

# Biodostupnost hidrokstirosola i tirosole iz ekstrakta kumine masline

---

**Bagarić, Marija**

**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:163:827283>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Marija Bagarić**

**Biodostupnost hidroksitirosola i tirosola iz  
ekstrakta komine masline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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

*Prije svega bih htjela zahvaliti mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo i asistentici mag. pharm. Kristini Radić na strpljenju i stručnim savjetima bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć. Htjela bih zahvaliti i svojim prijateljima i prijateljicama jer bez njihove podrške i pozitivne energije nikada ne bih uspjela. Posebno Mariji na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog školovanja, Doriji na svakom skuhanom čaju, Amonu i Jeleni na smijehu koji je olakšao svaku prepreku, Maši na razgovorima u kuhinji, Mihaeli na startnim pauzama koje su nas pratile od samog početka studiranja i Heleni jer joj je stalo do svih mojih velikih i malih događaja. Hvala i mojoj obitelji, posebno baki Anđi koja je uvijek zapamtila svaki moj ispit i srcem uvijek bila uz mene.*

## SADRŽAJ

1.UVOD.....	1
1.1. Maslina.....	1
1.2. Komina masline.....	3
1.3. Polifenoli.....	4
1.3.1. Hidroksitirosol.....	4
1.3.1.1. Antiaterogeno i kardioprotektivno djelovanje.....	5
1.3.1.2. Antidijabetičko djelovanje.....	6
1.3.1.3. Neuroprotektivno djelovanje.....	7
1.3.1.4. Antikancerogeno djelovanje.....	8
1.3.1.5. Antimikrobno djelovanje.....	8
1.3.2. Tirosol.....	9
1.3.2.1. Antiaterogeno i kardioprotektivno djelovanje.....	9
1.3.2.2. Antidijabetičko djelovanje.....	10
1.3.2.3. Neuroprotektivno djelovanje.....	10
1.3.2.4. Antimikrobno djelovanje.....	11
1.4. Biodostupnost i bioraspoloživost polifenola masline.....	11
2.OBRAZLOŽENJE TEME. ....	13
3.MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Ekstrakcija polifenola iz komine masline.....	14
3.2. Ekstrakcija polifenola iz maslinovog ulja.....	14
3.3. Simulacija probave ekstrakta komine masline i maslinovog ulja – standardizirana <i>in vitro</i> metoda.....	15
3.4. Simulacija probave ekstrakta komine masline i maslinovog ulja– modifikacija standardizirane <i>in vitro</i> metode.....	16
3.5. Određivanje ukupnih fenola/ukupnog reduktivnog potencijala pomoću Folin-Ciocalteu metode.....	17
3.6. Određivanje antioksidacijskog potencijala korištenjem TEAC metode.....	18
3.7. Određivanje HTS-a i TS-a tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti sa fluorescencijskim detektorom (HPLC-FLD).....	19

3.8. Statistička obrada podataka.....	20
4.REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. Usporedba sadržaja ukupnih antioksidansa, HTS-a i TS-a u uzorcima maslinovog ulja i ekstrakta komine masline.....	21
4.2. Optimizacija digestije maslinovog ulja.....	24
4.3. Usporedba biodostupnih frakcija polifenola/antioksidansa maslinovog ulja i ekstrakta komine masline.....	29
5.ZAKLJUČCI.....	33
6.LITERATURA.....	34
7.SAŽETAK/SUMMARY.....	40
8.TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

### 1.1. Maslina

Maslina (lat. *Olea europea* L.) je na Zemlji prisutna od mlađeg kamenog doba, a naši su preci još prije 9 tisuća godina sakupljali plodove divlje masline što potvrđuju i arheološki nalazi u spiljama. Ipak, prva su stabla kultivirana tek prije 5-6 tisuća godina na području Mezopotamije, Sirije i Palestine, odakle se maslina proširila Mediteranom te postala simbolom mediteranske prehrane i kulture. (Tasić, 2015.) Danas je maslina u Dalmaciji najvažnija voćna kultura čijim se uzgojem bavi 45 % obitelji na području obale i čak 93 % obitelji na otocima. ([www.plantea.com](http://www.plantea.com))



**Slika 1.** Stablo i plod masline (<http://www.zaton.hr/>).

Maslinovo se ulje prema kvaliteti, koja ovisi o stanju ploda, može razvrstati u četiri razreda. Djevičanska maslinova ulja dobivena su prvim mehaničkim prešanjem bez daljnjeg tretiranja pa se prema tome mogu podijeliti na:

- **ekstra djevičansko maslinovo ulje** – ulje dobiveno prvim prešanjem koje ima izvrstan okus i miris;  
sadržaj slobodnih masnih kiselina (izražen kao oleinska kiselina) nije veći od 0,8 g na 100 g ulja
- **djevičansko maslinovo ulje** – ulje dobiveno prvim prešanjem koje ima dobar okus i miris;  
sadržaj slobodnih masnih kiselina (izražen kao oleinska kiselina) nije veći od 2,0 g na 100 g ulja

Preostala dva razreda značajno su manje kvalitetna te se, ovisno o udjelu rafiniranog ulja, dijele na:

- **mješavinu rafiniranog i djevičanskog maslinovog ulja**
- **rafinirano maslinovo ulje** (*tal. lampante*) – najgore kvalitete; tradicionalno se koristi za punjenje uljnih lampi

Djevičansko maslinovo ulje čini osnovnu komponentu mediteranske prehrane. Bogato je antioksidansima, uključujući polifenole te zdrave, mononezasićene masne kiseline, uglavnom oleinsku. Iako se djevičansko maslinovo ulje odlikuje izvrsnim nutritivnim svojstvima, u nekim se zemljama nerijetko takva djevičanska ulja krivotvore miješanjem s drugim biljnim uljima i na taj način gube na kvaliteti. Usprkos tome, mediteranska se prehrana smatra posebno korisnom za zdravlje kardiovaskularnog sustava te se još povezuje sa smanjenjem rizika od pojave dijabetesa melitusa tipa 2, te smanjenim stvaranjem amiloidnih plakova karakterističnih za Alzheimerovu bolest. ([www.britannica.com](http://www.britannica.com); Bendini i sur., 2007.) Tijekom proizvodnje maslinovog ulja zaostaju komina masline i otpadna voda, nusproizvodi štetni za okoliš jer sadrže visoke koncentracije polifenola koji, prvenstveno antimikrobnim djelovanjem, štetno utječu na Zemljine ekosustave. S druge strane, polifenoli prisutni komini masline imaju dokazana antioksidacijska, antiproliferativna i protuupalna svojstva zbog kojih bi se komina masline, po uzoru na maslinovo ulje, mogla koristiti kao dobar izvor polifenola u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. (Romero i sur., 2017.)

## 1.2. Komina masline

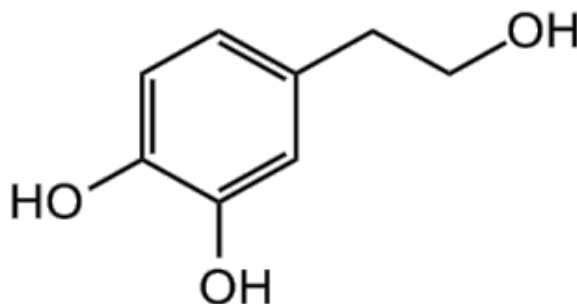
Komina masline glavni je nusproizvod koji nastaje pri proizvodnji maslinovog ulja. Na 100 kg plodova masline dobije se približno 35-40 kg komine. Ovaj nusproizvod heterogena je biomasa sa značajnim udjelom vlage i ulja čiji omjer i količina ovise o regiji uzgoja te primijenjenoj metodi ekstrakcije ulja. U kontinuiranom dvofaznom procesu, nakon odvajanja maslinovog ulja, taj ostatak sačinjavaju fragmenti kože (epikarpa), pulpe (mezokarpa) i koštice (endokarpa). Glavne sastavnice komine masline čine ugljikohidrati (polisaharidi), proteini, masne kiseline, pigmenti i polifenoli. Komina masline se, najviše zbog ekonomske isplativosti, često koristi kao biogorivo. Iako je ovo dobra strategija za smanjenje otpada nastalog pri proizvodnji maslinovog ulja i smanjenja emisija štetnih plinova koji nastaju uporabom fosilnih goriva, ona ne iskorištava potencijal bioaktivnih sastavnica komine. Naime, komina masline se ističe kao vrijedan nusproizvod zbog visokog udjela polifenola, a istraživanja se većinom koncentriraju na njezina antioksidativna svojstva. Najzastupljeniji polifenol u komini masline je hidroksitirozol, a značajno su zastupljeni i tirozol, oleuropein, kofeinska kiselina, p-kumarinska kiselina, verbaskozid, elenolna kiselina, katehol i rutin. Količina antioksidansa u komini masline može biti veća od količine antioksidansa u maslinovom ulju te zbog toga komina ima potencijalnu upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. (Nunes i sur., 2016.) Ekstrakcijom fenolnih sastavnica iz komine masline prije odlaganja potencijalno se smanjuju se štetni učinci za okoliš (prvenstveno u smislu utjecaja visokih koncentracija polifenola na mikrobe u tlu), a istovremeno se omogućuje dodatan izvor prihoda za proizvođače maslinovog ulja. (Goldsmith i sur., 2014)



### 1.3. Polifenoli

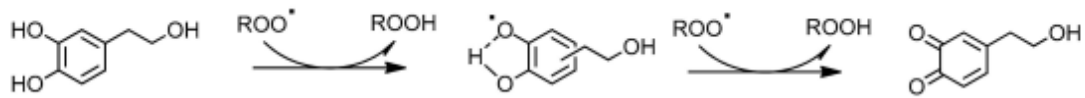
Polifenoli su aromatski spojevi s više hidroksilnih supstituenata koji su vrlo rasprostranjeni u prirodi te su često prisutni u ljudskoj prehrani. U prirodi se rijetko nalaze u slobodnom obliku, a uglavnom su esterificirani organskim kiselinama ili konjugirani monosaharidima i disaharidima. (Čović i sur, 2009.). Prema brojnim istraživanjima velik dio pozitivnih učinaka maslinovog ulja na zdravlje pripisuje se jednostavnim fenolima - hidroksitirosolu (HTS) i tirosolu (TS). Ovi polifenoli masline sve se više istražuju zbog svojih antioksidativnih, protuupalnih, kardioprotektivnih, neuroprotektivnih, antikancerogenih, antidijabetičkih, antimikrobnih i drugih svojstava. (Karković Marković i sur., 2019.)

#### 1.3.1. Hidroksitirosol (3,4 – dihidroksifeniletanol, HTS)



**Slika 2:** Prikaz strukture hidroksitirosola (<https://www.biomol.com/>).

Hidroksitirosol je glavni fenolni spoj u maslinovom ulju i komini masline koji ima sposobnost "gašenja" slobodnih radikala i kelacije metala, stoga je u početku većina bioloških učinaka HTS-a povezivana isključivo s njegovim antioksidacijskim djelovanjem. Značajna antioksidativna učinkovitost pripisuje se prisutnosti o-hidroksifenilne skupine koja donira atom vodika peroksil-radikalima ( $\text{ROO}^*$ ) te se na taj način prilično reaktivni  $\text{ROO}^*$  zamjenjuje  $\text{HTS}^*$  radikalom koji je nereaktivan zbog prisutnosti intramolekularne vodikove veze u fenoksi radikalima.



**Slika 3:** Pretpostavljeni mehanizam antioksidativnog djelovanja hidroksitirosola (Karković Marković i sur., 2019.).

Pretpostavlja se da ovo nije jedini mehanizam djelovanja HTS-a na zdravlje, stoga se proučavaju i drugi putevi antioksidativnog djelovanja, primjerice poticanje endogenih obrambenih sustava protiv oksidativnog stresa kroz aktivaciju različitih signalnih puteva u stanicama. HTS također ima značajna protuupalna svojstva. *In vitro* i *in vivo* istraživanja pokazuju utišavanje enzima iNOS i COX-2, smanjenje ekspresije TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  te inhibiciju aktivacije granulocita i monocita.

