Ispitivanje adsorpcije ekstrakta lišća masline na zeolitne nosače

Tolić, Vedrana

Master's thesis / Diplomski rad

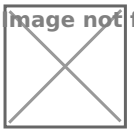
2019

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:193:495163

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

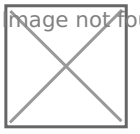


Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Vedrana Tolić

Ispitivanje adsorpcije ekstrakta lišća masline na zeolitne nosače

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Vedrana Tolić

Ispitivanje adsorpcije ekstrakta lišća masline na zeolitne nosače

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Dean Marković

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTEHNOLOGY

Graduate unersity study

Biotehnology in medicine

Vedrana Tolić

Adsorption testing of olive leaves extract on zeolite carriers

Master's thesis

Rijeka, 2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Dean Marković

Komentor: doc. dr. sc. Gabriela Ambrožić

Diplomski rad obranjen je dana 25.srpnja 2019. godine pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić (predsjednica)
2. doc. dr. sc. Karlo Wittine (član)
3. prof. dr. sc. Dean Marković (ćlan)

Rad ima 46 stranica, 19 slika, 7 tablica i 49 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru dr. sc. Deanu Markoviću na stručnom vodstvu i na smjernicama tijekom izrade diplomskog rada te poticanju inovativnosti i analitičkog razmišljanja.

Zahvaljujem se doktoranticama Željki Peršurić, na prenesenom znanju vezanom za UHPLC uređaj te Martini Mušković na korisnim savjetima koji su uvelike pomogli u eksperimetalnom dijelu rada.

Velika zahvala cijelom odjelu na prvom katu, posebice kolegicama Elizabeti Rus i Klari Vukić kojima se zahvaljujem na ogromnoj potpori tijekom izrade diplomskog rada.

Tijekom cijelog školovanja najveća podrška bila je moja obitelj na čemu im se iznimno zahvaljujem.

Ovaj diplomski rad izrađen je u centru za visokopropusne tehnologije te se zahvaljujem pristupu znanstvenoj opremi koja je korištena za njegovu izradu projekta Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kmapusu Sveučilišta u Rijeci" financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn.

SAŽETAK

Lišće masline jedan je od nusprodukata proizvodnje maslinovog ulja te iako je njegov potencijal prepoznat nije dovoljno iskorišten. Istraživanja su dokazala da je lišće masline bogat izvor fenolnih spojeva od kojih je najzastupljenija komponenta oleuropein. Oleuropein kao i ostale fenolne komponente identificirane i opisane u ovom radu pokazuju antioksidativne, antiinflamatorne, kardioprotektivne i neuroprotektivne učinke. Kao takav ekstrakt lišća masline već se koristi kao dodatak prehrani u svrhu poboljšanja ljudskog zdravlja.

Zeoliti se zbog svojih adsorptivnih sposobnosti prvenstveno koriste u uklanjanju raznih nečistoća no pokazao kao dobar nosač lijekova. Ukoliko bi na zeolit vezali spojeve korisne za zdravlje ljudi kao što su primjerice fenoli iz lišća masline dobio bi se dodatak prehrani s jakim antioksidativnim sposobnostima.

Različiti zeoliti pokazuju različitu adsorptivnu sposobnost za određene spojeve. Stoga je promatrana promjena u fenolnom sastavu ekstrakta lišća masline nakon dodatka četiri različita zeolita (zeolit A, TMAZ, PMA, PMA-O_2) UHPLC metodom s detektorom s nizom dioda. Primjećeno je da se koncentracije oleuropeina, 3-hidroksitirosola i pinorezinola smanjuju za sve zeolite, što nije slučaj za tirosol, 3-p-kumarinsku kiselinu i p-hidroksifenilocetnu kiselinu za sve navedene zeolite. Od zeolita najveće smanjenje koncentracije 6 ispitivanih fenola primjećeno je dodatkom PMA zeolita.

Ključne riječi: lišće masline, fenolni spojevi, zeoliti, klinoptilolit, UHPLC, adsorpcija.

SUMMARY

Olive leaves are one of the byproducts of olive oil production and although its potential is recognized, it is not sufficiently exploited. Studies have shown that olive leaves are rich in phenolic compounds, most of which is the oleuropein component. Oleuropein as well as other phenolic components identified and described in this paper exerts antioxidative, antiinflammatory, cardioprotective and neuroprotective effects. As such, olive leaf extract is already used as a dietary supplement for the purpose of improving human health.

Because of their adsorptive abilities, zeolites are primarily used in removing various impurities, but in addition they have proven to be a good carrier for drugs. If zeolite binds compounds useful for human health such as phenols from olive leaves we would achieve a nutrition supplement with strong antioxidant capabilities.

Various zeolites exhibit different adsorptive abilities for certain compounds. Therefore, a change in the phenolic composition of the olive leaves after adding four different zeolites (zeolite A, TMAZ, PMA, PMA-O2) was observed with UHPLC method with a diode array detector. It has been noted that the concentrations of oleuropein, 3-hydroxythyrosol and pinorezinol are reduced for all zeolites, which is not the case for thyrosol, 3-p-coumaric acid and p-hydroxyphenylacetic acid for all the zeolites mentioned. The highest decrese in the concentration of 6 phenols investigated was observed by the addition of PMA zeolite.

Key words: olive leaves, phenolic compund, zeolite, clinoptiolite, UHPLC, adorption.

Sadržaj

1. UVOD ... 1

1.1. Maslina ... 1

1.2. Lišće masline i njegove fenolne komponente ... 2

1.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz lišća masline ... 12

1.4. HPLC/UHPLC kao metoda detekcije i kvantifikacije polifenolinih komponenti ... 14

1.5. Zeoliti ... 16

2. CILJ RADA ... 24

3. MATERIJALI I METODE ... 25

3.1. Priprema uzorka i ekstrakcija ... 25

3.2. Evaporacija i liofilizacija ... 25

3.3. Priprema uzoraka za UHPLC analizu i analiza tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UHPLC) ... 26

3.4. Zeoliti ... 27

3.5. Vaganje zeolita i ekstrakta lišća masline vezanog na njega nakon filtracije ... 27

3.6. Vaganje zeolita nakon dodatka otapala, centrifuge i sušenja ... 28

3.7. Vezanje fenolnih komponenti iz lišća masline na zeolitne nosače te ispitivanje vezanja UHPLC metodom ... 28

4. REZULTATI ... 29

4.1. Kvantitativna analiza fenolinih spojeva u ekstraktu masline ... 29

4.2. Vezanje polifenola na zeolite ... 30

4.2.1. Vaganje zeolita i ekstrakta lišća masline vezanog na njega nakon filtracije ... 30

4.2.2. Vaganje zeolita nakon dodatka otapala, centrifuge i sušenja ... 31

4.3. Kvantifikacija polifenolnih komponenti u uzorku prije i nakon vezanja na zeolite pomoću HPLC metode ... 32

5. RASPRAVA ... 35

6. ZAKLJUČAK ... 40

7. LITERATURA ... 41

8. ŽIVOTOPIS ... 1

1. UVOD

1.1. Maslina

Maslina (lat. *Olea europaea*) je zimzeleno stablo iz porodice Oleaceae koja mogu doseći starost od stotinjak godina. Njezino podrijetlo se može pratiti duž istočne mediteranske obale od kuda se širila prema zapadu te naselila cijelo Sredozemlje(1). Maslini Sredozemlje pogoduje upravo zbog klime koju karakteriziraju blage i kišne zime te suha i vruća ljeta. Zbog koristi za ljudsko zdravlje danas je kultivirana diljem svijeta, ali mediteranske zemlje i dalje dominiraju u svijetskoj proizvodnji. 900 milijuna stabala maslina prekrivaju 8 milijuna hektara zemlje diljem svijeta, a skoro njih 98% smješteni su upravo u mediteranskim zemljama(2). Glavni proizviđači su Španjolska, Italija, Grčka, Tunis, Sirija, Turska, Maroko i Portugal(3).

Stablo masline se opširno proučavalo zbog svoje velike medicinske i nutritivne važnost koja je svijetu poznata od davnina. Više od 200 različitih kemijskih spojeva pronađeno je u maslini uključujući sterole, karotenoide, triterpenske alkohole i fenole. Fokus istraživanja stavljen je na fenole zbog jakog antioksidativnog učinka(4). Tradicionalna „mediteranska prehrana" smatra se jednom od najzdravijih prehrana zbog povezanosti sa smanjenom učestalosti kardiovaskularnih bolesti te pojedinih tumora. Različiti dijelovi masline te nusprodukti nastali preradom maslina se razlikuju po sastavu bioaktivnih komponenti. Konzumacija u svakodnevnoj prehrani je primarno fokusirana na plod te maslinovo ulje, dok su ostali dijelovi masline stavljeni u drugi plan.

Kultivacija maslina te sama ekstrakcija maslinovog ulja dovodi do nastanka značajnih količina nusprodukata koji predstavljaju prijetnju okolišu te nemaju široku praktičnu primjenu. Jedan od nuprodukata je maslinovo lišće koje nastaje tijekom obrezivanja maslina (oko 25 kg godišnje po drvetu) te u industrijskoj proizvodnji maslinovog ulja prilikom odvajanja listova od ploda (oko 10% težine ploda)(5). Zadnjih godina lišće masline pronalazi

svoju svrhu no i dalje njihov potencijal nije do kraja iskorišten te je potrebno pronaći nove načine iskorištavanja ove jeftine i lako dostupne sirovine.



