

# Priprava fenolnog ekstrakta maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline

---

Jančinec, Daria

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:514813>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

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



**Daria Jančinec**

**Priprava fenolnog ekstrakta maslinovih ulja  
autohtonih hrvatskih sorti masline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Dizajniranje novih lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju i Zavodu za fizikalnu kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Monike Barbarić i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Cvijete Jakobušić Brala.

*Zahvaljujem ponajprije mentorici izv. prof. dr. sc. Moniki Barbarić na ukazanoj pomoći, susretljivosti i strpljivosti tijekom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem i doc.dr.sc. Cvijeti Jakobušić Brala na pomoći pruženoj tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela i završne faze ovog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, koja je uvijek vjerovala u mene, pomagala mi, podupirala me i ohrabivala u svim studentskim i životnim izazovima.*

*Veliko hvala mojim dragim prijateljima - Mihaeli, Nikolini, Petru Krešimiru, Andrei, Karli, Heleni, Mariji, Klari i Barbari koji su mi studentske dane učinili posebnima i na čiju sam pomoć, podršku, obzirnost i susretljivost uvijek mogla računati.*

## SADRŽAJ

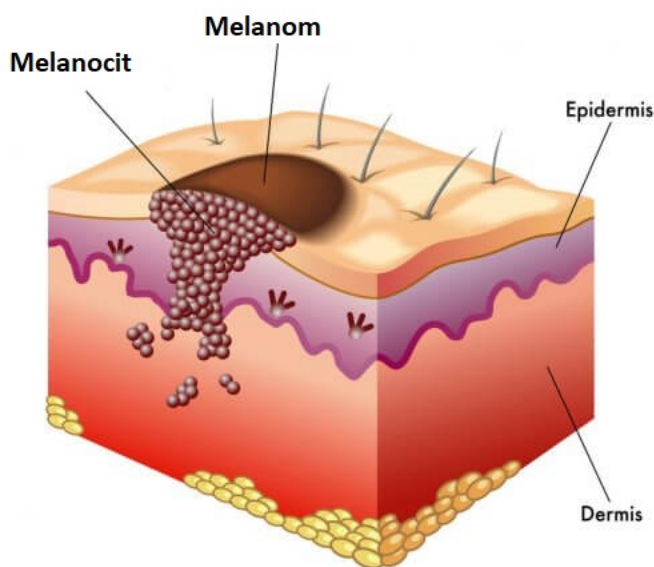
1. <b>UVOD</b> .....	1
1.1. Melanom .....	1
1.2. Maslinovo ulje .....	3
1.3. Oleokantal.....	7
1.4. Oleacein .....	9
1.5. Učinak oleokantala i oleaceina na melanom .....	11
2. <b>OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	13
3. <b>MATERIJALI I METODE</b> .....	14
3.1. <b>MATERIJALI</b> .....	14
3.1.1. Uzorci .....	14
3.1.2. Kemikalije .....	14
3.1.3. Instrumenti .....	14
3.2. <b>METODE</b> .....	15
3.2.1. Ekstrakcija polifenola iz maslinovog ulja .....	15
4. <b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	17
4.1. Određivanje oleokantala i oleaceina u uzorcima ulja .....	17
5. <b>ZAKLJUČAK</b> .....	19
6. <b>LITERATURA</b> .....	20
7. <b>SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	24
7.1. Sažetak.....	24
7.2. Summary.....	25

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

### 1.1. Melanom

Melanom je zloćudni tumor koji nastaje malignom preobrazbom melanocita, stanica koje stvaraju pigment melanin, a prisutne su u koži, oku, epitelu sluznica i moždanih ovojnica. Iako sam uzrok nije u potpunosti poznat, mnogi čimbenici pridonose povećanju rizika od razvoja melanoma poput izlaganja ultraljubičastom (*eng.* ultraviolet; UV) zračenju, svijetle puti, opekline od sunca, prisutnosti većeg broja madeža na tijelu, pozitivne obiteljske anamneze i oslabljenog imunološkog sustava kao posljedice imunosupresivne bolesti ili terapije ([www.plivazdravlje.hr](http://www.plivazdravlje.hr)). Smatra se da razvoj melanoma započinje nekontroliranim rastom i dijeljenjem genetički transformiranih melanocita (slika 1) ([www.poliklinika-mazalin.hr](http://www.poliklinika-mazalin.hr)). U odnosu na većinu ostalih tipova tumora kože, melanom se zbog svoje sklonosti metastaziranju u druge organe smatra visoko malignim i agresivnim tumorom. Vrlo je važna primarna prevencija i pravovremena dijagnostika, jer ukoliko se otkrije u početnom stadiju postoji mogućnost potpunog izlječenja ([www.hdtgv.hr](http://www.hdtgv.hr)).



Slika 1. Presjek kože i prikaz melanoma ([www.poliklinika-mazalin.hr](http://www.poliklinika-mazalin.hr))

Osnovna terapija melanoma je kirurško odstranjenje tumora, no ovisno o stadiju proširenosti bolesti (razvoju metastaza), koriste se i ostali oblici liječenja koji uključuju radioterapiju (zračenje), kemoterapiju te u novije vrijeme imunoterapiju i ciljanu terapiju ([www.plivazdravlje.hr](http://www.plivazdravlje.hr)).

Liječenje metastatskog melanoma sa citostaticima podrazumijeva primjenu alkilirajućeg agensa poput dakarbazina i kombinacija lijekova koje uključuju cisplatin, no kemoterapija pokazuje vrlo slab odgovor i brzi razvoj rezistencije (Liu i Sheikh, 2014.). Ciljana terapija obuhvaća primjenu BRAF (*eng.* v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B; BRAF) inhibitora, odnosno lijekova vemurafeniba i dabrafeniba kod bolesnika s BRAF-pozitivnim tumorom (mutacija prisutna kod otprilike 40-60% melanoma). Također se primjenjuju i MEK inhibitori (*eng.* mitogen-activated protein kinase; MEK), lijekovi koji inhibiraju djelovanje mitogen-aktivirajuće protein kinaze, poput lijeka trametiniba ([www.plivazdravlje.hr](http://www.plivazdravlje.hr)). Osim ciljane terapije, danas se u liječenju također primjenjuje i imunoterapija, čiji je osnovni princip djelovanja iskorištavanje vlastitog imunološkog sustava u borbi protiv melanoma. Ona obuhvaća primjenu monoklonskog protutijela ipilimumaba - inhibitora antigen 4 citotoksičnih limfocita T (*eng.* cytotoxic T-lymphocyte antigen-4; CTLA-4) i lijekove pembrolizumab i nivolumab koji putem inhibicije receptora PD-1 (*eng.* programmed cell death-1; PD-1) na površini stanica, potiču aktivaciju limfocita i uništenje tumorskih stanica. No, imunoterapija može uzrokovati autoimunosne upalne nuspojave poput umora, crvenila kože, svrbeža, proljeva, smanjenog apetita, konstipacije, artralgijske i dr. (Liu i Sheikh, 2014.).

U posljednje vrijeme sve se više istražuje učinkovitost prirodnih bioaktivnih spojeva koji općenito pokazuju slabu toksičnost, što ih čini alternativnom terapijom u odnosu na tradicionalne antitumorske lijekove. Od prirodnih spojeva koji zaustavljaju rast i invazivnost stanica melanoma u *in vitro* i *in vivo* uvjetima ističu se resveratrol i kurkumin (antiangiogena aktivnost), narciklasin i karotenoidi (potiču apoptozu stanica tumora), epigalokatehin galat iz zelenog čaja (utječe na apoptozni signalni put kod melanoma koji su rezistentni na antitumorske lijekove) i određeni polisaharidi iz vrste *Lentinula edodes* (koji posjeduju snažni stimulirajući efekt na antitumorsku imunost) ([www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)).