### 1.3.1.1. Antiaterogeno i kardioprotektivno djelovanje

HTS ima terapijski potencijal u liječenju ateroskleroze. Ateroskleroza je upalna bolest vaskularnog endotela, a neki od čimbenika koji utječu na endotelnu funkciju su i prisustvo reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u suvišku, hiperkolesterolemija i drugi. Oksidacija LDL kolesterola jedan je od ključnih koraka u inicijaciji stvaranja aterosklerotskih lezija, a HTS se pokazuje vrlo uspješnim u prevenciji lipidne peroksidacije i zaštite LDL-a od oksidacije. Osim sprječavanjem oksidacije LDL-a, HTS može djelovati antiaterosklerotski ublažavanjem upalnog odgovora uzrokovanog flavin monooksigenazom 3 (FMN3), enzimom koji je dokazano uključen u inicijaciju razvoja ateroskleroze. (Karković Marković i sur., 2019.) U kliničkoj studiji u kojoj su dobrovoljci s blagom hiperlipidemijom suplementirani s dnevnom dozom od 45 mg HTS-a tijekom 8 tjedana, nije primijećen izravan utjecaj na trigliceride, LDL, HDL i ukupni kolesterol u krvi. Ipak, u istoj je studiji već od 4. tjedna primijećena dvostruka endogena razina vitamina C. Povećana endogena razina vitamina C može se izravno povezati s antioksidativnim djelovanjem HTS-a. S obzirom na to da vitamin C regenerira  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) iz  $\alpha$ -tokoferil radikala, a  $\alpha$ -tokoferol je jedan od glavnih antioksidansa LDL-kolesterola, rezultat navedene studije mogao bi povezati

HTS s indirektnim mehanizmom zaštite od oksidacije LDL-a. (Lopez-Huertas i sur., 2017.) Druga je klinička studija pokazala kako redoviti unos 15 mg HTS-a dnevno modulira antioksidacijski profil, ekspresiju upalnih gena i oksidativnog stresa kod ateroskleroze. (Colica i sur., 2017.) Osim na samo stvaranje ateroskleroznih lezija, ovo je istraživanje na štakorima pokazalo da bi HTS mogao imati inhibicijski učinak i na stvaranje tromba. Stvaranje tromba kod ateroskleroze posebno je opasno jer tromb može začepiti ateroskleroznu krvnu žilu i uzrokovati tromboemboliju koja često rezultira infarktom miokarda ili moždanim udarom. U prevenciji tromboembolije najčešće se koristi acetilsalicilna kiselina (ASA), čiji se antiagregacijski učinak veže uz dva mehanizma - inhibiciju sinteze tromboksana i povećanje sinteze NO. U navedenoj su studiji uspoređivani učinci različitih doza HTS-acetata, HTS-a i ASA-e na agregaciju trombocita u štakora. Pokazano je da kod štakora oralna primjena HTS-a i HTS-acetata rezultira inhibicijom agregacije trombocita i to upravo inhibicijom tromboksana i povećanjem sinteze NO. Zbog rezultata navedenog istraživanja, HTS i derivati mogli bi se potencijalno koristiti kao alternativa ASA-i u prevenciji tromboembolije. Ipak, potrebno je provesti daljnja istraživanja. (Gonzalez-Correa i sur. 2008.)

### **1.3.1.2. Antidijabetičko djelovanje**

Dijabetes melitus kronična je metabolička bolest kod koje poremećaj izlučivanja inzulina ili pak inzulinska rezistencija dovode organizam do stanja trajne hiperglikemije. Kronična hiperglikemija inducira oksidativni stres koji može uzrokovati razvoj kroničnih vaskularnih komplikacija kao što su: retinopatija, nefropatija, neuropatija, moždani udar, ishemijske srčane bolesti i periferne vaskularne bolesti. Zbog svojih antioksidativnih svojstava HTS ima potencijal u zaštiti od bolesti koje se povezuju s oksidativnim stresom te bi se zbog toga mogao koristiti u prevenciji kroničnih komplikacija kod dijabetesa. Nekoliko *in vitro* i *in vivo* studija navode značajno antidijabetičko djelovanje HTS-a (Vlavcheski i sur., 2019.) *In vitro* istraživanje na asterocitima pokazalo je da HTS poboljšava osjetljivost na inzulin i vraća pravilnu inzulinsku signalizaciju. Glavni učinak inzulinskog signaliziranja u asterocitima poticanje je unosa glukoze u stanicu pomoću GLUT2

transportera, a blokiranjem inzulinskog puta zabilježeno je smanjenje ekspresije gena za GLUT2. Suplementiranjem HTS-om ponovno je povećana ekspresija GLUT2 transportera i omogućena normalna inzulinska signalizacija. (Crespo i sur., 2017.) Istraživanje na dijabetičkim štakorima, kod kojih je HTS, osim smanjenja koncentracije glukoze u serumu, uzrokovao i značajno povećanje hepatske koncentracije glikogena, pokazalo je kako bi mogući mehanizam hipoglikemijskog djelovanja HTS-a mogao biti i poticanje sinteze glikogena. (Jemai i sur., 2009.)

### **1.3.1.3. Neuroprotektivno djelovanje**

Alzheimerova i Parkinsonova bolest dvije su najčešće neurodegenerativne bolesti u osoba starije životne dobi, a spektar lijekova raspoloživih za liječenje ovih bolesti vrlo je uzak. Neuroprotektivni učinci HTS-a proučavani su velikim brojem *in vitro* i *in vivo* studija kojima je dokazano da HTS i njegov metabolit, HTS-sulfat prolaze krvno-moždanu barijeru, nakupljaju se u mozgu i smanjuju oksidativni stres u neuronima. (Lopez de las Hazas i sur., 2018.). Učinak HTS-a istraživan je na *in vitro* na modelima Alzheimerove bolesti u kojima se pokazalo da štiti neurone od toksičnosti uzrokovane amiloidom- $\beta$  i abnormalnim nakupljanjem proteina tau, što je karakteristično za Alzheimerovu bolest. (Rodriguez-Morato i sur., 2015.) Također se pokazalo da u PC12 stanicama, koje se koriste kao *in vitro* model Parkinsonove bolesti, HTS inhibira kako enzimsku tako i spontanu oksidaciju endogenog dopamina, ublažava nastajanje slobodnih radikala tijekom MAO inhibicije, ima zaštitni učinak protiv dopaminom i 6-hidroksidopaminom inducirane smrti dopaminergičkih stanica te suzbija toksičnost izazvanu  $\alpha$ -sinukleinom. (Goldstein i sur., 2016., Hornedo-Ortega i sur., 2018.)

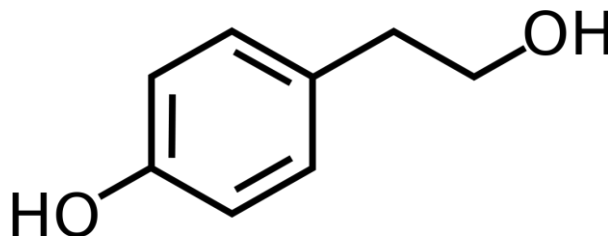
#### 1.3.1.4. Antikancerogeno djelovanje

Tijekom posljednjih desetak godina velikim brojem *in vitro* i *in vivo* studija pokazana je potencijalna antikancerogena učinkovitost HTS-a. Najbolje istražen antikancerogeni mehanizam djelovanja HTS-a je autooksidacija HTS-a koja dovodi do akumulacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u stanicama karcinoma. Recentne *in vitro* studije u kojima je istraživani utjecaj HTS-a na različite vrste humanih karcinoma, pokazale su antiproliferativno i proapoptotičko djelovanje HTS-a koje nije povezano s nakupljanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u stanicama već se antikancerogeni učinci postižu drugim mehanizmima. (Fabiani i sur., 2012., Rigacci i sur., 2016.) Velik broj istraživanja usmjeren je na rak debelog crijeva koji kao treći najčešći rak na svijetu ima sve veću incidenciju i smrtnost u zemljama u razvoju (gdje prije nije bio toliko prisutan). (Karković Marković i sur., 2019.) Iako je HTS u maslinovom ulju prisutan u niskim koncentracijama, u crijevu mu koncentracije rastu i to najvjerojatnije zbog gastrične hidrolize i kolonske fermentacije drugih kompleksnijih polifenola prisutnih u maslinovom ulju tijekom kojih se oslobađa HTS. (Corona i sur., 2006.) Primijećeno je da polifenoli iz maslinovog ulja *in vitro* djeluju antiproliferativno na stanice adenokarcinoma ljudskih crijeva tako što inhibiraju ERK1/2 fosforilaciju i smanjuju ekspresiju gena za ciklin D1. (Corona i sur., 2009.)

#### 1.3.1.5. Antimikrobno djelovanje

*In vitro* studije pokazuju da HTS postiže značajnu antimikrobnu aktivnost već u niskim koncentracijama, kako prema patogenima (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enterica* i dr.) tako i prema komenzalima (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*). Osim toga, HTS inhibira hemolitičku aktivnost induciranu streptolizinom O kojeg izlučuje *Streptococcus pyogenes*. HTS je također svrstan u posebnu skupinu inhibitora HIV-1 koji djeluje tako da sprječava ulazak virusa HIV-a u stanice domaćina. Također, pokazano je da HTS može inaktivirati virus influence tipa A, što upućuje na to da bi mehanizam antiviralnog djelovanja mogao biti povezan virusnom ovojnicu. (Karković Marković i sur., 2019.)

### 1.3.2. Tirosol (2-(4-hidroksifenil)-etanol, TS)



Slika 4: Prikaz strukture tirosola (<https://www.biomol.com/>).

Usprkos slabom antioksidacijskom djelovanju *in vitro*, tirosol se *in vivo*, zbog značajne unutarstanične akumulacije, pokazao kao učinkovit stanični antioksidans. (Di Benedetto i sur., 2007.) U usporedbi s drugim polifenolima, prilično je stabilan spoj te je znatno manje podložan autooksidaciji. Pokazalo se da antioksidacijsku aktivnost zadržava čak i u kritičnim uvjetima. U prisutnosti oksidiranog LDL-a, kad je proces autooksidacije već počeo, TS zadržava antioksidacijsku aktivnost, dok su inače aktivniji flavonoidi pokazali drastično smanjenje antioksidacijske aktivnosti te u nekim slučajevima čak postali i prooksidansi. (Perona i sur., 2006.)

#### 1.3.2.1. Antiaterogeno i kardioprotektivno djelovanje

Pokazalo se da TS djelovanjem na imunološki sustav (moduliranjem klastera diferencijacije 14 (CD14) i inhibicijom upale), pokazuje pozitivan učinak na: hipertenziju, aterosklerozu, koronarne bolesti srca, kronično srčano zatajenje, inzulinsku rezistenciju i pretilost. (Chang i sur., 2019.) Antiaterogeno djelovanje, također, pokazuje i zbog inhibicije proizvodnje leukotriena B4 koji potiče adheziju i aktivaciju leukocita u endotelu te na taj način negativno utječe na endotelnu funkciju. (Perona i sur., 2006.) Danas je jasno da postoji potreba za novim terapijskim strategijama u liječenju arterijske hipertenzije koje bi osim same razine krvnog tlaka trebale uzeti u obzir i druge čimbenike rizika koji dovode do razvoja kardiovaskularnih komplikacija. Jedan od takvih čimbenika rizika za razvoj

hipertenzije je sindrom hiperviskoznosti. *In vitro* istraživanja pokazuju da TS ograničava povećanje viskoznosti krvi, a njegov učinak usporediv je s djelovanjem pentoksifilina. Također, istraživanja na hipertenzivnim štakorima pokazala su da TS ograničava razvoj hiperviskoznosti, poboljšava kapacitet transporta kisika i eliminira mikrovaskularno razrjeđenje u cerebralnom korteksu. (Plotnikov i sur., 2018.)