Slika 1 *Lišće masline*

1.2. Lišće masline i njegove fenolne komponente

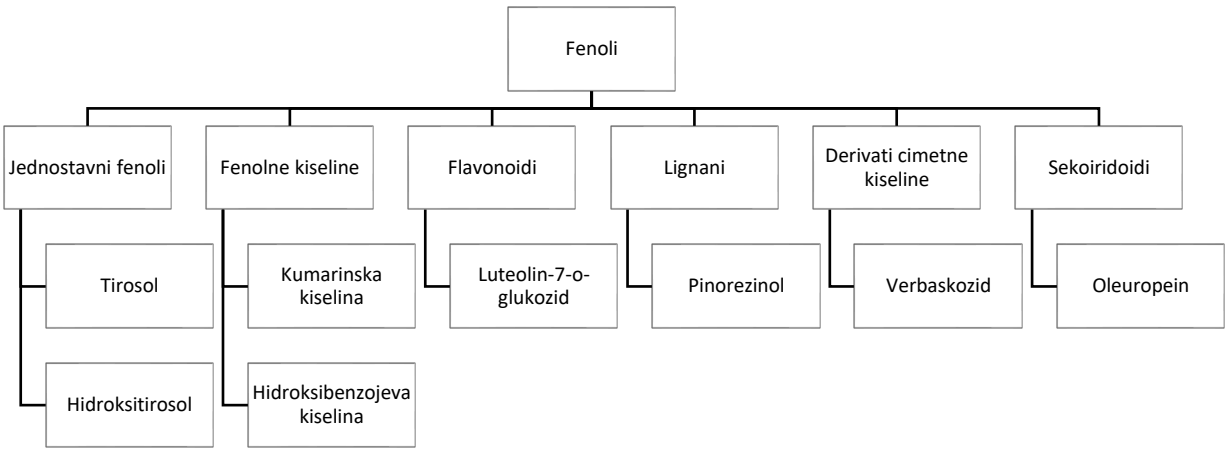
Na mediteranu lišće masline se koristilo kao tradicionalni lijek za virusne i gljivične infekcije te u borbi protiv gripe i prehlade. Posljednih godina lišće masline pronašlo je primjenu u prehrani kao ekstrakt te biljni čaj radi aktivnih sastojaka koji pokazuju antioksidativna, antiinflamatorna, antihipertenzivna, hipoglikemijska te hipokolesterolemijska svojstva(6). Upravo je snažna antioksidativna aktivnost ekstrakta lišća masline fokus istraživača stavila na lišće masline. U tablici 1 možemo vidjeti antioksidativni kapacitet ekstrakta lišća masline te pojedinih komponenti u ekstraktu, oleuropeina, hidroksitirosola i tirosola. Iako pokazuje koristi za ljudsko zdravlje lišće se i dalje većinski koristi se za prehranu životinja(7) te se dio spaljuje ili baca. Stoga bi bilo korisno dodatno povećati njegovu primjenu u svakodnevnom životu.

Tablica 1 *Antioksidativni kapacitet nekih fenolnih komponenti iz ekstrakta lišća masline (Benavente-Garcia et al., 2000.)*

Fenolna komponenta	Antioksidativni kapacitet u TEAC* (mM**)
Ekstrakt	1,58 ± 0,06
Oleuropein	0,88 ± 0,09
Hidroksitirosol	1,57 ± 0,12
Tirosol	0,35 ± 0,35

Kao glavno mjesto primarnog i sekundarnog metabolizma biljke, lišće možemo smatrati potencijanim izvorom bioaktivnih komponenti(8). U usporedbi sa maslinovim uljem, lišće masline sadrži veće količine polifenola. Primjerice oleuropein, najzastupljeniji fenol u maslinovom ulju nalazi se u rasponu od 0,005% do 0,12%, dok se u lišću masline nalazi između 1% i 14%. Korist za zdravlje se najviše može pripisat upravo fenolima kao što su oleuropein, hidroksitirosol, tirosol, tokoferol, p-kumarinska kiselina. Fenolne komponente u lišću masline su mnogobrojne i raznolike. Podijeljene su ovisno o molekularnim karakteristikama na jednostavne fenole i kiseline, lignane, sekoiridoide te flavonoide uključujući flavone, flavonole, substituirane fenole te druge(9). Većinski udio u lišću masline zauzimaju oleuropein, srodni sekoiridoidi te ostali derivati(10). Flavonoidi se nalaze u značajnim količinama, dok su jednostavi fenoli i kiseline manje zastupljeni. Međutim, nekoliko čimbenika mogu utjecati na kvalitativni i kvantitativni fenolni sastav lišća masline kao što su vrijeme prikupljanja, uvijeti sušenja, područje kultivacije, proces ekstrakcije te sorta masline(11). Tri fenolne komponete u najvećem udjelu su oleuropein, hirdroksitirosol i tirosol te su strukturno povezane.

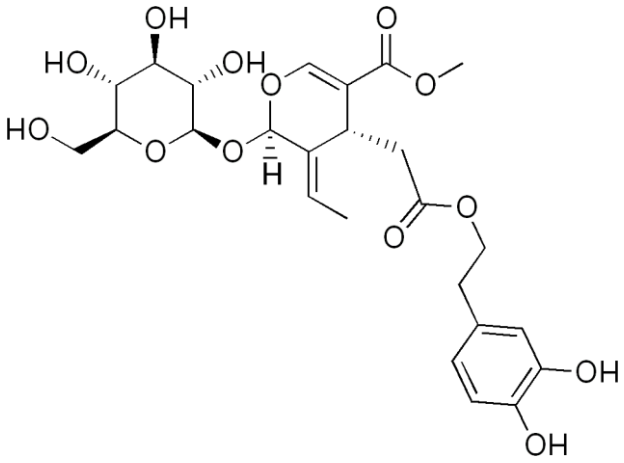
U ovom radu analizirani fenolni spojevi bit će oleuropein, hidroksitirosol, tirosol, 3-kumarinska kiselina, pinorezinol te para-hirdoksifeniloctena kiselina.



Slika 2 *Glavni razredi fenola i fenoli koji se nalaze u lišću masline (Abaza, 2015.)*

OLEUROPEIN

Najzastupljenija fenolna komponenta u lišću masline odgovorna za gorak okus je oleuropein koji pripada skupini sekoiridoida. Otkriven je 1908. godine zahvaljujući Bourquelot i Vintilescou, dok su kemijsku strukturu otkrili 1960. godine Panizzi, Scarpati i Oriente. Strukturno je glikozidni ester koji se sastoji od tri podjedinice; molekule glukoze, elenoilne kiseline i 3,4-dihiroksifenil etanola poznatijeg kao hidroksitirosola(12). U velikim količinama se nalazi u mladim i ne prerađenim maslinama, jer se tijekom sazrijevanja i prerade maslina uslijed kemijskih i enzimskih reakcija oleuropein metabolizira u hidroksitirosol nakon čega njegov udio opada. Upravo iz tog razloga velike koncentracije oleuropeina pronalazimo u lišću masline, dok u maslinama i maslinovom ulju pronalazimo više hidroksitirosola(2). Razine oleuropeina variraju zbog raznih faktora. Studije na vršene na različitim vrstama maslina pokazale su da je najvažnja varijabla vrsta masline (genetički faktori). Osim toga veće razine su primjećene kod mlađih maslina branih u proljeće(13,14).



Slika 3 *Prikaz strukture oleuropeina*

Poznato je da se oleuropein slabo absorbira zbog veličine i planarne strukture te se ne može pronaći u ljudskoj plazmi i fecesu jer se u potpunosti metabolizira do hidroksitirosola i ostalih degradacijskih produkata(15).

Epidemiološke studije pokazale su da je učestala konzumacija hrane bogate fenolima povezana sa manjom koincidencijom kardiovaskularnih bolesti(16). Oleuropein ima pozitivne učinke na kardiovaskularne bolesti kroz nekoliko aspekata; djeluje kao vazodilatator, antioksidans te spriječava upalu(12). Glavni razlog visokog antioksidativnog učinka oleuropeina je prisutnost o-dihidroksi strukture (katehola). O-difenolni spoj posjeduje snažnu sposobnost doniranja vodika. Reaktivne vrste kisika i dušika stalno su prisutne u organizmu te su kontrolirane enzimima kao što su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza. Kada je njihova produkcija velika mogu prouzročiti oštećenja na staničnoj razini, a ta oštećenja su povezana s povećanim rizikom od kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti i tumori(17). Smatra se da antioksidansi mogu prevenirati i smanjiti oksidativni stres te posljedično smanjiti rizik od kroničnih bolesti(18). U usporedbi s hidroksitirosolom, sposobnost uklanjanja radikala oleuropeina je manja, no studije su ukazale na sinergistički učinak fenolnih spojeva u ekstraktu lišća masline koji ima veću antioksidativnu aktivnost od zasebnih komponenti te od vitamina E i C koji slove za jake antioksidanse(18).

Nekoliko studija dokumentirali su da oleuropein izaziva antiinflamatorni odgovor kroz lipooksigenaznu aktivnost, produkciju leukotriena B4, inhibiciju biosinteze proinflamatornih citokina i moduliranje inflamatornih parametara. Konkretno, zabilježeno je da primjena oleuropeina u mišijim modelima sa induciranom upalom pluća značajno smanjuje TNF-α, interleukin-1-beta (IL-1β). Opisao se i antiarterosklerozni učinak oleuropeina te povezanost s upalnim odgovorom na eksperimentalnim zečjim modelima. Oleuropein je umanjio arterosklerozu korz nekoliko mehanizama, uključujući smanjenje lipida, inhibicuju LDL oksidaciju, suprimirajući upalne faktore i prevenirajući aktivnost makrofaga(19).

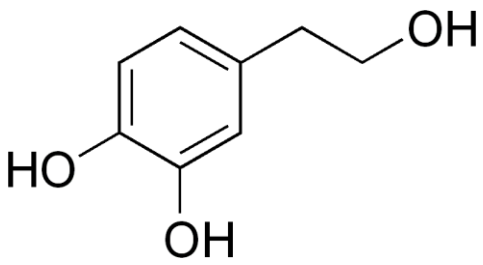
Među ostalim antioksidansima prisutnim u maslini oleuropein je najviše odgovoran za antitumorsku aktivnost. *In vitro* studije demonstrirale su antiproliferativno i proapoptotičko djelovanje oleuropeina na različiim tumorskim linijama(20).