Također, rade se i mnoga ispitivanja bioaktivnih spojeva iz maslinovog ulja (posebice polifenola) koji bi imali potencijalni antitumorski učinak.

## 1.2. Maslinovo ulje

Maslinovo ulje dobiva se iz ploda biljke *Olea europea*, L., stabla masline (slika 2). Maslina je jedna od najstarijih kultiviranih biljnih vrsta čiji je uzgoj započeo od davnina (prije otprilike 6000 godina) na području Mezopotamije, odakle se postupno proširila na zemlje Mediterana. U Hrvatskoj, masline se uzgajaju na cijelom priobalnom području i otocima - od Istre do južne Dalmacije zbog povoljnih klimatskih utjecaja (Kantoci, 2006). Od 31 hrvatske autohtone sorte ([www.oleacult.com](http://www.oleacult.com)) posebno valja istaknuti sorte Oblica, Lastovka, Drobnica, Levantinka i Paštrica koje pripadaju dalmatinskom kraju (Bakarić, 2005) te autohtone vrste Istarskog poluotoka: Buža, Buža puntonaža, Istarska bjelica, Rosinjola i Žižolera (Poljuha i sur., 2008; <http://www.istria-gourmet.com>).



Slika 2. Ilustracija biljke *Olea europea*, L. ([www.alamy.com](http://www.alamy.com))

Dozrijevanjem plodova ove zimzelene biljke, započinje proces berbe i proizvodnje maslinovog ulja različitim fizikalnim i kemijskim postupcima (Kantoci, 2006).

Ekstra djevičansko maslinovo ulje (*eng.* Extra Virgin Olive Oil; EVOO) dobiva se mehaničkim postupkom, tzv. hladnim prešanjem pri temperaturi koja ne prelazi 27°C, zbog čega se smatra najkvalitetnijim proizvodom koji zadržava jedinstveni sastav (slika 3) ([www.pzpakoska.hr](http://www.pzpakoska.hr)).



Slika 3. Maslinovo ulje i plod masline ([www.vitamini.hr](http://www.vitamini.hr))

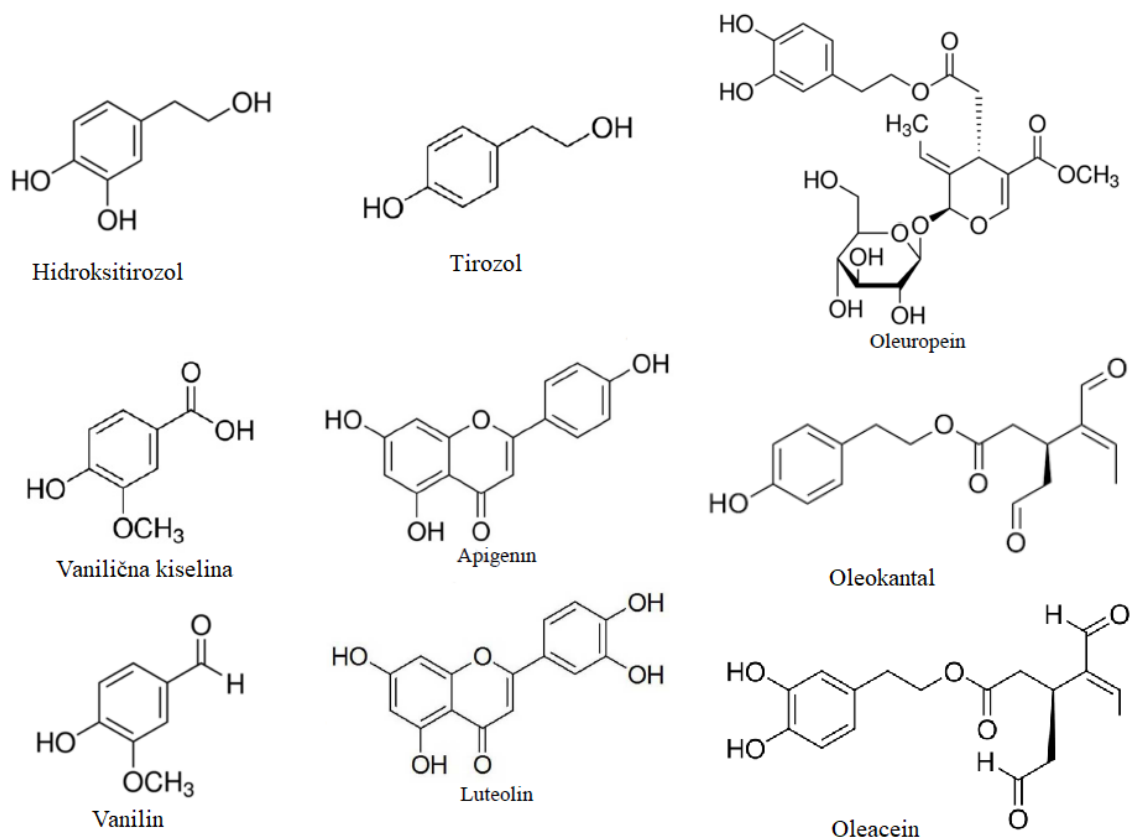
EVOO je najvećim dijelom sastavljeno od triglicerida (TGA), estera alkohola glicerola s višim masnim kiselinama. Iako udio pojedinih masnih kiselina u TGA može varirati, najzastupljenija je mononezasićena oleinska kiselina (70-80%), zatim slijede zasićene masne kiseline poput palmitinske i stearinske (16%) te polinezasićene esencijalne masne kiseline linolna i  $\alpha$ -linolenska kiselina (8-10%), koje značajno pridonose vrijednosti maslinovog ulja u odnosu na druga ulja i masti u ljudskoj prehrani (Wani i sur., 2018; Žanetić i Gugić, 2006).

Od drugih važnih sastavnica izdvajaju se ugljikovodici, steroli, skvalen, tokoferoli kao prirodni antioksidansi, različiti pigmenti, karotenoidi, derivati terpenskih kiselina i fenolni spojevi, koji su zaslužni za karakterističan (gorak) okus maslinovog ulja.



Općenito, polifenoli su biološki aktivne tvari, a nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka, čiju strukturu čini jedan ili više aromatskih prstenova na kojima su vezane hidroksilne skupine (Gorzynik-Debicka i sur., 2018).

Fenolne spojeve, prisutne u EVOO, možemo podijeliti na fenolne alkohole (hidroksitirozol i tirozol), fenolne kiseline i njihove derivate (kavena, galna, vanilična, p-hidroksibenzojeva, ferulična, cimetna i benzojeva kiselina), sekoiridoide (oleuropein, oleokantal, oleacein, aglikon oleuropeina), lignane (pinoresinol) i flavonoide (apigenin i luteolin) (slika 4) (Servili i sur., 2014). Udio i sadržaj pojedinih polifenola ovisi o agronomskim faktorima uzgoja, stupnju zrelosti ploda masline u trenutku berbe, ekstrakcijskom postupku kao i uvjetima pohrane gotovog maslinovog ulja. Upravo zbog proizvodnog postupka, EVOO sadrži najveću količinu polifenola (oko 500 mg/kg) u odnosu na maslinova ulja dobivena kemijskom ekstrakcijom koja su zbog postupka rafiniranja izgubila određen broj prirodnih sastavnica (Gorzynik-Debicka i sur., 2018; Garcia i sur., 2003).



