LC-MS/MS analiza sadržaja fenola u čaju lišća masline sorti Istarska bjelica, Leccino i Buža u svrhu optimizacije formulacije funkcionalnog čaja

Klisović, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:452971

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

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

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Medicinska kemija

Dora Klisović

LC-MS/MS analiza sadržaja fenola u čaju lišća masline sorti Buža, Istarska bjelica i Leccino u svrhu optimizacije formulacije funkcionalnog čaja

Diplomski rad

Rijeka, 2018. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Medicinska kemija

Dora Klisović

LC-MS/MS analiza sadržaja fenola u čaju lišća masline sorti Buža, Istarska bjelica i Leccino u svrhu optimizacije formulacije funkcionalnog čaja

Diplomski rad

Rijeka, 2018. godina

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem Lari Saftić i Željki Peršurić koje su bile uz mene u svakom koraku procesa izrade ovog diplomskog rada. Svojim savjetima, smjernicama i kritikama motivirale su me za rad i pripremale za budućnost.

Posebno hvala i mentorici dr. sc. Sandri Kraljević Pavelić koja nas je sve zajedno usmjeravala u radu.

Rad je podržan sredstvima Zaklade Sveučilišta u Rijeci – studentski projekt „Optimizacija formulacije čaja od lišća masline s ciljem proizvodnje funkcionalnog proizvoda”
U radu je korištena oprema nabavljena u okviru projekta Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci" financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR)

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji:
mami i tati, sestrama Sari i Foški, noničima, teti Ljubi te prijateljima bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće.

Diplomski rad obranjen je dana 28.09.2018.

pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Mirela Sedić (predsjednica)
2. izv. prof. dr. sc. Dean Marković
3. izv. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić (mentor)

Rad ima 52 stranice, 13 slika, 3 tablice i 50 literaturnih navoda.

SAŽETAK

Poznato je da fenoli maslinovog ulja imaju širok raspon pozitivnog djelovanja, ali je manje poznato da se te blagotvorne komponente nalaze i u ostalim dijelovima stabla masline. Upravo stoga, ovaj je rad usmjeren na analizu lišća maslina. Nedavna istraživanja sastava maslinovog lišća pokazala su kako se u lišću masline nalazi visoka količina polifenola, čime se može objasniti prethodno poznata antibakterijska, antivirusna i antimikrobna aktivnost. Cilj diplomskog rada bio je utvrđivanje potencijala lišća sorti masline Buža, Istarska Bjelica i Leccino, kao prirodnog izvora polifenola pogodnih za svakodnevnu konzumaciju u obliku čaja.

Specifično se pratio utjecaj sorte masline, vremena i temperature maceracije na sadržaj polifenola. Na temelju dobivenih rezultata provedena je optimizacija pripreme čaja. Razina uspješnosti optimizirane metode utvrđena je s organskom ekstrakcijom u metanolu. Analiza polifenolnog sadržaja provedena je na masenom spektrometru s trostrukim kvadropolom (LC-QQQ). Naposljetku, uz pomoć Design-Expert softvera dizajnirane su mješavine čaja na temelju željenog sastava polifenola.

Rezultati su pokazali utjecaj sorte masline i načina pripreme na kvantitativni i kvalitativni sastav polifenola. Najviša količina ukupnih fenola pronađena je u uzorcima čaja Istarske bjelice u čijoj se pripremi koristila kipuća voda, uz maceraciju od 15 min. Uzorci sorti Buža i Leccino, iako su sadržavali manje ukupne količine polifenola, istaknuli su se po raznolikosti polifenolnog sastava. Ovim radom dobili smo važne spoznaje o utjecaju sorte masline na kvantitativni i kvalitativni fenolni sastav. Opis monosortnih uzoraka čaja omogućuje daljnji razvoj funkcionalnog čaja s blagotvorinim učincima na zdravlje.

Ključne riječi: Čaj od maslinovog lišća, Funkcionalni proizvod, LC-QQQ, Polifenoli, Sorte masline

SUMMARY

Beneficial properties of polyphenols are widely recognized, and polyphenols-rich olive oil has been identified as one of essential food for healthy effect of Mediterranean diet. However, over the past decade, the olive leaves have been discovered as an alternative rich source of polyphenols as well. Recent studies on olive leaves confirmed a high phenolic content that explain their previously described strong antibacterial, antimicrobial and antiviral activity. Therefore, the major aim of our work was to comprehensively determine olive leaves phenolic content in cultivars Istarska bjelica, Leccino and Buža, as natural source of bioactive compounds suitable for daily consumption in the form of tea.

For this purpose, we examined the influence of olive leaf variety, maceration time and temperature on the final tea phenolic composition. Based on the obtained results, the method optimization was carried out. The level of success of the optimized method was determined with the organic extraction in methanol. Phenolic compounds were analysed by use of liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometer (LC-QQQ). Finally, using the Design-Expert software, tea mixtures where designed based on the desired polyphenol composition.

Expectedly, results revealed significant influence of the olive variety, but also maceration parameters on the quantitative and qualitative phenolic composition. The highest amount of phenolic compounds was obtained for Istarska bjelica after 15 min maceration. Samples of Buža an Leccino, although they contained less total amount of polyphenols, were distinguished by variety of the content. Furthermore, we designed several functional olive leaf teas mixtures with phenolic composition adjusted to the desired health effect. Results pinpoint the role of optimized phenolic composition in design and improvement of olive leaves teas quality.

Key words: Olive Leaf Tea, Functional olive leaf teas, LC-QQQ, Polyphenols, Olive cultivars

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Čaj lišća masline 2
1.2. Polifenoli 3
1.2.1. Podjela polifenola 3
1.2.2. Polifenoli u lišću masline 5
1.2.3. Bioraspoloživost polifenola iz lišća masline 5
1.3. Metode ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala 6
1.3.1. Priprema uzorka 6
1.3.2. Metode ekstrakcije 7
1.3.3. Utjecaj vrste otapala na ekstrakciju 8
1.4. Metode analize polifenolnog sadržaja 8
1.4.1. Tradicionalne metode analize 8
1.4.2. Nove metode analize 9
1.5. Zdravstveni učinak polifenola iz čaja lišća masline 10
1.5.1. Kardiotonični učinak 10
1.5.2. Antidijabetički učinak 11
1.5.3. Utjecaj na pretilost 11
1.5.4. Neuroprotektivni učinak 12
1.5.5. Antimikrobno djelovanje 12
1.5.6. Protuupalno djelovanje 13
2. CILJ RADA I HIPOTEZE 14
3. MATERIJALI I METODE 15
3.1. Kemikalije i reagensi 15
3.2. Priprema uzoraka 15
3.3. LC-QQQ analiza 16
3.4. Prikaz, analiza i statistička obrada podataka 23
4. REZULTATI 24
4.1. Optimizacija procesa pripreme čaja maslinovog lišća 24
4.1.1. Utjecaj vremena i temperature ekstrakcije na ukupni fenolni sadržaj 24
4.1.2. Usporedba ekstrakcije bazirane na organskom otapalu s optimiziranom vodenom ekstrakcijom 26
4.1.3. Usporedba načina pripreme uzoraka maslinova lišća 27
4.2. Analiza karakterističnog sadržaja polifenola u čajevima triju sorti maslina 29

4.3. Optimizacija formulacija funkcionalnih mješavina čaja lišća masline 32
4.4. Određivanje koncentracije derivata oleuropeina 36
4. RASPRAVA 37
5. ZAKLJUČAK 45
6. LITERATURA 46
7. ŽIVOTOPIS 50

1. UVOD

Maslina (*Olea europea* L.) je kvrgavo, razgranato stablo koje pripada obitelji *Oleaceae* te prirodno nastanjuje područja u kojima prevladava sredozemna klima s toplim i blagim zimama (1). Najpoznatija je po istoimenom plodu, maslini, komercijalno važnoj na Mediteranskom području kao sirovina za proizvodnju maslinovog ulja (2). Iako je u današnjem svijetu kultivacija masline proširena na mnogobrojna područja svijeta, regija Mediterana (južnozapadni dio Europe, zapadna Azija, i sjeverna Afrika) pokriva 98 % svjetske kultivacije masline (1). Zemlja koja se ističe najvećom proizvodnjom je Španjolska, slijede Italija i Grčka (2).

U Hrvatskoj su masline raspoređene po cijelom priobalnom području, uključujući Istru, Kvarner, Dalmaciju i njene otoke. Područje Istarskog poluotoka sadrži 11 % ukupnih stabala masline Hrvatske, točan broj je procijenjen na 1 070 000 stabala koji zauzimaju približno 5000 ha površine (3). Najčešće kultivirane sorte tradicionalnih naziva su Buža, Istarska bjelica, Rosulja, Črnica i Leccino (4).

Maslinovo ulje važan je prehrambeni proizvod, bogat prirodnim antioksidansima čije su medicinske i nutritivne vrijednosti široko poznate (5). Uz ulje, ekstrakti iz lišća maslina koristili su se stoljećima za promicanje i održavanje zdravlja. Primjerice, stari Egipćani koristili su lišće kako bi mumificirali faraone. Također, listovi su se koristili kao narodni lijek za liječenje vrućice, tropske bolesti i malarije (1).

Uzgoj maslina i ekstrakcija maslinovog ulja generira svake godine znatne količine otpadnog materijala općenito poznatog kao "maslinovi nusproizvodi". Listovi maslina, dostupni tijekom cijele godine, jedan su od nusproizvoda maslinarstva; akumuliraju se za vrijeme tradicionalnog godišnjeg obrezivanja maslina (oko 25 kg nusproizvoda (grančice i lišće) po stablu godišnje) i mogu se naći u velikim količinama u industriji prerade maslinovog ulja nakon što su odvojeni od voća prije prerade (oko 10% težine masline) (6). Samo na području Istarskog poluotoka nastane 5000

tona otpada suhog lišća, koje predstavlja neiskorišten biološki otpad (4). Usprkos toj činjenici samo se 10 % godišnjeg prinosa maslina iskoristi za proizvodnju koja nije povezana s maslinovim uljem (2).

Međutim, u proteklom desetljeću pojavio se veliki interes za lišćem masline koje nema daljnju ulogu u proizvodnji maslina i maslinovog ulja, a dobar je izvor bioaktivnih spojeva (4). Korištenje lišća maslina kao početne sirovine u proizvodnji antioksidansa, čaja ili u druge svrhe, moglo bi doprinijeti učinkovitost zbrinjavanja biološkog otpada koja se do sada oslanjala na ekološki neprihvatljivo spaljivanje (7).

1.1. Čaj lišća masline

Čaj (vodena infuzija) je jedan od najčešće konzumiranih napitaka na svijetu, odmah nakon vode te su njegova medicinska svojstva dobro istražena. Okus čaja od lišća masline sličniji je crnom čaju nego plodu masline, no blažeg je okusa te ne sadrži kofein (8).

Na Hrvatskom tržištu ovakav čaj još je uvijek nedovoljno zastupljen proizvod koji zaslužuje veću pažnju. Maslinari iz Sjeverne Istre i Dalmacije okrenuli su se proizvodnji i komercijalizaciji ovog proizvoda sa širokom primjenom. Napredak se dogodio 2017. godine kada je industrijski proizvod, čaj lišća masline tvrtke „Fanito" Vela Luka, službeno od strane Ministarstva zdravstva odobren kao dodatak prehrani.

Suvremena istraživanja pokazala su da čajevi lišća masline smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, inducirajući anti-aterosklerotični, hipotenzivni, antioksidativni, protuupalni i hipokolesterolemični efekt (9). Pogodni su za dijabetičare i djeluju neuroprotektivno (10). Lišće također sadrži antimikrobna svojstva u borbi protiv bakterija, gljivica i drugih mikroorganizama. Potencijalni zdravstveni učinak pripisuje se ponajviše polifenolima, među kojima se po količini ističe oleuropein (1).

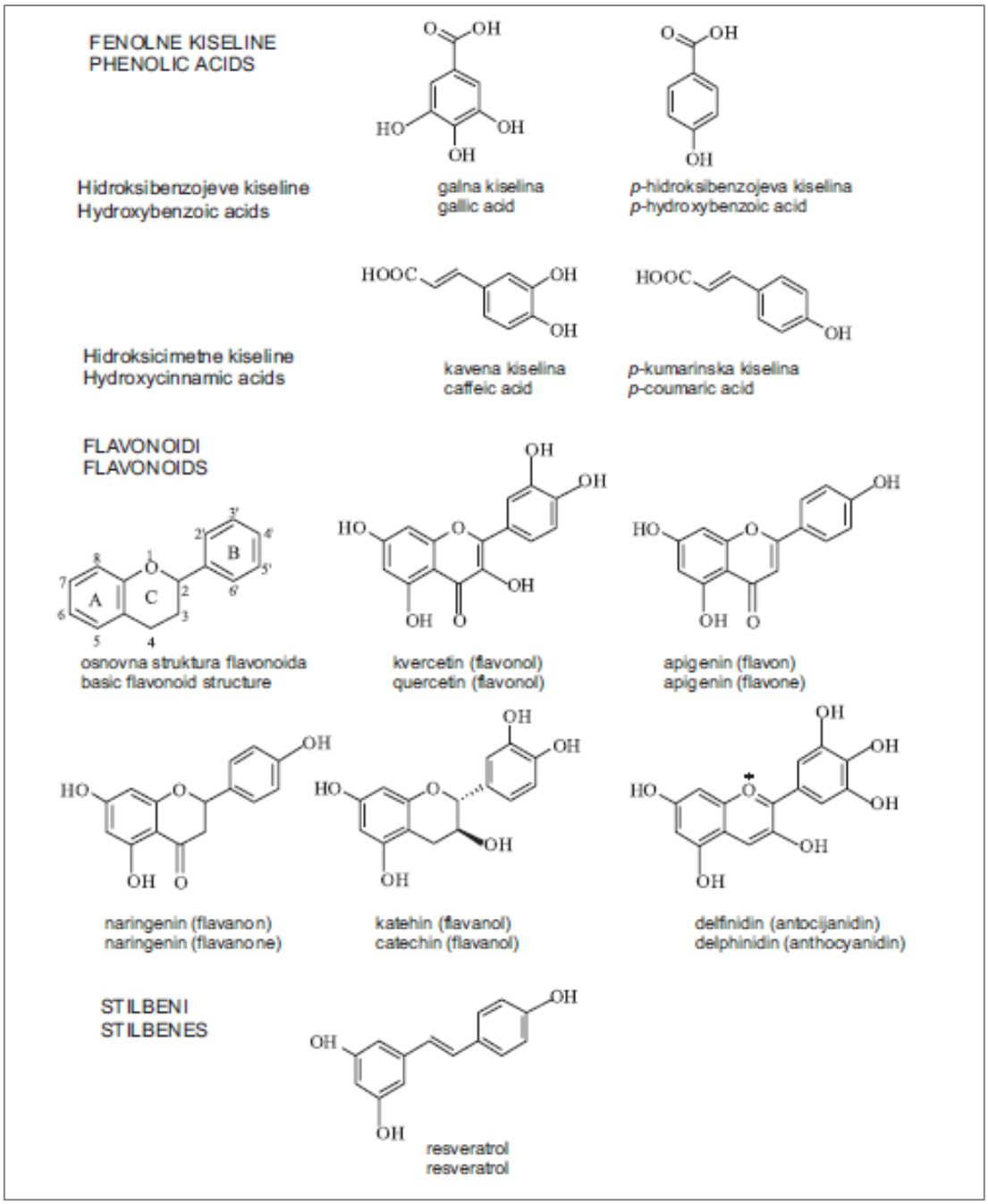
1.2. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka prisutni u svim biljnim tkivima. Iako pokazuju veliku strukturnu raznolikost, strukturno obilježje koje ih ujedinjuje je aromatski prsten s minimalno jednom hidroksilnom (OH) skupinom (fenol) (11). Sintetiziraju se u biljkama prilikom rasta, kao odgovor na stresna okruženja poput infekcije, UV radijacije ili oštećenja tkiva. Obavljaju različite uloge u životu biljaka, od strukturne do zaštite same biljke (12). Identificirano je gotovo 8000 polifenolnih komponenti, od jednostavnih monomera do kompleksnih oligomera i polimera (13).

Zdravstvene vrijednosti polifenola prepoznala je i Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, prema engl*. European Food Safety Authority*), koja je prihvatila zdravstvenu tvrdnju da polifenoli maslinovog ulja doprinose zaštiti lipida u krvi od oksidativnog stresa. Tvrdnja se odnosi na maslinovo ulje koje u 20 g sadrži minimalno 5 mg hidroksitirosola i njegovih derivata. Osim zdravstvenog učinka, polifenoli su djelomično odgovorni za organoleptička svojstva biljne hrane (povrće, voće, žitarice, orašasti plodovi) i pića (vino, pivo, čaj) koja ovise o njihovoj količini i sastavu (14).