Oštećenja mitohondrijske DNA i oksidativni stres su dva glavna faktora koja pridonose razvoju i napretku degenerativnih bolesti(19). Studije su ukazale na pozitivan učinak prirodno ekstrahiranih fenola na pojavnost bolesti povezanih sa starosti, kao što je demecija. Zabilježeno je da oleuropein djeluje na smanjenje i prevenciju agregacije amiloidnih plakova, što je karakteristično za Alzhaimerovu bolest.(12)

Prisutnost oleuropeina u različitim dijelovima masline daje joj prirodnu rezistenciju na mikroorganizme. Oleuropein pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv gram negativnih i gram pozitivnih bakterija, uključujući *Lactobacillus plantarum, Bacillus cereus and Salmonella enteritidis.* Osim antibiotske posjeduje i antiviralnu aktivnost, a neki od virusa na kojima je pokazana učinkovitost oleuropeina su hepatitis B virus (HBV) i humani virus imunodeficijencije (HIV)(19).

3-HIDROKSITIROSOL

Hidroksitirosol je jednostavni fenol koji nastaje hidrolizom aglikona sekoiridoida oleuropeina i ligstrozida. Osim oleuropeina i hidroksitirosol posjeduje kateholnu grupu koja je u mogućnosti stabilizirati slobodne radikale kroz formaciju intramolekularnih vodikovih veza(21). Iz tog razloga poput oleuropina hidroksitirosol je jak antioksidans. Hidroksitirosol lako oksidira te ga je zbog toga teško izolirati i ekstrahirati iz prirodnih izvora, no postoji nekoliko metoda sinteze hidroksitirosola(22).



Slika 4 *Prikaz strukture 3-hidroksitirosola*

Najzastupljenija fenolna komponenta u maslinovom ulju upravo je hidroksitirosol, a kako je maslinovo ulje korišteno diljem svijeta upravo je on bio fokus većine studija. Dokazano je da je konzumacija hidroksitirosola sigurna čak i u visokim dozama te da nije genotoksična niti mutagena in vitro. Studija u kojoj su oralno primjenjivali ekstrakt masline na štakorima u različitim dozama ukazala je na LD50 vrijednost veću od 5000mg/kg. Osim toga ispitana je subkronična toksičnost te učinak na reprodukciju i trudnoću te se pokazalo da hidroksitirosol nema toksični učinak ni pri najvećoj dnevnoj dozi od 2000mg/kg(2).

Jednom unešen intravenozno u štakore, ^{14}C-označen hidroksitirosol brzo nestaje iz plazme zbog brzog metabolizma i distribucije u različita tkiva. Metabolizira se toliko brzo da u 5 minuta nakon injektiranja u plazmi se mogu pronaći njegovi metaboliti. Poluživot hidroksitirosola procijenjen je na 1 do 2 minute.(4)

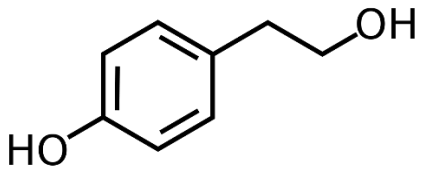
Razlika između antioksidativnog djelovanja oleuropeina i hidroksitirosola moguća je jer hidroksitirosol može neutralizirati peroksil radikal blizu površine membrane, dok oleuropein može neutralizirati čak i propagirajuće lipidne peroksilne radikale unutar membrane.

Hidroksitirosol je opisan kao polifenol s najjačim protuupalnim učinkom koji uključuje inhibiciju dušikovog oksida (NO) i produkciju prostanglandina E2; smanjuje izlučivanje proinflamatornih citokina (interleukina (IL) 1α, IL-β, IL-6, IL-12, TNF-α (tumor necrosis factor alfa) i kemokine (CXCL10, CCL2, MPC-1); smanjuje gensku ekspresiju inducibilne NO sintaza, prostanglandin E2 sintaza, makrofag upalni protein 1β, matriks metaloproteinaze-9, IL-1α, CXCL/IP-10. (23)

Pokazano je da hidroksitirosol samostalno smanjuje rizik od koronarne bolesti srca i arteroskleroze. Povećava osjetljivost na inzulin i sekretornu moć β stanica gušterače te na taj način smanjuje rizik obolijevanja od metaboličkog sindroma.(24)

TIROSOL

Tirosol je strukturno identičan hidroksitirosolu izuzev što hidroksitirosol posjeduje dodatnu hidroksi grupu na *meta* položaju. Spada u Ispitivajući snagu uklanjanja dušikovih reaktivnih vrsta oleuropeina, hidroksitirosola, kumarinske kiseline i tirosola ispostavilo se da je tirosol manje aktivan od ostalih fenola. To se objasnilo manjkom kateholnog dijela u tirosolu, što vidimo na Slici 3. (22) Iako nije antioksidativno sposoban poput predhodno opisanih fenola, i dalje je od važnosti zbog dobre bioraspoloživosti i prisutnosti u viskim koncentracijama.



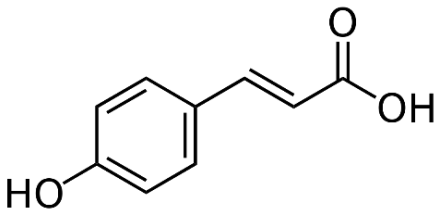
Slika 5 *Prikaz strukture tirosola*

Ispitivanje antialergene i antiinflamatorne aktivnosti tirosola dovelo je do rezultata koji su potvrdili njegov učinak. Rezultati su ukazali da inhibira degranulaciju mast stanica i ekspresiju upalnih citokina; posrednik ovih učinaka je fosfatidilinozitol-3-kinaza. Stoga tirosol ima potencijal postati terapeutik za alerijske bolesti kao što su atopijski dermatitis, rinitis, astma..(25)

Neuroprotektivna aktivnost tirosola zabilježena je u više radova. Studija rađena na štakorima s induciranim ishemijskim moždanim udarom promatrala je učinak tirosola na senzorne motorne funkcije nakon udara. Ispostavilo se da postoji dozno ovisan neuroprotektivni učinak. Testovi ispitivanja senzornih motornih aktivnosti bili su bolji kod štakora koji su konzumirali tirosol.(4)

p-KUMARINSKA KISELINA

p-kumarinska kiselina je hidroksicimetna kiselina te je jedan od najrasprostranjenijih derivata cimetne kiseline. Spada u skupinu fenolnih kiselina, a glavni izvori su voće (jabuka, kruška), povrće (grašak, soja,rajčica, krumpir), napici (čaj, kava, vino, pivo), čokolada. Studije koje su proučavale *p*-kumarinsku kiselinu pokazale su da posjeduje kardioprotektivnu, antimikrobnu, antitumorsku, neuroprotektivnu i protuupalnu aktivnost. (26)



Slika 6 *Prikaz strukture p-kumarinske kiseline*

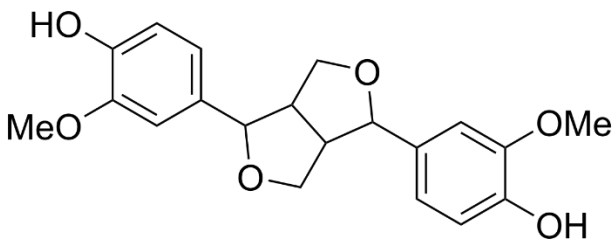
Rezultati jedne studije pokazali su da uspješno inhibira rast svih ispitivanih patogenih bakterija. *p*-kumarinska kiselina značajno povećava permeabilnost plazma membrane što rezultira gubitkom funkcije stanične barijere. Pokazali su istjecanje citoplazme elektronskom mikrografijom.

Osim toga pronađeno je i da je u mogućnosti vezati se na fosfatni anion u dvostrukom lancu DNA i interkalirati se u utore dvostrukog lanca što može utjecati na replikaciju, transkripciju i ekspresiju. (27)

p-kumarinska kiselina spriječava povećani imuni odgovor i fagocitički indeks makrofaga kod štakora. Osim toga kiselina smanjuje ekspresiju upalnog medijatora TNF-α i cirkulirajućih imunoloških kompleksa u štakorima s induciranim artritisom. Nadalje inhibira promjene u razini MCP-1(monocitni kemotaktični protein 1) inducirane TNF-om-α, plazminogen aktivator inhibitor 1 (PAI-1) i unutarstanične reaktivne kisikove vrste u 3T3-L1 adipocitima. Dodatno je povećala izlučivanje adiponektina, superoksid dismutaze, glutation S-transferaze 3T3-L1 adipocitima tretiranih TNF-om α. (28)

PINOREZINOL

Pinorezinol spada u skupinu lignana te se nalazi u hrani biljnog podrijetla, najveće koncentracije pronalazimo u sjemenu lana i sezama. Lignani su grupa spojeva koja spada u fitoestrogene te se ponašaju kao antioksidansi. Pinorezinolu je pripisano nekoliko korisnih učinaka na ljudsko zdravlje uključujući antifungalno, protuupalno, hipoglikemijsko i kemoprotektivno.(29) Od šest ispitivanih lignana na Caco-2 stanicama pinorezinol je pokazao najjači protuupalni odgovor kroz djelovanje na NF-kB signalni put. Značajno je smanjio interleukin 6 (IL-6) i ciklooksigenazu-2 (COX2).(30)

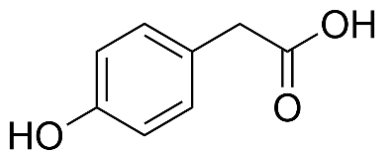


Slika 7 *Prikaz strukture pinorezinola*

Pinorezinol kao fitoestrogen posjeduje kemijsku strukturu sličnu estrogenu koji je ključan za rast i razvoj mliječnih žlijezda te je povezan s rakom dojke zbog povećane aktivacije estrogen receptora α (ERα). Fitoestrogeni mogu služiti kao antagonisti estrogena u tkivu tumora dojke te na taj način smanjiti proliferaciju stanica tumora. Iz tog razloga zanimljivo je bilo istražiti ima li pinorezinol kemopreventivnu i antitumorsku aktivnost posebice jer je korištenje maslinovog ulja povezano s manjom učestalosti raka dojke. Ispostavilo se da posjeduje citotoksični, antiproliferativni i prooksidativni učinak na ljudske stanice raka dojke i to neovisno o razini ekspresije estrogen receptora, dok na epitelne mliječne stanice pokazuje antioksidativnu i kemoprotektivnu aktivnost.(31)

p-HIDROKSIFENILOCETNA KISELINA

p-hidroksifenilocetna kiselina je monokarboksi kiselina, octena kiselina u kojoj je vodik zamijenjen 4-hidroksifenilnom grupom, što je prikazano na slici . Može ju se pronaći u raznoj hrani kao što su masline, zrna kakaa, zob i gljive. Ima ulogu kao metabolit biljaka, gljiva, ljudi i miševa, može se naći u svim ljudskim tkivima lociran uglavnom u citoplazmi, ali i u izvanstaničnom prostoru. Poput ostalih fenola posjeduje antioksidativna svojstva. (32,33)



Slika 8 *Prikaz strukture p-hidroksifenilocetene kiseline*

1.3. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz lišća masline

Ekstrakcija je proces odvajanja jedne ili više komponenti iz smjese pomoću otapala koji se ne miješa sa smjesom. Upravo je ekstrakcija korak koji je ključan u pripremi uzorka za daljnu analizu fenolnih spojeva te će ovisno o njoj varirati njihova zastupljenost u uzorku. Puno je parametara koji utječu na uspješnost ekstrakcije antioksidansa; tip otapala i njegova koncentracija, temperatura i vrijeme ekstrakcije, omjer količine otapala i materijala iz kojeg se vrši ekstrakcija, pH, karakteristike spojeva koje želimo ekstrahirati te priprema uzorka za samu ekstrakciju. Poželjno je koristiti ekstrakciju koja je brza, jednostavna te da se dobije što veća količina ekstrahiranog spoja uz što manji trošak.