Slika 4. Kemijske strukture fenolnih spojeva prisutnih u maslinovom ulju

Maslinovo ulje važno je iz zdravstvenih razloga i sastavni je dio ljudske prehrane, pogotovo mediteranske populacije. Mediteranska prehrana bogata je žitaricama, voćem i povrćem, mahunarkama, ribom, začinima i neizostavnim maslinovim uljem kao glavnim izvorom masnoća (Santangelo i sur., 2017). Zbog takvog prehrambenog obrasca, kod stanovnika Mediterana uočena je niža učestalost različitih bolesti - od kardiovaskularnih bolesti, ponajprije ateroskleroze, upalnih i neurodegenerativnih bolesti te određenih tipova karcinoma. Taj fenomen pripisuje se redovitoj, dnevnoj konzumaciji EVOO i njegovim polifenolnim sastavnicama (Karković Marković i sur., 2019). Kardioprotektivni učinak maslinovog ulja potvrdila je i Europska agenciju za sigurnost hrane (*eng.* European Food Safety Authority; EFSA) navodeći da dnevni unos 5mg hidroksitirozola i njegovih derivata (sadržanih u 20g maslinovog ulja) doprinosi zaštiti lipida u krvi od oksidativnog stresa (Commission Regulation (EU) No 432/2012).

Mnoga istraživanja stoga sve veću pažnju posvećuju upravo fenolnim komponentama maslinovog ulja i njihovom biološkom učinku na ljudski organizam. Osim protektivnog djelovanja na srce i krvožilni sustav, polifenoli su pokazali značajno protuupalno djelovanje zbog svog mehanizma da uklanjaju reaktivne kisikove (*eng.* reactive oxygen species; ROS) i reaktivne dušikove spojeve (*eng.* reactive nitro species; RNS) te utječu na razne signalne putove koji su uključeni u proces upale i stvaranje proupalnih faktora. Maslinovo ulje također posjeduje antimikrobno djelovanje. S obzirom da se fenolne sastavnice ne apsorbiraju u potpunosti u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta, već se metaboliziraju u nižim dijelovima (prvenstveno u debelom crijevu), utječu na ravnotežu i sastav crijevne mikroflore koja je nužna za obranu od nekih vrsta patogenih bakterija (Karković Marković i sur., 2019). U posljednjih nekoliko desetljeća, puno se istražuje i potencijalno antikancerogeno djelovanje. Mnoge studije potvrdile su da fenolni alkoholi i sekoiridoidi (oleuropein, oleokantal i oleacein) maslinova ulja djeluju na ekspresiju gena koji kontroliraju proliferaciju, apoptozu i diferencijaciju stanica tumora. U kombinaciji s nekim antitumorskim lijekovima, polifenoli su pokazali određeni stupanj interakcije, što dovodi do mogućnosti da, zbog kemoprotektivnog djelovanja, mogu poboljšati učinak kemoterapije i smanjiti neželjene toksične nuspojave (Torić i sur., 2020).

U središte sve većeg interesa zbog svojih bioloških svojstava i brojnih blagotvornih učinaka na organizam čovjeka, dolaze sekoiridoidi oleokantal i oleacin.

### 1.3. Oleokantal

Oleokantal je hidrofilni fenolni spoj sekoiridoidne strukture prisutan u maslinovom ulju i čini oko 0,02% mase EVOO (Segura-Carretero i Curiel, 2018). Ime potječe od njegovog doprinosa organoleptičkim svojstvima ulja jer nakon kušanja ostavlja oštar okus u usnoj šupljini te prema tome je ova nadražujuća komponenta dobila naziv "*oleocanthal*" (*eng*) - složenica riječi "oleo" (maslina), "canth" (ubod) i "al" (aldehid) ([www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)).

Oleokantal (slika 4) je dialdehidni derivat dekarboksimetilelenolne kiseline povezan s tirozolum, molekulske mase 304,34 g/mol. Molekulska formula spoja je  $C_{17}H_{20}O_5$  ([www.pubchem.com](http://www.pubchem.com)). U molekuli se nalazi jedan kiralni ugljikov atom (na položaju C5). U prirodi je oleokantal u S konfiguraciji, dok se sintetski nalazi u R konfiguraciji (Pang i Chin, 2018).

Iako predstavlja samo 10% od ukupnih fenolnih sastavnica maslinovog ulja, oleokantal je molekula koja posjeduje iznimna protuupalna svojstva i uspoređuje se sa nesteroidnim protuupalnim lijekom (*eng.* non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAID) ibuprofenom. Inhibicijom ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2), enzima uključenih u stvaranje medijatora upale (prostaglanidina i tromboksana), ispoljava svoj učinak ovisan o dozi i smatra se da je potentniji u inhibiciji COX enzima od ibuprofena u ekvimolarnim koncentracijama; istraživanje provedeno od strane Beauchampa i suradnika (2005) otkrilo je da oleokantal inhibira 41-57% aktivnosti COX u usporedbi s ibuprofenom koji je inhibirao samo 13-18% aktivnosti enzima. Također, oleokantal je pokazao inhibitorno djelovanje na 5-lipooksigenazu (5-LOX), enzim koji katalizira prvi korak biosinteze leukotriena - upalnih faktora u podlozi nekih bolesti poput astme i alergijskog rinitisa (Segura-Carretero i Curiel, 2018).

Nadalje, oleokantal se pokazuje kao potencijalna molekula u terapiji upalnih bolesti zglobova jer smanjuje ekspresiju proteina inducibilne sintetaze dušikova oksida (iNOS), koja ima ulogu u patogenezi osteoartritisa. iNOS nije prisutna u normalnim stanicama: potaknuta upalnim citokinima, ona stvara dušikov oksid (NO), koji u tom staničnom okolišu dodatno potiče upalu hondrocita i odgovoran je za progresiju bolesti (Karković Marković, 2019). Oleokantal je prepoznat kao potencijal u liječenju neurodegenerativnih bolesti - ponajprije Alzheimerove bolesti, koju karakterizira nakupljanje amiloidnih plakova i neurofibrilarnih petlji u mozgu (Servili i sur., 2014). Studije provedene u *in vitro* i *in vivo* uvjetima otkrile su da

oleokantal u *in vitro* uvjetima spriječava nastanak amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) i Tau-agregacija, dok u *in vivo* uvjetima pospešuje čišćenje A $\beta$  nakupina u mozgu miševa divljeg tipa (Karković Marković i sur., 2019). U prilog tomu idu i rezultati istraživanja koji pokazuju 40%-tno smanjenje oboljenja od Alzheimerove bolesti kod ljudi koji se drže mediteranskog načina prehrane (<https://www.researchgate.net>). Oleokantal je pokazao i dobro djelovanje protiv različitih vrsta bakterija kao što su *Esherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* (Karković Marković, 2019.).

