima s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina i nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina redom iznosi 19,3  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  i 18,6  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ . Veće koncentracije tirosola od nativnog uzorka pokazuju uzorci s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina i  $\beta$ -ciklodekstrina gdje one redom iznose 23,1 i 23,0  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ . Pozitivni utjecaj ciklodekstrina na koncentraciju tirosola nije toliko značajan kao u slučaju hidroksitirosola i oleuropeina. Količina tirosola nakon gastrične faze se u odnosu na uzorke prije digestije smanjuje, što je u suprotnosti s prijašnjim istraživanjem digestije polifenola maslinovog ulja gdje je utvrđeno da se u gastričnoj fazi efektivno povećava relativna količina tirosola (Corona i sur., 2006). Mogući razlog ovakve razlike u podacima je korištenje drugačijeg proizvoda ploda masline te drugačijih uvjeta digestije. Najznačajnije smanjenje koncentracije tirosola je kod uzorka s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina te nativnog uzorka gdje smanjenja redom iznose 9,8% te 5,4%. Kod ostalih uzoraka, smanjenja su zanemariva, od 2,0% do 0,6%. Nakon intestinalne faze količina tirosola u svim uzorcima raste u odnosu na gastričnu fazu. Najveći porast koncentracije tirosola je vidljiv kod uzorka s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina gdje je porast s 18,3  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  na 25,4  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  i kod nativnog uzorka (s 19,6  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  na 27,4  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ ). Najmanji porast je uočljiv kod uzorka s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina, gdje koncentracija tirosola u gastričnoj fazi iznosi 18,9  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ , dok nakon intestinalne faze ona iznosi 21,3  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ . Dijalizabilna frakcija je najveća kod nativnog uzorka (porast od 7,4% u odnosu na intestinalnu topljivu frakciju). Takav pozitivan, no znatno manji, trend uočava se i kod uzoraka s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina i  $\beta$ -ciklodekstrina, gdje porast redom iznosi 3,7% te 0,5%. Negativni utjecaj na dijalizabilnost pokazuju uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina te uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina, gdje pad dijalizabilnosti u odnosu na intestinalnu frakciju iznose redom 21,0% i 10,6%. U radu Albahari i suradnika (2018) dobiveni su nešto drugačiji rezultate pri određivanju prinosa polifenola, ujedno i tirosola, gdje se primjenom ciklodekstrina u formulaciji ekstrakta povisuje prinos tirosola i ostalih polifenola masline.

Tablica 6. Udio tirosola u uzorku u različitim fazama digestije.

Uzorak	Ukupna količina tirosola u uzorku ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*	Udio tirosola u gastričnom digestu ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*	Udio tirosola u intestinalnom digestu ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*	Količina dijalizabilnog tirosola ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*
NE	20,7	19,6	27,4	29,4
$\beta\text{CD}+\text{NE}$	23,0	20,8	25,1	25,2
$\text{HP}\beta+\text{NE}$	23,1	22,9	28,1	25,1
$\text{YCD}+\text{NE}$	19,3	18,9	21,3	22,1
$\text{RAMEB}+\text{NE}$	18,6	18,3	25,4	20,1

NE – nativni uzorak;  $\beta\text{CD}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina;  $\text{HP}\beta+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina;  $\text{YCD}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina;  $\text{RAMEB}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina. \* rezultati su izraženi na masu ekstrakta korigiranu na udio ciklodekstrina u ekstraktu

Slika 8. grafički pokazuje biodostupnost tirosola tijekom probave. Razlika udjela tirosola u dijalizabilnoj frakciji u odnosu na intestinalnu frakciju kod uzorka s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina te uzorka s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina su redom 28,7% te 12,9%. Može se uočiti da te dvije vrste ciklodekstrina negativno utječu na dijalizabilnost tirosola. Nakon ukupne digestije, najveću biodostupnost pokazuje uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina, koja iznosi 136,5% te je malo veća od biodostupnosti u nativnom uzorku, koja iznosi 132,2%. Ostali uzorci pokazuju manju biodostupnost, a vrijednosti se kreću od 108,9% do 121,7%.



NE – nativni uzorak;  $\beta\text{CD}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina;  $\text{HP}\beta+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina;  $\text{YCD}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina;  $\text{RAMEB}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina.