### **1.3.2.2. Antidijabetičko djelovanje**

Upala i oksidativni stres dva su glavna čimbenika uključena u kardiovaskularne komplikacije kod pacijenata s dijabetesom melitusom. Pokazalo se kako povećani oksidativni stres potiče aktivaciju transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B p65 koji aktivira sintezu različitih proupalnih citokina. Tako sintetizirani proupalni citokini, kao što su TNF $\alpha$  i IL-6, dokazano moduliraju inzulinsku rezistenciju u jetri i mišićima. Istraživanje na dijabetičkim štakorima pokazalo je kako je TS svojim antioksidativnim i protuupalnim djelovanjem značajno reducirao oksidativni stres i upalu inhibicijom aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B p65. Inhibicijom aktivacije NF- $\kappa$ B p65 posljedično je reducirana sinteza citokina TNF $\alpha$  i IL-6, što je dovelo do povećanja koncentracije inzulina te smanjenja koncentracije glukoze u plazmi dijabetičkih štakora. (Chandramohan i sur., 2016.)

### **1.3.2.3. Neuroprotektivno djelovanje**

TS pokazuje potencijalno neuroprotektivno djelovanje kod Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Istraživanje na kulturama stanica neuroblastoma (N2a), *in vitro* modelu Alzheimerove bolesti, pokazalo je kako TS i HTS preveniraju apoptozu uzrokovanu amiloidom- $\beta$ . Kod Alzheimerove bolesti prekomjerna translokacija transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B u jezgru stanice inducira prekomjernu ekspresiju amiloida- $\beta$ , što posljedično uzrokuje kroničnu upalu mozga. Primijećeno je da TS i HTS reduciraju translokaciju NF- $\kappa$ B u jezgru N2a stanica, što sugerira da svoje protektivne učinke ostvaruju primarno imunomodulatornim djelovanjem. Kao model Parkinsonove bolesti *in vitro* često se koriste 1-metil-4-fenilpiridinom (MPP+) tretirane stanice jer MPP+ selektivno ulazi u dopaminergičke neurone i inhibira lanac transporta elektrona u mitohondrijima, što uzrokuje oksidativni stres te naposljetku

uzrokuje staničnu smrt. *In vitro* istraživanje protektivnog djelovanja TS-a od MPP+-om inducirane stanične smrti dopaminergičnih neurona pokazalo je da TS smanjuje mitohondrijsku disfunkciju i intracelularnu ATP depleciju, koja se povezuje sa ishemijskom i dovodi do nekroze stanica. Također se pokazalo kako TS, u ovim specifičnim eksperimentalnim uvjetima, djeluje neuroprotektivno i povećanjem ekspresije antioksidativnih enzima superoksid dismutaze 1 (SOD-1), superoksid dismutaze 2 (SOD-2) i DJ-1 te povećavanjem aktivacije Akt-signalnog puta koji se povezuje s preživljavanjem i rastom stanice. (Angeloni i sur. 2017.)

#### **1.3.2.4. Antimikrobno djelovanje**

TS *in vitro* posjeduje snažno djelovanje protiv nekoliko sojeva bakterija odgovornih za crijevne i respiratorne infekcije. Antibakterijska svojstva TS-a mogu se povezati sa vezanjem i inhibicijom bakterijske ATP-sintaze. Također su primijećena antitripanosomska i antilišmanijska svojstva, no u tom smislu potrebna su daljnja istraživanja. (Medina i sur., 2006.; Amini i sur., 2017.; Belmonte-Reche i sur., 2016.)

#### **1.4. Biodostupnost i bioraspoloživost polifenola masline**

Biodostupnost se definira kao frakcija nutrijenta koja se tijekom probave oslobodi iz matriksa namirnice i dostupna je za apsorpciju u tankom crijevu. Taj pojam bitno je razlikovati od pojma bioraspoloživosti koja se definira kao udio nutrijenta koji nakon unosa *per os* dospije do sistemske cirkulacije ili specifičnog mjesta djelovanja. Drugim riječima, bioraspoloživost je količina unesenih polifenola koja je u stanju utjecati na ciljna tkiva. Molekula može imati snažnu antioksidacijsku aktivnost *in vitro*, no *in vivo* može pokazivati vrlo malu biološku aktivnost jer vrlo mala količina ishodnog spoja dospije u ciljna tkiva. Najzastupljeniji polifenoli u našoj prehrani, stoga, nisu nužno oni koji imaju najbolji profil bioraspoloživosti. Prema tome, nije dovoljno znati količinu antioksidansa koju pojedina hrana ili dodatak prehrani sadrži, već je važnije znati koliko je od toga zapravo bioraspoloživo. (D'Archivio i sur., 2010.) Studije na životinjama i ljudima pokazuju da polifenoli iz maslinovog ulja imaju vrlo dobru apsorpciju *in vivo* te je potvrđena i prisutnost HTS-a, TS-a i njihovih



metabolita u krvi i urinu nakon ingestije. (Vissers i sur., 2002.) Važno je, ipak, naglasiti da je primijećena smanjena bioraspoloživost HTS-a i TS-a primijenjenih u vodenoj otopini, u odnosu na primjenu u matriksu maslinovog ulja. Povećana bioraspoloživost promatranih polifenola u matriksu maslinovog ulja može biti posljedica prisutnosti drugih antioksidansa iz maslinovog ulja koji sprječavaju raspad ispitivanih polifenolnih spojeva u gastrointestinalnom traktu prije njihove apsorpcije. (Tuck i sur., 2001.)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Komina masline ekotoksičan je nusprodukt koji nastaje prilikom proizvodnje maslinovog ulja te ima visok sadržaj karakterističnih polifenola, najviše hidroksitirosola i tirosola. S obzirom na to da polifenoli maslinovog ulja pokazuju kardioprotektivna, antidijabetička, antikancerogena, neuroprotektivna i antimikrobna svojstva, polifenolima bogat ekstrakt komine masline mogao bi imati potencijal za uporabu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Učinci pojedinih polifenola, ipak, značajno ovise o sadržaju u namirnici/dodatku prehrani te o njihovoj biodostupnosti i bioraspoloživosti. Iako su biodostupnost i bioraspoloživost hidroksitirosola i tirosola iz maslinovog ulja relativno dobre te je dokazana prisutnost oba polifenola u krvi nakon ingestije maslinovog ulja, biodostupnost hidroksitirosola i tirosola iz ekstrakta komine masline do danas nije istražena. Stoga su osnovni ciljevi istraživanja bili usporediti količine biodostupnih frakcija hidroksitirosola i tirosola u ekstraktu komine masline i u maslinovom ulju te u tom smislu vrednovati ekstrakt komine masline kao alternativni izvor hidroksitirosola i tirosola u prehrani. Konkretni ciljevi rada su:

- usporediti udio HTS-a i TS-a u suhim ekstraktima komine masline s onima u maslinovom ulju
- optimirati *in vitro* metodu za simulaciju probave maslinovog ulja (što je zahtjevno zbog njegove lipofilnosti – kao i za druge vrste masti i ulja) i odrediti udio biodostupne frakcije HTS-a i TS-a u ulju
- odrediti *in vitro* biodostupne frakcije HTS-a i TS-a u ekstraktu komine masline

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

#### **3.1. Priprema ekstrakata komine masline**

Ekstrakt komine masline pripremljen je prema prethodno optimiranom postupku (Radić i sur, 2020). Zaleđena komina masline odmrznuta je, homogenizirana i vagana. Na 8 g suhe odmašćene komine dodano je 400 mL 60 % EtOH (nativni uzorak). Ekstrakcija je provedena na temperaturi od 70°C 2 h, pri 110 rpm.

Uzorak je nakon ekstrakcije centrifugiran na 4000 rpm, 15 minuta. Supernatant je profiltriran kroz gusti filter papir. Nakon uklanjanja etanola u rotavaporu, uzorci su liofilizirani i dobiven je ekstrakt komine masline korišten za daljnje analize.

#### **3.2. Ekstrakcija polifenola iz maslinovog ulja**

Ekstrakcija polifenola iz maslinovog ulja provedena je prema postupku Selquera i suradnika (2015). Ukratko, 250 mg maslinovog ulja ekstrahirano je sa 2,5 mL otapala metanol/voda (1:1, pH 2 – zakiseljeno dodatkom kloridne kiseline). Ekstrakcija je provedena na sobnoj temperaturi, u trajanju od 60 minuta, pri 220 rpm. Uzorak je zatim centrifugiran pri 2500 g, u trajanju od 10 min, na temperaturi od 4°C. Otpipetirano je i spremljeno 2 mL supernatanta, a lipidni ostatak korišten je za sekundarnu ekstrakciju. U navedeni lipidni ostatak otpipetirano je 2,5 mL otapala aceton/voda (7:3) te je ekstrakcija provedena 30 minuta prema prethodno opisanim uvjetima. Uzorak je centrifugiran, a 2 mL supernatanta ponovno je pokupljeno i pomiješano s metanolnim ekstraktom. Dobiveni ekstrakt maslinovog ulja korišten je za daljnje analize.

### **3.3. Simulacija probave ekstrakta komine masline i maslinovog ulja – standardizirana *in vitro* metoda**

*In vitro* istraživanje biodostupnosti provedeno je prema standardiziranoj metodi u skladu s protokolom Minekusa i suradnika (2014). Prije izrade reakcijskih smjesa sve su kemikalije i reagensi zagrijani na 37°C.

#### Gastrična faza

U kivete (50 mL) je dodano redom, u duplikatu: 200 mg ekstrakta komine masline i 200 µL maslinovog ulja; u svaki uzorak je dodano 1800 µL destilirane vode te su uzorci homogenizirani vorteksiranjem. Također, u duplikatu je pripravljena i slijepa proba koja je sadržavala samo destiliranu vodu (1800 µL). U sve uzorke je dodano 1,875 mL simulirane gastrične tekućine (SGF, eng. Simulated Gastric Fluid), 0,4 mL otopine pepsina, 1,25 µL 0,3 M CaCl<sub>2</sub> te 0,05 mL 1 M HCl-a. SGF otopina pripravljena je tako što je u odmjernu tikvicu od 200 mL otpipetirano 3,455 mL KCl-a, 0,45 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,25 mL NaHCO<sub>3</sub>, 5,9 mL NaCl, 0,2 mL MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>, 0,25 mL (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> te je ista nadopunjena do oznake destiliranom vodom (1,25 x koncentrat). pH je podešen na 3. (Za podešavanje pH je bilo potrebno oko 6,3 mL 1 M HCl-a). Otopina je do pokusa pohranjena na -20°C. Otopina pepsina pripravljena je vaganjem 50 mg pepsina i otapanjem u 1 mL SGF otopine (25000U/mL). Nakon dodavanja SGF otopine i pepsina, pH reakcijske smjese i podešen na 3 te je otopini dodano 0,174 mL vode. Kivete su dobro zatvorene, sadržaj je homogeniziran te inkubiran na temperaturi od 37 °C u vremenu od 2 h u vodenoj kupelji uz stalno protresanje. Tijekom inkubacije provjeravan je pH i podešavan na 3 pomoću 1 M HCl ili 1 M NaOH.

#### Intestinalna faza

Simulacija intestinalne faze probave provedena je na dva načina; korištenjem dvije različite koncentracije pankreatina. Naime, količina predložena standardnom metodom je značajno povećana (u dodatnom uzorku) kako bismo se uvjerali da uvjeti standardne metode osiguravaju kompletnu digestiju uzorka (s visokim sadržajem masti). Pripravljene su dvije različite otopine pankreatina (*a* i *b*) s različitim koncentracijama pankreatina: 8 mg pankreatina otopljeno u 1 mL SIF otopine (800

U/mL) (a) i 16 mg pankreatina i otapanjem u 1 mL SIF otopine (1600 U/mL) (b). Nakon simulacije gastrične faze probave svakom je uzorku dodano 2,75 mL simulirane intestinalne tekućine (SIF, eng. Simulated Intestinal Fluid), 1,25 mL otopine pankreatina (*a* ili *b*), 0,625 mL žučnih soli (160 mM), 10 µL 0,3 M CaCl<sub>2</sub> te 0,0375 mL 1 M NaOH-a.