Inhibicija enzima COX-2, koji je uključen u patogenezu nekih vrsta tumora, potaknula je istraživanja da oleokantal posjeduje važna antiupalna svojstva u borbi protiv određenih karcinoma. Zbog mogućnosti inhibicije signalnog puta HGF/c-Met (*eng.* hepatocyte growth factor/c-mesenchymal-epithelial transition factor; HGF/c-Met) pokazao se vrlo uspješan u zaustavljanju proliferacije, migracije i invazije (ne)metastatskih ljudskih staničnih linija tumora dojke i prostate te rasta tumora u animalnim modelima. U *in vitro* uvjetima, blokiranjem STAT3 (*eng.* signal transducer and activator of transcription 3; STAT3) signalnog puta, oleokantal je izazvao antiproliferativni odgovor i uzrokovao apoptozu stanica hepatocelularnog karcinoma, dok je u *in vivo* uvjetima izazvao supresiju rasta tumora i redukciju metastaza u plućima (Torić i sur., 2019). Prilikom tretmana stanica multiplog mijeloma, zabilježena je inhibicija upalnog proteina makrofaga 1 $\alpha$  (*eng.* macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ; MIP-1 $\alpha$ ), koji je u toj bolesti previše eksprimiran i kao aktivator osteoklastogeneze uzrokuje komplikacije i bolove u kostima kod 90% pacijenata (Karković Marković i sur., 2019; Pang i Chin, 2018).

Značajno je i otkriće koje je ova molekula pokazala u kombinaciji s tamoksifenom kod tumora dojke ovisnog o estrogenu. Zabilježeno sinergističko djelovanje (kao i kod kombinacije oleokantala i lapatiniba) u supresiji rasta stanica tumora dojke pokazuje potencijal da se kombinacijom antitumorskih lijekova s polifenolima iz maslinovog ulja može postići bolji terapijski odgovor, smanjena rezistencija na postojeće lijekove i smanjenje nuspojava (Torić i sur., 2019).

Koncentracija oleokantala u EVOO varira od 0,2 mg/kg do 498 mg/kg jer ovisi o raznim faktorima kao što su proces ekstrakcije, agronomski faktori, geografski utjecaji, sorta masline, pohrana ulja i razni drugi (Becerra-Herrera i sur., 2018; [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)).

#### 1.4. Oleacein

Oleacein je prirodni polifenolni spoj prisutan u EVOO i pripada skupini sekoiridoida. To je dialdehidni derivat dekarboksimetilelenolne kiseline povezan s hidroksitirozolum, molekulske formule  $C_{17}H_{20}O_6$ , a razlikuje se od oleokantala po jednoj dodatnoj hidroksilnoj skupini koja je vezana na aromatski prsten (slika 4). Molekulska masa oleaceina iznosi 320,3 g/mol (www.pubchem.com).

Ime "oleacein" nastalo je nakon otkrića da u *in vitro* uvjetima može inhibirati angiotenzin konvertirajući enzim (*eng.* angiotensin converting enzyme; ACE) - stoga je naziv kombinacija engleskih riječi *olea* (maslina), *ACE* (naziv enzima) i *inhibitor* (Naruszewicz i sur., 2014).

Oleacein je spoj koji posjeduje mnoge povoljne biološke učinke od kojih se ističu antioksidativna i protuupalna svojstva. Upravo zahvaljujući svojoj strukturi i *o*-hidroksifenilnoj skupini unutar molekule, uspješno hvata slobodne radikale - ROS i RNS koji su uključeni u oksidativni stres. Antioksidativna aktivnost također je povezana s utjecajem na funkciju neutrofila. Upalom stimulirani neutrofilni otpuštaju mijeloperoksidaze (*eng.* myeloperoxidase; MPO), enzime odgovorne za nastanak reaktivnih spojeva hipoklorne kiseline (HOCl) koji uzrokuju štetu reakcijama oksidacije i klorinacije. Oleacein značajno smanjuje otpuštanje MPO iz neutrofila i učinak se može usporediti s učinkom indometacina, lijeka iz skupine NSAID. U prilog protuupalnom djelovanju ide i poticanje ekspresije receptora CD163 na površini makrofaga i utjecaj na smanjeno otpuštanje različitih medijatore upale u organizmu kao što su elastaze, matriksne metaloproteinaze (*eng.* matrix metalloproteinase; MMP) i interleukin IL-8. Također, oleacein je pokazao mnogo jače inhibitorno djelovanje na enzim 5-LOX, nego hidroksitirozol i oleokantal koji isto djeluju na spomenuti enzim.

Kardioprotektivni učinak postiže se inhibicijom neutralnih endopeptidaza (*eng.* neutral endopeptidase; NEP), enzima koji razgrađuju natriuretske peptide. Natriuretski peptidi svojim učinkom zaustavljaju renin-angiotenzin-aldosteron sustav u ljudskom organizmu i stoga inhibicija NEP može imati ključnu ulogu u nekim kardiovaskularnim bolestima. (Karković Marković i sur., 2019.; Naruszewicz i sur., 2014). Osim toga, oleacein ima mogućnost stabilizacije karotidnog plaka i stoga bi se potencijalno mogao smanjiti rizik od srčanog udara. Također, pretpostavlja se da oleacein ima protektivno djelovanje protiv nakupljanja abdominalne masti i povećanja tjelesne mase (Karković Marković i sur., 2019).

Za razliku od ostalih fenolnih sastavnica EVOO, antitumorsko djelovanje oleaceina manje je zabilježeno u literaturi, no nije zanemarivo. Oleacein inkubiran zajedno s vodikovim peroksidom (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) smanjio je DNK oštećenje u HL60 stanicama promijelotične leukemije. Također, reducirao je pokretljivost i migraciju stanica ne-melanomnog tumora kože i kroz inhibiciju signalnih putova zaustavio proliferaciju atipičnih keratinocita koji su bili stimulirani s epidermalnim faktorom rasta *in vitro* (eng. epidermal growth factor; EFG) (Torić i sur. 2019).

Oleacein posjeduje i određeno antibakterijsko djelovanje protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija (Karković Marković i sur., 2019), ali je pokazao je slabije djelovanje na bakteriju *Helicobacter pylori* nego molekula oleokantala (Pang i Chin, 2018).

Predstavljajući jednu od najviše zastupljenih fenolnih komponenti, prosječna količina oleaceina u EVOO kreće se od 111 mg/kg do 285 mg/kg, a može dosegnuti čak 780mg/kg (Naruszewicz i sur., 2014).

## 1.5. Učinak oleokantala i oleaceina na melanom

Oleokantal i oleacein se sve više ističu kao potencijalni spojevi u liječenju različitih vrsta tumora, između ostalog i melanoma, zahvaljujući svojim kemoprotektivnim i citotoksičnim učincima. S obzirom da mnogi antitumorski lijekovi koji se danas koriste u terapiji melanoma, poput BRAF inhibitora, CTLA-4 inhibitora i interleukina IL-2 izazivaju slab odgovor i brojne toksične učinke, sve se više pažnje posvećuje prirodnim bioaktivnim spojevima zbog obećavajućeg djelovanja i niske toksičnosti.