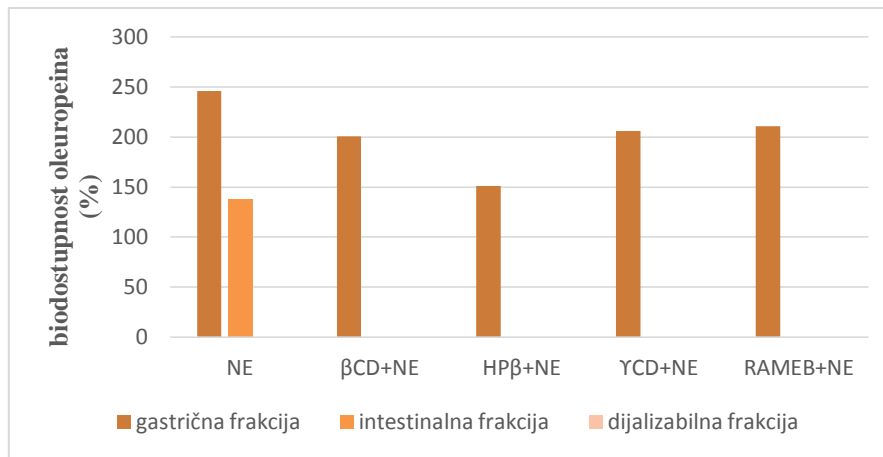
Slika 8. Biodostupnost tirosola u različitim frakcijama uzorka komine masline

Od svih karakterističnih fenola komine masline, udio oleuropeina u ekstraktima komine masline bio je najmanji (u nativnom uzorku prije digestije ona iznosi 2,0  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ ). U ostalim uzorcima, gdje su dodani ciklodekstrini, udio se kreće od 3,1 do 3,6  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  (najmanja koncentracija je kod uzorka s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina, dok je najveća kod uzorka s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina). Slične podatke dobivaju i drugi znanstvenici pri određivanju prinosa oleuropeina, gdje se primjenom ciklodekstrina u formulaciji ekstrakta povećava prinos polifenola masline (Albahari i sur., 2018). Oleuropein je stabilan u želucu te mu se nakon gastrične faze koncentracija u uzorku povećava, što su pokazala i prijašnja istraživanja (Corona i sur., 2006), gdje se oleuropein nije razgradio u kiselim uvjetima želuca, ali je u tankom crijevu. Jedan od produkata razgradnje oleuropeina je i hidroksitirozol te time možemo djelomično objasniti porast količine hidroksitirozola tijekom probave u želucu. Nakon intestinalne faze, u nativnom se uzorku koncentracija oleuropeina smanjila s 4,9  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  na 2,7  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ , dok se u uzorcima s dodanim ciklodekstrinima oleuropein više ne detektira. Isto tako, u dijalizabilnoj frakciji ne nalazimo oleuropein, što potvrđuje prethodno istraživanje (Corona i sur., 2006), gdje je kao *in vitro* metoda permeabilnosti korištena Caco-2 stanična linija.

Tablica 7. Udio oleuropeina u uzorku u različitim fazama probave.

Uzorak	Ukupna količina oleuropeina u uzorku ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*	Udio oleuropeina u gastričnom digestu ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )	Udio topljivog oleuropeina u intestinalnom digestu ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*	Udio dijalizabilnog oleuropeina ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )*
NE	2,0	4,9	2,7	0,00
$\beta\text{CD}+\text{NE}$	3,3	6,6	0,00	0,00
$\text{HP}\beta+\text{NE}$	3,1	4,8	0,00	0,00
$\gamma\text{CD}+\text{NE}$	3,6	7,4	0,00	0,00
RAMEB+NE	3,1	6,4	0,00	0,00

NE – nativni uzorak;  $\beta\text{CD}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina;  $\text{HP}\beta+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina;  $\gamma\text{CD}+\text{NE}$  – uzorak s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina; RAMEB+NE – uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina \*rezultati su izraženi na masu ekstrakta korigiranu na udio ciklodekstrina u ekstraktu



NE – nativni uzorak;  $\beta$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\beta$ -ciklodekstrina; HP $\beta$ +NE – uzorak s dodatkom hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina;  $\gamma$ CD+NE – uzorak s dodatkom  $\gamma$ -ciklodekstrina; RAMEB+NE – uzorak s dodatkom nasumično metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina.