Različite studije o lišću masline kao otapalo za ekstrakciju polifenola koristile su vodu, metanol, etanol, aceton, te vodeno alkoholne mješavine(11). Ispitivan je utjecaj različitih parametara kao što su tip, sastav, pH i temperatura otapala te vrsta ekstrakcije na koncentraciju oleuropeina iz lišća masline. Za ispitivanje tipa i koncentracije otapala korišteno je 7 različitih otapala (voda, 80%-tni metanol, 100%-tni metanol, 50%-tni etanol, 80%-tni etanol, 100%-tni etanol i 20%-tni acetonitril). Ispostavilo se da mješavine organskih otapala (voda/etanol, voda/acetonitril, voda/metanol) omogućuju bolju ekstrakciju oleuropeina od čistih otapala (voda, 100%-tni metanol, 100%-tni etanol). Dodatak vode kao ko-otapala je potrebno da bi se uspješno ekstrahirao oleuropein iz lišća masline; mješavine otapala su bolje jer deaktiviraju enzime zaslužne za pretvorbu oleuropeina u druge spojeve. Otapalo najuspješnije u ekstrakciji bio je 80%-tni etanol nakon kojeg slijedi 20%-tni acetonitril. Za ispitivanje temperature, estrakcija je provedena 4 sata u vodi na tri različite temperature od 25, 40 i 60°C. Sadržaj oleuropeina je rastao pri povećanju tempreature što se može objasniti time što se topljivost oleuropeina povećava povećanjem temperature. Najbolja ekstrakcija oleuropeina pokazala se pri kiselom pH (3). Smanjenje koncentracije oleuropeina

povećanjem pH može se pripisati ionizaciji hidroksilnih grupa, što spriječava njegovo otpuštanje od lišća.(34)

Iako je većina istraživanja u skladu sa studijom Al-Rimawija i sur. gdje je je pokazano da je najučinkoviija ekstrakcija fenolnih komponenti 80%-tnim etanolom pri visokim temperaturama neki radovi upućuju na drugačije rezultate koji ukazuju na metanol kao najuspješnije otapalo. U radu Abaze i sur. korištena su 4 otapala za ekstrakciju fenola iz lišća masline: 80%-tni metanol, 70%-tni etanol, 80%-tni aceton i deionizirana voda. Najveća koncentracija fenola dobila se s 80%-tnim metanol, dok je najmanja dobivena deioniziranom vodom.(35)

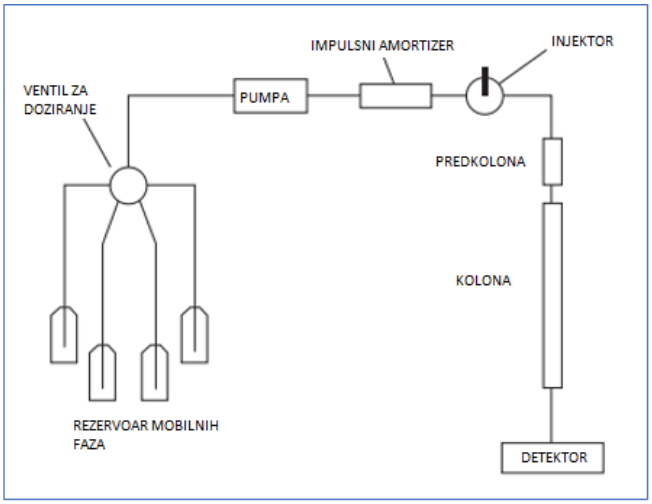
Upješnost ekstrakcije i antioksidativni kapacitet značajno ovise o otapalu. Organska otapala visoke polarnosti su uspješnija u prinosu fenolnih komponenti iz maslinovog lišća za razliku od nepolarnih. Pri ekstrakciji ne smije se zaboraviti na sigurnost u slučaju prijemjne ekstrakta na ljude. Stoga iako je prethodno spomenuti metanol dobar izbor u ekstrakciji fenola, on dovodi do nastajanja neprihvatljive količine toksičnih ostataka u konačnom ekstraktu; stoga su etanol i voda i dalje najzastupljenija otapala.(36)

Fenoli čine veliku skupinu biljnih sekundarnih metabolita, široko su rasprostranjeni te pokazuju veliku strukturnu raznolikost. Mogu se pojaviti se kao aglikoni ili glikozidi, monomeri ili složene polimerne strukture, slobodni ili pak veznani za određeni matriks. Osim toga nisu uniformno distribuirani u biljci te se njihova stabilnost značajno razlikuje jer se polarnost fenolnih komponenti značajno razlikuje. Ove značajke fenola otežavaju proces ektrakcije i izolacije što znači da je iznimno je teško razviti jednu optimiziranu metodu ekstrakcije za sve fenolne komponente. (37) Stoga pri izboru ekstrakcije koja će biti najuspješnija za određen eksperiment treba u obzir uzeti sve parametre kako bi dobili ekstrakt siguran i ne toksičan za ljude.

1.4. HPLC/UHPLC kao metoda detekcije i kvantifikacije polifenolinih komponenti

Tekućinska kormatografija je najkorištenija separacijska metoda koja omogućuje identifikaciju i kvantifikaciju komponenata neke smjese. Neki od razloga njezine raširenosti su visoka osjetljivost metode, prikladnost za odvajanje nestabilnih i termički osjetljivih vrsta, osim toga njegova primjena moguća je za širok spektar tvari koje su važni u industriji te u mnogim područjima znanosti. Primjena tekućinske kormatografije moguća je na materijale kao što su aminokiseline, proteini, nukleinske kiseline, ugljikohidrati, lijekovi, terpenoidi, pesticidi, antibiotici, steroidi, metaloorganske vrste te mnoštvo anorganskih spojeva.

U HPLC metodi tekući ili pak kruti uzorak prethodno otopljen u odgovarajućem otapalu prolazi kolonom pomoću mobilne faze. Odjeljivanje se provodi na temelju interakcija stacionarne faze i otopljenih tvari. Slijed elucije otopljenih tvari u HPLC metodi ovisi o polarnosti. U kromatografiji obrnutih faza stacionarna faza manje je polarna od mobilne te sukladno tome prilikom eluiranja prvo izlaze polarnije komponente dok je u kromatografiji normalnih faza to obrnuto. Vrlo važna karakteristika HPLC uređaja je posjedovanje više rezervoara otapala što omogućuje brzo i lako mijenjanje sastava mobilne faze koje je ključno u gradiijentnoj eluciji. Prije korištenja, iz mobilne faze (otapala) moraju biti uklonjeni otopljeni plinovi (N_2 i O_2) te sve nećistoće (čestice prašine i sl.). Degaziranje je bitno jer otopljeni plinovi u otapalu mogu formirati mjehurić koji dolaskom na detektor remeti njegov signal. Otapala iz rezervoara dopremaju pumpe, dok ventil za doziranje kontrolira sastav mobilne faze čineći mogućim promjenu sastava mobilnih faza pri korištenju gradijentne elucije. HPLC uobičajeno posjeduje dvije kolone, analitičku kolonu zaduženu za razdvajanje komponenti te predkolonu kojoj je uloga štititi analitičku kolonu od onečišćenja te joj na taj način produžiti vijek.(38) Shemu osnovnih dijelova HPLC instrumenta moguće je vidjeti na slici 9.



Slika 9 *Shematski prikaz osnovnih dijelova HPLC uređaja (Harvey, 2000.)*

Za detekciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva često je korištena upravo HPLC metoda. Najčešće korištene kolone u HPLC analizi su C18 veličine čestica od 5 μm. Poželjne su kraće kolone s manjom veličinom pora za dobivanje bolje rezolucije te kraćeg trajanja analize. Kolone veličina pora od 3 i 1,8 μm korištene su u radovima za odvajanje fenola iz lišća masline. Za eluiranje spojeva je najčešće korištena gradijentna metoda jer izokratna elucija nije u stanju dovoljno dobro razdvojiti komponente zbog kompleksnog fenolnog profila u lišću masline(11). Spektar mogućnosti za mobilne faze je širok; no najučestaliji je binarni sustav koji je kombinacija vode i manje polarnog otapala kao što je metanol ili acetonitril. Kako bi se održao nizak pH i spriječila degradacija fenola, u vodenu fazu dodaje se octena, mravlja ili čak perklorna kiselina. UV-VIS detekcija je i dalje najkorištenija za detekciju fenolnih komponenti. Spektar se snima uglavnom na valnoj duljini od 280 nm no treba uzeti u obzir da ne postoji uiverzalni maksimum apsobancije za fenole u lišću masline.