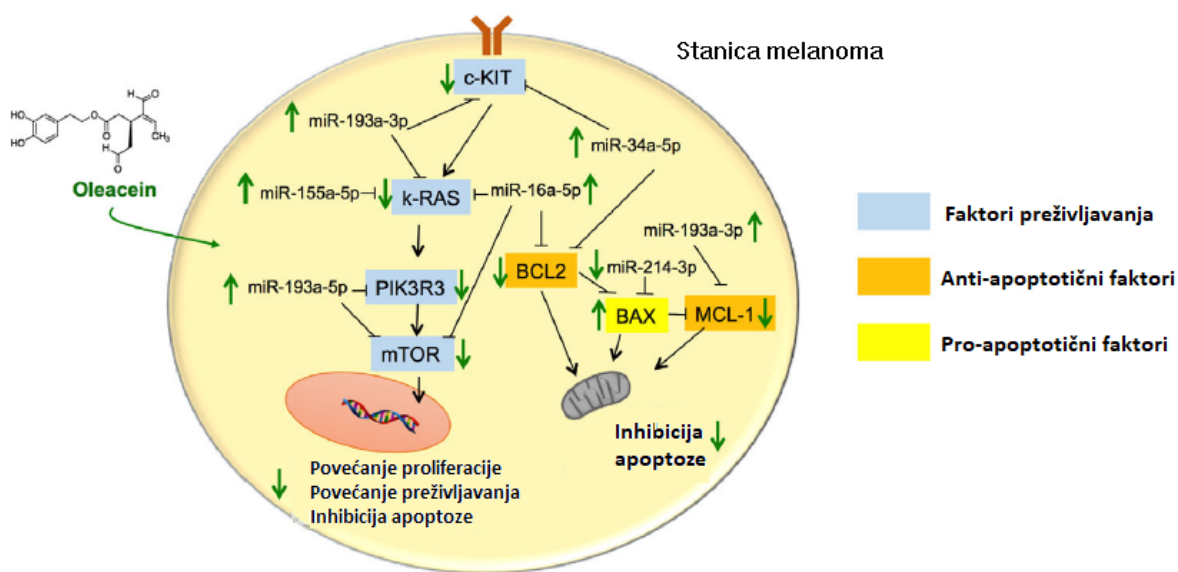
Oleokantal postiže antitumorski učinak inhibicijom raznih signalnih puteva koji su uključeni u patogenezu melanoma. *In vitro*, oleokantal je pokazao supresiju proliferacije, migracije, invazije stanica melanoma te inducirao apoptozu. Također, *in vivo* je otkriveno da inhibira metastaze melanoma u plućnom modelu (Gu i sur., 2017).

Studija provedena od strane Foglija i sur. (2016) pokazala je da oleokantal ispoljava citotoksičnost prema humanim stanicama melanoma, bez učinka na normalne zdrave stanice. U navedenoj studiji pokazano je da u koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$  utječe na smanjenje ekspresije anti-apoptotičnog gena Bcl-2 mRNA (*eng.* B cell lymphoma-2; Bcl-2) te inhibira fosforilaciju proteina Akt i ekstracelularne signal-regulirane kinaze ERK 1/2 (*eng.* extracellular signal-regulated kinase-1/2; ERK 1/2) potičući tako apoptozu stanica melanoma.

Gu i sur. (2017) su u svom istraživanju pokazali da oleokantal zaustavlja rast i metastaze melanoma kroz blokadu STAT3 signalnog puta. STAT3 je konstitutivno aktiviran u 50-90% melanoma i zaslužan je za njegovu invazivnost jer regulira ekspresiju gena za vaskularni endotelni faktor rasta (*eng.* vascular endothelial growth factor; VEGF) povezan sa angiogenezom i matriksne metaloproteinaze MMP-2 i MMP-9 koje razgradnjom ekstracelularnog staničnog matriksa omogućavaju tumoru prodiranje u druga tkiva i stvaranje metastaza. Dobiveni rezultati pokazuju da je djelovanje oleokantala na stanice melanoma ovisno o dozi, a zabilježene citotoksične koncentracije kreću se od 20  $\mu\text{M}$  do 40  $\mu\text{M}$ .

Oleacein je već dokazao svoja antiproliferativna svojstva na ne-melanomnim stanicama, stoga je nedavno istraživanje provedeno kako bi se pokazao učinak na melanomu. Carpi i sur. (2020) su u provedenoj studiji pokazali da oleacein ima sposobnost inhibirati proliferaciju stanica melanoma utječući na ekspresiju gena povezanih sa regulatornom mikroRNA (*eng.* microRNA; miRNA) koja je uključena u mTOR (*eng.* mammalian target of rapamycin; mTOR) signalni put i proces apoptoze. mTOR signalni put je pozitivni regulator staničnog rasta i kao takav odgovoran je za mnoge anaboličke procese u stanici (biosinteza proteina i lipida), no u karcinomima može doći do njegove pojačane aktivacije što rezultira rezistencijom na apoptozu i omogućava preživljavanje tumorskim stanicama. Rezultati su pokazali da oleacein smanjuje mRNA ekspresiju c-KIT, K-RAS i PIK3R3 - važnih efektoru u pojačanoj mTOR aktivaciji (slika 5).

Oleacein je izazvao takav učinak tijekom 72 h u koncentraciji  $IC_{50} = 20 \mu M$  ( $IC_{50}$  : koncentracija koja je odgovorna za inhibiciju rasta stanica od 50%).



Slika 5. Shema signalnih puteva uključenih u supresiju tumora na stanici melanoma nakon primjene oleaceina (preuzeto iz Carpi i sur., 2020)



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Maslinovo ulje vrlo je važan dio zdrave prehrane, a posebno se ističe u mediteranskoj prehrani, u kojoj predstavlja jednu od glavnih komponenti. Redovita konzumacija maslinovog ulja doprinosi prevenciji oboljenja naročito kardiovaskularnih, dijabetesa, a djeluje i antikancerogeno.

Melanom je zloćudni tumor koji je u zadnjih 20 godina postao jedan od najčešćih tumora u Zapadnom svijetu s najbrže rastućom incidencijom. Iako melanom kože čini samo 4% svih kožnih tumora, on uzrokuje čak 80% smrtnih slučajeva od svih tumora kože. Zbog slabe osjetljivosti na danas dostupno liječenje proširenog oblika melanoma, većina bolesnika umire u petogodišnjem razdoblju, zbog čega je iznimno važno tražiti nove potencijalne lijekove. Brojne studije *in vitro* i *in vivo* istražuju učinak sintetski, polu-sintetskih ili prirodnih bioaktivnih spojeva. Maslinovo ulje je jedan od izvora bioaktivnih sekoiridoida (oleokantala i oleaceina) čiji se biološki učinak istražuje na različitim stanicama karcinoma, ali je zasada vrlo malo istraživanja na melanomu.

U ovom diplomskom radu pripremljeni su fenolni ekstrakti pet uzoraka maslinovih ulja hrvatskih autohtonih sorti maslina Buža (Meloto), Žižolera (Meloto), Bjelica, Oblica i Žižolera (Oleum) koji će se u daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog diplomskog rada, ispitati *in vitro* na stanicama melanoma.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1.MATERIJALI**

##### **3.1.1. Uzorci**

- Ekstra djevičansko maslinovo ulje Buža, Meloto (*eng.* Extra Virgin Olive Oil; EVOO 1), OPG Matteo Beluci, Vodnjan, Istra
- Ekstra djevičansko maslinovo ulje Žižolera, Meloto (EVOO 2), OPG Matteo Beluci, Vodnjan, Istra
- Ekstra djevičansko maslinovo ulje Bjelica (EVOO 3), Oleum Maris d.o.o., Vodnjan, Istra
- Ekstra djevičansko maslinovo ulje Oblica (EVOO 4), Dubrovnik
- Ekstra djevičansko maslinovo ulje Žižolera (EVOO 5), Oleum Maris d.o.o., Vodnjan, Istra

##### **3.1.2. Kemikalije**

- Acetonitril, Reag.Ph.Eur, za tekućinsku kromatografiju (LiChrosolv<sup>®</sup>, Merck, Njemačka)
- Cikloheksan (Emplura<sup>®</sup>, Merck, Njemačka)