Slika 9. Biodostupnost oleuropeina u različitim frakcijama uzorka komine masline.

## 5. ZAKLJUČCI

- Količina polifenola u ekstraktima komine masline se tijekom *in vitro* simulacije probave povećava neovisno o prisustvu i vrsti ciklodekstrina u ekstraktima.
- Zbog utjecaja probavnih enzima i promjena pH kroz gastrointestinalni sustav na matriks tijekom probave ekstrakata komine masline dolazi do porasta antiradikalne aktivnosti.
- Dijalizabilnost polifenola i antioksidansa ekstrakta komine masline smanjuje se u prisustvu ciklodekstrina. U nativnom uzorku gotovo je cijela intestinalna frakcija nativnog uzorka bez dodatka ciklodekstrina raspoloživa za apsorpciju dok se kod uzoraka s dodatkom ciklodekstrina biodostupnost i udio dijalizabilne frakcije smanjuje.
- Samo je dio intestinalne frakcije uzoraka s ciklodekstrinima dostupan za apsorpciju u tankom crijevu dok od 30,7% do 42,7% frakcije nije te odlazi u debelo crijevo gdje može utjecati na stjenku crijeva te crijevnu mikrofloru.
- Od karakterističnih polifenola komine masline hidroksitirosol je udjelom najzastupljeniji, zatim slijedi tirosol, dok je najmanje oleuropeina.
- Prisustvo ciklodekstrina tijekom formulacije ekstrakta povećava prinos hidroksitirosola i oleuropeina, dok je pozitivan učinak na prinos tirosola manje izražen.
- Karakteristični polifenoli komine masline su stabilni u gastrointestinalnom sustavu osim oleuropeina koji se nakon gastrične faze u potpunosti razgrađuje.
- Svi ciklodekstrini korišteni u ovom istraživanju smanjuju dijalizabilnost hidroksitirosola, dok na dijalizabilnost tirosola negativno utječu samo hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin i nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin. Oleuropein nije pronađen u dijalizabilnoj frakciji zbog nestabilnosti u alkalnim uvjetima tankog crijeva.



## 6. LITERATURA

$\gamma$ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications, 2014.  
[https://www.researchgate.net/publication/268983067\\_g-](https://www.researchgate.net/publication/268983067_g-Cyclodextrin_a_review_on_enzymatic_production_and_applications)

Cyclodextrin\_a\_review\_on\_enzymatic\_production\_and\_applications, pristupljeno  
28.5.2019.

Albahari P, Jug M, Radić K, Jurmanović S, Brničić M, Brničić SR, Vitali Čepo D. Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction. *LWT*, 2018, 92, 22-31.

Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P. Valorization of olive oil solid waste using high pressure-high temperature reactor. *Food Chemistry*, 2011, 128, 704-710.

Alminger M, Aura AM, Bohn T, Dufour C, El SN, Gomes A, Santos CN. *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *CRFSFS*, 2014, 13, 413-436.

Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J Agric Food Chem*, 1986, 34, 823-826.

Armstrong BK, Doll R. Environmental factors and the incidence and mortality from cancer in different countries with special reference to dietary practice. *Int J Cancer*, 1975, 15, 617-631.

Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175, 880-885.

Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 46, 27-43.

Azber N, Bayram A, Muezzinoglu A, Sengul F, Filibeli A, Ozer A. A Review of Waste Management Options in Olive Oil Production. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2004, 34, 209-247.