SIF otopina pripravljena je tako što je u odmjernu tikvicu od 200 mL otpipetirano 3,4 mL KCl-a, 0,4 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21,25 mL NaHCO<sub>3</sub>, 4,8 mL NaCl-a, 0,55 mL MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>, - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> te je ista nadopunjena do oznake destiliranom vodom (1,25 x koncentrat). pH je podešen na 7. (Za podešavanje pH je bilo potrebno oko 6,3 mL 1 M HCl-a). Otopina žučnih soli pripravljena je vaganjem 65,37 mg žučnih soli i otapanjem u 1 mL vode. Nakon dodavanja SGF otopine, pankreatina (otopine a i b) i žučnih soli, pH je po potrebi podešen na 7 te je na kraju uzorcima dodano 0,328 mL vode. Falcon kivete zatvorene su parafilmom i sadržaj homogeniziran te inkubiran na temperaturi od 37 °C u trajanju od 2 h u vodenoj kupelji uz stalno protresanje. Tijekom inkubacije provjeravan je pH i po potrebi podešavan na 7 pomoću 1 M HCl ili 1 M NaOH po potrebi. Po završetku simulacije probave uzorci su centrifugirani 10 minuta, pri 4000 o/min. Supernatant je otpipetiran u Falcon kivetu, a pelet bačen. Alikvot supernatanta od 2 mL profiltriran je kroz PES filtere od 0,45 µm u viala za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) te skladišten u zamrzivaču do provođenja kromatografske analize.

#### **3.4. Simulacija probave ekstrakta komine masline i maslinovog ulja–modifikacija standardizirane *in vitro* metode**

*In vitro* simulacija probave maslinovog ulja provedena je korištenjem standardnog postupka koji je korišten i za ekstrakt komine masline (Minekus i sur., 2014) te korištenjem još 6 modificiranih postupka u kojima su kombinirani različiti omjeri pankreatina, žučnih soli i gastrične lipaze kao što je prikazano u Tablici 1. Razlog za navedeno je činjenica da još uvijek ne postoji konsenzus o uvjetima provođenja *in vitro* simulacije digestije za uzorke hrane s visokim udjelom masti.

**Tablica 1:** Koncentracije radnih otopina pepsina, pankreatina, žučnih soli i lipaze korištene u različitim protokolima za istraživanje *in vitro* biodostupnosti.

	Pepsin (mg/mL)	Pankreatin (mg/mL)	Žučne soli (mg/mL)	Lipaza (mg/mL)
<b>Standardni protokol</b>	50	(a) 8 (b) 16	65,37	0
<b>Protokol 1</b>	50	50	200	0
<b>Protokol 2</b>	50	30	120	0
<b>Protokol 3</b>	50	20	80	0
<b>Protokol 4</b>	50	10	40,85	0
<b>Protokol 5</b>	50	8	65,37	27
<b>Protokol 6</b>	50	8	65,37	0

\* Korišteni volumeni radnih otopina enzima su isti u svim korištenim protokolima (kako je opisano u poglavlju 3.3);

\*\*Otopina lipaze pripremljena je tako što je 10,8 mg lipaze otopljeno u 0,4 mL SGF otopine (60U/mL).

### 3.5. Određivanje ukupnih fenola/ukupnog reduktivnog potencijala pomoću Folin-Ciocalteu metode

Za određivanje ukupnih fenola/ukupnog reduktivnog potencijala pomoću Folin-Ciocalteu (FC) metode korišten je originalni protokol Singletona i Rossija (1965), modificiran prema metodi Gaa i suradnika (2002). FC reagens smjesa je fosfovolframata i fosfomolibdata žute boje. Hidroksilne skupine fenolnih komponenti uzorka (ili drugih spojeva) imaju reduktivna svojstva te zbog toga reduciraju fosfomolibdate i fosfovolframate iz reagensa. Tim procesom nastaju plavo obojeni W(VI) i Mo(VI) kompleksi nepoznate strukture, a intenzitet obojenja proporcionalan je udjelu fenolnih komponenti uzorka (udjelu ukupnih reduktivnih spojeva u uzorku). Otopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pripremljena je otapanjem 6 g bezvodnog Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 80 mL vode, nakon čega je otopina prokuhana. Nakon hlađenja dodano je par kristala Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i otopina je ostavljena da stoji 24 h; zatim je profiltrirana kroz gusti filter papir i nadopunjena do 100 mL. Folin-Ciocalteu (FC) reagens je korišten nerazrijeđen. Probavljena frakcija ekstrakta komine masline i maslinovog ulja razrijeđena prije provođenja analitičkog postupka 10 puta. U 200 µL razrijeđenog ekstrakta dodano je

1.35 mL destilirane vode te 150  $\mu$ L FC reagensa te je uzorak dobro protresen. Nakon 5 minuta dodano je 1.5 mL 6%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i dobro protresena. Plavo obojenje reakcijske smjese razvija se tijekom 30 minuta inkubacije na 50°C. Nakon hlađenja reakcijske smjese apsorbancija svake otopine mjerena je spektrofotometrijski na 725 nm. Pomoću baždarnog dijagrama izračunata je količina ukupnih polifenola/ukupnog redukcijskog potencijala i izražena kao ekvivalenati galne kiseline (GAE eng. *Gallic Acid Equivalence*).

### **3.6. Određivanje antioksidacijskog potencijala korištenjem TEAC metode**

Antioksidacijski potencijal uzoraka određen je pomoću TEAC (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metode koja je provedena prema postupku Pellegrinija i suradnika (1999). TEAC je metoda određivanja antioksidativne aktivnosti koja mjeri sposobnost uzorka da hvata  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radikal kation, što rezultira smanjenjem apsorbancije reakcijske otopine i njenim obezbojenjem. Za dobivanje  $\text{ABTS}$  radikal kationa 7 mM otopina  $\text{ABTS}$ -a i 2,45 mM otopina kalijevog persulfata ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) pomiješane su u jednakim omjerima. Za dobivanje 7 mM  $\text{ABTS}$  stock otopine odvagano je 38,4 mg  $\text{ABTS}$ -a i otopljeno u 10 mL destilirane vode. Za dobivanje 2,45 mM otopine  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  odvagano je 66,2 mg  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  u 100 mL destilirane vode. Pri miješanju tih dviju otopina odmah počinje stvaranje  $\text{ABTS}$  radikala, što se očituje nastankom zeleno-plavog obojenja. Reakcija završava tek nakon više od 6 sati. Otopina se, zbog toga, do nastanka konačnog intenziteta boje, drži 12 sati u mraku, nakon čega se razrijedi tako da njena apsorbancija mjerena na 732 nm bude  $0,700 \pm 0,02$ . (1 ml+ cca 40 ml vode). Reakcijska smjesa radi se u kiveti, miješanjem 300  $\mu$ L 20 puta razrijeđenog ekstrakta komine i maslinovog ulja i 2,5 mL otopine  $\text{ABTS}$  radikala. Apsorbancija je mjerena nakon tri minute. Iz razlike početnog obojenja ( $A_{0\text{min}}$ ) i obojenja nakon 3 minute ( $A_{3\text{min}}$ ) izračunao se postotak obezbojenja i iz baždarnog dijagrama očitao antioksidacijski potencijal izražen kao  $\mu\text{g}$  ekvivalenta Trolox-a (vodotopljivi oblik vitamina E) u 1 mL ekstrakta ( $\mu\text{g TE/mL}$ ). S obzirom na to da je reakcija obezbojenja vrlo brza,  $A_0$  je zapravo nemoguće izmjeriti. Zato je  $A_0$  određen mjerenjem reakcijske smjese u koju je umjesto uzorka dodan isti alikvot EtOH.

### 3.7. Određivanje HTS-a i TS-a tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s fluorescencijskim detektorom (HPLC-FLD)

Pri određivanju sadržaja polifenola HTS-a i TS-a u ekstraktu komine masline i maslinovom ulju, korištena je obrnuto fazna C18 kromatografska kolona dimenzija  $250 \times 4,6$  mm i veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ . Za separaciju pikova korištena je metoda Tsarbopoulosa i suradnika (2003). Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20  $\mu\text{L}$ . Brzina protoka podešana je na 1 mL/min, a mjerenje je izvođeno pri sobnoj temperaturi. Korištena je gradijentna metoda u kojoj se mobilne faze (acetatni pufer i acetonitril) tijekom elucije miješaju u različitim omjerima prema Tablici 2.

**Tablica 2:** Koncentracijski gradijent otapala u primijenjenoj HPLC metodi.

t [min]	Protok otapala [mL min <sup>-1</sup> ]	Acetatni pufer [%]	Acetonitril [%]
0	1	90	10
4	1	80	20
8	1	40	60
11	1	30	70
15	1	90	10
20	1	90	10

Detekcija eluiranih pikova provedena je pomoću fluorescencijskog detektora pri valnim duljinama ekscitacije i emisije od 280 i 316 nm. HTS i TS identificirani su usporedbom vremena zadržavanja dobivenih pikova s vremenima zadržavanja standardnih otopina navedenih spojeva, a njihova koncentracija određena je postupkom integriranja površine pikova.



### **3.8. Statistička obrada podataka**

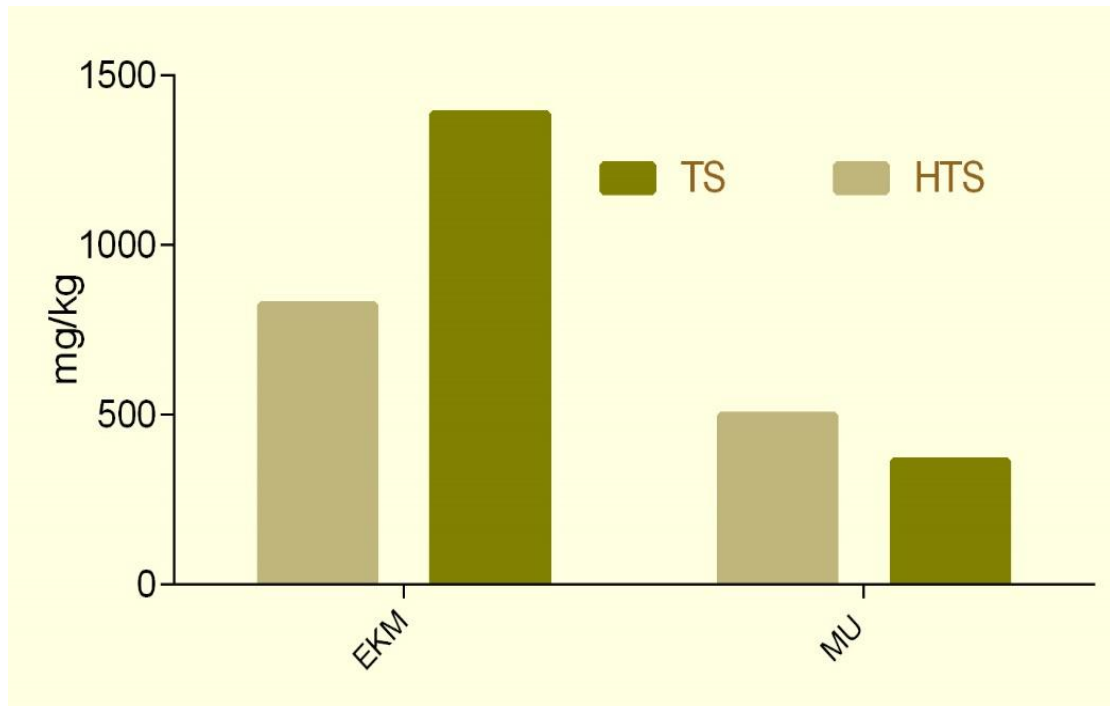
Sve ekstrakcije/simulacije digestije provedene su u duplikatu. Svaki ekstrakt analiziran je u duplikatu (n=4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti mjerenja  $\pm$  standardna devijacija. Značajnost razlika među pojedinim rezultatima istražena je primjenom Studentovog t-testa ili jednosmjerne analize varijance. Za statističku obradu rezultata korišten je programski paket GrafPad Prism ver. 8.4.2.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