##### **3.1.3. Instrumenti**

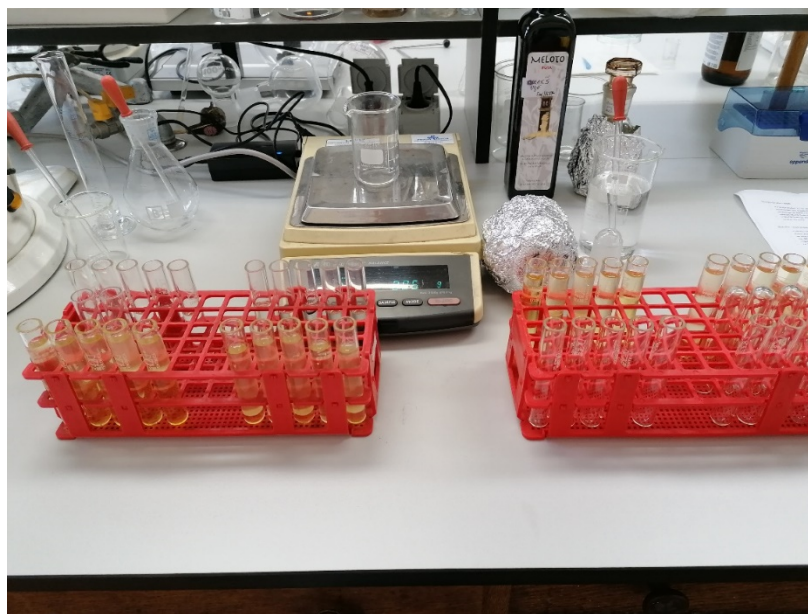
- Analitička vaga (HX-3000, Lenz, Japan)
- Centrifuga (Rotofix 32, Hettich<sup>®</sup>, Njemačka)
- Laboratorijski rotacioni uparivač (R-200, Büchi, Švicarska)
- Tresilica (Mixer, Thermolyne Corporation, SAD)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Ekstrakcija polifenola iz maslinovog ulja

U 20 grama EVOO (1-5) doda se 80 ml cikloheksana i 100 ml acetonitrila. Smjesa se miješa na tresilici 2 minute zaštićeno od svjetlosti i zatim centrifugira 5 minuta pri 4000 okretaja /min. Nakon centrifugiranja acetonitrilni (gornji) sloj prenese se u tikvicu i upari do suhog ostatka (smola) na vakuum uparivaču pri temperaturi 33°C (slika 7).

Ekstrakcije uzoraka EVOO (1-5) ponovljene su 2 puta pri čemu su dobiveni EVOO-PE (1a-5a i 1b-5b) (*eng.* Extra Virgin Olive Oil - Phenolic Extract; EVOO-PE) (Tablica 1).



Slika 6. Priprema uzoraka EVOO (1-5) za centrifugiranje



Slika 7. Postupak uparivanja na laboratorijskom rotacionom uparivaču, pri temperaturi 33°C

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Određivanje oleokantala i oleaceina u uzorcima ulja

Ekstrakcijom probranih autohtonih hrvatskih sorti masline Buža (Meloto), Žižolera (Meloto), Bjelica, Oblica i Žižolera (Oleum) (EVOO 1-5) dobiveni su fenolni ekstrakti (EVOO-PE 1-5). Mase dobivenih fenolnih ekstrakata prikazane su u Tablici 1. Provedena je  $^1\text{H}$  NMR analiza sadržaja maslinovih ulja kvantitativnim određivanjem sadržaja oleokantala i oleaceina u fenolnim ekstraktima. Za svako ulje postupak ekstrakcije i  $^1\text{H}$  NMR analize proveden je minimalno dva puta. Snimljeni su  $^1\text{H}$  NMR spektri fenolnih ekstrakata navedenih uzoraka maslinovih ulja te je uz primjenu baždarnih pravaca određen sadržaj spomenutih fenolnih spojeva (podaci iz laboratorija Zavoda za fizikalnu kemiju; Kugić, 2020).

Tablica 1. Uzorci maslinovih ulja (EVOO 1-5), fenolni ekstrakti dobiveni njihovom ekstrakcijom (EVOO-PE 1a-5a, 1b-5b) i njihove mase (g) te sadržaj oleokantala i oleaceina (mg/kg ulja)

Sorta	Lokalitet	Oznaka EVOO	Oznaka EVOO-PE	Masa EVOO-PE (g)	Oleokantal (mg/kg ulja)	Oleacein (mg/kg ulja)
Buža, Meloto	Istra	EVOO 1	EVOO-PE 1a	0,1070	$47,2 \pm 1,7$	$84,0 \pm 1,1$
			EVOO-PE 1b	0,1112		
Žižolera, Meloto	Istra	EVOO 2	EVOO-PE 2a	0,1904	< LOQ*	< LOQ*
			EVOO-PE 2b	0,1094		
Bjelica	Istra	EVOO 3	EVOO-PE 3a	0,1358	$96,7 \pm 2,9$	$80,3 \pm 25,3$
			EVOO-PE 3b	0,2338		
Oblica	Dubrovnik	EVOO 4	EVOO-PE 4a	0,1413	$51,9 \pm 12,9$	$55,3 \pm 0,7$
			EVOO-PE 4b	0,1216		
Žižolera, Oleum Maris	Istra	EVOO 5	EVOO-PE 5a	0,1071	$66,0 \pm 2,4$	$174 \pm 9$
			EVOO-PE 5b	0,0880		

\* LOQ – granica određivanja

Sadržaj oleokantala i oleaceina u ispitanim maslinovim uljima je značajan u usporedbi s podacima iz literature i varira u maslinovim uljima različitih sorti masline te ovisi o geografskom porijeklu. Najviša koncentracija oleokantala utvrđena je u sorti Bjelica (Istra;  $96,7 \pm 2,9$  mg/kg), dok su nešto niže koncentracije zabilježene u sortama Žižolera, Oleum Maris (Istra) ( $66,0 \pm 2,4$  mg/kg), Oblica ( $51,9 \pm 12,9$ ) i Buža, Meloto ( $47,2 \pm 1,7$  mg/kg). Visoka količina oleaceina zabilježena je u sorti Žižolera, Oleum Maris (Istra) ( $174 \pm 9$  mg/kg) i sličan sadržaj u sortama Buža, Meloto ( $84,0 \pm 1,1$  mg/kg) i Bjelica ( $80,3 \pm 25,3$  mg/kg). Najmanji sadržaj oleaceina je u sorti Oblica ( $55,3 \pm 0,7$  mg/kg). Sadržaj oleokantala i oleaceina u sorti Žižolera, Meloto (Istra) bio je ispod limita kvantifikacije.

Pripremljeni fenolni ekstrakti odabranih autohtonih sorti maslina (EVOO-PE 1-5) poslužit će za daljnja biološka ispitavanja *in vitro* na stanicama melanoma te će se učinak povezati sa sadržajem sekoiridoidnih spojeva oleokantala i oleaceina.

## 5. ZAKLJUČAK

U diplomskom radu pripremljeni su fenolni ekstrakti pet odabranih autohtonih hrvatskih sorti maslina Buža (Meloto), Žižolera (Meloto), Bjelica, Oblica i Žižolera (Oleum). Fenolni ekstrakti bogati su sekoiridoidnim spojevima oleokantalom i oleaceinom čiji je sadržaj kvantitativno određen  $^1\text{H}$  NMR tehnikom.

Dobiveni rezultati daju uvid u sadržaj biomedicinski važnih spojeva u autohtonim hrvatskim uljima i služe za daljnja ispitivanja biološkog učinka fenolnih ekstrakata ulja na stanicama melanoma.