- Berben P, Bauer-Brandl A, Flaten GE, Faller B, Brouwers J, Brandl M, Augustijns P. Drug permeability profiling using cell-free permeation tools: Overview and applications. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 119, 219-233.
- Bianchi G. Lipids and phenols in table olives. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2003, 105, 229-242.
- Boskou D, Blekas G, Tsimidou M. Phenolic compounds in olive oil and olives. *Curr Top Nutraceutical Res*, 2005, 3, 125-136.
- Calabriso N, Scoditti E, Pellegrino M, Annunziata Carluccio M. Olive Oil. The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach. London, *Elsevier Inc.*, 2014, 135-142.
- Chen GL, Chen SG, Zhao YY, Luo CX, Li J, Gao YQ. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. *Ind Crops Prod*, 2014, 57, 150-157.
- Corona G, Tzounist X, Dessi MA, Deiana M, Debnam ES, Visioli F, Spencer JPE. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: Implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic Res*, 2006, 40, 647-658.
- Covas MI, Ruiz-Gutierrez V, Torre R, Kafatos A, Lamuela-Raventos RM, Osada J, Visioli F. Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health. *Nutr Rev*, 2006, 64, 20-30.
- De Bruno A, Romeo R, Fedele FL, Sicari A, Piscopo A, Poiana M. Antioxidant activity shown by olive pomace extracts. *J Environ Sci Health A Tox Hazard*, 2018, 45, 526-533.
- Di Cagno M, Bibi HA, Bauer-Brandl A. New biomimetic barrier Permeapad<sup>TM</sup> for efficient investigation of passive permeability of drugs. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 73, 29-34.
- Ehrhardt C, Kim KJ. Drug Absorption Studies: *In Situ*, *In Vitro* and *In Silico* Models. New York, Springer, 2008, 35-76.
- Gao L, Wang S, Oomah BD, Mazza G. Wheat quality: Wheat quality elucidation. *AAFC*, 2002, 57-68.
- George S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 1370-1373.

Grdinić V, Kremer D. Ljekovite biljke i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2009, 35.

Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol*, 2012, 30, 591-600.

Kalua CM, Allen MS, Bedgood DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chem*, 2007, 100, 273-286.

Kaniewski D, Van Campo E, Boiy T, Terral JF, Khadari B, Besnard G. Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biol Rev*, 2012, 97, 885-899.

Kantoci, D. Maslina. *Glasnik zaštite bilja*, 2006, 29, 4-14.

Kountouri AM, Mylona A, Kaliora AC, Andrikopoulos NK. Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine*, 2007, 14, 659-667.

Kuštrak D. Farmakognozija i fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing - Tehnička knjiga, 2005, 193.

Linoleic acid, 2004. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linoleic-acid>, pristupljeno 28.5.2019.

Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima J. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta*, 2008, 613, 1-19.

Maleš Ž. Pojedine biljne vrste iz Biblije. *Farmaceutski glasnik*, 2014, 70, 9-12.

Minekus M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Brodkorb A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food Funct*, 2014, 5, 1113-1124.

Muankaew C, Loftsson T. Cyclodextrin-Based Formulations: A Non-Invasive Platform for Targeted Drug Delivery. *Basic clin pharmacol toxicol*, 2018, 122, 46-55.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin sci*, 1993, 84, 407-412.

Nogueira JH. Valorization of olive pomace through combination of biocatalysis with supercritical fluid technology. *Universidade de Nova de Lisboa*, 2015, 1-99.

Oleic acid, 2004. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oleic-acid>, pristupljeno 28.5.2019.

Palmitic acid, 2004. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/palmitic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/palmitic_acid), pristupljeno 28.5.2019.

Prior RL, Wu XL, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Agric Food Chem*, 2005, 53, 4290-4302.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.*, 1999, 26, 1231-1237.

Romani A, Mulinacci N, Pinelli P, Vincieri FF, Cimato A. Polyphenolic content in five tuscan cultivars of *Olea europaea* L. *J Agri Food Chem*, 1999, 47, 964-967.

Roselló-Soto E, Koubaa M, Moubarik A, Lopes RP, Saraiva JA, Boussetta N, Barba FJ. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends Food Sci Technol*, 2015, 45, 296-310.

Sharma N, Baldi A. Exploring versatile applications of cyclodextrins: An overview. *Drug Deliv*, 2016, 23, 739-757.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, 16, 144-158.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 1999, 299, 152-178.

Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers HJ. Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric*, 2000, 80, 1013-1023.

Stearic acid, 2004. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Stearic-acid>, pristupljeno 28.5.2019.

Sun H, Liu S, Du Y, Pang KS, Chow EC. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4, 395-411.

Sun H, Nguyen K, Kerns E, Yan Z, Yu KR, Shah P, Xu X. Highly predictive and interpretable models for PAMPA permeability. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25, 1266-1276.

Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem*, 2010, 120, 599-606.

Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev*, 2005, 18, 98-112.

Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil : metabolism and health effects. *J Nutr Biochem*, 2002, 13, 636-644.