1.2.1. Podjela polifenola

Polifenoli se dijele na flavonoide, fenolne kiseline i stilbene. Aglikoni flavonoida tj. flavonoidi bez vezanih molekula šećera, posjeduju strukturu tipa C_6-C_3-C_6. Pritom su atomi ugljika raspoređeni tako da su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem koji može ili ne mora formirati treći prsten (15). Razlikuju se prema stupnju oksidacije prstena, stupnju nezasićenosti te položaju OH skupine. U biljkama se najčešće pronalaze O-konjugirani šećeri na C_2, C_3 ili C_7 poziciji (11). Glukoza je najčešći šećer, no mogu se pojaviti galaktoza, ksiloza i drugi (14). Najdetaljnije istražene skupine flavonoida su: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli (katehini) i njihovi polimeri proantocijanidini te antocijanidini. Stilbeni su polifenoli koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida, a sadrže 1,2-difenileten kao funkcionalnu skupinu (15) (Slika 1).



Slika 1. Podjela i strukturne formule pojedinih polifenola (15)

Fenolne kiseline su aromatski sekundarni metaboliti široko raspodijeljeni u biljnom carstvu. Općenito se pod pojmom „fenolne kiseline" podrazumijevaju jednostavni fenoli s jednom karboksilnom funkcionalnom skupinom, primjerice tirosol (6). Kada se govori o fenolnim kiselinama kao biljnim metabolitima, tada se podrazumijevaju dvije različite karbonske strukture: hidroksicimetne kiseline (npr. ferulična, *p*-kumarinska, kofeinska kiselina) i hidroksibezojeve kiseline (npr. galna i vanilinska kisleina). Iako

je temeljna struktura jednaka, brojevi i pozicije OH skupina na aromatskom prstenu čine razliku (16).

1.2.2. Polifenoli u lišću masline

Različite su skupine polifenola prisutne u kemijskom sastavu lišća masline. U značajnim količinama pojavljuju se sekoiridoidi, točnije oleuropein, jednostavni polifenoli tirosol i hidroksitirosol, flavonoidi luteolin-7-O-glukozid i apigenin-7-O-glukozid te fenolna kiselina verbaskozid (13). Sekoiridoidi su grupa polifenola vrlo sličnih kumarinu, produkti su sekundarnog metabolizma terpena te su prisutni jedino u biljkama *Olearaceae* obitelji. Oleuropein je ester hidroksitirosola i glukozida elenolske kisleine, dok je verbaskozid konjugirani glukozid hidroksitirosola i kavene kiseline. Ostali jednostavni fenoli i fenolne kiseline prisutne u nižim koncentracijama (6).

Fenolni spojevi pohranjeni su u debelim listovima kako bi se spriječila degradacija, moguće je da upravo iz tog razloga sadrže najveću ukupnu koncentraciju polifenola u odnosu na druge dijelove biljke. U usporedbi s maslinovim uljem, lišće masline je značajno bogatiji izvor oleuropeina, također sadrži i više glikoziliranih flavona. Međutim, maslinovo ulje sadrži više aglikona flavona iz razloga što se oni razvijaju za vrijeme sazrijevanja ploda masline (13). Točnije, oleuropein u lišću masline zauzima 1–14 %, a u maslinovom ulju 0.005–0.12 % (16).

Na kvantitativni i kvalitativni sastav polifenola iz lišća masline utječu mnogobrojni faktori, između kojih su i datum prikupljanja, sorta masline, zemljopisno područje uzgoja, uvjeti sušenja i kultivacije te ekstrakcija (6).

1.2.3. Bioraspoloživost polifenola iz lišća masline

Bioraspoloživost u probavnom traktu direktno je pod utjecajem kemijske strukture, stupnja glikozilazije, acilacije, molekularne veličine, stupnja polimerizacije i topljivosti pojedinog polifenola. Zbog velike varijabilnosti kemijske strukture te kompleksnih struktura u kojima se

nalaze u biljnim tkivima vrlo je teško generalizirati bioraspoloživost polifenola (14). No, ono što je zasigurno poznato je da se polifenoli u obliku aglikona apsorbiraju u tankom ili debelom crijevu, gdje su podložni metilaciji, sulfaciji ili glukozilaciji (11).

In vivo i *in vitro* istraživanja na polifenolima iz ekstrakta lišća masline su pokazala da vrlo niske koncentracije dosežu do ciljnih organa i stanica (17). S druge strane, polifenoli iz maslinovog ulja imaju značajno višu bioraspoloživost koja je potvrđena mnogobrojnim istraživanjima. Iako su istraživanja apsorpcije i metabolizma na maslinovom ulju detaljno provedena, informacije o ekstraktima iz lišća masline još su uvijek nedostatna. Istraživanja bi se trebala provesti sustavno, kako bi se dobila realna slika farmakokinetike polifenola iz ekstrakta maslinovog lišća. Lockyer i sur. navode kako su potrebna i dodatna klinička istraživanja koja bi potvrdila dobivena saznanja o zdravstvenim učincima i bioraspoloživosti (13).

1.3. Metode ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala

1.3.1. Priprema uzorka

Fenolni spojevi mogu se ekstrahirati iz sviježih, smrznutih ili suhih uzoraka biljaka (lišća). Za sušene uzorke potrebno je svježe sakupljene uzorke sušiti u strogo kontroliranim uvjetima kako bi se poboljšala kvaliteta finalnog proizvoda, kako bi se spriječilo kvarenja te kako se polifenoli ne bi degradirali djelovanjem enzima. Sušenjem se smanjuje razina vode te na taj način pospješuje ekstrakcijski postupak (6).

Sušenje na zraku, mikrovalno sušenje te sušenje zaleđivanjem najviše su korištene metode u istraživačkim radovima. Sušenje na zraku može se provoditi na sobnoj temperaturi ili povišenim temperaturama uz kontrolirane uvjete radi sprječavanja degradacije polifenola. Rezultati istraživanja Malik i sur., provedenih na uzorcima lišća masline, pokazali su

sušenje na sobnoj temperaturi (25 °C) kao optimalno, dok je zagrijavanje na 60 °C dovelo do značajnih gubitaka u koncentraciji polifenola (18). Sušenje zaleđivanjem omogućuje kvalitetno sušenje, bez uzrokovanja degradacije polifenola. Uzorci su u tom slučaju odmah smrznuti tekućim dušikom te liofilizirani prije ekstrakcije. No, postupak se ne preporučuje za lišće masline jer su rezultati pokazali značajni gubitak koncentracije oleuropeina uzrokovan zaleđivanjem (19).

Uz sušenje, uzorke lišće potrebno je usitniti do željene konzistencije. Kovačić i sur. svojim su istraživanjem dokazali kako sitno mljeveni uzorci imaju višu ukupnu koncentraciju polifenola od grubo mljevenih (4).

1.3.2. Metode ekstrakcije

U istraživanju Kovačić i sur. naglašava se kako postoji velika potreba za razvijanjem zelene metode za ekstrakciju polifenola. Zbog toga je odabir odgovarajuće metode ekstrakcije vrlo važan te se temelji se na kemijskoj strukturi željene supstance, veličini čestice uzoraka i prisutnošću neželjenih supstanci (4).

Na topljivost polifenola utječu vrijeme i temperatura ekstrakcije (12). Više temperature utječu na poboljšanje topljivosti i ubrzavanje reakcije, a uz to smanjuju viskoznost i površinsku napetost što također doprinosi uspješnosti ekstrakcije. Za eliminaciju neželjenih komponenti kao što su voskovi, masne kiseline, klorofil, potrebni su dodatni koraci pročišćavanja (17).

Konvencionalne metode ekstrakcije uključuju vodenu kupelj, indirektnu metodu zagrijavanja koja se koristi već desetljećima. Biljni materijal se zagrijava kako temperatura kupelji raste te ispušta željene supstance u medij. Optimalna temperatura kupelji je 20-50 °C, a sve iznad 70 °C uzrokuje degradaciju polifenola. Dulje vrijeme ekstrakcije pogoduje uspješnijim rezultatima (19).

Kada se radi o polifenolima iz lišća masline najčešće korištena metoda je i dalje ekstrakcija otapalom. To je metoda koja je dizajnirana kako bi topljive tvari difuzijom iz krute tvari prešle u tekuću (17). Pojam maceracija

koristi se za opisivanje postupka nakapanja krute tvari radi izdvajanja željenih supstanci, kada se govori o ekstrakciji sastojaka iz biljnih tkiva. Ovisno o biljnoj vrsti određuju se parametri maceracije (vrijeme i temperatura). Proces maceracije moguće je ubrzati korištenjem mikrovalnog i ultrazvučnog zračenja (19).

Ultrazvučno zračenje ovisi o efektima ultrazvučnih valova koji pospješuju transfer mase, pucanje stanice i kapilarni efekt (12). Iako je ultrazvučna kupelj najčešće korištena metoda ekstrakcije, ekstrakcija s mikrovalnim zračenjem se pokazala najboljom, a koristi se najmanje energije za ekstrakciju materijala (19).

1.3.3. Utjecaj vrste otapala na ekstrakciju

Istraživanja na lišću masline do sada su se provodila s vodom, metanolom, etanolom, acetonom te vodenom mješavinom alkohola kao otapalima za ekstrakciju polifenola. No, najbolju metodu za ekstrakciju fenolnih komponenti je veoma teško odrediti zbog razlika u polaritetu molekula (2). Svaka biljna vrsta također, ima svoja specifična svojstva te je vrlo važno razviti optimalne uvjete ekstrakcije za pojedinačnu vrstu (7). Prinos i brzina polifenolne ekstrakcije direktno su ovisne o vrsti otapala. Metanol se pokazao kao vrlo uspješno otapalo za ekstrakciju polifenola nižih molekulskih masa (17).

1.4. Metode analize polifenolnog sadržaja

1.4.1. Tradicionalne metode analize

Kolorimetrijski Folin-Ciocalteu esej je najbrža i najčešće korištena kvantitativna tehnika za određivanje ukupnih polarnih polifenola (12). Esej se provodi uz pomoć Folin-Ciocalteuovog reagensa (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) koji u reakciji s polifenolima, u blago alkalnim uvjetima stvara relativno slabo plavo obojeni kompleks koji je moguće

spektrofotometrijski odrediti pri 750nm (20). Metoda je već primijenjena za analizu vodenog ekstrakta lišća masline, gdje je rezultat izražen pomoću standarda galne kiseline (4,21). Kavena kiselina poslužila je kao standard u istraživanju Lafka i sur. (7). Iako su metode temeljene na kolorimetriji jednostavne i praktične, nedostaci poput sporosti u uspostavljanju ravnoteže i mogućnosti interferencije preostalih tvari iz uzoraka glavni su razlozi razvoja novih metoda. Osim toga metoda pruža samo informacije o ukupnom polifenolnom sastavu, bez detaljne fenolne karakterizacije (20).

Za identifikaciju pojedinačnih polifenola najčešće se koristi visokoprotočna tekućinska kromatografija (HPLC, prema engl. *High performance liquid chromatography*), u reverznoj fazi, spregnuta s detektorima kao što su ultraljubičasta vidljiva spektroskopija (UV-VIS, prema engl*. Ultraviolet–visible spectroscopy*), masena spektrometrija (MS prema engl. *Mass spectrometry*) ili nuklearna magnetna rezonancija (NMR, prema engl*. Nuclear magnetic resonance*). Manje korištena tehnologija za identifikaciju polifenola je plinska kromatografija (6). UV-VIS je jedna od najčešće korištenih metoda analize fenolne komponente. U većini radova koristi se valna duljina od 280 nm, no ne postoji univerzalni maksimum apsorbancije za polifenole lišća masline. NMR se ne upotrebljava često, no ima mogućnost specifične detekcije složenih struktura (20).

1.4.2. Nove metode analize

Kromatografske metode u kombinaciji s raznim detektorima i uz primjenu komercijalnih standarda omogućavaju karakterizaciju pojedinačnih polifenola. Međutim, za detaljnu identifikaciju fenolnih komponenti te mogućih derivata sve se više upotrebljava masena spektromerija (MS). MS osigurava bolju selektivnost i osjetljivost prilikom analize (21). Dokazano je da je to jedna od najučinkovitijih tehnika u biomedicinskim istraživanjima, naročito kod analize kompleksnih bioloških struktura. Sve se više upotrebljava trostruki kvadrupol za tandemsku masenu spektrometriju (MS/MS), koji u odnosu na jednostruki kvadrupol za MS omogućuje veću selektivnost, točnost i reproducibilnost, pri niskim

koncentracijama analita. Uz pomoć pristupa odabira praćenja višestrukih produkt-iona iz jednog ili više prekursorskih iona (engl. *Multiple reaction monitoring*, MRM) omogućena je identifikaciju s većom sigurnošću. Analizator trostruki kvadropol (QQQ) funkcionira na način da ion specifične mase i naboja (*m/z*) može proći kroz kvadrupol samo ako ima određeni naboj te se iz tog razloga kvadrupoli nazivaju i filteri mase (22).

Kombinacija tekućinske kromatografije (LC) i tandemske masene spektrometrije široko je korištena metoda za analizu kvalitativnog i kvantitativnog sastava uzoraka. Najčešće se za analizu prirodnih komponenti, kao ionizator, koristi elektrosprej ionizator (ESI prema engl. *electrospray ionization*). Ova kombinirana tehnika omogućuje potvrdu poznatih struktura te identifikaciju nepoznatih komponenti. Tehnika je primijenjena u istraživanju Falcao i sur. (23), gdje je provedena analiza polifenola iz propolisa, uz pomoć HPLC-a na kojemu je razdvojeno 35 komponenti koje su zatim identificirane uz pomoć ESI-MS. Određeni polifenoli potvrđeni su usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim. Primjerice, kavena kiselina otkrivena je uz pomoć prekursor iona *m/z*-179. Potvrđeno je da je ESI-HPLC s MS detektorom adekvatna metoda za identifikaciju flavonoida (22).

1.5. Zdravstveni učinak polifenola iz čaja lišća masline

Zdravstveni učinci polifenola iz čaja lišća masline na čovjeka mogu se podijeliti u nekoliko skupina djelovanja koje su opisane u slijedećim ulomcima.

1.5.1. Kardiotonični učinak

Kardiovaskularne bolesti (KVB) su vodeću uzrok smrti u svijetu (13). Pod tim pojmom smatraju se sva patološka stanja koja uključuju srčani mišić ili krvne žile, uglavnom uzrokovana aterosklerozom, odnosno promjenama, oštećenjima i naslagama na stjenkama arterija (24).

Mnogobrojna istraživanja potvrdila su da ekstrakt maslinovog lišća bogat polifenolima utječe na KVB tako što inducira anti-aterosklerozni, hipotenzivni, antioksidativni i protuupalni učinak (2).

Provedena je i klinička studija na pacijentima s hipertenzijom, tretman je uključivao 1,6 μg/dan vodenog ekstrakta lišća. Nakon 3 mjeseca primijećeno je značajno smanjenje krvnog tlaka bez razvoja nuspojava (2). Polifenoli na mnogobrojne načine djeluju na aterosklerozu. Primarno, imaju jako antioksidativno djelovanje, koje je povezano sa strukturom. Sekundarno, moduliraju staničnu signalizaciju blokirajući NF-κB (nuklearni faktor B). Nadalje, poboljšavaju endotelnu funkciju, povećavajući limfocite T i monocite koji se vežu za endotel nakon oštećenja krvnih žila (25).

1.5.2. Antidijabetički učinak

Dijabetes tipa 2 je kronična i učestala bolest čiji uzrok mogu biti okolišni faktori ili genetska mutacija (26). Osim lijekova, alternativna i narodna medicina koristi različite prirodne proizvode za snižavanje razine glukoze u krvi. Mnogobrojna istraživanja pokušala su utvrditi djelovanje polifenola iz čaja lišća maslina i predložiti ih kao prikladnu zamjenu ili nadopunu postojećoj terapiji. Primjerice, u istraživanju Eidi i sur. tretirali su jednu skupinu miševa različitim dozama ekstrakta lišća masline, a drugu s referentnim lijekom Glibenclamide. Rezultati su pokazali da je antidijabetički učinak ekstrakta jači nego kod referentnog lijeka (27). Drugo novije istraživanje provedeno na Tsumura Suzuki obese diabetes (TSOD) modelima miševa za tip 2 dijabetes sugerira da nakon prehrane obogaćene ekstraktom malinovog lišća miševi pokazuju smanjenje hiperglikemije, poremećaja tolerancije na glukozu te oksidativnog stresa (26).