## 6. LITERATURA

- Bakarić P. Glavne sorte maslina na području Dubrovačko-neretvanske županije s posebnim osvrtom na autohtone sorte poluotoka Pelješca. *Pomologia Croatica*, 2005, 11, 15-21.
- Barbarić J, Znaor A. Incidence and mortality trends of melanoma in Croatia. *Croat Med J*. 2012, 53, 135-140.
- Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, 2005, 437, 45-46.
- Becerra-Herrera M, Vélez-Martín A, Ramos-Merchante A, Richter A, Beltrán R, Sayago A. Characterization and evaluation of phenolic profiles and color as potential discriminating features among Spanish extra virgin olive oils with protected designation of origin. *Food Chemistry*, 2018, 241, 328-337.
- Carpi S, Polini B, Manera C, Digiacomo M, Esposito Salsano J, Macchia M, Scoditti E, Nieri P. miRNA Modulation and Antitumor Activity by the Extra-Virgin Olive Oil Polyphenol Oleacein in Human Melanoma Cells. *Front Pharmacol*, 2020, 11, 574317.
- Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health, 2017, <http://data.europa.eu>, pristupljeno 29.10.2020.
- Flavonoids: Promising Natural Products for Treatment of Skin Cancer (Melanoma), 2016., [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com), pristupljeno 20.10.2020.
- Fogli S, Arena C, Carpi S, Polini B, Bertini S, Digiacomo M, Gado F, Saba A, Saccomanni G, Breschi MC, Nieri P, Manera C, Macchia M. Cytotoxic Activity of Oleocanthal Isolated from Virgin Olive Oil on Human Melanoma Cells. *Nutrition and Cancer*, 2016, 68, 873-877.
- Garcia A, Brenes M, Garcia P, Romero C, Garrido A. Phenolic content of comercial olive oils. *Eur Food Res Technol*, 2003, 216, 520-525.
- Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Gammazza AM, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive oil and Plant Polyphenols. *Int. J. Mol. Sci*, 2018, 19, 1-13.



Gu Y, Wang J, Peng L. (-)-Oleocanthal exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling pathway. *Oncol Rep*, 2017, 37, 483-491.

Hrvatske maslinarske sorte, 2014., <http://www.oleacult.com>, pristupljeno 20. 10. 2020.

Istarska maslinova ulja, glavne sorte masline, 2013., <http://www.istria-gourmet.com>, pristupljeno 20.10.2020.

Kantoci D. Maslina. *Glasnik Zaštite Bilja*, 2006, 29, 4-14.

Karković Marković A, Torić J, Barbarić M, Jakobušić Brala C. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, 2019, 24, 2001.

Kugić A. Kvantitativna <sup>1</sup>H NMR analiza sekoiridoidnih fenolnih spojeva i masnih kiselina u maslinovom ulju autohtonih hrvatskih sorti masline, 2020., (rad nagrađen Rektorovom nagradom)

Liu Y, Sheikh MS. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Mol Cell Pharmacol*, 2014, 6, 228.

Mala škola maslinovog ulja, 2020., <https://vitamini.hr>, pristupljeno 28. 10. 2020.

Maligni melanom, 2020., <https://www.hdtgv.hr>, pristupljeno 19. 11. 2020.

Melanom, 2020., <https://poliklinika-mazalin.hr>, pristupljeno 19. 11. 2020.

Melanom - rizici, rano otkrivanje i liječenje, 2016., <https://www.plivazdravlje.hr>, pristupljeno 19. 11. 2020.

National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for Oleacein, 2020., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 1.11. 2020.

National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for Oleocanthal, 2020., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 1.11. 2020.

Naruszewicz M, Czerwińska M, Kiss A. Oleacein. Translation from Mediterranean Diet to Potential Antiatherosclerotic Drug. *Current pharmaceutical design*, 2015, 21, 1205-1212.

Olea europaea acebuche, 2020., <https://www.alamy.com>, pristupljeno 29.10.2020.

Oleocanthal: A Naturally Occurring Anti-Inflammatory Agent in Virgin Olive Oil, 2012., <https://www.researchgate.net>, pristupljeno 25.10.2020.

Pang KL, Chin KY. The Biological Activities of Oleocanthal from a Molecular Perspective. *Nutrients*. 2018, 10, 570.

Poljuha D, Sladonja B, Brkić Bubola K, Radulović M, Brščić K, Šetić E, Krapac M, Milotić A. A Multidisciplinary Approach to the Characterisation of Autochthonous Istrian Olive (*Olea europaea* L.) Varieties, *Food Technology and Biotechnology*, 2008, 46, 347-354.

Prerada maslina u maslinovo ulje: proces proizvodnje, 2016., <https://www.pzpakoska.hr>, pristupljeno 25. 10. 2020.

Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, De Sanctis P, Giovannini C, D'Archivio M, Masella R. Anti-inflammatory Activity of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Which Role in the Prevention and Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases?. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2018, 18, 36-50.

Segura-Carretero A, Curiel JA. Current Disease-Targets for Oleocanthal as Promising Natural Therapeutic Agent. *Int J Mol Sci*, 2018, 19, 2899.

Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, Selvaggini R, Taticchi A. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*, 2014, 3, 1-23.

Šitum M. Melanom, udžbenik i atlas. Zagreb, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti i Medicinska naklada, 2016.

Torić J, Karković Markovića A, Jakobušić Brala C., Barbarić M. Anticancer effects of olive oil polyphenols and their combinations with anticancer drugs, *Acta Pharmaceutica*, 2019, 69, 461-482.

Torić J, Brozović A, Baus Lončar M, Jakobušić Brala C, Karković Marković A, Benčić Đ, Barbarić M. Biological Activity of Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oils through Their Phenolic Profile and Their Combination with Anticancer Drugs Observed in Human Cervical Carcinoma and Colon Adenocarcinoma Cells. *Antioxidants*, 2020, 9, 453.

Wani TA, Masoodi FA, Gani A, Baba WN, Rahmanian N, Akhter R, Wani IA, Ahmad M. Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. *Trends in Food Science and Technology*, 2018, 77, 77-90.

Žanetić M, Gugić M. Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pomologia Croatica*, 2006, 12, 159-173.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### 7.1. Sažetak

Maslinovo ulje vrlo je važan dio zdrave prehrane, a posebno se ističe u mediteranskoj dijeti, u kojoj predstavlja jednu od glavnih komponenti. Njegova dnevna, redovita konzumacija ima blagotvorni učinak na ljudsko zdravlje, omogućava dugoročni životni vijek i povećanu kvalitetu života. Zahvaljujući svom bogatom i složenom kemijskom sastavu, maslinovo ulje predstavlja dobar izvor biološki aktivnih polifenola, u koje spadaju sekoiridoidi oleokantal i oleacein, kojima se pripisuje ključna uloga u preventivnom i terapijskom djelovanju na zdravlje čovjeka. Oleokantal posjeduje protuupalna svojstva uporediva s učinkom nesteroidnog antiupalnog lijeka ibuprofena, a može se pohvaliti i svojim neuroprotektivnim, antireumatskim, antibakterijskim i antitumorskim učincima. Oleacein, sličnog djelovanja kao oleokantal, ima značajna antioksidativna, kardioprotektivna, antidijabetička, antimikrobna i antikancerogena svojstva. Oleokantal i oleacein sve više privlače pažnju u znanstvenom svijetu i njihov se biološki učinak istražuje u raznim smjerovima, a u posljednje je vrijeme naglasak na antitumorskim učincima koje ostvaruju na stanicama različitih karcinoma. Maligni melanom, zloćudni tumor melanocita je jedan od najagresivnijih tumora u ljudi s rastućom incidencijom u svijetu. Iako melanom kože čini samo 4% svih kožnih tumora, on uzrokuje čak 80% smrtnih slučajeva od svih tumora kože. Zbog slabe osjetljivosti i razvoja rezistencije na danas dostupno liječenje, većina bolesnika s metastazama umire u petogodišnjem razdoblju, stoga je iznimno važno tražiti nove potencijalne lijekove. Iz navedenog razloga cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti fenolne ekstrakte maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline - Buža (Meloto), Žižolera (Meloto), Bjelica, Oblica i Žižolera (Oleum) te procijeniti njihovu kvalitetu s obzirom na sadržaj oleokantala i oleaceina. Navedeni polifenolni ekstrakti će se u daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog diplomskog rada, ispitati *in vitro* na stanicama melanoma.