Viola P, Viola M. Virgin olive oil as a fundamental nutritional component and skin protector. *Clin Dermatol*, 2009, 27, 159-165.

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

Yüksel Aydar A, Öncü Öner T, Fatma Üçok E. Effects of Hydroxytyrosol on Human Health. *EC Nutrition*, 2017, 11, 147-157.

## 7. SAŽETAK

Komina masline je ostatak koji u velikim količinama ostaje nakon proizvodnje maslinovog ulja. Obiluje polifenolima koji pokazuju antioksidativna svojstva. Cilj ovog rada bio je istražiti stabilnost i bioraspoloživost specifičnih biološki aktivnih spojeva komine tijekom *in vitro* simulacije gastrične i intestinalne probave. Uzorci obuhvaćeni istraživanjem uključuju čisti (nativni) ekstrakt komine te ekstrakte poboljšanih tehnoloških (organoleptičkih) svojstava pripremljenih korištenjem različitih vrsta ciklodekstrina. Osim istraživanja gastrointestinalne stabilnosti, ispitivanjem permeabilnosti dijalizijskim membranama određena je količina bioraspoložive frakcije polifenola u pojedinim uzorcima. Udio ukupne količine biodostupnih i bioraspoloživih polifenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, antioksidacijski kapacitet TEAC metodom, a udio hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina primjenom kromatografije (HPLC). Hidroksitirosol je najzastupljeniji od karakterističnih fenola u ekstraktu komine masline (78,4 – 108,7  $\mu\text{g}/100\text{mg}$ ). Korištenjem ciklodekstrina u pripremi ekstrakata povećan je antioksidacijski potencijal, udio ukupnih fenola te prinosi hidroksitirosola i oleuropeina. Količina ukupnih polifenola i antiradikalni kapacitet uzoraka se tijekom *in vitro* probave povećavaju neovisno o prisustvu i vrsti ciklodekstrina (porast od 157,3 – 189,9 mg GAE/100 g). Karakteristični fenoli komine masline su stabilni u gastrointestinalnom sustavu osim oleuropeina koji se u intestinalnoj fazi u potpunosti razgrađuje. Prisutnost ciklodekstrina u uzorku komine masline negativno utječe na dijalizabilnost biološki aktivnih spojeva (manja za 4,0% – 20,9%) . Potrebna su daljnja istraživanja na Caco-2 staničnim kulturama i *in vivo* istraživanja kako bi se dobio bolji uvid u stabilnost i biodostupnost fenola masline.

## SUMMARY

Olive pomace is a by-product that remains in large quantities after olive oil production. It is rich in polyphenols that show antioxidant properties. The aim of this research was to examine the stability and bioavailability of specific biologically active compounds of olive pomace during the *in vitro* simulation of gastric and intestinal digestion. Samples analysed in the frameworks of this study included native olive pomace extract and extracts with improved technological (organoleptic) properties prepared using various types of cyclodextrins. By examining permeability with dialysis membranes, the amount of bioavailable fraction of polyphenols in each individual sample was determined. The share of the total amount of bioaccessible and bioavailable polyphenols was determined by the Folin-Ciocalteu method, the antioxidant capacity by the TEAC method, and the share of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein by chromatography (HPLC). Hydroxytyrosol was the most abundant among the specific phenols of olive pomace (78,4 – 108,7 µg / 100mg). By using cyclodextrins for olive pomace extract preparation, the antioxidant potential, the share of total phenols and the yields of hydroxytyrosol and oleuropein increased. The amount of total polyphenols and the antiradical capacity of the samples during *in vitro* digestion increased regardless of the presence and type of cyclodextrin (157,3 – 189,9 mg GAE / 100g increase). Characteristic olive pomace phenols were stable during the gastrointestinal digestion with the exception of oleuropein, that was completely degraded during intestinal phase. The presence of cyclodextrins in the olive pomace extracts negatively affected the dializability of biologically active compounds (reduction from 4,0% to 20,9%). Further studies in Caco-2 cell model or *in vivo* studies are needed to obtain a better insight into the stability and bioavailability of olive pomace phenols.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## Utjecaj ciklodekstrina na bioraspoloživost hidroksitirosola, tirosole i oleuropeina iz ekstrakta komine masline