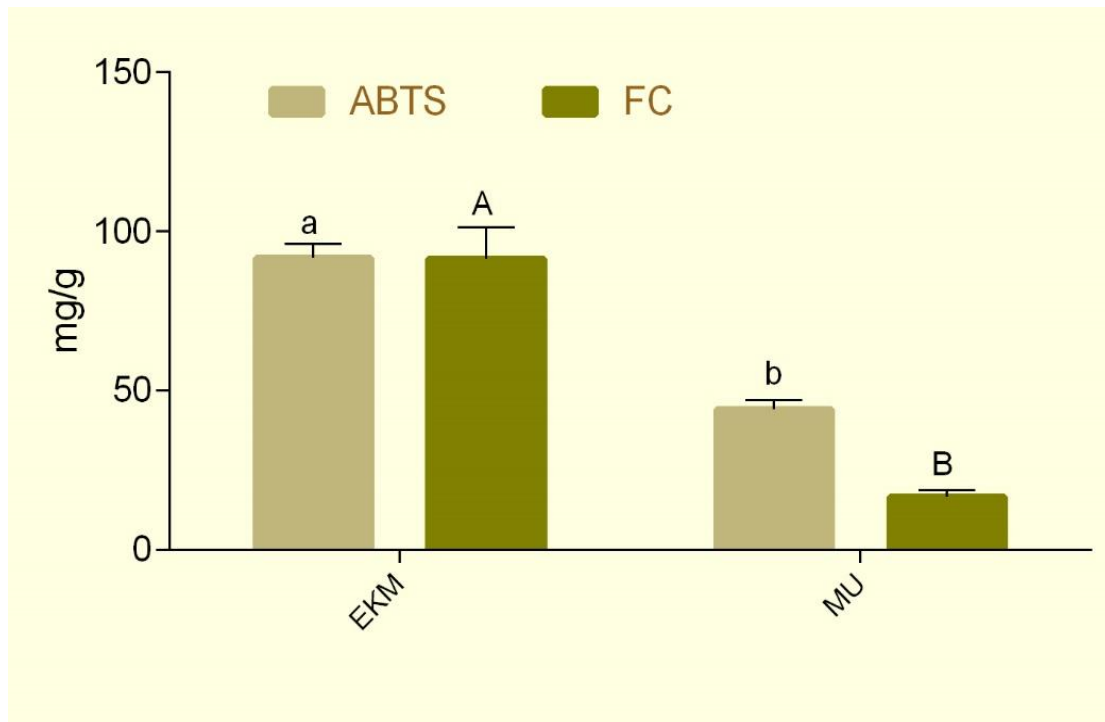
### **4.1. Usporedba sadržaja ukupnih antioksidansa, HTS-a i TS-a u uzorcima maslinovog ulja i ekstrakta komine masline**

Ekstrakti polifenola iz komine masline i maslinovog ulja pripremljeni su prema prethodno opisanim postupcima ekstrakcije, a s ciljem usporedbe ukupne količine polifenola u komini i maslinovom ulju. Ekstrakti su pripremljeni različitim metodama zbog različite lipofilnosti navedenih uzoraka. Količine HTS-a i TS-a u ekstraktu komine masline (EKM) i maslinovom ulju (MU) prikazane su na Slici 5a. Dobivene vrijednosti za EKM bile su: 823 mg/kg (HTS) i 1385 mg/kg (TS). U maslinovom ulju određene su značajno niže vrijednosti: 498 mg/kg (HTS) i 363 mg/kg (TS). Iz prikazanih rezultata vidljivo je da EKM sadrži značajno veću količinu polifenola od MU-a; udio HTS-a u EKM-u viši je 1,7 puta nego u MU-u, a udio TS-a čak 3,8 puta. Na Slici 5b vidljiva je značajno veća reduktivna i antioksidansna aktivnost EKM-a u odnosu na MU. ABTS antiradikalna učinkovitost EKM-a bila je 91,6 mg TE/g što je dvostruko više nego u MU-u (44 mg TE/g). Reduktivna učinkovitost EKM-a je čak 5,5 puta veća u odnosu na onu MU-a (slijedom 91,3 i 16,6 mg GAE/g). S druge strane, Cioffi i suradnici (2010) također su istraživali polifenole iz komine masline i maslinovog ulja, no u njihovom je radu pokazano da komina ima svega 5 % reduktivnih svojstava maslinovog ulja te je određena čak dvostruko manja koncentracija HTS-a i TS-a u komini nego u MU-u. Pri tome je važno napomenuti da su u spomenutom radu određivane koncentracije antioksidansa u sirovoj komini, dok je u našem istraživanju korišten ekstrakt polifenola komine masline, dakle koncentrirani izvor polifenolnih komponenti. Također, varijacije u rezultatima istraživanja sadržaja polifenola u komini masline i maslinovom ulju mogu se objasniti time što koncentracija polifenola uvelike ovisi o geografskom porijeklu, uvjetima kultivacije, vremenu branja, stanju plodova te uvjetima proizvodnje maslinovog ulja, stoga je očekivano da uzorci s različitih područja pokazuju različite rezultate. U našem istraživanju nije bilo moguće usporediti koncentracije polifenola u maslinovom ulju i komini koja je zaostala nakon proizvodnje baš tog maslinovog ulja, čime bi se dobio realniji uvid u količine polifenola koji zaostaju u komini nakon proizvodnje maslinovog ulja. Ipak, prema dostupnim literaturnim podacima, zbog svoje

hidrofilnosti, polifenoli u manjem udjelu prelaze u maslinovo ulje, a u većem (do 80 %) zaostaju u komini i vegetativnoj vodi (Cioffi i sur., 2010) što je u skladu s našim rezultatima.



**Slika 5a.** Udio hidroksitirosola (HTS) i tirosola (TS) u ekstraktu komine masline (EKM) i maslinovom ulju (MU).



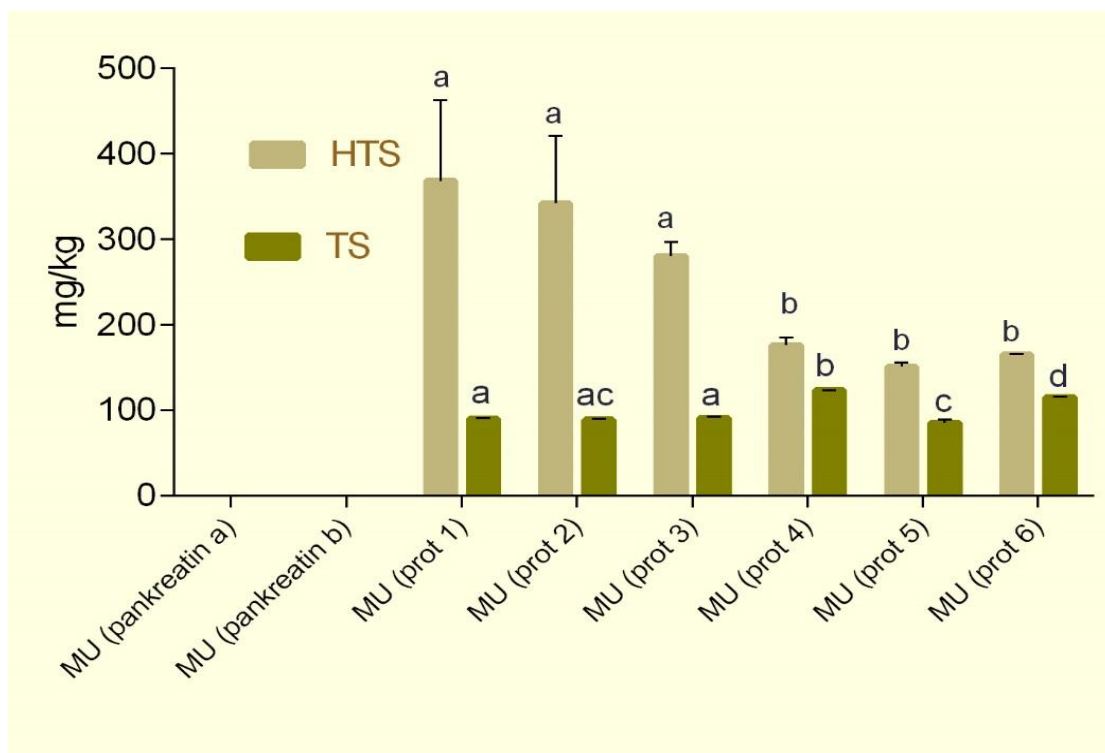
**Slika 5b.** Antiradikalna (ABTS) i reduktivna (FC) učinkovitost ekstrakta komine masline (EKM) i maslinovog ulja (MU).

*Različita slova iznad uzoraka iste serije označuju statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) određene Studentovim t-testom.*

## 4.2. Optimizacija digestije maslinovog ulja

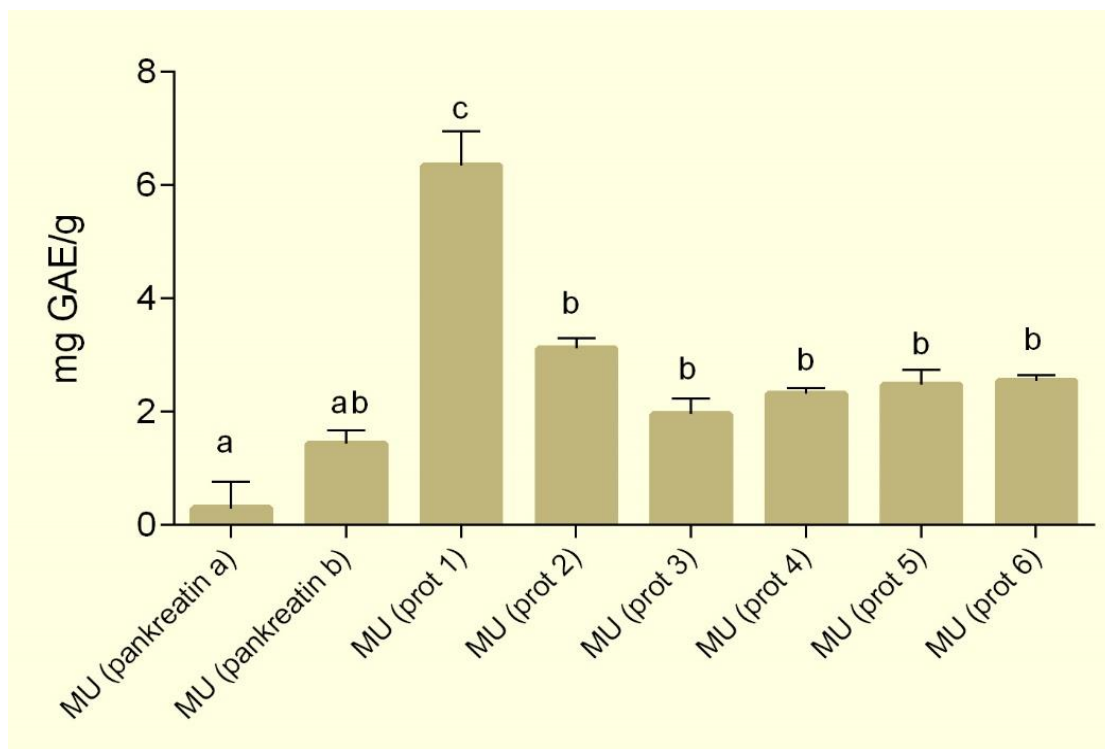
*In vitro* simulacija probave maslinovog ulja zbog njegove je lipofilnosti vrlo zahtjevna te trenutno ne postoji konsenzus o optimalnim uvjetima provođenja simulacije *in vitro* digestije pa je postupak potrebno optimizirati. Prva su dva uzorka MU-a tretirana prema standardiziranom protokolu za *in vitro* simulaciju probave maslinovog ulja, detaljno opisanog u poglavlju 3.3. Analizom HPLC-FLD metodom, zbog premale koncentracije polifenola u uzorku i premale osjetljivosti metode, ni u jednom od ta dva uzorka nije dokazana prisutnost HTS-a i TS-a. Ipak, FC i TEAC metode pokazale su kako dodatak veće količine pankreatina (pankreatin b) tijekom simulacije probave uzrokuje značajno veću reduktivnu i antiradikalnu učinkovitost probavljenog uzorka (što je vjerojatno posljedica prisustva drugih antioksidansa u uzorku-npr. vitamina E). Zbog značajnog utjecaja količine pankreatina na dobivene rezultate, standardizirana metoda simulacije probave maslinovog ulja je dalje modificirana prema Tablici 1. Rezultati prikazani na Slici 6a pokazuju da količina biodostupnog HTS-a proporcionalno raste s porastom količine pankreatina i žučnih soli u reakcijskoj smjesi. Tako je koncentracija HTS-a dobivena protokolom 4 svega 176  $\mu\text{g/g}$  uzorka, a protokolom 1, u kojem je dodana 5 puta veća koncentracija pankreatina i žučnih soli, čak 368  $\mu\text{g/g}$  uzorka. Na Slici 6a možemo vidjeti da dodatak različitih koncentracija pankreatina i žučnih soli nije značajno utjecao na koncentraciju biodostupnog TS-a. Rezultati dobiveni pomoću FC metode u skladu su s rezultatima dobivenim HPLC-FLD metodom (Slika 6b). Dodatkom najveće koncentracije pankreatina i žučnih soli (protokol 1) određena je najveća reduktivna učinkovitost biodostupne frakcije MU-a. Rezultati dobiveni TEAC metodom nisu u potpunosti u skladu s rezultatima dobivenim ostalim metodama jer ne pokazuju linearnu ovisnost dodanih koncentracija probavnih enzima s antiradikalnom aktivnošću u pojedinim uzorcima (Slika 6c). Ipak, uzorci tretirani prema protokolima 1-4 pokazuju veću antiradikalnu sposobnost od uzoraka tretiranim prema standardiziranom protokolu. Prema Samsu i suradnicima (2016) za reprezentativnu i učinkovitu provedbu *in vitro* simulacije probave od iznimne je važnosti dodatak lipaze u gastričnoj fazi probave pa je tako standardizirana metoda *in vitro* simulacije probave modificirana dodatkom gastrične lipaze prema Tablici 1 (protokoli 5-6).