Mobilna faza	Indeks polarnosti
acetonitril	5,8
voda	10,2

Slika 10 *Prikaz indeksa polarnosti mobilnih faza korištenih u ovom radu*

1.5. Zeoliti

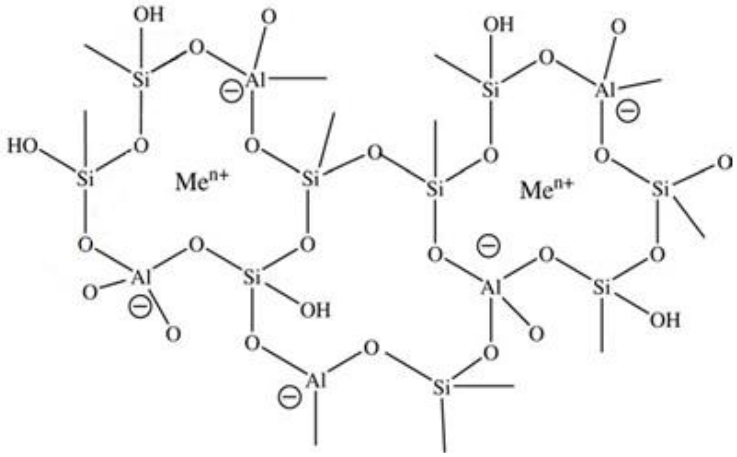
Zeoliti su minerali koji mogu biti prirodnog i sintetskog podrijetla, a klasificirano je oko 40 prirodnih i 150 sintetskih zeolita. Nomenklatura i klasifikacija zeolita temelji se na njihovoj strukturi s kodom od tri slova; klinoptilolit je označen sa slovima HEU.(39) Pronađeni su diljem svijeta, primjerice u Europi (Mađarska, Italija, Rumunjska, Slovačka, Slovenija, Turska, Ukrajina, Azerbajdžan), Aziji (Kina, Iran, Japan, Korea), Australiji i Novom Zelandu te u puno zemalja Amerike, poput Argentine, Kube, Meksika te Sjedinjenih Američkih Država.

Tablica 2 *Proizvodnja zeolita u tonama za 2016. i 2017. godinu, za pojedine države i ukupno u svijetu.(https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/zeolites/mcs-2018-zeoli.pdf; U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries, January 2018)*

	Mine production	
	2016	**2017**
SAD	73400	79000
Kina	300000	300000
Kuba	51000	55000
Jordan	13000	13000
Korea	191000	200000
Novi zeland	80000	80000
Turska	55000	60000
Ostale zemlje	35000	350000
Ukupno u svijetu	1100000	1100000

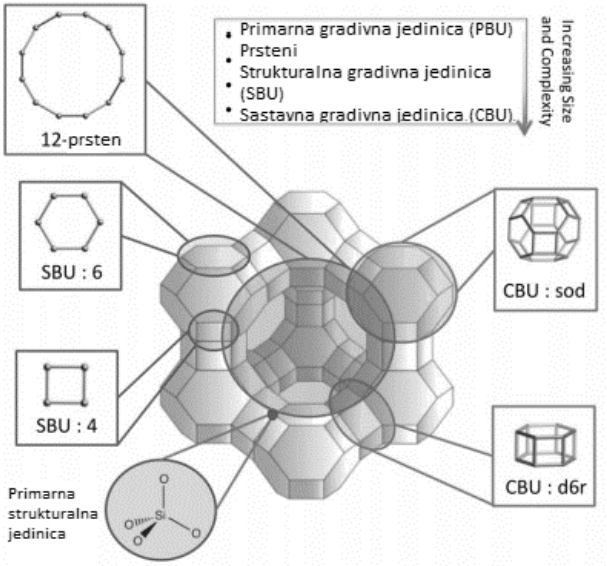
Prirodni zeoliti većinom su vulkanskog podrijetla, nastala kroz tisuće godina kada bi vruća lava došla u doticaj s morem. U moru bi došlo do reakcija između vruće lave, vode i soli što je u konačnici dovelo do nastanka zeolita. Naziv dolazi iz grčkih riječi „zeo" (kipjeti) i „lithos" (kamen); što znači kipući kamen. Tako ga je prvi nazvao 1756. godine švedski mineralog Alex Fredrik Cronstedt koji je primjetio da se njegovim zagrijavanjem otpušta para, a zbog brzog isparavanja vode zeolit se činio kao da ključa zbog čega je dobio takav naziv.(40)

Zeoliti su aluminosilikati trodimenzionalne, mrežaste strukture građene od tetraedra silicija i aluminija s atomima kisika koji povezuju susjedne tetraedre. Općenita formula glasi $(M^{n+})x/n\ [(AlO_2)x(SiO_2)y\cdot mH_2O$ gdje „M" označava pozitivni metalni ion, primjerice katione natrija (Na^+), kalija (K^+), magnezija (Mg^{2+}), ili kalcija (Ca^{2+}). Aluminij u strukturi donosi negativan naboj stoga su kationi prisutni kako bi ukupni naboj strukture zeolita bio neutralan. Kationi su smješteni u porama te su u mogućnosti lako se zamijeniti s drugim pozitivno nabijenim ionima(41,42).



Slika 11 *2D prikaz strukture zeolita (Granda Valdez, 2006.)*

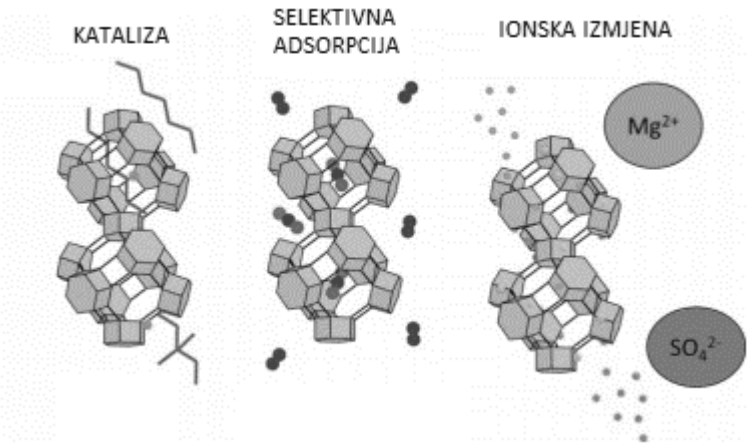
Struktura zeolita može se kategorizirati u primarne gradivne jedinice (PBU) i sekundarne (strukturalne) gradivne jedinice (SBU). PBU su $(SiO_4)^{4+}$ i $(AlO_4)^{5+}$ tetraedri što vidimo na slici ispod (primjer $(SiO_4)^{4+}$). Djeleći kisik sa susjednim tetraedrom stvara se jednostavna geometrijska formacija koju nazivamo SBU. SUB dolazi u različitim formama kao što su pojedinačni prstenovi, dvostruki prstenovi, poliedri ili pak više kompleksne strukture. Trenutno su poznate 23 vrste SBU. Nadalje postoje veće i kompleksnije jedinice koje se nazivaju strukturne gradivne jedinice (CBU), a razlikuju se od SBU po većem broju metalnih centara. Povezivanjem ovih jedinica nastaje strukturni motiv koji posjeduje šupljine (pore i kanale) koji zeolitima daju važna fizička i kemijska svojstva.(40,43)



Slika 12 *Prikaz gradivnih jedinica zeolita; primarna gradivna jedinica (PBU); strukturalna gradivna jedinica (SBU); kompozitna gradivna jedinica (CBU.) (Granda Valdez, 2006.)*

KARATERISTIKE ZEOLITA I NJEGOVA PRIMJENA

Svojstva koja zeoliti posjeduju, a čine ih zanimljivima za istraživanjem jesu ionska izmjena, adsorpcija i kataliza (slika 13). Zeolit se često naziva „molekularno sito" jer njihova porozna struktura dopušta samo molekulama određene veličine (manje ili iste veličine) da prođu kroz kanale, dok su veće molekule isključene. Sposobnost adsorpcije zeolita ovisi o veličini adsorbanta i veličini pora u zeolitu (0,4 nm do 1,3 nm). Adsorpcija se može dogoditi u unutarnjoj i vanjskoj površini zeolita.



Slika 13 *Prikaz tri karakteristike zeolita; kataliza, adsorpcija i ionska izmjena(Granda Valdez, 2006.)*

Zeoliti od čistog silicija nisu dobri ionski izmjenjivači, ali takvi materijali mogu adsorbirati neutralne molekule. Omjer silicija i aluminija određuje kapacitet i privlačenje kationa koji obitavaju unutar pora i kanala. Osim metalnih kationa i vode koji se nalaze u porama i kanalima, ostale molekule koje posjeduju kationske grupe mogu se vezati na površine zeolita.

Zeoliti su minerali posjeduju fizičke i kemijske karakteristike prethodno nabrojene koje ih čine zanimljivima različitim područjima kao što su agronomija, ekologija, farmacija, industrijski procesi, medicina i biotehnologija. Zeoliti se upotrebljavaju kao katalizatori u petrokemijskoj industriji, kao sita za razdvajanje i sortiranje molekula, kao adsorbent za pročišćavanje vode, tla i zraka, za uklanjanje radioaktivnih kontaminacija, u izradi deterdženata.

Primjena zeolita u biotehnologiji i medicini je raznolika upravo zbog karakteristika koje posjeduju. Neke od primjena su zaštita okoliša (pročišćavanje voda, tla i zraka), detoksifikacija živih organizama, primjena u agrokulturi, veterinarskoj medicini i zootehnologiji, u razdvajanju raznih biomolekula i stanica, za dostavu lijekova i gena, u izgradnji biosenzora i za detekciju biomarkera, u kreaciji novih antioksidansa, hemostatika te u tkivnom inžinjerstvu i u zavoju za rane. Većina ovih primjena zeolita je u eksperimentalnom razvoju, ali neke su već pronašle mjesto u kliničkoj uporabi.

Zeoliti imaju potencijal u dostavi različitih lijekova (antiinflamatornih, antitumorskih, antimikrobnih), a osim toga mogli bi dostavljati i nukleinske kiseline. Dostava lijeka pomoću zeolita bila bi korisna u slučajevima kada lijekovi narušavaju funkciju želuca i uzrokuju njegovu iritaciju. Ovakav princip se istražuje za pH kontroliranu oralnu primjenu aspirina te drugih nesteroidnih protuupalnih lijekova. Osim toga zeoliti bi mogli dostaviti citotoksične lijekove isključivo do ciljnog mjesta kako se ne bi narušila funkcija zdravih stanica. Nekoliko istraživanja pokazala su uspješnost zeolita napunjenog s 5-flourouracilom (istraživanja rađena na različitim tumorskim stanicama). Korištenje zeolita kao nosača ispituje se i za

antimikrobne lijekove kao što su antibiotici, kemoterapeutici, metalni ioni i dušikov oksid.