1.5.3. Utjecaj na pretilost

U posljednja dva desetljeća pretilost je postala vodeći zdravstveni problem visoko razvijenih zemalja (28). Kronična je bolest koja se povezuje s razvojem dijabetesa i KVB, a karakterizirana je prekomjernom tjelesnom težinom (29). Mnogobrojna istraživanja pokazala su kako polifenoli

kvercetin i hidroksitirosol utječu pozitivno na simptome pretilosti. Predloženi mehanizam djelovanja uključuje ublažavanje unutarstaničnog oksidativnog stresa, inhibiciju lipogeneze te suzbijanje diferencijacije lipocita. Klinička istraživanja dovela su do ograničenih pozitivnih rezultata, no još uvijek nema dovoljno podataka za podršku visokih i dugotrajnih doza u liječenju pretilosti (28).

1.5.4. Neuroprotektivni učinak

Svojstvo polifenola da kao aglikon pasivnom difuzijom prelaze membrane, time i krvno moždanu membranu, čini ih pogodnima za liječenje neurodegenerativnih bolesti. To su bolesti vrlo visokog mortaliteta i često ne postoji učinkoviti oblik izlječenja (30). Liječenje se svodi na ranu dijagnozu i pokušaj zaustavljanja progresije bolesti (31). Predloženi mehanizam patogeneze uključuje indukciju oksidativnog stresa, abnormalnu agregaciju proteina, poremećenu razinu Ca^{2+} te apoptozu stanica (30).

Polifenolni spojevi istražuju se za liječenje kroničnih degenerativnih bolesti poput Alzheimerove ili Parkinsonove. Djeluju na smanjivanje nakupljanja β–amiloida i sprječavaju stvaranje novih neurofibrilarnih vlakana. Antioksidativno djelovanje, također pogoduje neurodegenerativnim bolestima (30).

Istraživanja su do sada bila usmjerena na usporedbu djelovanja polifenola iz maslinovog lišća s postojećim lijekovima za neurodegenerativne bolesti. Pokazano je kako je djelovanje polifenola jednako ili jače, što predstavlja odličnu pretpostavku za klinička istraživanja u budućnosti (2).

1.5.5. Antimikrobno djelovanje

Komponente ekstrakta lišća masline spominju se kao značajne pri vrlo niskim koncentracijama u inhibiciji rasta mikroorganizama uzročnika crijevnih i dišnih infekcija (2). Osim blagotvornih svojstva za zdravlje čovjeka, polifenoli se mogu koristiti u prehrambenoj industriji kao prirodni

konzervansi. Osim toga, ekstrakti lišća masline dokazano poboljšavaju kvalitetu i rok trajanja mesnih proizvoda. Također, dokazano mogu zaustaviti rast triju poznatih patogena koji se prenose hranom: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, i *Salmonelle* Enterice (32).

1.5.6. Protuupalno djelovanje

Mehanizam protuupalnog djelovanja ekstrakta lišća masline ovisi o pojedinoj vrsti polifenola. Općenito se pretpostavlja da svi polifenoli smanjuju proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta i dušikovog oksida te da zaustavljaju sekreciju i proizvodnju upalnih citokina (29).

Kliničkim istraživanjem potvrđen je utjecaj ekstrakta lišća masline na medijatore upale. Time su potvrđena prethodna saznanja da fenoli smanjuju razinu citokina upale u životinjama. Između ostalih, praćeni su interleukin 8 i TNF-α, kojima se razina nakon akutne doze ekstrakta maslinovog lišća značajno smanjila (9).

2. CILJ RADA I HIPOTEZE

Glavni cilj ovog istraživačkog rada je utvrditi potencijal lokalnih sorti lišća maslina kao prirodnog izvora bioaktivnih spojeva pogodnih za svakodnevnu konzumaciju u obliku čaja.

Specifični ciljevi istraživačkog rada:

1. Kvalitativno i kvantitativno odrediti sastav polifenola u čaju lišća masline uz pomoć metode LC-QQQ.
2. Istražiti učinak temperature na ekstrakciju i na sastav polifenola. Ako je koncentracija polifenola povezana s temperaturom, onda će čaj lišća masline pripravljen na višoj temperaturi sadržavati veću koncentraciju polifenola. Hipotezu ćemo ispitati analizom uzoraka pripremljenih pri različitim temperaturama (80, 90 i 100 °C).
3. Istražiti učinak dužine maceracije na sastav polifenola u čaju. Hipoteza je da će koncentracija polifenola biti povezana s vremenom maceracije te će čaj lišća masline s dužim vremenom maceracije imati višu koncentraciju polifenola. Hipotezu ćemo ispitati ekstrakcijom uzoraka u različitom vremenu (1, 5, 10, 15, 20 minuta).
4. Usporediti sadržaj polifenola dobiven vodenom ekstrakcijom s organskom kako bi odredili iskoristivost metode vodene ekstrakcije. Iskoristivost metode ispitati ćemo tako što ćemo iste uzorke ekstrahirati vodom i metanolom. Hipoteza je da će ekstrakcija vodom biti dovoljno učinkovita iako manja od one organskim otapalom te kako će različita polarnost otapala utjecati na sastav polifenola u ekstraktu.
5. Usporediti sadržaj ukupnih polifenola u sitno i krupno mljevenim uzorcima čaja lišća masline. Hipoteza je da će sitnije usitnjeni uzorci lišća omogućiti bolju ekstrakciju polifenola te u konačnici višu ukupnu koncentraciju polifenola.
6. Odrediti omjere pojedinih sorti u mješavini čajeva kako bi dobili funkcionalne mješavine željenih svojstva. Hipoteza je da će se omjeri pojedinih sorti morati mijenjati s obzirom na željena biološka svojstva čaja

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije i reagensi

2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (2,5-DHBA), 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (3,4-DHBA), 4-hidroksibenzojeva kiselina (*p*HBA), 3-hidroksitirosol, apigenin, diosmetin, kavena kiselina, krizin, kvercetin, luteolin, luteolin O-7-glukozid, naringenin oleuropein i tirosol nabavljeni su od Sigme Aldrich (St. Louis, MO, SAD). Ferulična kiselina nabavljena je od Extrasynthese. Apigenin-7-O-glukozid i verbaskozid dobiveni su od HWI Analytik GMBH (Njemačka). Galna kiselina nabavljena je od Alfa Aesar (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD).

Kemijski reagensi, metanol (LC-MS čistoće) i acetonitril (LC-MS čistoće) nabavljeni su od Honeywell research chemicals, a mravlja kiselina (LC-MS čistoće) nabavljena je od Sigme Aldrich. MiliQ voda dobivena je primjenom Mili-Q sustava pročišćavanja vode (<0,058 µS / cm, Mili-Q model Pacific TII 12, Thermo Scientific, Massachusetts, SAD).

3.2. Priprema uzoraka

U ovom istraživanju korišteni su uzorci lišća triju sorti maslina koje nisu tretirane kemijskim sredstvima Buža (B), Istarska bjelica (IB) i Leccino (L). Svi uzorci prikupljeni su na lokalitetu Novigrad, Hrvatska GPS koordinate: N 45°33', E 13°59' u travnju 2017. Uzorci lišća su osušeni i skladišteni u mraku na sobnoj temperaturi do analize.

Pripremna uzorka lišća masline u vodi

Simulirajući kućanske uvjete, s 20 ml zagrijane destilirane vode (80, 90 i 100 °C) preliveno je 0,2 g u tarioniku usitnjenog uzorka lišća IB, L, B te njihovih mješavina. Za svaku sortu i mješavinu uzorci su držani u vodi 1, 5, 10, 15 i 20 minuta. Nakon ekstrakcije uzorci su filtrirani filterom Syringe s porama veličine 0,2 µm.

Priprema uzorka lišća masline u metanolu

50 mg u tarioniku usitnjenog uzorka lišća IB, B i L pomiješano je s 4 ml metanola. 10 % -tno, vodom, razrijeđena otopina metanola stavljena je 10 minuta u ultrazvučnu kupelj, bez zagrijavanja. Otopina je filtrirana Syringe filterom s porama veličine 0,2 µm.

Priprema usitnjenog lišća masline u vodi

Uzorci lišća IB, B i L usitnjeni su na mlinu za usitnjavanje Retsch GM 200 (Slika 2). 0,2 mg uzorka svake sorte preliveno je s 20 ml destilirane kipuće vode. Ekstrakcija je provedena nakon 15 minuta te su uzorci filtrirani Syringe filterom s porama veličine 0,2 µm.



Slika 2. Mlin za usitnjavanje Retsch GM 200

3.3. LC-QQQ analiza

Za kvantifikaciju korišten je tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti HPLC Agilent 1260 serije opremljen s degaserom, binarnom pumpom, autosamplerom i kolonskom pećnicom spojenom na Agilent 6460 trostruki kvadropolni (QQQ) maseni spektrometar opremljen sa elektrosprej raspršivačem (AJS ESI) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (Slika 3). Kvantitativna obrada podataka izvršena je pomoću softvera Agilent MassHunter Quantitative Analysis (verzija B.07.00).



Slika 3. Visokoprotočni tekućinski kromatograf (HPLC) spregnut s masenim spektrometrom te analizatorom trostrukim kvadropolom (MS-QQQ) prikazan je na slici. Uređaj se nalazi u prostorijama Odjela za biotehnologiju u Rijeci.

Kromatografske analize provedene su na koloni s hidrofobnim punilom Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HT (2,1 mm x 50 mm I.D, 1,8 µm, Agilent Technologies). Mobilna faza je sadržavala (A) 0,1% mravlje kiseline u miliQ i (B) 0,1% mravlje kiseline u acetonitrilu (ACN).

Metoda A

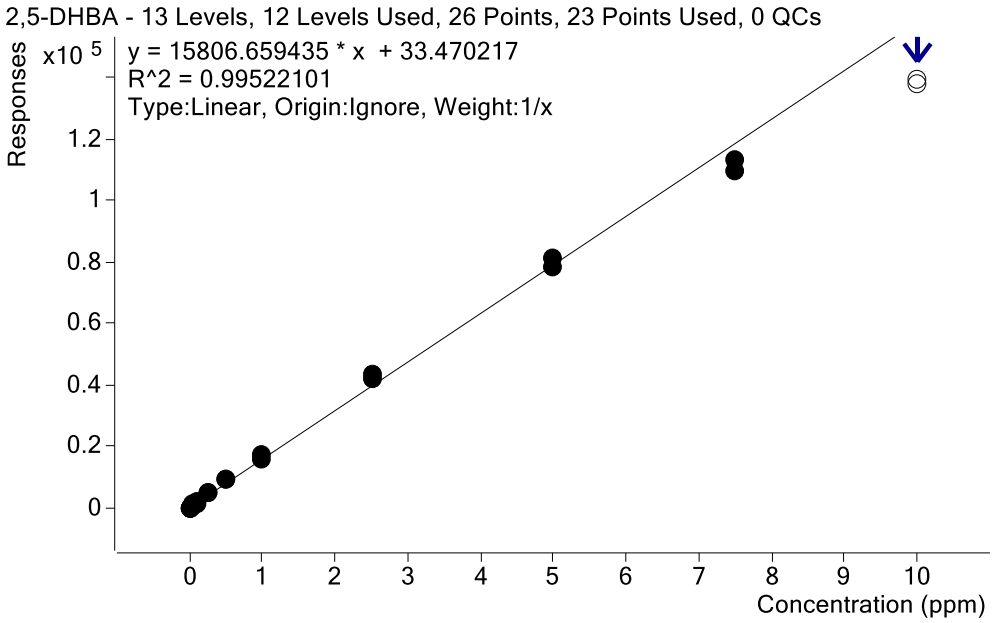
Za metodu A eluacija gradijenta je modificirana kako slijedi: 0-0,9 min linearni gradijent od 1% do 10% B, 0,9-3 min od 10% do 20% B, 3-4,5 min od 20% do 25% B, 4,5-6 min od 25% do 30% B, 6-7,5 30% B, 7,5-9 min od 30% do 90% B, 9-9,30 90% B, 9,30-9,60 od 90% do 10% B i 9,60-15 min od 10 do 1% B. Vrijeme protoka je postavljeno na dvije minute, a brzina protoka na 0,33 ml/min. Peć na koloni održavana je na 30°C. Kod svake analize injektirano je 4 µL pripremljenog uzorka. Za AJS-ESI-QQQ, parametri su postavljeni na sljedeći način: kapilarni napon je 3,5 kV u pozitivnom i negativnom načinu rada, napon mlaznice 0,5 kV, temperatura izvora iona je podešena na 300 ° C, protok plina je 5 l/min, tlak je bio 45 psi, temperatura plina za sušenje bila je 250°C, a protok plina protoka 11 l/min. Dušik je korišten kao plin u kolizijskoj ćeliji. Kolizijske energije su bile podešene od 0 V do 40 V ovisno o analiziranom fenolnom spoju (Tablica 1).

Metoda B

Za analizu tirosola razvijena je metoda B. Kromatografska analiza razvijena je na istoj mobilnoj fazi i koloni, ali eluacija gradijenta je modificirana: 0-0.1 linearni gradijent od 1% do 10% B, 0.1-13.39 od 10% do 90%, 12.39-14.59 min od 90% do 10% B, od 14,59-16 min od 10% do 1% B. Vrijeme ispiranja („posttime") je postavljeno na 4 minute, a brzina protoka na 0,1 ml/min. Peć na koloni održavana je na 30°C. Volumen injektiranog uzorka postavljen je na 10 µL. Za AJS-ESI-QQQ, parametri su postavljeni na sljedeći način: kapilarni napon je 4 kV u pozitivnom i negativnom načinu rada, napon mlaznice 0,5 kV, temperatura izvora iona je podešena na 300 °C, protok plina je 10 l/min, tlak je bio 35 psi, temperatura plina za sušenje bila je 250°C, a protok plina protoka 11 l/min. Dušik je korišten kao plin u kolizijskoj ćeliji. Kolizijske energije su bile podešene od 0 V do 40 V ovisno o analiziranom fenolnom spoju (Tablica 1).

Limit detekcije, limit kvantifikacije, linearnost i kalibracijska krivulja

Kalibracijske krivulje provedene su upotrebom smjese svih standarda u rasponu od 0,001 µg/ml do 5 ug/ml te su izrađene linearnom regresijom, (bez prisile prolaska kroz 0). Slika 4 prikazuje primjer kalibracijske krivulje za 2,5-DHBA.



Slika 4. Kalibracijska krivulja za 2,5-DHBA. Prikazan je koeficijent linearnosti (R^2) te jednadžba pravca. Iz pravca je vidljiv raspon linearnosti (0,001-7,5 ppm).

Nadalje, 1/x statistička težina primijenjena je kako bi se dobile najpouzdanije kalibracijske krivulje za sve standarde. Učinkovit raspon kalibracijskih krivulja dobiven je na temelju linearnog odgovora za svaki pojedini polifenolni spoj, a prihvatljiva linearnost ispitana je pomoću koeficijenta linearnosti (R^2). Koncentracije svih standarda su ubrizgane u triplikatu. Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) određene su prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (ICH):

$$LOD = 3{,}3 \times \frac{b}{a}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{b}{a}$$

Parametri linearnosti i limiti detekcije i kvantifikacije, prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Parametri linearnosti, limit detekcije i kvantifikacije. Prikazana je jednadžba pravca, raspon linearnosti, koeficijent linearnosti (R^2), granica detekcije (LOD), granica kvantifikacije (LOQ) te retencijsko vrijeme (RT) za svaku fenolnu komponentu.