Martina Horvat

### SAŽETAK

Komina masline je ostatak koji u velikim količinama ostaje nakon proizvodnje maslinovog ulja. Obiluje polifenolima koji pokazuju antioksidativna svojstva. Cilj ovog rada bio je istražiti stabilnost i bioraspoloživost specifičnih biološki aktivnih spojeva komine tijekom *in vitro* simulacije gastične i intestinalne probave. Uzorci obuhvaćeni istraživanjem uključuju čisti (nativni) ekstrakt komine te ekstrakte poboljšanih tehnoloških (organoleptičkih) svojstava pripremljenih korištenjem različitih vrsta ciklodekstrina. Osim istraživanja gastrointestinalne stabilnosti, ispitivanjem permeabilnosti dijaliziranim membranama određena je količina bioraspoložive frakcije polifenola u pojedinim uzorcima. Udio ukupne količine biodostupnih i bioraspoloživih polifenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, antioksidacijski kapacitet TEAC metodom, a udio hidroksitirosola, tirosole i oleuropeina primjenom kromatografije (HPLC). Hidroksitirosol je najzastupljeniji od karakterističnih fenola u ekstraktu komine masline (78,4 – 108,7 µg/100mg). Korištenjem ciklodekstrina u pripremi ekstrakata povećan je antioksidacijski potencijal, udio ukupnih fenola te prinosi hidroksitirosola i oleuropeina. Količina ukupnih polifenola i antiradikalni kapacitet uzoraka se tijekom *in vitro* probave povećavaju neovisno o prisustvu i vrsti ciklodekstrina (porast od 157,3 – 189,9 mg GAE/100 g). Karakteristični fenoli komine masline su stabilni u gastrointestinalnom sustavu osim oleuropeina koji se u intestinalnoj fazi u potpunosti razgrađuje. Prisutnost ciklodekstrina u uzorku komine masline negativno utječe na dijalizabilnost biološki aktivnih spojeva (manja za 4,0% – 20,9%). Potrebna su daljnja istraživanja na Caco-2 staničnim kulturama i *in vivo* istraživanja kako bi se dobio bolji uvid u stabilnost i biodostupnost fenola masline.

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

Rad sadrži: 44 stranica, 9 grafičkih prikaza, 7 tablica i 54 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Komina masline, gastrointestinalna stabilnost, biodostupnost, bioraspoloživost, tirosol, hidroksitirosol, oleuropein

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

Rad prihvaćen: lipanj 2019.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of food chemistry  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

### The effect of cyclodextrins on bioavailability of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein from olive pomace extracts

Martina Horvat

#### SUMMARY

Olive pomace is a by-product that remains in large quantities after olive oil production. It is rich in polyphenols that show antioxidant properties. The aim of this research was to examine the stability and bioavailability of specific biologically active compounds of olive pomace during the *in vitro* simulation of gastric and intestinal digestion. Samples analysed in the frameworks of this study included native olive pomace extract and extracts with improved technological (organoleptic) properties prepared using various types of cyclodextrins. By examining permeability with dialysis membranes, the amount of bioavailable fraction of polyphenols in each individual sample was determined. The share of the total amount of bioaccessible and bioavailable polyphenols was determined by the Folin-Ciocalteu method, the antioxidant capacity by the TEAC method, and the share of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein by chromatography (HPLC). Hydroxytyrosol was the most abundant among the specific phenols of olive pomace (78,4 – 108,7 µg / 100mg). By using cyclodextrins for olive pomace extract preparation, the antioxidant potential, the share of total phenols and the yields of hydroxytyrosol and oleuropein increased. The amount of total polyphenols and the antiradical capacity of the samples during *in vitro* digestion increased regardless of the presence and type of cyclodextrin (157,3 – 189,9 mg GAE / 100g increase). Characteristic olive pomace phenols were stable during the gastrointestinal digestion with the exception of oleuropein, that was completely degraded during intestinal phase. The presence of cyclodextrins in the olive pomace extracts negatively affected the dializability of biologically active compounds (reduction from 4,0% to 20,9%). Further studies in Caco-2 cell model or *in vivo* studies are needed to obtain a better insight into the stability and bioavailability of olive pomace phenols.

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

Thesis includes: 44 pages, 9 figures, 7 tables and 54 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Olive pomace, gastrointestinal stability, bioavailability, bioaccessibility, tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropein

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

Ocjenjivači: **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

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

The thesis was accepted: June 2019.