Uspoređujući koncentracije TS-a i HTS-a u uzorcima u kojima je standardizirana metoda simulacije probave modificirana prema protokolima 5 i 6, ne postoji gotovo nikakva razlika u biodostupnosti polifenola iz uzorka MU-a s dodanom gastričnom lipazom i onog bez dodane gastrične lipaze. Rezultati dobiveni HPLC-FLD metodom (Slika 6a) u potpunosti su u skladu s rezultatima dobivenima FC metodom (Slika 6b), dok TEAC metoda (Slika 6c) pokazuje značajno manju antioksidativnu učinkovitost u uzorku MU-a s dodanom gastričnom lipazom, u odnosu na uzorak MU-a bez nje. Razlog ovakvih rezultata mogla bi biti interferencija gastrične lipaze i neke od antioksidativnih sastavnica MU-a koja je eventualno mogla spriječiti antioksidativnu aktivnost MU-a. Uspoređujući rezultate dobivene nakon svih provedenih modifikacija zaključeno je da je najbolja metoda za *in vitro* simulaciju probave ona opisana protokolom 1 jer u usporedbi s ostalim provedenim modifikacijama, prema svim metodama analize, pokazuje najveću reduktivnu i antiradikalnu učinkovitost uzorka. Iako je protokolom 1 dobivena i apsolutno najveća količina biodostupnog HTS-a, zbog velikih standardnih devijacija dobivene vrijednosti nisu se statistički razlikovale od onih dobivenih protokolima 2 i 3 te se u tom smislu sva tri protokola mogu smatrati pogodnima za utvrđivanje biodostupnih frakcija HTS-a i TS-a iz MU-a (Slika 6a). Također, protokoli 1-3 pokazali su se jednako učinkovitim u smislu određivanja antiradikalne aktivnosti biodostupne frakcije maslinovog ulja (Slika 6c). Ipak, dostatne količine pankreatina (prema protokolu 1) apsolutno su nužne za točno određivanje količine biodostupnih reducensa, kako je vidljivo iz Slike 6b. Pretpostavljamo da su uvjeti enzimatske hidrolize prema protokolu 1 nužni za adekvatnu hidrolizu i solubilizaciju vitamina E koji onda značajno doprinosi antioksidativnoj učinkovitosti biodostupne frakcije.



Slika 6a. Utjecaj različitih uvjeta *in vitro* simulacije probave na prinos biodostupne frakcije hidrokstirosola (HTS) i tirozola (TS).

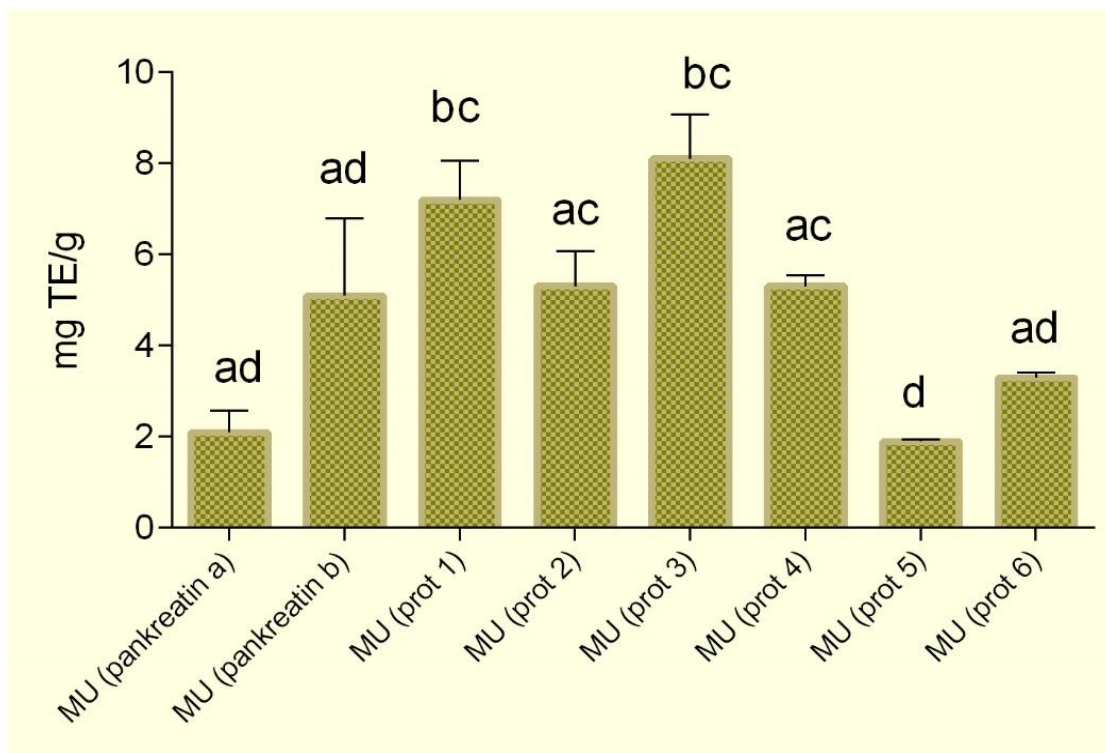
*MU*-maslinovo ulje; *prot 1-6*- protokoli 1-6 opisani u Tablici 1. Različita slova iznad uzoraka iste serije označavaju postojanje statistički značajne razlike određene jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* Tukey-ovim testom.



Slika 6b. Utjecaj različitih uvjeta *in vitro* simulacije probave na reduktivnu učinkovitost biodostupne frakcije maslinovog ulja.

GAE-ekvivalenti galne kiseline; MU-maslinovo ulje; prot 1-6- protokoli 1-6 opisani u Tablici 1. Različita slova iznad uzoraka iste serije označavaju postojanje statistički značajne razlike određene jednosmjernom analizom varijance i *post hoc* Tukey-ovim testom.





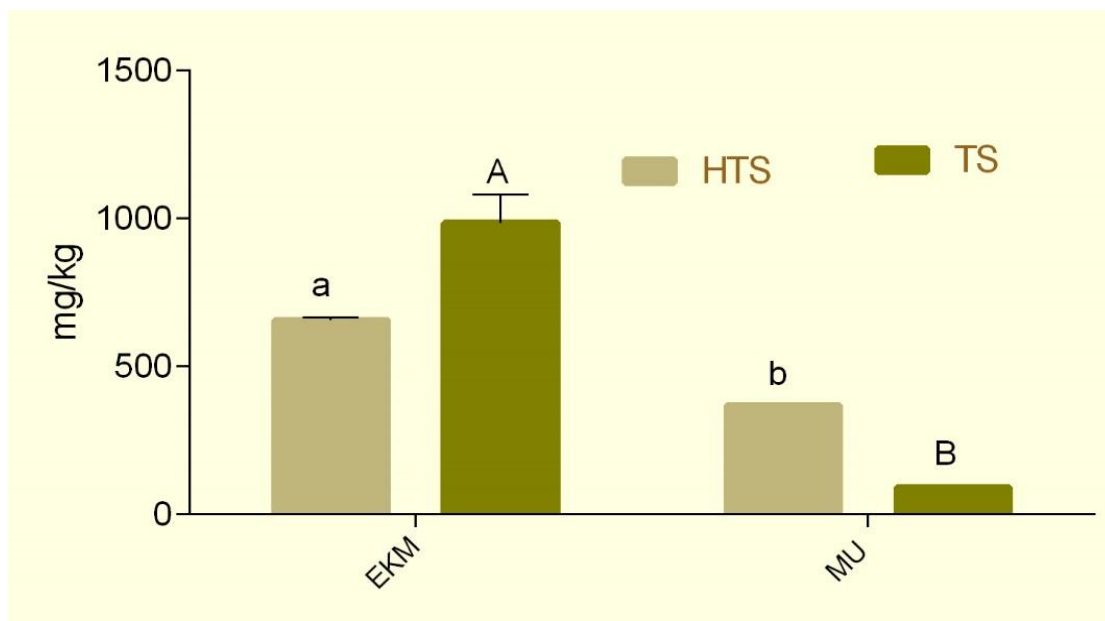
**Slika 6c.** Utjecaj različitih uvjeta *in vitro* simulacije probave na antiradikalnu učinkovitost (ABTS) biodostupne frakcije maslinovog ulja.

*TE-ekvivalenti Trolox<sup>®</sup>-a; MU-maslinovo ulje; prot 1-6- protokoli 1-6 opisani u Tablici 1. Različita slova iznad uzoraka iste serije označavaju postojanje statistički značajne razlike određene jednosmjernom analizom varijance i post hoc Tukey-ovim testom.*

### **4.3. Usporedba biodostupnih frakcija polifenola/antioksidansa maslinovog ulja i ekstrakta komine masline**

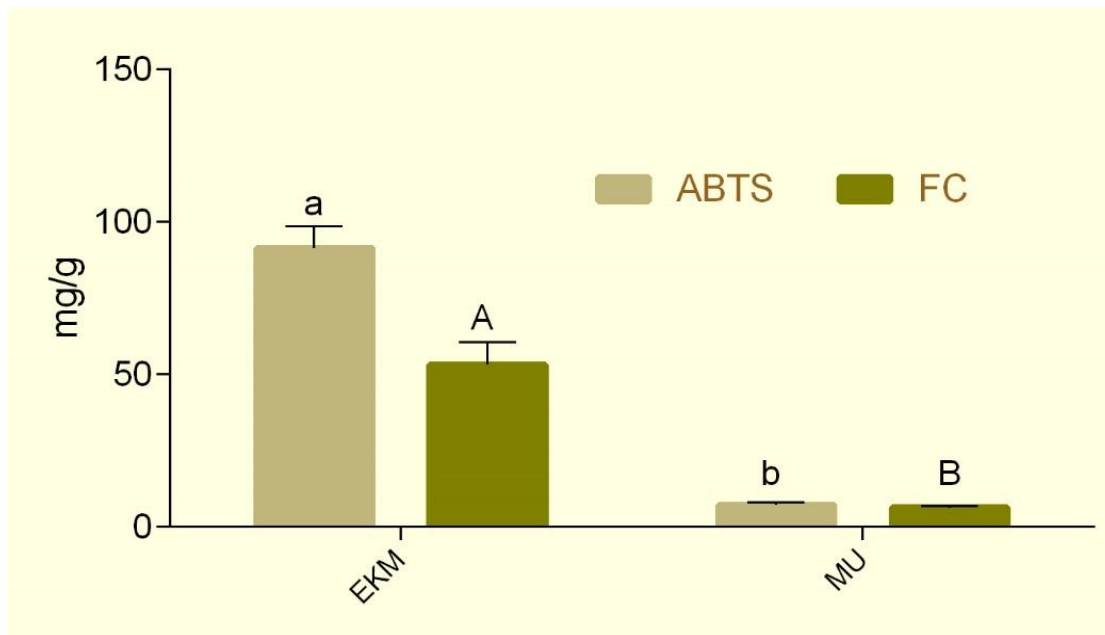
Rezultati istraživanja udjela biodostupnih frakcija HTS-a, TS-a i antioksidansa iz ekstrakta komine masline i maslinovog ulja prikazani su na Slikama 7a i 7b.