Specifična površina zeolita može se iskoristiti za pročišćavanje proteina, a osim toga moguće je odjeljivati različite stanice sisavaca i mikroba. Pokazano je da se određene stanice mikroba absorbiraju na pojedine zeolite.

Pojedini zeoliti pokazuju citotoksične učinke. U određenim slučajevima to je nepoželjna karakteristika jer može izazvati rak no upravo ta sposobnost može se iskoristiti u borbi protiv tumora na način da se iskoristi antiproliferativna i proapoptotska aktivnost zeolita.(44,45)

Klinoptilolit

Klinoptilolit je najčešći mineral pronađen u prirodi te je raširen diljem svijeta. Uobičajeno stijene sadrže 50% klinoptilolita, no veoma je čest i njegov sadržaj od 80%. Iako je vađenje klinoptilolita iz prirodnih izvora bilo popularno godinama njegova sinteza se istraživala zbog potrebe za visokom kvalitetom i čistoćom. Iz tog razloga puno studija se fokusiralo na njegovu sitezu pomoću raznih kemikalija i tehnika kako se bi se dobili klinoptiloliti različitog sastava. Osim toga klinoptiloliti se ne koriste samo u svojoj osnovnoj formi već i u modificiranim oblicima. Istraživanjem se došlo se do zaključka da se njegova primjena može proširiti funkcionalizacijom vanjskih kao i unutarnjih površina.(46) Većina klinoptilolita korištenog u medicinske svrhe prolazi kroz mehaničke i tribomehaničke procese koji uzrokuju primjetne promjene u veličini čestica i raspodjele povećanjem specifične površine. Tijekom mikronizacije događaju se deformacije i nastaju nove površine zbog pucanja kemijskih veza i gibanja čestica.(41)

Pripada grupi heulandita koji posjeduje tetraedralna strukturu formiranu od jedinica SiO_4 i AlO_4 čiji je omjer veći od 4 te sadrži tri grupe presjecajućih kanala. (47) Zanimljive karakteristike klinoptilolita su jaka adsorpcija i visoka moć ionske izmjene, a upravo to ih čini pogodnim za upotrebu u

različitim područjima uključujući agrokultutu, ekologiju, farmaciju i dr. U agrikulturi i hortikulturi koristi se za sporo otpuštanje gnojiva, insekticida, pesticida, antibakterijskih sredstava i stimulatora rasta. Ovakav materijal je pogodan i za zaštitu okoliša uklanjajući teške metale, boje i surfaktante iz vode ili pak uklanjajući toksične plinove. Njegova uporaba moguća je i u medicini za proizvodnju antidijarealnih i antivirusnih lijekova, protutumorske terapije te se mogu koristiti kao nosači lijekova.(46)

Potencijal primjene zeolita u medicinske svrhe pripisan je njegovoj mogućnosti reverzibilne izmjene iona i velikog kapaciteta adsorpcije. Osnovna karakteristika povezuje se s uklanjanjem toksina te na taj način podpomaže održavanju homeostaze organizma što može biti od koristi u mnoštvu medicinskih stanja. Uslijed neuravnotežene prehrane ili pak patoloških stanja kao što su ulcerativni kolitis, sindrom iritabilnog crijeva i kolorektalna karcinogeneza gdje dolazi do pretjerane produkcije štetnih produkata (NH_4, CO_2, H_2S) fermentacijom proteina u crijevima, klinoptilolit bi se mogao koristiti kao adjuvant u terapiji jer pokazuje afinitet za amonijakom. (48)

Većina dosadašnjih ispitivanja in vivo izvodila su se na životinjama te su prikazali poboljšanje njihovog stanja nakon izlaganja raznim toksinima primjenom klinoptilolita. Klinoptilolit ubačen u prehranu može uspješno spriječiti mikotoksine direktnom adsorpcijom, što je dokazano in vitro gdje je klinoptilolit pokazao sklonost pojedinim mikotoksinima (aflatoksin, zearalenon, ohratoksin i T2 toksin) te in vivo(48)

Osnovna struktura klinoptilolita smatra se biološki neutralna i ne toksična. Procijenjena je netoksična doza zeolita klinoptilolita za životinje je 1000 mg/kg te se smatra da oralna primjena ovog zeolita zbog svoje kemijske stabilnosti ne predstavlja potencijalnu opasnost primjene in vivo. Ispitivana je toksičnost na način da se 15 dana životinjama klinoptilolit (tribomehanički aktivirani) kao prah uvrstio u prehranu. Izabrane su doze veće od preporučenih (400 mg/miš/dan i 1000 mg/miš/dan) no niti jedna od primjenjenih doza nije rezultirala smrtnim ishodom. Nije zamijećena

toksičnost ni u klasičnim akutnim, subrkoničnim i kroničnim testovima. Zbog visokog afiniteta klinoptilolita prema olovu i kadmiju njihovo vezanje može se smatrati ireverzibilno ili veoma sporo reverzibilno, stoga opasnost od otpuštanja tih kationa u organizam je minimalna. Značajnije otpuštanje kadmija i olova primjećeno je jedino pri pH nižem od 1 što nije relevantno za primjenu in vivo.(48)

Prilikom klasične detoksifikasije organizma postoji opasnost od uklanjanja bitnih elektrolita iz seruma no u istraživanjima koja su uključivala ljude i životinje detoksifikacija pomoću klinoptilolita nije dovela do značajnih promjena u bitnim elementima i vitaminima. Općenito se klinoptiloliti smatraju sigurnima za primjenu in vivo, ali treba uzeti u obzir heterogenost takvih materijala. Različite veličine čestica, površine, sastav kationa mogu potaknuti različite biološke učinke i učinkovitost. Stoga potrebno je procijenjivati biološke učinke i toksičnost prema tipu klinoptilolitnog materijala. U različitim studijama se koriste klinoptiloliti iz različitog izvora, kemijskog sastava, čistoće, koristili su se drugačiji procesi mljevenja. Osim toga istraživači imaju drugačije ciljeve i dizajne eksperimenata. Iz ovih razloga nije moguće generalizirati djelovanje i sigurnost klinoptilolita. (48)

Zeolit A

Iako se većinom u medicini koriste prirodni zeoliti svoje mjesto tu bi mogli pronaći i sintetski zeoliti poput natrijevog aluminijevog silikata Zeolit A je otkriven i sintetiziran krajem 1950.-ih godina te posjeduje dobro organiziranu površnu sa specifičnom strukturom nalik na loptice. Njegova formula glasi : 48 Na_2O × 48 Al_2O_3 ×96 SiO_2 ×216 H_2O.(41,49)

Zeolit A je široko primjenjivan kao ionski izmjenjivač u industriji. Posjeduje sastav s najvećim mogućim udjelom aluminija u tetraedralnoj strukturi alumosilikata i molarnim omjerom Si/Al od skoro jedan. Takva struktura uravnotežena je s maksimalnim brojem kation izmjenjujućih mjesta te iz tog razloga posjeduje veću moć izmjenjivanja kationa. Ipak, to ga čini

nestabilnim u kiselinama i neprikladnim za primjenu in vivo poput ostali zeoliti s niskim udjelom silicija. Iako pokazuje najbolju aktivnost u uklanjaju kationa in vitro od testirana 4 zeolita, in vivo rezultati na štakorima pokazuju da nije prikladan za oralnu primjenu zbog otpuštanja aluminija u krv i organe. Zeolit A je povećao koncentraciju aluminija u plazmi i kostima intoksiciranih životinja što se podudara s prethodno utvrđenim otpuštanjem iona aluminija pri kiselom pH.(48) Trenutno njegova primjena je najzastupljenija u izradi deterdženata i tableta za mekšanje vode.(43) Iako nailazimo na određene probleme i zeolit A se može koristiti u medicini kao sustav dostave lijeka, za uklanjanje aflatoksina in vivo ili za topičku primjene.(41)

2. CILJ RADA

Korist lišća masline u medicinske svrhe prepoznata je od davnina iako je njegov sastav bio nepoznat. Istraživanjem ekstrakta lišća masline dokazali su se pozitivni učinci za ljudsko zdravlje. Lišće masline sadrži veliki udio fenola, a upravo su oni bioaktivna komponenta lišća masline koja pokazuje antioksidativna, antiinflamatorna, antihipertenzivna, hipoglikemijska te hipokolesterolemijska svojstva. Iako je fokus istraživanja i proizvodnje stavljen na plod masline i maslinovo ulje, lišće masline kao velik izvor fenola iz tog razloga bio bi jeftina i lako dostupna sirovina. Svoje mjesto u medicini pronašli su i zeoliti, prirodni i sintetski aluminosilikati koji zahvaljujući svojoj strukturi pokazuju svojstva ionskog izmjenjivača, katalizatora i adsorbenta. Upravo ove karakteristike ih čine poželjnima u medicini. Neke primjene zeolita već su pronašle svoje mjesto u praksi, dok se druge tek ispituju. Adsorpcija spojeva na zeolite osim za uklanjanje nećistoća i toksičnih spojeva iz prirode (vode, zraka, tla), omogućuje dostavu lijekova u organizmu. Iz dosasažnjih istraživanja može se zaključiti da zeoliti mogu vrlo dobro poslužiti kao nosači spojeva korisnih za ljudsko zdravlje.