Fenolna komponenta	Jednadžba pravca Y=ax+b		Polaritet	*m/z* prekursor ion	Fragmentor /V	*m/z* podukt ion	Kolozijske energije/V	Raspon linearnosti/ ppm	R^2	LOD	LOQ	RT/
	Nagib (a)	Odsječak (b)								ug/ml	ug/ml	min
Metoda A												
2,5-DHBA	15806,7	33,47	-	152,8	80	108,0	20	0,001-7,5	0,995	0,0070	0,0212	4,42
						81,8	20					
						53,0	16					
3,4-DHBA	3761,51	15,01	-	152,9	90	108,0	20	0,005-7,5	0,998	0,0132	0,0399	1,70
						81,0	16					
						53,0	18					
3-Hidroksitorosol	756,94	18,41	-	152,9	100	123,0	18	0,1-2,5	0,994	0,0803	0,2432	1,73
						95,0	20					
Apigenin	41665	7,67	-	268,9	160	116,9	22	0,001-0,5	0,995	0,0006	0,0018	10,33
						149,0	24					
Apigenin-7-O-glukozid	90425,9	-7,26	-	430,9	200	268,1	36	0,001-0,5	0,997	- 0,0003	- 0,0008	7,55
						310,9	24					
Diosmetin	107137	452,09	+	301,0	160	228,7	46	0,001-2,5	0,995	0,0139	0,0422	10,60
						257,9	36					
						285.9	24					
Ferulična kiselina	2289,69	4,91	-	192,9	100	134,0	6	0,01-10	0,997	0,0071	0,0214	6,70
						149,0	8					
						177,9	12					
Kavena kiselina	27277,16	206,79	-	178,8	100	88,9	34	0,005-5	0,991	0,0250	0,0758	5,35
						116,9	24					
						135,0	12					

Kvercetin	17670,8	-23,67	-	300,9	150	120,9	24	0,1-1	0,997	-0,0044	-0,0134	9,15
						151,0	18					
						178,8	14					
Luteolin	26778,7	63,89	-	284,9	180	133,0	36	0,001-5	0,994	0,0079	0,0239	9,11
						150,9	24					
Luteolin-7-O-glukozid	122734	117,66	+	449.1	130	287,0	14	0.001-2.5	0.9998	0,0032	0,0096	6,80
Naringenin	33448	10,74	-	270,9	140	118,9	24	0,001-0,5	0,998	0,0011	0,0032	10,16
						151,0	12					
Oleuropein	15681,8	-10,76	-	538,9	170	275,1	18	0,001-2,5	0,991	-0,0023	-0,0069	8,07
						307,3	18					
						377,3	12					
***p*-Kumarinska kiselina**	30897,4	769,42	-	162,9	90	64,9	48	0,025-2,5	0,991	0,0822	0,2490	6,26
						92,8	36					
						119,0	12					
***p*-Hidroksibenzojeva kiselina**	18186,8	29,97	-	136,9	80	64,8	34	0,01-1	0,992	0,0054	0,0165	4,29
						93,0	12					
Rutin	6302,98	0,93	-	609,1	200	264,6	46	0.001-5	1,000	0,0005	0,0015	6,60
						299,9	38					
Verbaskozid	16911,7	-8,68	-	623,0	200	161,0	38	0,001-7,5	0,993	-0,0017	-0,0051	6,96
						461,4	28					
Metoda B												
Tirosol	61,54	-19,73	-	136,8	100	93	40	0,5-5	0,993	0,962	3,206	1,736
						105,9	12					
						107	10					
						119	10					

Derivati oleuropeina

Za LC-QQQ kvantifikaciju fenolnih komponenta bez standarda, analiza je provedena na temelju prekursora fenolne komponente. Metoda je temeljena na opisanoj Metodi A, ali u dinamičnom MRM (DMRM) načinu. DMRM način se pokazao visoke kvalitete analizirajući u točno određenom trenutku s delta retencijskim vremenom za svaku analiziranu komponentu. Fragmentor i kolizijske energije za derivate oleuropeina jednake su prethodno određenima za oleuropein zbog sličnosti u kemijskoj strukturi. Parametri su definirani u Tablici 2.

Tablica 2. Prikaz MRM parametara derivata oleuropeina bez standarda za LC-QQQ analizu. Parametri uključuju polaritet, prekursor ion, produkt ion, retencijsko vrijeme (RT) te kvantifikacijsku tranziciju.

Derivat oleuropeina	Polaritet	*m/z* prekursor ion	*m/z* podukt ion	RT/ min	Kvantifikacijska tranzicija
3,4-DHPEA-EA	-	377	275	10.9	377 -> 275
3,4-DHPEA-EDA	-	319	69 59	8.1	319 -> 69
***p*-HPEA-EA**	-	361	291 259.1	11.2	361 -> 291
3,4-DHPEA-AC	-	196	59	6.7	196 -> 59
Ligstrozid derivat 1	-	393	317 257 317	9.3	393 -> 257
Ligstrozid derivat 2	-	355	199 155 111	7.5	335 ->199
Oleuropein derivat	-	365	229 153	9.8	365 -> 229

3.4. Prikaz, analiza i statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina dvaju injektiranja svakog uzorka ± standardna devijacija. Kompletna analiza rezultata provedena je u Excel-u 2016 verzija 1708 (Microsoft, 2016). Program Unscrambler 10.4. (CAMO SoftwareAS, Oslo, Norveška) korišten je za analizu glavnih komponenti (PCA, prema engl Principal Component Analysis).

U programu Design-Expert version 10 (Stat-Easte, Inc. Minneapolis, SAD) dizajnirane su formulacije mješavina čaja. Dizajn mješavina je specijalizirani oblik statističke metode odzivnih površina (RMS, prema engl. *Response Surface Methodology*). Ova metoda omogućuje uspostavu površinskog modela, na temelju kojeg su procijenjene željene fenolne komponente u mješavinama te određeni omjeri sorti prema ciljnim vrijednostima.

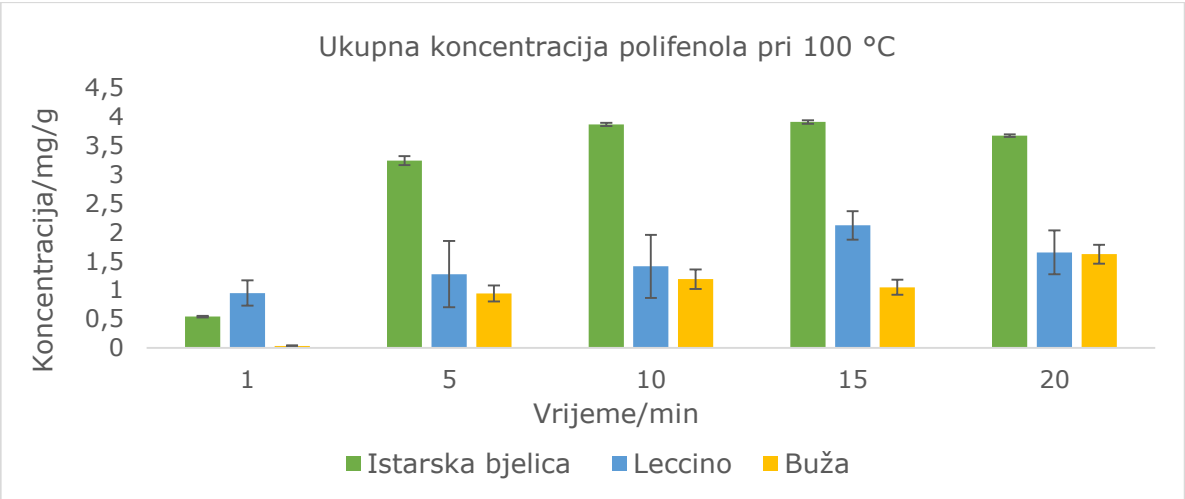
4. REZULTATI

4.1. Optimizacija procesa pripreme čaja maslinovog lišća

4.1.1. Utjecaj vremena i temperature ekstrakcije na ukupni fenolni sadržaj

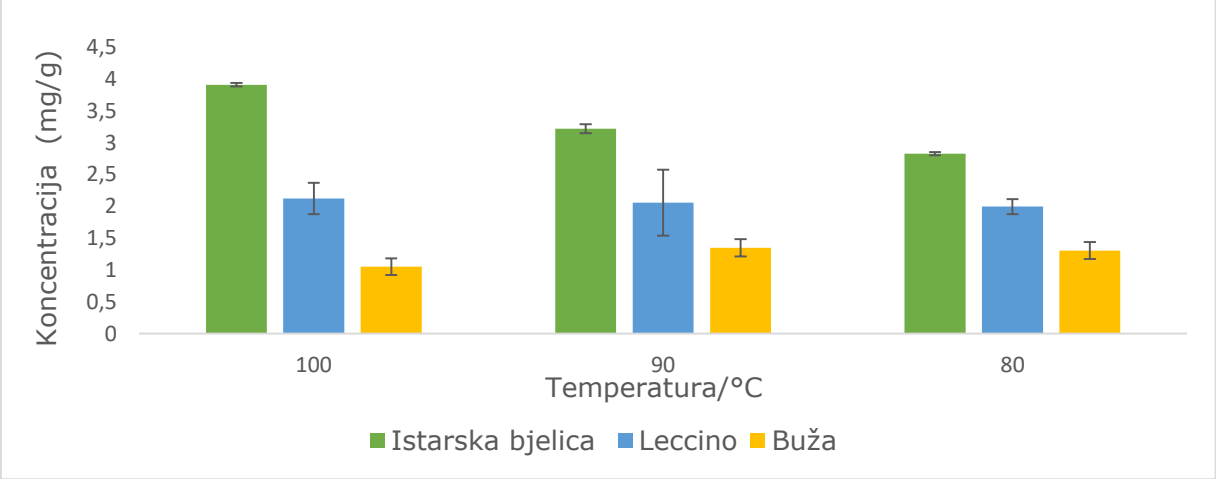
Kako bi odredili temperaturu i vrijeme vodene ekstrakcije pri kojima je ukupna koncentracija polifenola najviša, analizirali smo ekstrakte svake sorte maslinovog lišća dobivene na različitim temperaturama (80, 90 i 100 °C) i različitim vremenima ekstrakcije (1, 5, 10, 15 i 20 minuta). U svim uzorcima potvrđena je prisutnost 16 polifenola (2,5–DHBA, 3,4–DHBA, 3-hidroksitirosol, apigenin, apigenin-7-O-glukozid, kavena kiselina, ferulična kiselina, luteolin, naringenin, oleuropein, *p*-kumarinska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina (*p*-HBA), kvercetin, rutin, tirosol, verbaskozid). U čaju B dodatno su potvrđeni diosmetin i kvercetin. Ukupna koncentracija određena je zbrajanjem koncentracija svih pojedinačno određenih polifenola pojedine sorte.

Pri 1 min maceracije koncentracija ukupnih fenola niža je od 1 mg/g zatim se povećava s produženjem vremena maceracije i u 15 minuti doseže svoj maksimum te za IB iznosi 3,91 mg/g. Također, i L (2,12 mg/g) doseže maksimalnu koncentraciju pri 15 min. Suprotno, kod B (1,62 mg/g) ukupna koncentracija polifenola najviša je pri 20 min (Slika 5). Prema dobivenim rezultatima, za daljnja ispitivanja koristili smo 15 min kao optimalno vrijeme ekstrakcije.



Slika 5. Ukupna koncentracija polifenola u čajevima lišća sorti Istarska bjelica, Leccino i Buža ovisna je o vremenu ekstrakcije. Ukupna koncentracija je zbroj svih koncentracija pojedinačno pronađenih polifenola u različitim vremenima ekstrakcije (1, 5, 10, 15 ili 20 minuta). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina dvaju injektiranja uzoraka ± standardna devijacija.

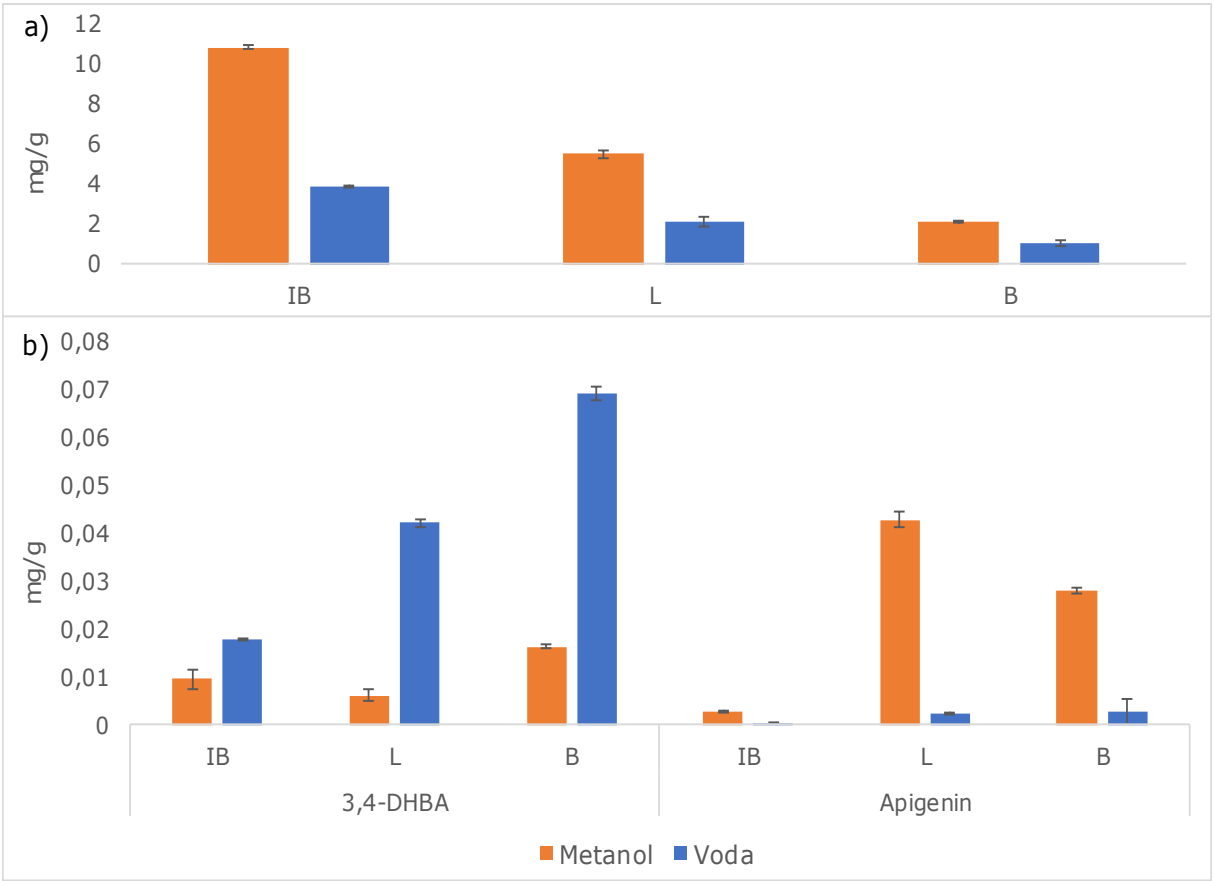
Rezultati su pokazali kako se povećavanjem temperature vode povećava ukupna koncentracija polifenola. Ukupna koncentracija polifenola za uzorke sorti IB (3,91 mg/g) i L (2,12 mg/g) najviša je pri 100 °C. Uzorci sorte B (1,34 mg/g) pokazali su najvišu koncentraciju pri 90 °C (Slika 6). Na osnovu dobivenih rezultata, određena je temperatura od 100 °C kao optimalna.



Slika 6. Ukupna koncentracija polifenola u čajevima lišća masline sorti Istarska bjelica, Leccino i Buža u ovisnosti o temperaturi ekstrakcije. Ukupna koncentracija je određena kao zbroj svih koncentracija pojedinačno analiziranih polifenola u uzorcima pripremljenih pri različitim temperaturama vode (80, 90 i 100 °C) i vremenu maceracije od 15 min. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina dvaju injektiranja uzoraka ± standardna devijacija.

4.1.2. Usporedba ekstrakcije bazirane na organskom otapalu s optimiziranom vodenom ekstrakcijom

Određena je uspješnost vodene ekstrakcije, uspoređujući je s organskom ekstrakcijom. Ukupna koncentracija polifenola kod metanolne ekstrakcije uzoraka IB iznosila je 10,82 mg/g, dok je kod vodene 3,91 mg/g. Kod uzoraka L (5,50 mg/g za metanol i 2,12 mg/g za vodu) i B (2,07 mg/g za metanol i 1,05 mg/g za vodu) razlika je manja (slika 7a). Gledajući pojedinačno polifenole, pojedini su bolje ekstrahirani u vodi (2,5-DHBA, 3,4-DHBA, 3-hidroksitirosol, ferulična kiselina, *p*-kumarinska kiselina, *p*HBA, i rutin), a drugi u metanolu (apigenin, apigenin glukozid, kavena kiselina, luteolin, naringenin, oleuropein, kvercetin, verbaskozid, diosmetin, luteolin glukozid i tirosol. Slika 7b prikazuje odnos koncentracije 3,4 DHBA i apigenina u metanolu i vodi.