Rezultati analize HPLC-FLD metodom pokazuju da je biodostupnost HTS-a i TS-a značajno veća iz hidrofilnog EKM-a nego iz lipofilnog MU-a (Slika 7a). U biodostupnoj frakciji EKM-a određeno je 657 mg/g HTS-a i 986 mg/kg TS-a dok je u biodostupnoj frakciji MU-a određeno 368 mg/g HTS-a i 90 mg/g TS-a. Rezultati dobiveni FC i TEAC metodama u skladu su s onima dobivenima HPLC-FLD metodom, s tim da su razlike u količini biodostupnih frakcija ukupnih antioksidansa u MU-u i EKM-u još naglašenije. Izmjerena reduktivna učinkovitost biodostupne frakcije MU-a bila je samo 6,3 mg GAE/g, što iznosi 12 % reduktivne učinkovitosti biodostupne frakcije EKM-a (53,2 mg GAE/g), dok izmjerena antiradikalna učinkovitost biodostupne frakcije MU-a iznosi 7,2 mg TE/g, što je svega 8 % antiradikalne učinkovitosti biodostupne frakcije EKM-a (91,4 mg TE/g) (Slika 7b). Ovi rezultati upućuju na to da je EKM značajno bolji izvor antioksidansa u odnosu na MU.



**Slika 7a.** Udio biodostupne frakcije hidroksitirosola (HTS) i tirosola (TS) u ekstraktu komine masline (EKM) i maslinovom ulju (MU).

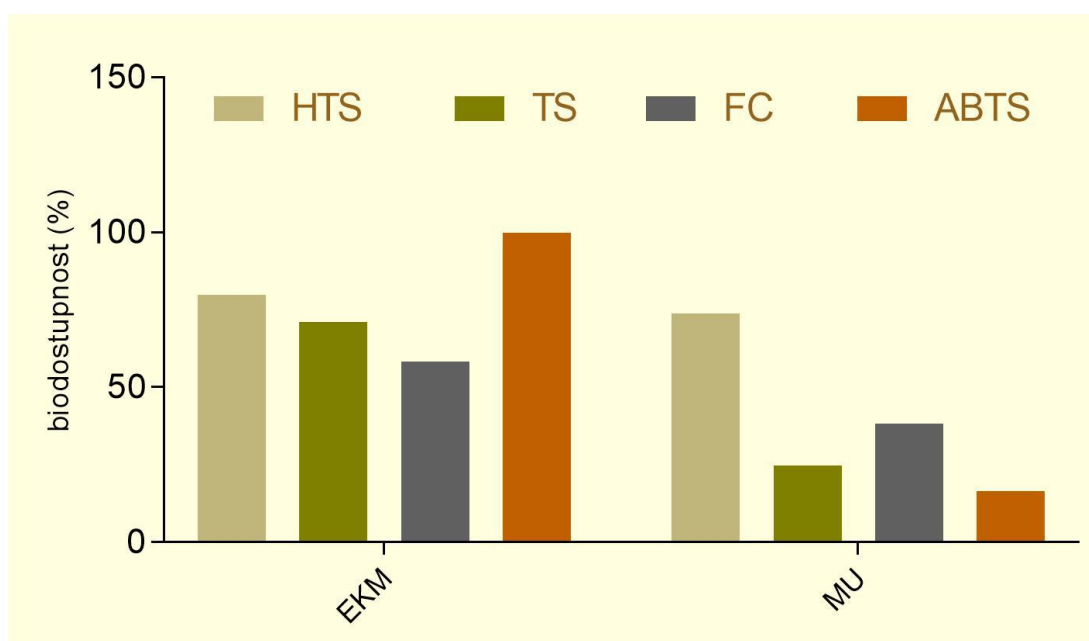
Različita slova iznad uzoraka iste serije označuju statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) određene Studentovim *t*-testom.



**Slika 7b.** Antiradikalna (ABTS) i reduktivna (FC) učinkovitost biodostupne frakcije komine masline (EKM) i maslinovog ulja (MU).

Različita slova iznad uzoraka iste serije označuju statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) određene Studentovim *t*-testom.

Dobiveni rezultati mogu se prikazati i kao postoci biodostupne frakcije u odnosu na ukupne polifenole/antioksidanse u uzorku (Slika 7c). Na taj način moguće je prokomentirati i utjecaj matriksa namirnice na biodostupnost pojedinih nutrijenata u tankom crijevu. Kako je vidljivo iz Slike 7c biodostupnost HTS-a iz EKM-a i MU-a je visoka i podjednaka te iznosi oko 80 %. Biodostupnost TS-a iz EKM-a iznosi oko 71 %, dok je iz MU-a puno niža (24 %). Iz navedenog možemo zaključiti da tijekom procesa probave u primijenjenim uvjetima za MU dolazi ili do degradacije TS-a ili on stvara netopljive komplekse s drugim komponentama matriksa ili enzimima i žučnim solima te prestaje biti dostupan za apsorpciju. Što se tiče biodostupnosti antioksidansa, u oba je slučaja (FC i ABTS metoda) njihova biodostupnost veća iz EKM-a (58 % vs 38 % za FC te 100 % vs 16 % za ABTS).



**Slika 7c.** Biodostupnost hidroksitirosola (HTS), tirosole (TS), ukupnih fenola (FC) i ukupnih antioksidansa (ABTS) iz ekstrakta komine masline i maslinovog ulja izražena kao postotak u odnosu na ukupne koncentracije u nedigeriranim uzorcima.

U dostupnoj literaturi nema podataka o usporedbi biodostupnosti HTS-a, TS-a i ukupnih antioksidansa iz maslinovog ulja i ekstrakta komine masline, niti o utjecaju uvjeta *in vitro* simulacije probave na dobivene rezultate, stoga nije bilo moguće prokomentirati rezultate u tom smislu. Ipak, dostupan je veći broj istraživanja koji su

*in vivo* pristupom istraživali bioraspoloživost polifenola iz maslinovog ulja. Tako su Vissers i suradnici (2004), mjereći koncentraciju HTS-a u krvi zdravih dobrovoljaca, pokazali da se HTS *per os* apsorbira čak 55-66 %. Nadalje, Tuck i suradnici (2001) uspoređivali su bioraspoloživost polifenola iz hidrofilnih i lipofilnih matriksa. Njihovo istraživanje pokazalo je da je u štakora eliminacija urinom nakon 24 h značajno veća za HTS i TS koji su ingestirani *per os* iz uljnog matriksa nego iz vodenog matriksa. Naši rezultati suprotni su navedenim podacima, a za to može postojati nekoliko razloga – razlika probavnog sustava kod različitih vrsta može uzrokovati različitu bioraspoloživost pojedinih spojeva pa se zbog toga rezultati dobiveni u štakorima mogu značajno razlikovati od rezultata dobivenih u ljudima. Također, kao što je ranije u radu navedeno, postoji razlika u sastavu polifenola u maslinovom ulju i komini masline s obzirom na stadij rasta, stanje plodova te geografsko područje uzgoja. Usprkos tome, u našem se istraživanju, prema svim korištenim metodama analize, ekstrakt komine masline pokazao kao bolji izvor polifenola od maslinovog ulja te smatramo da su daljnja istraživanja u svrhu razvijanja dodataka prehrani na bazi komine masline opravdana.

## 5. ZAKLJUČCI

- Ekstrakt komine masline sadrži veću količinu polifenola te pokazuje jaču antiradikalnu i reduktivnu sposobnost u odnosu na maslinovo ulje.
- Modifikacijom standardizirane *in vitro* simulacije probave maslinovog ulja dodatkom različitih količina pankreatina i žučnih soli dokazali smo značajan učinak uvjeta simulacije probave na rezultate: dodatak gastrične lipaze ne predstavlja značajan korak u simulaciji, već su od presudne važnosti količina pankreatina i žučnih soli koji se dodaju tijekom simulacije intestinalne faze probave.
- Najboljom metodom *in vitro* simulacije probave maslinovog ulja pokazala se metoda opisana protokolom 1 (50 mg/mL pankreatina; 200 mg/mL žučnih soli).
- Biodostupnost hidroksitirosola i tirosola bolja je iz ekstrakta komine masline nego iz maslinovog ulja.
- Ekstrakt komine masline dobar je izvor hidroksitirosola, tirosola i ostalih antioksidansa koji pokazuju i dobru biodostupnost te je u tom smislu superioran u odnosu na maslinovo ulje. Dobiveni rezultati opravdavaju provođenje daljnjih istraživanja biološke vrijednosti EKM.

## 6.LITERATURA

Amini A, Liu M, Ahmad Z. Understanding the link between antimicrobial properties of dietary olive phenolics and bacterial ATP synthase. *Int J Biol Macromol*, 2017, 101, 153–164.

Angeloni C, Malaguti M, Barbalace M, Hrelia S. Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11), 2230.

Belmonte-Reche E, Martinez-Garcia M, Penalver P, Gomez-Perez V, Lucas R, Gamarro F, Maria Perez-Victoria J, Carlos Morales J. Tyrosol and hydroxytyrosol derivatives as antitrypanosomal and antileishmanial agents. *Eur J Med Chem* 2016, 119, 132–140.

Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G. Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade, *Molecules*, 2007, 12(8), 1679–1719.

Berrougui H, Ikhlef S, Khalil A. Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Promote Cholesterol Efflux and Improve HDL Functionality. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015, 208062.

Chandramohan R, Pari L. Anti-inflammatory effects of tyrosol in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J Funct Foods*, 2016, 27, 17–28.

Chang CY, Huang IT, Shih HJ, Chang YY, Kao MC, Shih PC, Huang CJ. Cluster of differentiation 14 and toll-like receptor 4 are involved in the anti-inflammatory effects of tyrosol. *J Funct Foods* 2019, 53, 93–104.

Cioffi G, Pesca MS, De Caprariis P, Braca A, Severino L, De Tommasi N. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem*, 2010, 121(1), 105–111.

Colica C, Di Renzo L, Trombetta D, Smeriglio A, Bernardini S, Cioccoloni G, Costa de Miranda R, Gualtieri P, Sinibaldi Salimei P, De Lorenzo A. Antioxidant Effects of a Hydroxytyrosol-Based Pharmaceutical Formulation on Body Composition,

Metabolic State, and Gene Expression: A Randomized Double-Blinded, Placebo-Controlled Crossover Trial. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 1–14.

Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessi MA, Spencer JPE. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53, 897–903.

Corona G, Tzounis X, Assunta Dessì M, 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 Radical Res*, 2006, 40, 647–658.

Čović D, Bojić M, Medić-Šarić M. Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. *Farmaceutski glasnik*, 2009, 65, 693-704.

Crespo MC, Tome-Carneiro J, Pintado C, Davalos A, Visioli F, Burgos-Ramos E. Hydroxytyrosol restores proper insulin signaling in an astrocytic model of Alzheimer's disease. *Biofactors*, 2017, 43, 540–548.

Crespo MC, Tome-Carneiro J, Burgos-Ramos E, Loria Kohen V, Espinosa MI, Herranz J, Visioli F. One-week administration of hydroxytyrosols to humans does not activate Phase II enzymes. *Pharmacol Res*, 2015, 95-96, 132-137.

D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci*, 2010, 11, 1321-1342.