## 7.2. Summary

Olive oil is very important part of a healthy diet, particularly in the Mediterranean diet, in which it represents one of its main components. When consumed on daily basis, it makes a significant, beneficial effect on human health, making life span longer and improving quality of life. Due to its rich and complex chemical composition, olive oil is a good source of bioactive polyphenols, including the secoiridoids oleocanthal and oleacein, which are considered to have a key role in the preventive and therapeutic effects on human health. Oleocanthal has anti-inflammatory properties comparable to the effect of the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen and possesses neuroprotective, antirheumatic, antibacterial and antitumor effects. Oleacein, similar in action to oleocanthal, has significant antioxidant, cardioprotective, antidiabetic, antimicrobial and anticancer properties. Oleocanthal and oleacein attract more and more attention in the scientific world and their biological effect has been investigated in various directions, including recent research on the antitumor effects they exert on cancer cells. Melanoma, a malignant tumor of melanocytes, is one of the most aggressive tumors with a growing incidence in the world. Although skin melanoma represents only 4% of all skin tumors, it causes 80% of all deaths from all skin cancer. Due to low sensitivity and the development of resistance to the treatment available today, most patients with metastases die within a five-year period, so it is extremely important to look for new potential drugs. The aim of this diploma thesis was to prepare phenolic extracts of olive oils of autochthonous Croatian olive varieties - Buža (Meloto), Žižolera (Meloto), Bjelica, Oblica and Žižolera (Oleum) and evaluate their quality regarding the proportion of polyphenols oleocanthal and oleacein. These polyphenolic extracts will be tested *in vitro* on melanoma cells in further research, which goes beyond the scope of this diploma thesis.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### PRIPRAVA FENOLNOG EKSTRAKTA MASLINOVIH ULJA AUTOHTONIH HRVATSKIH SORTI MASLINE

Daria Jančinec

#### SAŽETAK

Maslinovo ulje vrlo je važan dio zdrave prehrane, a posebno se ističe u mediteranskoj dijeti, u kojoj predstavlja jednu od glavnih komponenti. Njegova dnevna, redovita konzumacija ima blagotvorni učinak na ljudsko zdravlje, omogućava dugoročni životni vijek i povećanu kvalitetu života. Zahvaljujući svom bogatom i složenom kemijskom sastavu, maslinovo ulje predstavlja dobar izvor biološki aktivnih polifenola, u koje spadaju sekoiridoidi oleokantal i oleacein, kojima se pripisuje ključna uloga u preventivnom i terapijskom djelovanju na zdravlje čovjeka. Oleokantal posjeduje protuupalna svojstva uporediva s učinkom nesteroidnog antiupalnog lijeka ibuprofena, a može se pohvaliti i svojim neuroprotektivnim, antireumatskim, antibakterijskim i antitumorskim učincima. Oleacein, sličnog djelovanja kao oleokantal, ima značajna antioksidativna, kardioprotektivna, antidijabetička, antimikrobna i antikancerogena svojstva. Oleokantal i oleacein sve više privlače pažnju u znanstvenom svijetu i njihov se biološki učinak istražuje u raznim smjerovima, a u posljednje je vrijeme naglasak na antitumorskim učincima koje ostvaruju na stanicama različitih karcinoma. Maligni melanom, zloćudni tumor melanocita je jedan od najagresivnijih tumora u ljudi s rastućom incidencijom u svijetu. Iako melanom kože čini samo 4% svih kožnih tumora, on uzrokuje čak 80% smrtnih slučajeva od svih tumora kože. Zbog slabe osjetljivosti i razvoja rezistencije na danas dostupno liječenje, većina bolesnika s metastazama umire u petogodišnjem razdoblju, stoga je iznimno važno tražiti nove potencijalne lijekove. Iz navedenog razloga cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti fenolne ekstrakte maslinovih ulja autohtonih hrvatskih sorti masline - Buža (Meloto), Žižolera (Meloto), Bjelica, Oblica i Žižolera (Oleum) te procijeniti njihovu kvalitetu s obzirom na sadržaj oleokantala i oleaceina. Navedeni polifenolni ekstrakti će se u daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog diplomskog rada, ispitati in vitro na stanicama melanoma.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 7 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: maslinovo ulje, melanom, oleokantal, oleacein

Mentor: **izv. prof. dr. sc. Monika Barbarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ko-mentor: **doc. dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **izv. prof. dr. sc. Monika Barbarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**doc. dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**doc. dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: prosinac 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Medicinal Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### PREPARATION OF PHENOLIC EXTRACT OF OLIVE OILS OF AUTOCHTHONOUS CROATIAN OLIVE VARIETIES

**Daria Jančinec**

#### SUMMARY

Olive oil is very important part of a healthy diet, particularly in the Mediterranean diet, in which it represents one of its main components. When consumed on daily basis, it makes a significant, beneficial effect on human health, making life span longer and improving quality of life. Due to its rich and complex chemical composition, olive oil is a good source of bioactive polyphenols, including the secoiridoids oleocanthal and oleacein, which are considered to have a key role in the preventive and therapeutic effects on human health. Oleocanthal has anti-inflammatory properties comparable to the effect of the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen and possesses neuroprotective, antirheumatic, antibacterial and antitumor effects. Oleacein, similar in action to oleocanthal, has significant antioxidant, cardioprotective, antidiabetic, antimicrobial and anticancer properties. Oleocanthal and oleacein attract more and more attention in the scientific world and their biological effect has been investigated in various directions, including recent research on the antitumor effects they exert on cancer cells. Melanoma, a malignant tumor of melanocytes, is one of the most aggressive tumors with a growing incidence in the world. Although skin melanoma represents only 4% of all skin tumors, it causes 80% of all deaths from all skin cancer. Due to low sensitivity and the development of resistance to the treatment available today, most patients with metastases die within a five-year period, so it is extremely important to look for new potential drugs. The aim of this diploma thesis was to prepare phenolic extracts of olive oils of autochthonous Croatian olive varieties - Buža (Meloto), Žižolera (Meloto), Bjelica, Oblica and Žižolera (Oleum) and evaluate their quality regarding the proportion of polyphenols oleocanthal and oleacein. These polyphenolic extracts will be tested *in vitro* on melanoma cells in further research, which goes beyond the scope of this diploma thesis.

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

Thesis includes: 30 pages, 7 figures, 1 table and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive oil, melanoma, oleocanthal, oleacein

Mentor: **Monika Barbarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-mentor: **Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Monika Barbarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Miranda Sertić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: December 2020.