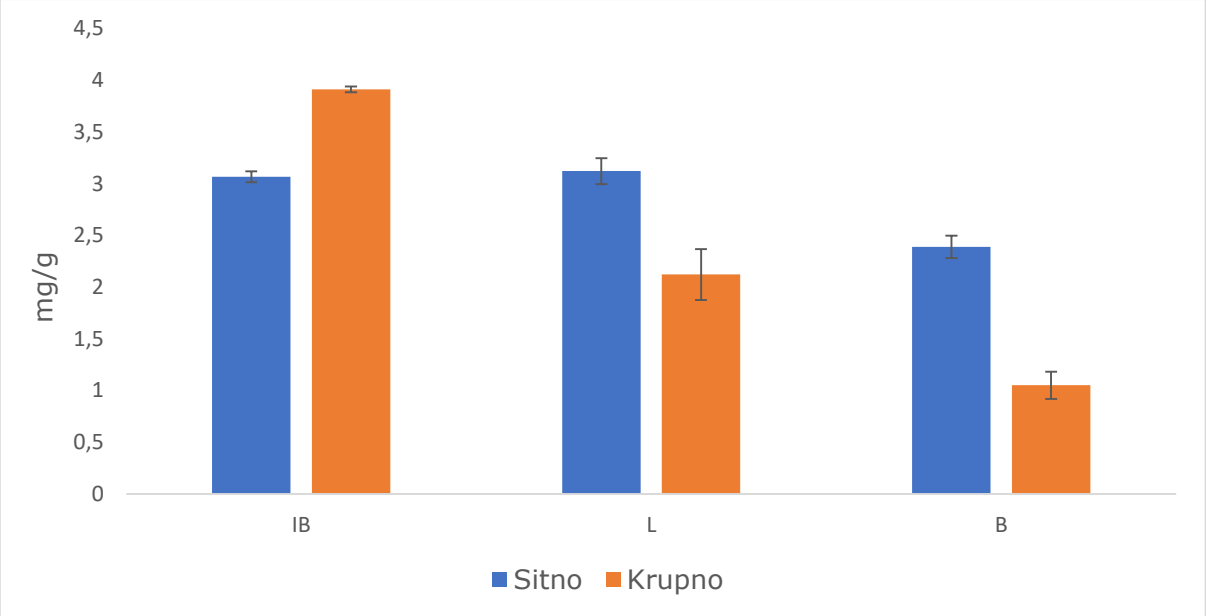


Slika 7. Usporedba optimizirane vodene s organskom ekstrakcijom. Prikaz ukupnih koncentracija (dobivenih zbrajanjem svih pojedinačno određenih

polifenola) sorti Istarske bjelice (IB), Leccina (L) i Buže (B) nakon metanolne ekstrakcije i vodene ekstrakcije na optimalnoj temperaturi (100 °C) i vremenu (15 min) (a). Koncentracije 3,4-DHBA i apigenina nakon vodene i organske ekstrakcije (b). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina dvaju injektiranja uzoraka u mg (polifenola) / g (suhog lišća) ± standardna devijacija.

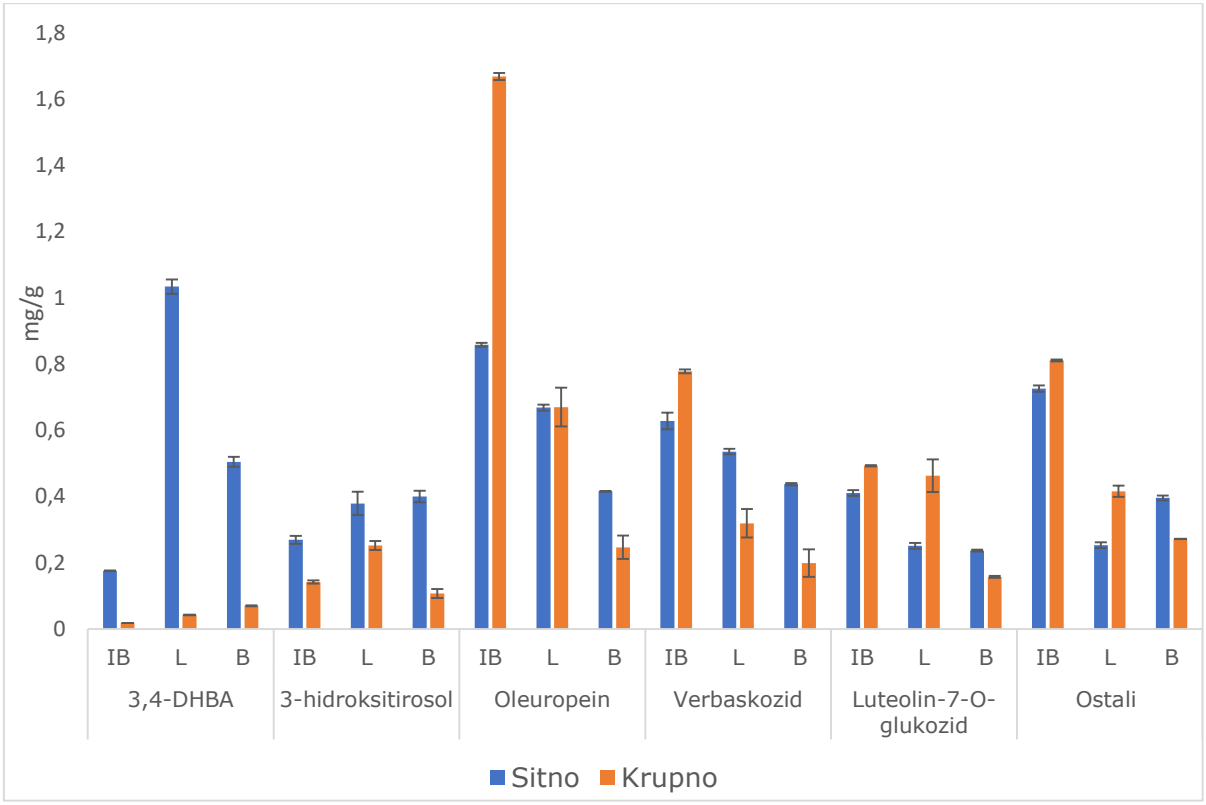
4.1.3. Usporedba načina pripreme uzoraka maslinova lišća

Važan segment za optimizaciju ekstrakcijskog postupka bio je ispitati korelaciju između veličine čestica lišća masline i koncentracije polifenola. Uzorci su usitnjeni na mlinu za usitnjavanje te je od dobivenog sitnog praha pripremljen čaj pri optimalnoj temperaturi od 100 °C i 15 minutnoj maceraciji. Dobivene vrijednosti koncentracije uspoređene su s prethodno dobivenima rezultatima na uzorcima koji su usitnjeni u tarioniku. Polifenoli IB imaju veću koncentraciju kada su krupno usitnjeni s koncentracijom 3,91 mg/g. Kod B (2,39 mg/g) i L (3,12 mg/g) sitno mljeveni uzorci pokazuju veću koncentraciju (Slika 8).



Slika 8. Usporedba ukupne koncentracije sitno i krupno mljevenih uzoraka sorti Istarske bjelice (IB), Leccina (L) i Buže (B). Uzorci su usitnjeni u tarioniku (krupno) i u Retsch GM 200 mlinu (sitno). Određena je ukupna koncentracija polifenola u vodi na optimalnoj temperaturi (100 °C) i vremenu (15 min). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina dvaju injektiranja uzoraka u mg (polifenola) / g (suhog lišća) ± standardna devijacija.

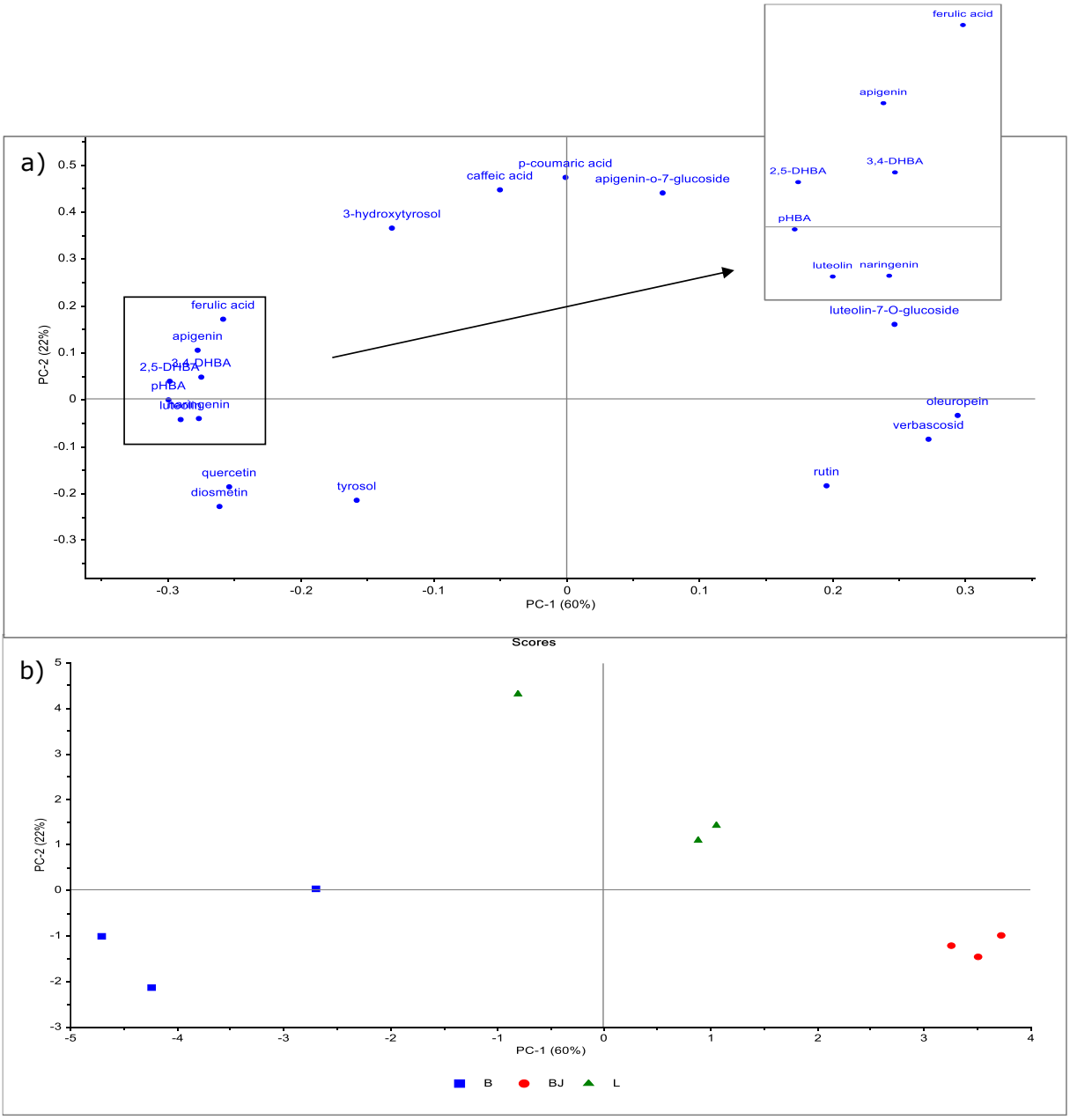
Nadalje, usporedba krupno-sitno odnosa na pojedinačnim polifenolima pokazala je kvantitativnu razliku u individualnim polifenolima. Primjerice, 3,4-DHBA i 3-hidroksitirosol znatno su bolje ekstrahirani u sitno mljevenim uzorcima svih triju sorti. Oleuropein i verbaskozid pokazuju navišu koncentraciju u krupno mljevenim uzorcima IB, dok su kod L i B koncentracije više kod sitno mljevenih. Luteolin-7-O-glukozid ima višu koncentraciju u krupno mljevenim uzorcima IB i L, dok je kod B viša u sitno mljevenim uzorcima. Slika 9 prikazuje odnos koncentracija najzastupljenijih polifenola kod sitno i krupno mljevenih uzoraka.



Slika 9. Usporedba koncentracije polifenola sitno i krupno mljevenih uzoraka sorti Istarske bjelice (IB), Leccina (L) i Buže (B). Uzorci su usitnjeni u tarioniku (krupno) i u mlinu za usitnjavanje (sitno) te pripremljeni u vodi na optimalnoj temperaturi (100 °C) i vremenu (15 min). „Ostali" prikazuje zbroj koncentracija svih preostalih pronađenih polifenola. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina dvaju injektiranja uzoraka u mg (polifenola) / g (suhog lišća) ± standardna devijacija.

4.2. Analiza karakterističnog sadržaja polifenola u čajevima triju sorti maslina

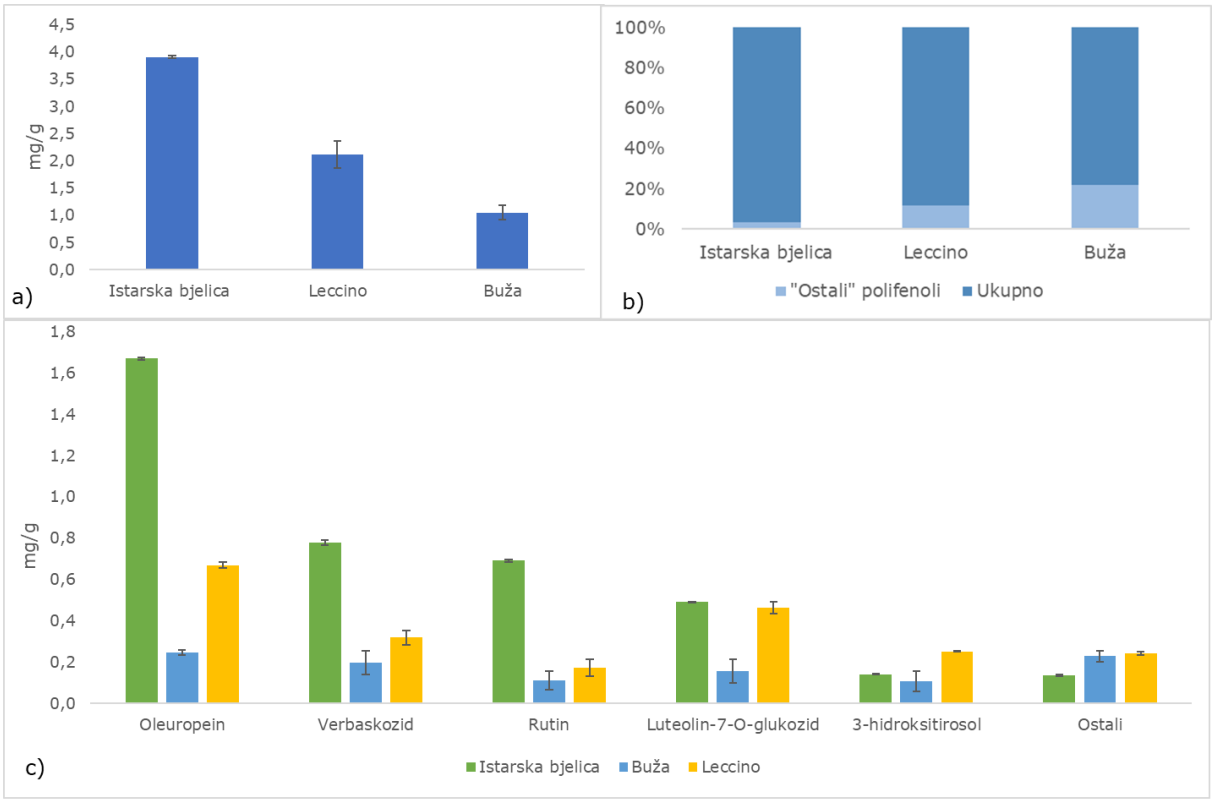
Nakon analize sastava polifenola i njihove kvantifikacije provedena je i statistička obrada metodom glavnih komponenti (PCA). Praćeno je grupiranje uzoraka triju različitih sorti, s jednakim vremenom ekstrakcije (15 min) i različitom temperaturom vode (80, 90 i 100 °C) kako bi se utvrdilo postoji li grupiranje uzoraka iste sorte prema specifičnom polifenolnom sastavu.



Slika 10. Projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2) uzoraka za udio polifenola uzoraka Istarske bjelice (BJ), Leccina(L) i Buže(B) pripremljenih u vodi 15 minuta na temperaturama od 80, 90 i 100 °C. Položaj pojedinog polifenola u dijelu koordinatne osi −0,3 PC−1 i od −0,1 do 0,1 PC−2 (a) te PC1/2 položaj grupiranih uzoraka svake sorte (b).

Slika 10a prikazuje razmještaj varijabli, tj. polifenola u prostoru glavnih komponenti. PC-1 objašnjava 60 % svih varijanci, dok PC-2 objašnjava 22 %. Iz Slike 10b vidljivo je kako su uzorci B okupljeni u negativnom dijelu PC-1 i PC-2 osi, dok su uzorci L grupirani su u pozitivnom PC-1 i PC-2 dijelu osi. Uzorci Istarske bjelice okupljeni su u PC-1 pozitivnom i PC-2 negativnom dijelu koordinatne osi.

Sljedeći korak u analizi bio je utvrđivanje specifičnih svojstava svake sorte optimiziranom metodom. Najveća vrijednost ukupnih fenola izmjerena je u čaju lišća Istarske bjelice gdje ukupna koncentracija doseže 3,91 mg/g (Slika 11a). Udio ostalih polifenola u ukupnom sastavu IB iznosi 3,49%, za L 11,49% te za B 21,79% (Slika 11b). Čajevi lišća sorti L i B, iako imaju manju ukupnu koncentraciju fenola (2,21 mg/g i 1,04 mg/g), pokazuju ujednačeni omjer različitih fenola (Slika 11c).