Di Benedetto R, Vari R, Scazzocchio B, Filesi C, Santangelo C, Giovannini C, Matarrese P, D'Archivio M, Masella R. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr Metab Cardiovasc*, 2007, 17, 535–545.

Fabiani R, Sepporta MV, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Crescimanno M, Morozzi G. Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: The role of extracellular production of hydrogen peroxide. *Eur J Nutr*, 2012, 51, 455–464.



Goldsmith CD, Stathopoulos CE, Golding JB, Roach PD. Fate of the phenolic compounds during olive oil production with the traditional press method. *Int Food Res J*, 2014, 21, 101-109.

Goldstein DS, Jinsmaa Y, Sullivan P, Holmes C, Kopin IJ, Sharabi Y. 3,4-Dihydroxyphenylethanol (Hydroxytyrosol) Mitigates the Increase in Spontaneous Oxidation of Dopamine During Monoamine Oxidase Inhibition in PC12 Cells. *Neurochem Res*, 2016, 41, 2173–2178.

Gonzalez-Correa J, Navas MD, Munoz-Marin J, Trujillo M. Effect of Hydroxytyrosol and Hydroxytyrosol Acetate Administration to Rats on Platelet Function Compared to Acetylsalicylic Acid. *J Agr Food Chem*, 2008, 56, 7872–7876.

Gonzalez-Santiago M, Martin-Bautista E, Carrero JJ, Fonolla J, Baro L, Bartolome MV, Gil-Loyzaga P, Lopez Huertas E. One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis*, 2006, 188(1), 35-42.

Hornedo-Ortega R, Cerezo AB, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Protective effects of hydroxytyrosol against alpha-synuclein toxicity on PC12 cells and fibril formation. *Food Chem Toxicol*, 2018, 120, 41–49.

Hydroxytyrosol, <https://www.biomol.com/products/chemicals/biochemicals/hydroxytyrosol-cdx-h0155-m025>, pristupljeno 27.3.2020.

Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem-Biol Interact*, 2008, 176, 88–98.

Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and Antioxidant Effect of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *J Agr Food Chem*, 2009, 57(19), 8798-8804.

Karković Marković A, Torić J, Barbarić M, Jakobušić Brala C. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, 2019, 24(10), 2001.

Lopez de las Hazas MC, Godinho-Pereira J, Macia A, Almeida AF, Ventura MR, Motilva M-J, Santos CJ. Brain uptake of hydroxytyrosol and its main circulating metabolites: Protective potential in neuronal cells. *J Funct Foods*, 2018, 46, 107–110.

Lopez Huertas E, Fonolla J. Hydroxytyrosol supplementation increases vitamin C levels in vivo. A human volunteer trail. *Redox Biol*, 2017, 11, 384-389.

Maslina, <https://www.plantea.com.hr/maslina/>, pristupljeno 27.3.2020.

Medina E, De Castro A, Romero C, Brenes M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *J Agr Food Chem*, 2006, 54, 4954–4961.

Minekus M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carrière F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Egger L, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie A, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Recio I, Santos CN, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MS, Weitschies W, Brodkorb A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct*, 2014, 5, 1113-1124.

Nunes MA, Pimentel F, Costa ASG, Alves RC, Oliveira MB. Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innov Food Sci Emerg*, 2016, 35, 139–148.

Olive oil, <https://www.britannica.com/topic/olive-oil>, pristupljeno 27.3.2020.

Olive tree, <https://www.zaton.hr/en/blog/260/figs-olives-grapes-dalmatia-s-cherished-fruits-in-fall>, pristupljeno 27.3.2020.

Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem*, 2006, 17, 429–445.

Plotnikov MB, Aliev O, Sidekhmenova A, Shamanaev AY, Anishchenko AM, Fomina T, Plotnikova TM, Arkhipov AM. Effect of p-tyrosol on hemorheological parameters and cerebral capillary network in young spontaneously hypertensive rats. *Microvasc Res*, 2018, 119, 91–97.

Radić K, Jurišić Dukovski B, Vitali Čepo D. Influence of Pomace Matrix and Cyclodextrin Encapsulation on Olive Pomace Polyphenols' Bioaccessibility and Intestinal Permeability. *Nutrients*, 2020, 669, 1-16.

Rigacci S, Stefani M. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *Int J Mol Sci*, 2016, 17, 843.

Rodriguez-Morato J, Xicota L, Fito M, Farre M, Dierssen M, de la Torre R. Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 2015, 20, 4655–4680.

Romero C, Medina E, Mateo MA, Brenes M. New by-products rich in bioactive substances from the olive oil mill processing. *J Sci Food Agr*, 2017, 98 (1), 225-230.

Sams L, Paume J, Giallo J, Carrière F. Relevant pH and lipase for in vitro models of gastric digestion. *Food Funct*, 2016, 7(1), 30–45.

Seiquer I, Rueda A, Olalla, M, Cabrera-Vique C. Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chem*, 2015, 188, 496-503.

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

Tasić N, Flora mediterana sa osvrtom na maslinu. Specijalistički rad. Fakultet za mediteranske poslovne studije Tivat, Tivat, 2015.

Tsarbopoulos A, Gikas E, Papadopoulos N, Aligiannis N, Kafatos A. Simultaneous determination of oleuropein and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2003, 785(1), 157-164.

Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL, Stupans I. The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J Nutr*, 2001, 131, 1993-1996.

Tyrosol, <https://www.biomol.com/products/chemicals/biochemicals/tyrosol-cay27600-100?fs=3642845941>, pristupljeno 27.3.2020.

Vilaplana-Perez C, Aunon D, Garcia-Flores LA, Gil-Izquierdo A. Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer, and AIDS. *Front Nutr*, 2014, 1.

Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr*, 2004, 58, 955-965.

Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJ, Leenen R & Katan MB. Apparent absorption of olive oil phenols in humans. *J Nutr*, 2002, 132, 409–417.

Vlavcheski F, Young M, Tsiani E. Antidiabetic Effects of Hydroxytyrosol: In Vitro and In Vivo Evidence. *Antioxidants*, 2019, 8(6),188.

## 7. SAŽETAK

Prema rezultatima brojnih istraživanja velik broj bioloških učinaka maslinovog ulja (MU) pripisuje se jednostavnim fenolima – hidroksitirosolu (HTS) i tirosolu (TS) te ostalim spojevima s antioksidativnom aktivnošću. Količina antioksidansa u komini masline značajno je veća od one u MU, stoga bi ekstrakt komine masline (EKM) mogao imati potencijal za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U ovom radu po prvi puta je istražen je udio i biodostupnost hidroksitirosola, tirosola i ukupnih antioksidansa EKM-a i uspoređena s onom MU-a. U radu je optimiran *in vitro* protokol za simulaciju probave maslinovog ulja, koja je zahtjevna zbog njegove lipofilnosti. Količine HTS-a i TS-a određene su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-FLD), a količine ukupnih antioksidansa određene su primjenom dviju jednostavnih kemijskih metoda. Dobiveni rezultati ukazuju na veliku značajnost optimizacije količine pankreatina i žučnih soli u procesu simulacije digestije uzoraka s velikim udjelom masti. Udio ukupnih i biodostupnih antioksidansa, HTS-a i TS-a značajno je veći u EKM-u što, ga čini boljim izvorom antioksidansa masline od maslinovog ulja. Dobiveni rezultati ukazuju na opravdanost daljnjih istraživanja biološke vrijednosti EKM-a kao alternativnog izvora polifenola masline u prehrani.

Ključne riječi: ekstrakt komine masline, maslinovo ulje, biodostupnost, polifenoli, hidroksitirosol, tirosol

## 7. SUMMARY

Numerous scientific studies point out that majority of olive oil's positive health effects can be attributed to its content of potent antioxidants hydroxytyrosol and tyrosol. As the amounts of antioxidants in olive pomace can exceed the amounts in olive oil, olive pomace extract has the potential to be used as valuable raw material in food and pharmaceutical industries. In this work we investigated the content and bioaccessibility of hydroxytyrosol, tyrosol and total antioxidants of olive pomace extract (OPE) and obtained results were compared to the their content and bioaccessibility from olive oil. *In vitro* protocol for simulating the digestion of olive oil has been optimized for the purpose. The amount of hydroxytyrosol and tyrosol was determined using high performance liquid chromatography (HPLC-FLD) and the amount of total antioxidants was determined using two simple chemical methods. The obtained results indicate great importance of optimizing the amount of pancreatin and bile salts in the process of digestion simulation for samples with a high fat content. The proportions of total and bioaccessible antioxidants - hydroxytyrosol and tyrosol, were notably higher in the olive pomace extract, making it a significantly better source of olive antioxidants in comparison to olive oil. Obtained results justify further research of biological value of OPE as an alternative source of olive polyphenols in nutrition.

Keywords: olive pomace extract, olive oil, bioaccessibility, polyphenols, hydroxytyrosol, tyrosol

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### BIODOSTUPNOST HIDROKSITIROSOLO I TIROSOLO IZ EKSTRAKTA KOMINE MASLINE

**Marija Bagarić**

#### SAŽETAK

Prema rezultatima brojnih istraživanja velik broj bioloških učinaka maslinovog ulja (MU) pripisuje se jednostavnim fenolima – hidroksitirosolu (HTS) i tirosolu (TS) te ostalim spojevima s antioksidativnom aktivnošću. Količina antioksidansa u komini masline značajno je veća od one u MU, stoga bi ekstrakt komine masline (EKM) mogao imati potencijal za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U ovom radu po prvi puta je istražen je udio i biodostupnost hidroksitirosola, tirosola i ukupnih antioksidansa EKM-a i uspoređena s onom MU-a. U radu je optimiran *in vitro* protokol za simulaciju probave maslinovog ulja, koja je zahtjevna zbog njegove lipofilnosti. Količine HTS-a i TS-a određene su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-FLD), a količine ukupnih antioksidansa određene su primjenom dviju jednostavnih kemijskih metoda. Dobiveni rezultati ukazuju na veliku značajnost optimizacije količine pankreatina i žučnih soli u procesu simulacije digestije uzoraka s velikim udjelom masti. Udio ukupnih i biodostupnih antioksidansa, HTS-a i TS-a značajno je veći u EKM-u što, ga čini boljim izvorom antioksidansa masline od maslinovog ulja. Dobiveni rezultati ukazuju na opravdanost daljnjih istraživanja biološke vrijednosti EKM-a kao alternativnog izvora polifenola masline u prehrani.

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

Rad sadrži: 41 stranicu, 12 grafičkih prikaza, 2 tablice i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ekstrakt komine masline, maslinovo ulje, biodostupnost, polifenoli, hidroksitirosol, tirosol

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. Monika Barbarić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Miranda Sertić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2020.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### BIOACCESSIBILITY OF HYDROXYTYROSOL AND TYROSOL FROM OLIVE POMACE EXTRACT

Marija Bagarić

#### SUMMARY

Numerous scientific studies point out that majority of olive oil's positive health effects can be attributed to its content of potent antioxidants hydroxytyrosol and tyrosol. As the amounts of antioxidants in olive pomace can exceed the amounts in olive oil, olive pomace extract has the potential to be used as valuable raw material in food and pharmaceutical industries. In this work we investigated the content and bioaccessibility of hydroxytyrosol, tyrosol and total antioxidants of olive pomace extract (OPE) and obtained results were compared to the their content and bioaccessibility from olive oil. *In vitro* protocol for simulating the digestion of olive oil has been optimized for the purpose. The amount of hydroxytyrosol and tyrosol was determined using high performance liquid chromatography (HPLC-FLD) and the amount of total antioxidants was determined using two simple chemical methods. The obtained results indicate great importance of optimizing the amount of pancreatin and bile salts in the process of digestion simulation for samples with a high fat content. The proportions of total and bioaccessible antioxidants - hydroxytyrosol and tyrosol, were notably higher in the olive pomace extract, making it a significantly better source of olive antioxidants in comparison to olive oil. Obtained results justify further research of biological value of OPE as an alternative source of olive polyphenols in nutrition.

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

Thesis includes: 41 pages, 12 figures, 2 tables and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive pomace extract, olive oil, bioaccessibility, polyphenols, hydroxytyrosol, tyrosol

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

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Monika Barbarić Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Miranda Sertić, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2020.