Sa saznanjima o zdravstvenim benefitima lišća masline i potencijal zaolita kao netoksičnog nosača spojeva cilj ovog rada je spojiti najbolje od dvije zasebno obećavajuće sirovine. Zeolit koji sam po sebi posjeduje pozitivne karateristike za ljudsko zdravlje i smatra se ne toksičan mogao bi na sebe vezati fenolne spojeve iz lišća masline. Na taj način dobio bi se produkt koji bi bio primjenjiv na ljudima, a bio bi od koristi za zdravlje. Mogao bi se koristiti kao dodatak prehrani ili pak kao potpora terapiji u određenom zdravstvenim stanjima. Zeolit bi ulaskom u organizam mogao otpustit svoje vezane bioaktivne komponente koje bi mogle pomoći pri jačanju prirodnih funkcija organizma svojim dokazanim učincima. Stoga cilj ovog rada je vidjeti vežu li se određeni polifenoli (oleuropein, tirosol, 3-hidroksitirosol, 3-kumarinska kiselina, pinorezinol, para-hidroksifeniloctena kiselina) iz lišća masline na zeolite, odnosno mogu li zeoliti poslužiti kao nosači za fenole iz etanolnog ekstrakta lišća masline.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema uzorka i ekstrakcija

Biljni materijal (lišće masline) pribavljen je rezidbom maslina nepoznate vrste na području općine Umag (Jurićani) u travnju 2018. godine tijekom redovite rezidbe maslina. Sorta masline s kojih je uzorak skupljen je nepoznata, a stablo je staro 90-ak godina. Ubrano lišće pohranjeno je u zamrzivač do dana ekstrakcije. Lišće masline se na dan ekstrakcije odvojilo od grančica, opralo s vodovodnom vodom kako bi se uklonile nečistoće te usitnilo.

Provedena je ekstrakcija s 80%-tnim etanolom na 70°C. Kako bi nastalo dovoljno ekstrakta za daljnje postupke korištena masa lišća u ekstrakciji iznosila je 150 g. U staklenoj čaši se 1050 mL 80%-tnog etanola zagrijavalo na 70°C. Temperatura se provjeravala pomoću termometra uronjenog u otapalo. U trenutku postizanja željene temperature 150 g maslinovog lišća ubačeno je u zagrijani etanol gdje se uz konstantno miješalo ekstrahiralo 4 sata. Nakon provedene ekstrakcije dobiven je etanolni ekstrakt koji je nakon hlađenja dva puta vakumski profiltriran pomoću Büchnerovog lijevka kroz filter papir Whatman. Za ispiranje taloga i čaše korišteno je otapalo. Iskorišteno lišće pohranjeno je u zamrzivač, a etanolni ekstrakt je ostavljen preko noći u frižideru kako bi se istaložio klorofil. Nakon taloženja klorofila ponovila se filtracija.

3.2. Evaporacija i liofilizacija

Kako bi se uzorak pripremio za daljnje korištenje potrebno je ukloniti otapalo iz uzorka za što se koristio BUCHI Rotavapor R-205. Etanolni ekstrakt maslinovog lišća uparavan je na početnom tlaku od 135 mbar koji se postupno smanjivao do 55 mbar te temperaturi vodene kupelji na 45°C. Nakon evaporacije ekstrakt nije bio u potpunosti suh stoga je napravljena liofilizacija uzorka. Kako bi se priremili za liofilizaciju ekstrakti su stavljeni

u zamrzivač na -80°C gdje su pušteni nekoliko sati. Zamrznuti ekstrakti su stavljeni na liofilizator Kambič Lio-5P i ostavljeni preko noći.

Nakon uklanjanja otapala iz uzorka dobiven je suhi ekstrakt. Masa produkta dobivena je oduzimanjem mase prazne tikvice i mase tikvice sa suhim ekstraktom dobivenim opisanim postupcima za čiju je odvagu korištena analitička vaga.

3.3. Priprema uzoraka za UHPLC analizu i analiza tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UHPLC)

Suhi uzorci otopljeni su u 50:50 acetonitrila i vode nakon čega su profiltrirani kroz Aqua-tools filtere pora dimenzija 0,2 µm sa špricom. Pripremljene su dvije koncentracije uzorka (1mg/ml i 100mg/ml).

Za izvođenje analize korišten je Agilent 1290 Infinity LC sustav s DAD detektorom (190,0-640,0 nm) te ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm) kolonom veličine čestica od 1,8 µm. Korištena je gradijentna metoda u trajanju od 35 min pri protoku od 0,300 ml/min. Volumen injektiranja iznosio je 1 µL. Kako se bi polifenoli ostali stabilni temperatura kolone održavana je na 30°C. Detekcija spojeva u uzorku je provedena na valnim duljinama od 280 i 325 nm. Korištene su dvije mobilne faze: (A) smjesa vode s 0,1% mravlje kiseline te (B) acetonitrila s 0,1% mravlje kiseline. Detaljna metoda prikazana je u tablici.

Tablica 3 *Prikaz gradijentne metode; izmjena omjera mobilnih faza u ovisnosti o vremenu.*

Vrijeme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
0,00	100,00	0,00
3,50	95,00	5,00
7,20	85,00	15,00
25,00	60,00	40,00
26,00	60,00	40,00
27,00	0,00	100,00
29,00	0,00	100,00
30,00	100,00	0,00
35,00	100,00	0,00

Usporedbom retencijskih vremena standarda sa retencijskih vremenima dobivenih u ekstraktu identificirane su fenolne komponente. Kvanitifikacija spojeva u uzorku izvršena je pomoću površina ispod pika i baždarnih krivulja za standardne otopine (pribavljene od prije). Koncentracije fenolinih spojeva izračunate su u Microsoft Excelu te su prikazane kao miligram spoja po gramu maslinovog lišća.

3.4. Zeoliti

Za vezanje polifenola na zeolite korištena su 4 različita zeolita. Jedan sintetski (Zeolit A) te tri prirodna klinoptilolita dobivena različitim postupcima (TMAZ, PMA i PMA-O_2)

Prirodni tribomehanički aktivirani zeolit (TMAZ) mikroniziran je tribomehaničkom aktivacijom u kojoj se čestice zeolita usitnjavaju međusobnim sudaranjem pri velikim brzinama. PMA (Panaceo mikroaktivacija) je proizveden procesom dvostruke aktivacije višestrukim sudarom čestica velike brzine u vihoru koji stvara sedam kružnih redova oštrica pozicioniranih na dva suprotono rotirajuća diska pri čemu su suprotno rotirajući diskovi postavljeni tako da čestice moraju proći svih sedam kružnih redova oštrica centrifugalnom silom. Klinoptilolit je dva puta prošao kroz predhodno opisani aktivacijski proces. PMA-O_2 prošao je aktivaciju kao i PMA uz dodatak čistog medicinskog kisika kako bi se povećala temperatura i sudar čestica te na taj način dobila drugačija svojstva površine klinoptilolita.

3.5. Vaganje zeolita i ekstrakta lišća masline vezanog na njega nakon filtracije

Etanolni ektrakt se otopio u vodi/80% etanolu te mu se dodala jednaka količina zeolita. Otopljeni etanolni ekstrakt i zeolit se ostavio dva dana kako bi se dogodilo vezanje. Nakon dva dana provedena je vakum filtracija te se time dobio filtrat od zeolita i komponenti izekstrakta lišća masline ukoliko

se dogodilo vezanje. Kako bi se dobila točna odvaga taloga, prije vaganja se filter papir s talogom stavio u prethodno vaganu tikvicu koja se postavila na liofilizator Kambič Lio-5P. Tikvica je ostavljena preko noći na te se na taj način uklonilo zaostalo otapalo. Masa taloga dobivena je oduzimanjem mase prazne tikvice i filer papira od mase tikvice sa filter papirom i talogom.

3.6. Vaganje zeolita nakon dodatka otapala, centrifuge i sušenja

Zeolitima se dodalo otapalo (voda/80% etanol) te se epica s zeolitima i otapalo vorteksirala jednu minutu nakon čega se radi uspostavljanja ravnoteže između otapala i krutine ostavilo 5 sati. Epica je postavljena na centrifugu na 20min pri 130000 okretaja. Nakon provedene centrifuge uklonilo se otapalo iznad taloga te su se talozi radi zaostalog otapala postavili na liofilizator Kambič Lio-5P. Talozi su se nakon sušenja izvagali.

3.7. Vezanje fenolnih komponenti iz lišća masline na zeolitne nosače te ispitivanje vezanja UHPLC metodom

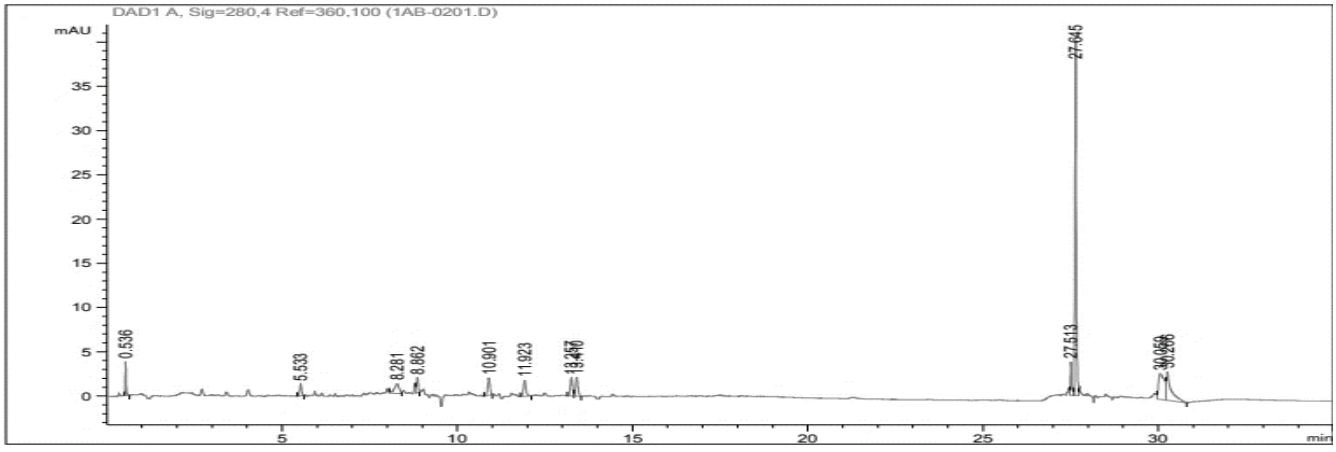
Ekstrakt se otopi u vodi. Dio otopljenog uzorka se pripremi za HPLC analizu na način da se uzme dio te mu se doda jednaka količina acetonitrila. Provede se identifikacija i kvantifikacija oleuropeina u uzorku istom metodom kojom je napravljena prethodna identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva u uzorku. U ostatak otopljenog ekstrakta se doda količina zeolita jednaka preostaloj masi otopljenog uzorka te se ostavi dva dana kako bi se dogodilo vezanje. Nakon dva dana pripremi se uzorak za HPLC te se provede analiza.