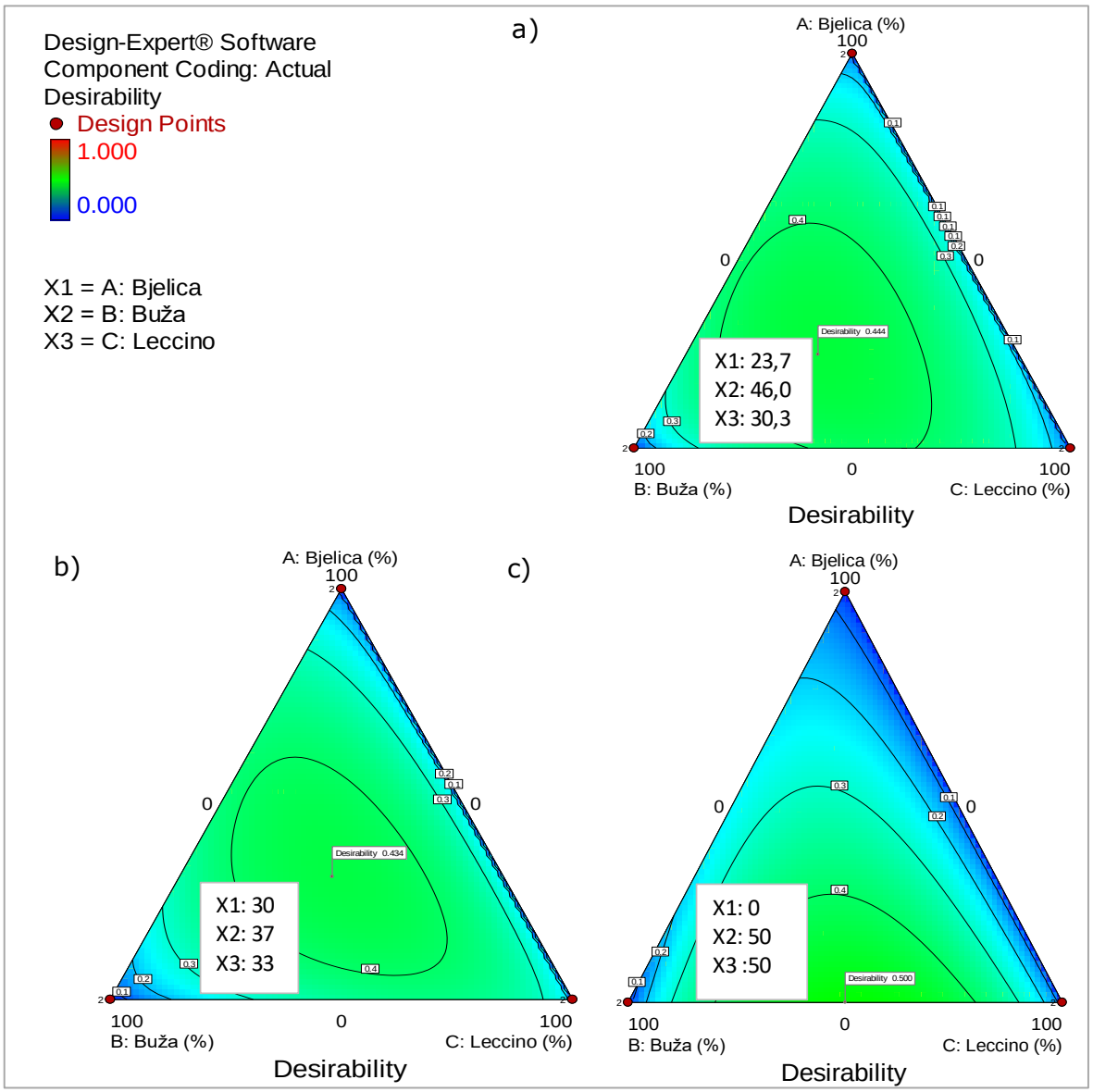


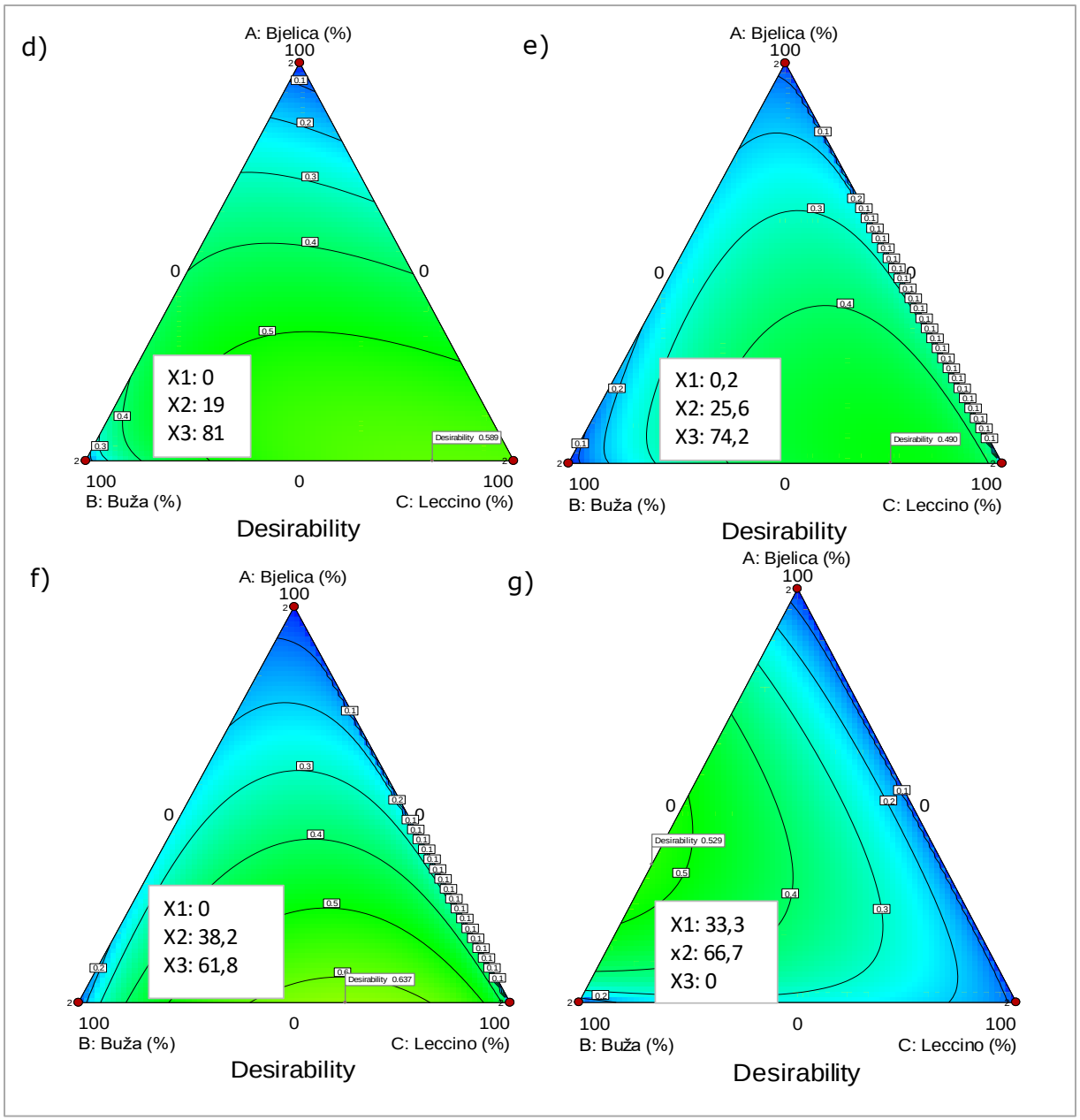
Slika 11. Koncentracije polifenola u čajevima Istarske bjelice, Leccina i Buže. Uzorci su pripremljeni optimiziranom metodom (15 minuta, vodena ekstrakcija na 100 °C). Ukupna koncentracija dobivena je zbrajanjem svih pojedinačno određenih koncentracija polifenola (a). Prikaz postotnog udjela zbroja koncentracije ostalih u ukupnoj koncentraciji (b). Koncentracije najzastupljenijih polifenola u čajevima lišća masline (c). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina dvaju injektiranja uzoraka u mg (polifenola) / g (suhog lišća) ± standardna devijacija.

4.3. Optimizacija formulacija funkcionalnih mješavina čaja lišća masline

Na temelju dobivenih rezultata dizajnirano je sedam mješavina sorti čaja lišća masline s ciljem dobivanja funkcionalnog proizvoda. Za svako funkcionalno djelovanje određeni su polifenoli prema kojima su dizajnirane mješavine. Pomoću programa Design-Expert određen je omjer sorti za svaku mješavinu i ciljne koncentracije za pojedini polifenol (Slika 12). Svakoj mješavini pripisana su blagotvorna svojstva temeljena na prethodnim literaturnim istraživanjima polifenola.

Na temelju dobivenih vrijednosti pripremljene su mješavine čajeva prema definiranim optimalnim uvjetima vodene ekstrakcije te su analizirane uz pomoć LC-QQQ. Kvantitativni rezultati prikazani su u Tablici 3.





Slika 12. Prikaz grafova (contour plots) prema kojima su dizajnirane mješavine čaja: za prevenciju razvoja kardiovaskularnih bolesti (a), s pozitivnim djelovanjem na smanjivanje rizika od dijabetesa (b), s pozitivnim učinkom na redukciju pretilosti (c), s neuroprotektivnim (d), antimikrobnim (e) i protuupalnim djelovanjem (f) te s pozitivnim učinkom na imunitet (g). Ciljne koncentracije polifenola prikazane su tako da zelena označava najvišu, a plava najnižu koncentracija polifenola. X1 se odnosi na Istarsku bjelicu, X2 na Bužu te X3 na Leccino. Vrijednosti su izražene u postocima (%).

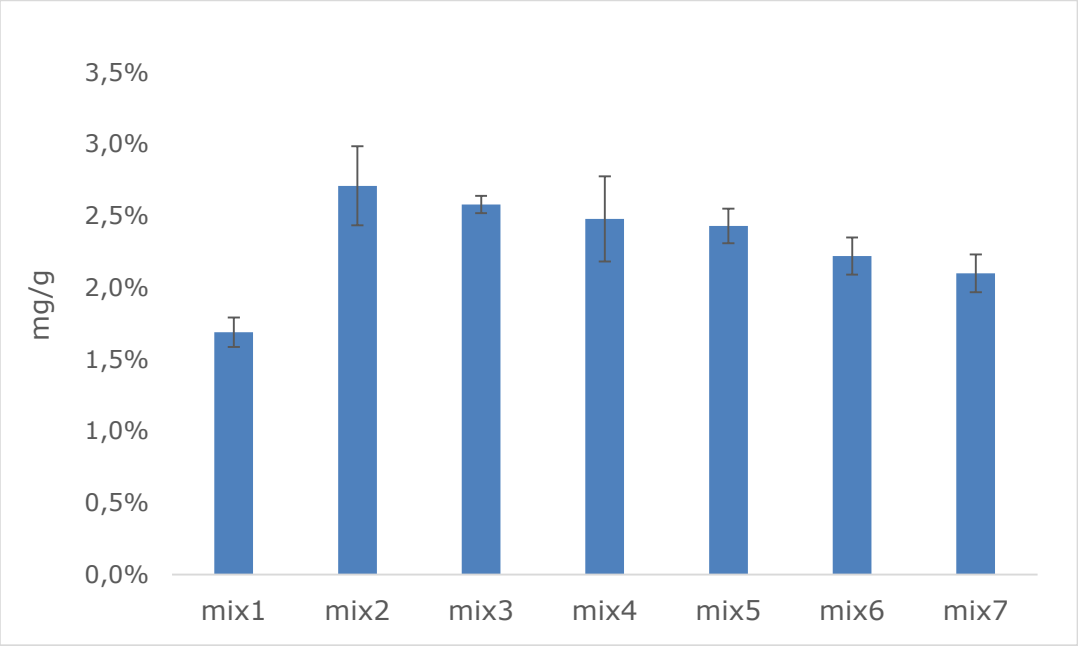
Tablica 3. Kvantitativni prikaz polifenolnog sadržaja izražen kao mg/g ± standardna devijacija (SD) u uzorcima funkcionalnih mješavina čaja analiziranih na LC-QQQ.

Fenolna komponenta	mix 1	mix 2	mix 3	mix 4	mix 5	mix 6	mix 7
				mg/g			
2,5-DHBA	0.0007±0.0001	0.0032±0.0002	0.0022±0.0004	0,0025±0,0004	0,0022±0,0004	0,0027±0,0000	0,0033±0,0000
3,4-DHBA	0.0118±0.0002	0.0402±0.0009	0.0236±0.0006	0,0314±0,0009	0,0236±0,0006	0,0266±0,0008	0,0223±0,0012
3-Hidroksitirosol	0.0850±0.0072	0.1219±0.0002	0.1399±0.0076	0,1504±0,0009	0,1399±0,0076	0,1256±0,0072	0,1237±0,0013
Apigenin	0.0006±0.0001	0.0007±0.0000	0.0010±0.0003	0,0010±0,0112	0,0010±0,0003	0,0012±0,0002	0,0008±0,0001
Apigenin-7-O-glukozid	0.0235±0.0000	0.0197±0.0004	0.0380±0.0005	0,0435±0,0001	0,0380±0,0005	0,0356±0,0003	0,0110±0,0001
Kavena kiselina	0.0015±0.0001	0.0016±0.0003	0.0022±0.0001	0,0022±0,0013	0,0022±0,0001	0,002±0,0001	0,0021±0,0001
Ferulična kiselina	0.0029±0.0008	0.0048±0.0016	0.0064±0.0003	0,0065±0,0000	0,0064±0,0003	0,0039±0,0008	0,0043±0,0003
Luteolin	0.0031±0.0001	0.0038±0.0000	0.0052±0.0000	0,0049±0,0002	0,0052±0,0000	0,0053±0,0004	0,0065±0,0011
Naringenin	0.0002±0.0000	0.0003±0.0000	0.0004±0.0000	0,0003±0,0008	0,0004±0,0000	0,0005±0,0003	0,0004±0,0001
Oleuropein	1.1554±0.0034	0.8198±0.0032	0.7640±0.0261	0,8385±0,0001	0,7640±0,0261	0,725±0,0059	0,9439±0,0119

p-kumarinska kiselina	0.0042±0.0004	0.0040±0.0006	0.0062±0.0006	0,0070±0,0068	0,0062±0,0006	0,0061±0,0011	0,0037±0,0002
*p*HBA	0.0022±0.0002	0.0046±0.0000	0.0040±0.0000	0,0042±0,0013	0,0040±0,0000	0,0036±0,0005	0,0048±0,0006
Kvercetin	0.0046±0.0003	0.0066±0.0003	0.0078±0.0008	0,0065±0,0000	0,0078±0,0008	0,0055±0,0004	0,0064±0,0002
Verbaskozid	0.6719±0.0171	0.4639±0.0136	0.4918±0.0034	0,5042±0,0000	0,4918±0,0034	0,4859±0,0028	0,6443±0,0109
Diosmetin	0.0000±0.0000	0.0001±0.0001	0.0001±0.0000	0,0000±0,0133	0,0001±0,0000	0,0001±0,0001	0,0004±0,0000
Rutin	0.5070±0.0018	0.2366±0.0025	0.1553±0.0010	0,1705±0,0000	0,1553±0,0010	0,1684±0,0029	0,3446±0,0000
Luteolin-7-O-glukozid	0.3846±0.0132	0.2330±0.0044	0.2786±0.0049	0,2941±0,0018	0,2786±0,0049	0,2729±0,0038	0,2487±0,0037
Tirosol	0.0602±0.0049	0.0839±0.0019	0.0770±0.0047	0,0749±0,0007	0,0770±0,0010	0,0836±0,0005	0,0730±0,0021

4.4. Određivanje koncentracije derivata oleuropeina

U uzorcima svake mješavine kvantificirani su derivati oleuropeina, koji prema literaturnim podacima za maslinovo ulje čine značajan udio ukupnog sastava polifenola. U tu svrhu provedena je analiza te je određen udio koji čine u funkcionalnim mješavinama čaja.



Slika 13. Postotni udio zbroja derivata oleuropeina u ukupnoj koncentraciji polifenola pojedine mješavine. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina dvaju injektiranja uzoraka ± standardna devijacija te pretvoreni u postotni udio u zbroju koncentracija svih pronađenih polifenola.

Analizom su potvrđeni sljedeći spojevi: ligostrozid aglikon (p-HPEA-EA, prema engl. *ligstroside aglycon*), oleuropein aglikon (3,4-DHPEA-EA, engl. *oleuropein aglycon mono alehide*), oleokantahal (3,4-DHPEA-EDA, prema engl. *3,4-dihydroxyphenylethanol*), hidroksitirosol acetat (3,4-DHPEA-AC prema engl. *3,4-dihydroxyphenyl ethyl acetate*), ligstrozid derivat 1, ligstrozid derivat 2 i oleuropein derivat. Oni u svakoj mješavini čine 1,5-2,7% ukupne koncentracije polifenola. Točni postoci za svaku mješavinu prikazani su na Slici 13.

4. RASPRAVA

Prikazano istraživanje ukazuje na varijacije kvantitativnog polifenolnog sastava čaja lišća masline u ovisnosti o sorti masline te uvjetima pripreme. Utvrdili smo optimalne uvjete pripreme čaja s obzirom na koncentraciju polifenola te dizajnirali funkcionalne mješavine željenih svojstava. Rezultati su pokazali utjecaj vremena i temperature maceracije na koncentraciju ekstrahiranih polifenola. Njihova bioraspoloživost u otapalu direktno je povezana s kemijskim svojstvima pojedinog polifenola.

Prvi korak istraživanja uključivao je optimizaciju procesa pripreme čaja vodenom ekstrakcijom radi postizanja optimalne koncentracije polifenola. Iako je u prethodnim istraživanjima predlagano duže vrijeme maceracije (4, 21), usredotočili smo se na kraća vremena (do 20 min) zbog kućanskih uvjeta pripreme čaja. Potvrdili smo hipotezu da viša temperatura i dulje vrijeme maceracije utječu na povećanje ukupne koncentracije polifenola. Rezultati su pokazali da je najviša ukupna koncentracija kod čaja *Istarske bjelice* i *Leccina* izmjerena nakon 15 min maceracije, s početnom temperaturom od 100 °C. Maksimalna ukupna koncentracija čaja sorte *Buža* postignuta je pri vremenu od 20 min. Kao optimalni parametri za pripremu čaja koja će se koristiti u daljnjim analizama odabrani su 15 min maceracije uz početnu temperaturu vode od 100 °C.

Sljedeći korak u procesu optimizacije bio je usporedba optimizirane vodene ekstrakcije s organskom ekstrakcijom, kako bi odredili uspješnosti vodene ekstrakcije. Kao otapalo koristili smo metanol te je ekstrakcija dodatno ubrzana 10 minutnim korištenjem ultrazvučne kupelji koja ubrzava ekstrakcijski postupak, ali ne uzrokuje degradaciju polifenola (19).

Očekivano, metanolna ekstrakcija se pokazala uspješnijom gledajući ukupnu koncentraciju polifenola svake sorte. No, ukoliko uzmemo u obzir podatak da je prosječno uzorak vodene ekstrakcije sadržavao 41,83 % ukupnih polifenola (u odnosu na ekstrakciju metanolom) rezultati su zadovoljavajući te se može zaključiti kako je vodena ekstrakcija uspješna u izdvajanju veće količine polifenola.

Gledajući pojedinačno polifenole, njihova bioraspoloživost u otapalu direktno je povezana s kemijskim svojstvima pojedinog polifenola. Rezultati su dokazali kako fenolne kiseline imaju bolju bioraspoloživost u vodi (2,5-DHBA; 3,4-DHBA; ferulična kiselina, 3-hidroksitirosol i dr.) zbog polarnog karaktera, dok u metanolu imaju strukturno velike, nepolarne molekule poput flavonoida (oleuropein, verbaskozid, diosmetin luteolin-7-O-glukozid i dr.). Primjerice, logP vrijednost za 3,4-DHBA iznosi 0,86, zbog čega smo i očekivali uspješniju vodenu ekstrakciju. Apigeninu, nakon vodene ekstrakcije, koncentracija ne prelazi 0,01 mg/g dok je nakon metanolne znatno viša, što potvrđuje hidrofobni karakter molekule (logP=3,02). Zaključujemo da polarnost utječe na uspješnost ekstrakcije pojedinog polifenola, čime je potvrđena postavljena hipoteza. Omjer koncentracija u vodi i metanolu pojedinog polifenola ostaje očuvan u svim sortama, prema tome zaključujemo da ekstrakcije nisu pod utjecajem sorte masline.

Mnogi autori predlagali su sitno mljevenje uzoraka lišća, kako bi se povećala iskoristivost ekstrakcije (4). Rezultati provedenog istraživanja nisu pokazali prednosti usitnjavanja uzorka. Naime, uzorci L i B pokazali su višu koncentraciju ukupnih polifenola kod sitnije mljevenih uzoraka. Međutim, čaj IB je imao višu koncentraciju ukupnih polifenola kod krupno (u tarioniku) mljevenih uzoraka ponajprije zbog visokih koncentracija oleuropeina. Usprkos tomu, zbog male razlike u ukupnim koncentracijama između sitno i krupno mljevenih uzoraka nije moguće zaključiti da usitnjavanje uzoraka znatno utječe na povećanje ekstrakcijskih prinosa. Konkretno, luteolin-7-O-glukozida ima više u krupno mljevenim uzorcima IB i L, a 3,4-DHBA je bolje ekstrahiran u sitno mljevenim uzorcima svih triju sorti. Upravo ti pojedinačni rezultati ukazuju na to da je korelacija između veličine čestica i koncentracije ovisna o individualnom polifenolu i sorti iz koje je analiziran. Postavljena hipoteza je opovrgnuta.

Dosadašnjih radovi temeljili su se na interpretaciji rezultata dobivenih analizom ukupnih polifenola te bi se rezultati prikazali na temelju jednog standarda (21). LC-QQQ analiza omogućuje određivanje koncentracije svakog polifenola za kojeg imamo standard. Ukupna koncentracija

polifenola kod pojedinog uzorka dobivena je zbrajanjem svih identifikacijskih i kvantificiranih polifenola. Pojedinačne bi vrijednosti zatim zbrojili te dobili ukupne za svaku sortu. Najveću vrijednost ukupnih fenola odredili smo u uzorcima lišća Istarske bjelice gdje ukupna koncentracija doseže 3,91 mg/g, pri optimalnim uvjetima. S druge strane čajevi lišća sorti L i B imaju manju ukupnu koncentraciju polifenola (2,21 mg/g i 1,04 mg/g), no zanimljiva činjenica je da čajevi B i L sadrže različite polifenole koji su više zastupljeni. Ukoliko pogledamo zastupljenost polifenola koji ne spadaju u pet najzastupljenijih (oleuropein, verbaskozid, rutin, luteolin glukozid i 3-hidroksitirosol u ukupnom sastavu), ona za IB iznosi 3,49 %, za L 11,49 % te za B 21,79 %. Čaj lišća B sadrži najviši udio ostalih polifenola, tome pridonosi i činjenica da u svom sastavu sadrži dodatno polifenole kvercetin i diosmetin.

U dosadašnjim istraživanjima najzastupljeniji polifenoli u lišću masline bili su oleuropein (5,53-26,471 mg/g), 3-hidroksitirosol (0,5-1,16 mg/g), luteolin-7-O-glukozid (0,02-6,01 mg/g), apigenin-7-O-glukozid (0,01-2,33 mg/g) i verbaskozid (0,2-8,5 mg/g) (13). Naši rezultati kod svih sorti potvrđuju navedene polifenole kao najzastupljenije: oleuropein (0,27-1,67 mg/g), verbaskozid (0,199-0,778 mg/g), luteolin-7-O-glukozid (0,159-0,497 mg/g) te 3-hidroksitirosol (0,116-0,261 mg/g), uz iznimku rutina (0,11-0,69 mg/g) kojega ima u višoj koncentraciji od apigenin-7-O-glukozida (0,05-0,01 mg/g). S obzirom da najzastupljeniji polifenoli ostaju očuvani u čajevima zaključujemo da pripremom čaja maslinovog lišća ne dolazi do značajne degradacije polifenola, osim u slučaju apigenin glukozida koji je potvrđen kao termonestabilan pri optimalnim uvjetima pripreme (33).

Metoda PCA je provedena kako bi se bolje opisala pojedina sorta s obzirom na polifenolni sastav te ispitalo variranje u sastavu s obzirom na pa primijenjenu temperaturu u pripremi čaja. PCA je pokazala kako svaka sorta ima svoj specifični polifenolni sastav, to jest okarakterizirana je određenim polifenolima. Uzorci B okupljeni su u negativnom dijelu osi PC-1

i PC-2, što upućuje na obilježenost sorte B kvercetinom, diosmetinom, tirosolom, luteolinom i naringeninom. Uzorci L grupirani su u pozitivnom području PC-1 i PC-2 osi zbog čega su obilježene s *p*-kumarinskom kiselinom, kavenom kiselinom, 3-hidroksitirosolom i apigenin-7-O-glukozidom. Uzorci IB, određeni s verbaskozidom, oleuropeinom, rutinom i luteolin-7-O-glukozidom, okupljeni su u PC-1 pozitivnom i PC-2 negativnom dijelu koordinatne osi.

Također smo temeljem analize sorti, pripremili funkcionalne mješavine čajeva s obzirom na željeni biološki učinak. Prvu mješavinu napravili smo s ciljem dobivanja funkcionalnog čaja za prevenciju razvoja kardiovaskularnih bolesti (KVB). Dosadašnja istraživanja potvrdila su da 3-hidroksitirosol, oleuropein i tirosol utječu na prevenciju i progresiju ateroskleroze (34), upravo zato smo ih odabrali kao bitne komponente za mješavinu. Ferulična kiselina i kvercetin izabrani su zbog jakog antioksidativnog i protuupalnog djelovanja. Kliničko istraživanje dokazalo je je feruličnu kiselinu kao molekulu s velikom mogućnošću poboljšavanja lipidnog profila (smanjuje razinu HMG-CoA reduktaze) i smanjenju oksidativnog stresa kod hiperlipidemičnih pacijenata (35). Kvercetin djeluje na krvni tlak, potvrđeno je kliničkim istraživanjem te je pretpostavljeno da nema drugih utjecaja na KVB (36). Oleuropein i hidroksitirosol korišteni su u kliničkom istraživanju u kojem je dokazano kako imaju značajan utjecaj na krvni tlak i lipidni profil (9). Kao najvažniji polifenol u formulaciji završnog proizvoda odabrani su tirosol i oleuropein, s obzirom na njihovu ulogu u mnogobrojnim koracima razvoja ateroskleroze kao glavnog uzročnika KVB (36). Predložena mješavina s optimalnim svojstvima trebala bi sadržavati 23,8 % IB, 46,0% B i 30,2% L. Predviđene koncentracije za oleuropein i tirosol iznosile su 0,71 mg/g i 0,08 mg/g. U pripremljenoj mješavini koncentracija oleuropeina prelazi željenu s 1,15 mg/g, dok je tirosol ispod željene razine s 0,06 mg/g. Ukoliko popijemo 2 šalice čaja od lišća masline na dan unosimo 23,2 mg/g oleuropeina. Tim unosom približavamo se količini od 136,2 mg oleuropeina na dan koja je prepoznata

kao djelotvorna u kliničkom istraživanju (9). S obzirom na sve navedeno možemo reći da su rezultati zadovoljili očekivanja.

Druga mješavina dizajnirana je za smanjivanje simptoma dijabetesa: hiperglikemije, poremećaja tolerancije na glukozu te oksidativnog stresa. Kao funkcionalna mješavina važna je za pojedince koji imaju predispoziciju razvoja dijabetesa ili su ga razvili te ga mogu koristiti za smanjenje simptoma. Polifenoli koje smo odabrali su: 2,5-DHBA, 3,4-DHBA, diosmetin, luteolin-7-O-glukozid, rutin, oleuropein, kvercetin i 3-hidroksitirosol. 2,5-DHBA jedan je od derivata salicilne kiseline koji pokazuje inhibitorno djelovanje, modifikacijom sinteze LDL kolesterola (37). Djelovanje 3,4-DHBA uspoređeno je s poznatim lijekom glibenklamidom (38). Diosmetin je odabran zbog snižavanja razine kolesterola (26), a rutin zbog aktivacije enzima jetre koji su uključeni u glukoneogenezu i druge metaboličke puteve (39). Za luteolin-7-O-glukozid potvrđeno je da smanjuje razinu glukoze u krvi, HbA_{1c} (hemoglobin A_{1c}) i inzulina (40). Za oleuropein i hidroksitirosol je kliničkim istraživanjem potvrđen ujecaj na povećanje izlučivanja i djelotvornosti inzulina. Također je pokazano 15-20 %-tno poboljšanje inzulinske osjetljivosti kod pacijenata koji su podloženi terapiji s oleuropeinom, u odnosu na placebo pacijente (41). Na kraju, kvercetin smo odredili kao najznačajniji te mu prilikom izrade mješavina dali prednost iz razloga što može zaustaviti citokinima inducirano oštećenje beta stanica jetra (42). Kombinirajući sve željene polifenole dobivene su slijedeće vrijednosti za pripremu mješavine: 29,9 % IB, 37,0 % B i 31.1 % L. Za 3-hidroksitirosol i oleuropein željene koncentracije iznosile su 0,17 mg/g i 0,81 mg/g, a dobivene su 0,121 mg/g i 0,82 mg/g, čime su postignute željene koncentracije u mješavini.

Mješavina s pozitivnim učinkom kod smanjenja pretilosti napravljena je mješavinom B i L u jednakom omjeru. Design-Expert sugerirao je takav omjer iz razloga što smo uvrstili 3-hidroksitirosol i kvercetin kao polifenole sa željenim svojstvom. 3-hidroksitirosol korišten je u već spominjanom kliničkom istraživanju provedenom na pretilim muškarcima, koje je rezultiralo pozitivnim učincima na simptome pretilosti (41). Kvercetin smo

odabrali zbog *in vivo* istraživanja na miševima koja opisuju njegovu korelaciju s raznim molekulskim ciklusima koje se povezuje sa pretilošću (29). Ciljna koncentracija za hidroksitirosol iznosila je 0,18 mg/g te nije postignuta s dobivenom vrijednošću od 0,16 mg/g. No, kvercetin je daleko premašen s dobivenom koncentracijom od 0,01 mg/g. Razina detekcije za kvercetin je vrlo niska te je moguće da je upravo zbog toga došlo do malog odstupanja kod razine hidroksitirosola.

Četvrta mješavina pripremljena je za neuroprotektivno djelovanje. Polifenoli prema kojima je dizajnirana su 3,4-DHBA, 3-hidroksitirosol, apigenin, luteolin, naringenin i oleuropein. 3,4-može proći krvno moždanu barijeru (KMB), te je upravo iz tog razloga prikazana kao odličan kandidat za inhibiciju progresije neurodegenerativnih bolesti, poput Alzheimerove i Parkinsonove (31). Apigenin je djelotvoran u formi biapigenina, a luteolin i naringenin imaju pozitivni učinak na poticanje pamćenja (30). Odabrali smo oleuropein i hidroksitirosol jer su mnogobrojni i radovi *in vivo* i *in vitro* istraživanjima potvrdili njihovu djelotvornost (30), te istaknuli djelovanje oleuropeina (43). Predloženi omjer mješavina nije uključivao IB, nego 19,1 % B i 80,9 % L. Postignuta je željena koncentracija oleuropeina od 0,59 mg/g, kao najvažnije komponente.

Iz razloga što se polifenoli iz lišća masline pokazali kao dobri prirodni konzervansi (32), dizajnirali smo petu mješavinu s antimikrobnim djelovanjem i preferirano visokom koncentracijom za: apigenin-7-O-glukozid, kavenu kiselinu, naringenin, *p*-kumarinsku kiselinu i kvercetin. Djelovanje apigenin-7-O-glukozida dokazano je na 14 različitih vrsti *Candida spp.* (44). Kavena kiselina predlaže se za liječenje oralne kandidijaze te bi primjena oralno u obliku čaja mogla biti funkcionalno rješenje koje je potrebno ispitati (45). Flavone, naringenin i kvercetin odabrali smo jer su se pokazali djelotvornima na 9 mikrobnih vrsta između kojih su bili *Candida albicans*, *Escerichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (46). Rezultati istraživanja Loiu i sur. prikazali su dvojni mehanizam djelovanja *p*-kumarinske kiseline: ometanje bakterijske stanične membrane i inhibicija staničnih funkcija što u konačnici dovodi do stanične

smrti (47). Predloženi dizajn mješavine sastajao se od 0,2% IB, 25,7% B i 74,1% L. Koncentracije odabranih polifenola vrlo su niske (koncentracija željenih i postignutih polifenola < 0,03 mg/g) te zaključujemo da je u sljedećim istraživanjima pogodnije ispitivati djelovanje temeljeno na ukupnoj koncentraciji polifenola vodenog ekstrakta.

Mješavina šest dizajnirana je za protuupalno djelovanje. Supresijom upale direktno se utječe i na patološka stanja poput dijabetesa ili pretilosti, koje su rezultat kroničnih upalnih procesa. Primjerice, TNF-α, poznat kao proinflamatorni citokin povezuje se s smanjenjem inzulinske rezistencije (40). Odabrani polifenoli s visokim značajem bili su: apigenin, apigenin-7-O-glukozid, kavena kiselina i kvercetin. Apigenin i njegov glukozid imaju sličan mehanizam djelovanja, zaustavljaju STAT3-NF-kB signalizaciju te suprimiraju COX 2 u makrofagima (48). Kavena kiselina ima snažno protuupalno djelovanje čiji se mehanizam temelji na supresiji aktivacije transkripcijskih faktora (49). Kvercetin dokazano djeluje na protuupalne čimbenike već pri koncentraciji od 25 i 50 μM (29). Ako navedenu vrijednost usporedimo s 5,5 μg/g dobivene koncentracije u mješavini, možemo pretpostaviti da bi mješavina bila djelotvorna već pri malim dozama čaja. Dizajnirana mješavina sastojala se od 38,18 % B i 61,82 % L.

Posljednja mješavina dizajnirana je za jačanje imuniteta, kako bi stavili naglasak na prevenciju razvoja bolesti. Dizajn se temeljio na kvercetinu, rutinu i naringeninu te je omjer sorti bio: 33,3 % BJ i 66,7 % B. Kvercetin je odabran na temelju širokog spektra djelovanja kojeg smo već prethodno naveli (29), dok se naringeninu i rutinu uz širok spektar djelovanja pripisuje svojstvo poticanja imunog odgovora (50).

Uzimajući u obzir prethodna istraživanja provedena u našem laboratoriju na propolisu i maslinovom ulju pretpostavljali smo kako bi veliki udio u ukupnim polifenolima mogli činiti derivati oleuropeina. Analizom mješavina potvrđeni su sljedeći derivati: *p*-HPEA-EA, 3,4-DHPEA-EA, 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-AC, ligstrozid derivat 1, ligstrozid derivat 2 i oleuropein derivat. Oni čine tek 1,5-2,7 % ukupne koncentracije polifenola što je mnogo niže od njihove zastupljenosti u maslinovim uljima gdje

dominiraju u polifenolnom sastavu (2). Stoga se može zaključiti kako u sastavu čaja od lišća masline ostaje sačuvana struktura oleuropeina i ne dolazi do razgradnje u derivate.

Zdravstvena tvrdnja navodi kako dnevni unos od 20 g maslinovog ulja, koji sadrži najmanje 5 mg hidroksitirosola i derivata, doprinosi zaštiti lipida u krvi od oksidativnog stresa (prema 3. Uredbi komisije (EU) br. 432/2012 o zdravstvenim tvrdnjama Republike Hrvatske). Ukoliko ju primijenimo na naše rezultate dobivene na čaju od lišća masline, može se utvrditi da se dnevnim unosom od 11,2 ml čaja lišća sorte *Istarska bjelica* ostvaruje pripisan zdravstveni učinak.

U našem istraživanju dizajnirali smo mješavine na temelju prethodnih ispitivanja biološke aktivnosti analiziranih polifenolnih komponenti. Sljedeći korak u istraživanju trebao bi uključiti ispitivanje biološke aktivnosti svake mješavine kako bi potvrdili njihova blagotvorna djelovanja na zdravlje čovjeka. Iz razloga što se bioraspoloživost polifenola u tijelu čovjeka pokazala dobra (13) pretpostavljamo kako će klinička ispitivanja potvrditi rezultate dobivene na individualnim polifenolima.

5. ZAKLJUČAK

Ovaj rad pruža jedinstveni pristup dizajniranju novog funkcionalnog proizvoda: čaja od maslinovog lišća. Glavni cilj istraživačkog rada bio je optimizacija procesa proizvodnje novog funkcionalnog proizvoda iz otpadnog produkta masline nastalog obrezivanjem stabala masline. Analizom je identificirano 18 različitih polifenola u sastavu čaja od maslinovog lišća sorti Istarske bjelice, Buže i Leccina. Značajni udio u sastavu činili su oleuropein, verbaskozid, rutin luteolin-7-O-glukozid i 3-hidroksitirosol.

Naši rezultati također su pokazali utjecaj pripreme uzoraka na polifenolni sastav čaja lišća masline. Uvjeti maceracije pri kojima je ukupna koncentracija polifenola bila najviša su 100 °C i 15 minuta. Provedena vodena ekstrakcija je vrlo efikasna metoda zbog visokog iskorištenja, a nije štetna za okoliš kao ni za ljudsko zdravlje.

Upotreba suvremene tehnike analize uzoraka ima mnogobrojne prednosti nad konvencionalnim metodama. Iz tog razloga po prvi puta je primijenjena visokoprotočna metoda analize temeljena na tekućinskoj kromatografiji u sprezi s masenom spektrometrijom LC-QQQ za analizu polifenolnog sastava čaja iz hrvatskih, lokalnih sorti maslinovog lišća.

LC-QQQ analiza omogućila je bolje razumijevanje zastupljenosti pojedinih polifenola u različitim sortama što je temelj za dizajniranje funkcionalnih mješavina od triju sorti masline. Naravno, za završnu potvrdu funkcionalnih svojstva čajnih mješavina potrebno bi bilo provesti i dodatna biološka ispitivanja.

Usprkos širokoj primjeni u prošlosti i tradicionalnoj medicini čaj lišća masline nema široku primjenu u svakodnevici. Istraživanja poput ovog, osim znanstvene svrhe mogu pomoći u jačanju svijesti javnosti na namirnicu koja bi u budućnosti mogla predstavljati široko primjenjiv, jeftin i obilan izvor bioaktivnih fenolnih komponenti.

6. LITERATURA

1 Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani A-H, Saari N. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (Olea europaea L.)—A Review. Int J Mol Sci 2012; 13: 3291–3340.

2 Hashmi MA, Khan A, Hanif M, Farooq U, Perveen S. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of Olea europaea (Olive). Evid Based Complement Alternat Med 2015; 2015: 541591.

3 Sladonja B, Poljuha D. Characterisation of Autochthonous Olive Varieties in Istria. 2015.

4 Kovačić I, Bilić J, Dudaš S, Poljuha D. Phenolic content and antioxidant capacity of istrian olive leaf infusions. Poljoprivreda 2017; 23: 38–45.

5 Silva S, Gomes L, Leitão F, Coelho AV, Boas LV. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Olea europaea L. Fruits and Leaves. Food Science and Technology International 2006; 12: 385–395.

6 Abaza L, Taamalli A, Nsir H, Zarrouk M. Olive Tree (Olea europeae L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. Antioxidants 2015; 4: 682–698.

7 Lafka T-I, Lazou A, Sinanoglou V, Lazos E. Phenolic Extracts from Wild Olive Leaves and Their Potential as Edible Oils Antioxidants. Foods 2013; 2: 18–31.

8 Al-Attar AM, Zeid A, M I. Effect of Tea (Camellia sinensis) and Olive (Olea europaea L.) Leaves Extracts on Male Mice Exposed to Diazinon. BioMed Research International. 2013. doi:10.1155/2013/461415.

9 Lockyer S, Rowland I, Spencer JPE, Yaqoob P, Stonehouse W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. Eur J Nutr 2017; 56: 1421–1432.

10 Casamenti F, Stefani M. Olive polyphenols: new promising agents to combat aging-associated neurodegeneration. Expert Rev Neurother 2017; 17: 345–358.

11 Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. Biomed Res Int 2015; 2015: 905215.

12 Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. J Sep Sci 2007; 30: 3268–3295.

13 Lockyer S, Yaqoob P, Spencer JPE, Rowland I. Olive leaf phenolics and cardiovascular risk reduction: Physiological effects and mechanisms of action.; : 16.

14 Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev 1998; 56: 317–333.

15 Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. Chemistry in industry (kui@zg.t-com.hr); Vol58 No3 2009.

16 Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine 1996; 20: 933–956.

17 Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. Molecules 2016; 21: 901.

18 Malik NSA, Bradford JM. Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (Olea europaea L.) leaves. 2008; : 6.

19 RAJBHAR K, DAWDA H, MUKUNDAN U. POLYPHENOLS: METHODS OF EXTRACTION. 2015; : 6.

20 Berend S, Grabarić Z. [Determination of total polyphenol content in food with the flow-injection method]. Arh Hig Rada Toksikol 2008; 59: 205–212.

21 Goldsmith CD, Vuong QV, Stathopoulos CE, Roach PD, Scarlett CJ. Optimization of the Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves. Antioxidants (Basel) 2014; 3: 700–712.

22 Hughes RJ, Croley TR, Metcalfe CD, March RE. A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. International Journal of Mass Spectrometry 2001; 210–211: 371–385.

23 Falcão SI, Vilas-Boas M, Estevinho LM, Barros C, Domingues MRM, Cardoso SM. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2010; 396: 887–897.

24 Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB et al. (eds.). Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd ed. World Bank: Washington (DC), 2006http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11728/ (accessed 30 Jul2018).

25 Tangney CC, Rasmussen HE. Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. Current Atherosclerosis Reports 2013; 15. doi:10.1007/s11883-013-0324-x.

26 Murotomi K, Umeno A, Yasunaga M, Shichiri M, Ishida N, Koike T et al. Oleuropein-Rich Diet Attenuates Hyperglycemia and Impaired Glucose Tolerance in Type 2 Diabetes Model Mouse. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2015; 63: 6715–6722.

27 Eidi A, Eidi M, Darzi R. Antidiabetic effect of Olea europaea L. in normal and diabetic rats. Phytotherapy Research 2009; 23: 347–350.

28 Zhao Y, Chen B, Shen J, Wan L, Zhu Y, Yi T et al. The Beneficial Effects of Quercetin, Curcumin, and Resveratrol in Obesity. Oxid Med Cell Longev 2017; 2017. doi:10.1155/2017/1459497.

29 Chen S, Jiang H, Wu X, Fang J. Therapeutic Effects of Quercetin on Inflammation, Obesity, and Type 2 Diabetes. Mediators of Inflammation. 2016. doi:10.1155/2016/9340637.

30 Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC, Hrelia S. Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. Int J Mol Sci 2017; 18. doi:10.3390/ijms18112230.

31 Krzysztoforska K, Mirowska-Guzel D, Widy-Tyszkiewicz E. Pharmacological effects of protocatechuic acid and its therapeutic potential in neurodegenerative diseases: Review on the basis of in vitro and in vivo studies in rodents and humans. Nutritional Neuroscience 2017; : 1–11.

32 Liu Y, McKeever LC, Malik NSA. Assessment of the Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract Against Foodborne Bacterial Pathogens. Front Microbiol 2017; 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00113.

33 Hostetler GL, Riedl KM, Schwartz SJ. Effects of food formulation and thermal processing on flavones in celery and chamomile. Food Chemistry 2013; 141: 1406–1411.

34 Souza PAL de, Marcadenti A, Portal VL. Effects of Olive Oil Phenolic Compounds on Inflammation in the Prevention and Treatment of Coronary Artery Disease. Nutrients 2017; 9: 1087.

35 Bumrungpert A, Lilitchan S, Tuntipopipat S, Tirawanchai N, Komindr S. Ferulic Acid Supplementation Improves Lipid Profiles, Oxidative Stress, and Inflammatory Status in Hyperlipidemic Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. Nutrients 2018; 10. doi:10.3390/nu10060713.

36 Zahedi M, Ghiasvand R, Feizi A, Asgari G, Darvish L. Does Quercetin Improve Cardiovascular Risk factors and Inflammatory Biomarkers in Women with Type 2 Diabetes: A Double-blind Randomized Controlled Clinical Trial. Int J Prev Med 2013; 4: 777–785.

37 Exner M, Hermann M, Hofbauer R, Kapiotis S, Speiser W, Held I et al. The salicylate metabolite gentisic acid, but not the parent drug, inhibits glucose autoxidation-mediated atherogenic modification of low density lipoprotein. FEBS letters 2000; 470: 47–50.

38 Harini R, Pugalendi KV. Antihyperglycemic effect of protocatechuic acid on streptozotocin-diabetic rats. J Basic Clin Physiol Pharmacol 2010; 21: 79–91.

39 Habtemariam S, Lentini G. The therapeutic potential of rutin for diabetes: an update. Mini Rev Med Chem 2015; 15: 524–528.

40 Zang Y, Igarashi K, Li Y. Anti-diabetic effects of luteolin and luteolin-7-O-glucoside on KK-A(y) mice. Biosci Biotechnol Biochem 2016; 80: 1580–1586.

41 de Bock M, Derraik JGB, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC et al. Olive (Olea europaea L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. PLoS One 2013; 8. doi:10.1371/journal.pone.0057622.

42 Dai X, Ding Y, Zhang Z, Cai X, Li Y. Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F β-cells via the mitochondrial pathway and NF-κB signaling. Int J Mol Med 2013; 31: 265–271.

43 Omar SH. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. Sci Pharm 2010; 78: 133–154.

44 Smiljkovic M, Stanisavljevic D, Stojkovic D, Petrovic I, Marjanovic Vicentic J, Popovic J et al. Apigenin-7-O-glucoside versus apigenin: Insight into the modes of anticandidal and cytotoxic actions. EXCLI J 2017; 16: 795–807.

45 Sardi J de CO, Gullo FP, Freires IA, Pitangui N de S, Segalla MP, Fusco-Almeida AM et al. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against Candida spp. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2016; 86: 387–391.

46 Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int J Food Microbiol 2000; 56: 3–12.

47 Lou Z, Wang H, Rao S, Sun J, Ma C, Li J. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. Food Control 2012; 25: 550–554.

48 Lee J-H, Zhou HY, Cho SY, Kim YS, Lee YS, Jeong CS. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. Arch Pharm Res 2007; 30: 1318–1327.

49 Yang WS, Jeong D, Yi Y-S, Park JG, Seo H, Moh SH et al. IRAK1/4-Targeted Anti-Inflammatory Action of Caffeic Acid. Mediators Inflamm 2013; 2013. doi:10.1155/2013/518183.

50 Magrone T, Spagnoletta A, Salvatore R, Magrone M, Dentamaro F, Russo MA et al. Olive Leaf Extracts Act as Modulators of the Human Immune Response. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 2017; 18. doi:10.2174/1871530317666171116110537.

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Dora Klisović
Rijeka, 11.11.1994. godine

J. Rakovca 14a, 52470 Umag (Hrvatska)

(+385) 994017265

klisovic.d@gmail.com

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2016–danas
Diplomski sveučilišni studij "Medicinska kemija"
Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)
www.biotech.uniri.hr

2013–2016
Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova
Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)
www.biotech.uniri.hr

2009–2013
Maturant gimnazije
Srednja škola "Vladimir Gortan"
Školski brijeg 1, 52460 Buje (Hrvatska)
www.ss-vgortan-buje.skole.hr

RADNO ISKUSTVO

09/2017–07/2018
Izrada diplomskog rada
Laboratorij za visokoprotočne analize,
Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju
Tema: LC-MS/MS analiza sadržaja fenola u čaju lišća masline sorti Buža, Istarska bjelica i Leccino u svrhu optimizacije formulacija funkcionalnog čaja
Mentor: izv. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

2016
Stručna praksa
Laboratorij za kontrolu kvalitete
Jadran galenski laboratorij JGL d.d.
Pulac 4A, 51000 Rijeka (Hrvatska)

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	B2	B2	B2	B2	B2
talijanski	C1	B2	C1	B2	B2
španjolski	B1	B1	A2	A2	A2

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

DODATNE INFORMACIJE

Studentski poslovi

- Prodavač
  Decathlon, Rijeka (Hrvatska)
  (2017.-2018.)
- Sezonski recepcioner
  Istraturist d.o.o., Umag (Hrvatska)
  (2015.-2017.)
- Prodavač
  dm-drogerie markt d.o.o., Umag (Hrvatska)
  (2010.-2014.)

Projekti

- Član projektnog tima: "Optimizacija formulacije čaja lišća masline s ciljem proizvodnje funkcionalnog proizvoda"
  projekt financiran od Zaklade Sveučilišta u Rijeci
  (2017/2018)
- Peta generacija Start up inkubatora grada Rijeke
  Tema "Smart food"
  (2015.-2016.)

Kongresi

- Aktivno sudjelovanje na 9. studentskom kongresu
  „Prehrana i klinička dijetoterapija" ,Medicinski fakultet, Rijeka
  Naslov sažetka: LC-MS analiza sadržaja fenola u čaju lišća masline sorti Istarska bjelica, Leccino i Buža
  Autori: Dora Klisović, Lara Saftić, Željka Peršurić
  (08.-10.06. 2018)
- Pasivno sudjelovanje na 9. Međunarodnom kongresu
  prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb
  Naslov rada: „Development Of Functional Olive Leaf Teas"
  (03.-05.10.2018.)

Nagrade i stipendije

- 2013.-2018. stipendistica grada Umaga, Hrvatska
- 2017. Erasmus+ stipendija Sende, Španjolska
- 2016. Nacionalno studentsko StartUp natjecanje, Zagreb - prvo mjesto
- 2016. Studentsko StartUp natjecanje- prvo mjesto