Koncentracije fenolinih spojeva izračunate su u Microsoft Excelu te su prikazane kao miligram spoja po gramu maslinovog lišća prije i nakon dodatka zeolita. Promatrala se razlika u koncentraciji tih spojeva. Postupak je ponovljen za sva 4 zeolita.

4. REZULTATI

4.1. Kvantitativna analiza fenolinih spojeva u ekstraktu masline

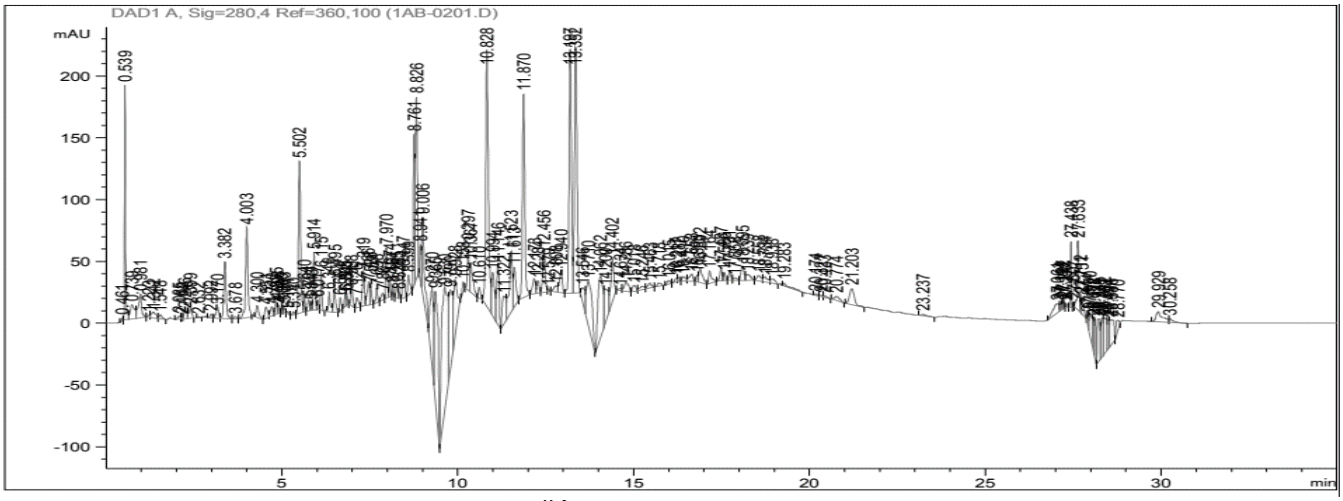
Provedenom UHPLC analizom etanolnog ekstrakta (ekstrakcija s 80%-tnim etanolom pri 70°C) dobiveni su kromatogrami s retencijskim vremenima izlaska pojedinih spojeva s površinom njihovih pikova. Pomoću retencijskih vremena standarda i baždarnih krivulja identificirani su i kvantificirani određeni fenolni spojevi u etanolom ekstraktu. Identificirani fenolni spojevi su oleuropein, tirosol, 3-hidroksitirosol, 3-kumarinska kiselina, pinorezinol, para-hidroksifeniloctena kiselina. Primjeri kromatograma dvije različite koncentracije ekstrakta lišća masline prikazani slikama ispod(Slika 14 i 15). Pri manjoj koncentraciji moguće je uočiti pikove spojeva koji su više zastupljeni u ekstraktu (oleuropein), dok se pri većoj koncentraciji može uočiti više pikova jer su detektrirani i spojevi čija koncentracija manja.



Slika 14 *Kromatogram ekstrakta lišća masline nepoznate sorte iz Umaga koncentracije 1mg/ml. Ekstrakcija je provedena na 70 C° 80%-tnim etanolom. Na kromatogramu je vidljiv pik oleuropeina s retencijskim vremenom 11,923.*

Pomoću dobivenih površina ispod pikova identificiranih fenolnih spojeva prisutnih u lišću masline, u Microsoft Excelu izračunata je koncentracija te izražena kao miligram spoja po gramu uzorka (lišća). U narednoj tablici

moguće je vidjeti zastupljenost pojedine fenolne komponete u ekstraktu lišća masline.



Slika 15 *Kromatogram ekstrakta lišća masline nepoznate sorte iz Umaga koncentracije 100mg/ml. Ekstrakcija je provedena na 70C 80%-tnim etanolom. Na kromatogramu je prisutno puno pikova radi velike koncentracije uzorka.*

Tablica 4 *Koncentracije fenolnih spojeva (mg/g) u ekstraktu lišća masline nepoznate sorte iz Umaga. Nejzastupljenija fenolna komponenta je oleuropein.*

Fenolni spoj (mg/g)	**Ekstrakcija - 80% etanol (70°C)**
Oleuropein	9,91810
3-hidroksitirosol	0,87462
Tirosol	0,16913
p-hidroksifenilocetena kiselina	0,25927
p-kumarinska kiselina	0,06805
Pinorezinol	1,84629

4.2. Vezanje polifenola na zeolite

4.2.1. Vaganje zeolita i ekstrakta lišća masline vezanog na njega nakon filtracije

Nakon provedenog vezanja ekstrakta lišća masline na zeolit od interesa je bila količina vezanog ekstrakta. Masa zeolita bila bi veća ukoliko je došlo do vezanja. U konačnici masa zeolita nakon filtracije i sušenja filtrata na liofilizatoru bila je manja od početne odvage za većinu zeolita. Manja

konačna masa zeolita nakon vezanja primjećena je za sve zeolite osim za PMA gdje je masa za uzorak otpljen u vodi 0,0179g i u etanolu 0,0335g.

Tablica 5 *Odvage (za svaki zeolit) uzoka, zeolita te zeolita nakon vezanja komponenti iz lišća masline; odvage za uzorke otopljene u vodi i u 80%-tnom etanolu.*

	Ekstrakt otopljen u H2O			**Ekstrakt otopljen u 80%-tnom etanolu**		
	Početna odvaga zeolita/g	**Početna odvaga uzorka/g**	**Konačna odvaga zeolita nakon vezanja/g**	**Početna odvaga zeolita/g**	**Početna odvaga uzorka/g**	**Konačna odvaga zeolita nakon vezanja/g**
Zeolit A	0,2001	0,1989	0,1934	0,2007	0,2009	0,1920
PMA-O_2	0,2005	0,2003	0,2184	0,2016	0,2012	0,2351
TMAZ	0,2013	0,2012	0,1642	0,2006	0,2010	0,1955
PMA	0,2002	0,2004	0,1856	0,2008	0,2009	0,2023

4.2.2. Vaganje zeolita nakon dodatka otapala, centrifuge i sušenja

Radi predhodnih rezultata bilo je potrebno vidjeti dolazi li do kvantitativnog gubljenja mase zeolita kada se zeolitu doda otapalo. Zeoliti su se izvagali prije i nakon provedenog postupka i sušenja. Odvage su manje poslije provedenog postupka.

Tablica 6 *Odvage zeolita prije i nakon dodavanja otapala (voda i 80%-tni etanol), centrifuge i sušenja.*

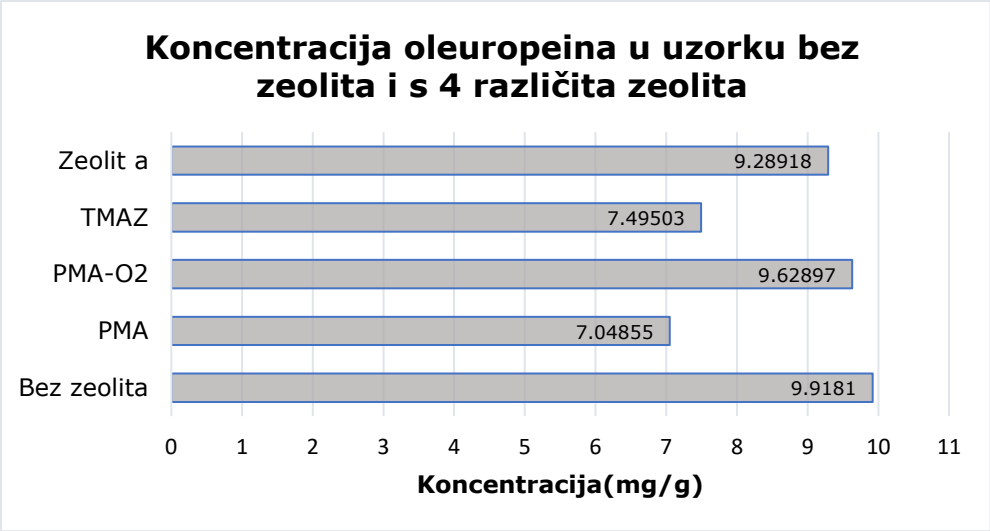
	Ekstrakt otopljen u H2O		**Ekstrakt otopljen u 80%-tnom etanolu**	
	Početna odvaga zeolita/g	**Konačna odvaga zeolita/g**	**Početna odvaga zeolita/g**	**Konačna odvaga zeolita/g**
Zeolit A	0,2019	0,1909	0,2001	0,1884
PMA-O_2	0,2003	0,1892	0,2006	0,1929
TMAZ	0,2017	0,1926	0,2008	0,1925
PMA	0,2001	0,1905	0,2017	0,1935

4.3. Kvantifikacija polifenolnih komponenti u uzorku prije i nakon vezanja na zeolite pomoću HPLC metode

Provedenom UHPLC analizom etanolnog ekstrakta dobiveni su kromatogrami s retencijskim vremenima izlaska pojedinih spojeva s površinom njihovih pikova. UHPLC analiza se provela na otopljenom uzorku bez zeolita i nakon dodavanja zeolite u uzorak. Pomoću retencijskih vremena standarda i baždarnih krivulja identificirani su i kvantificirani određeni fenolni spojevi u etanolom ekstraktu prije i nakon dodavanja zeolita. Promatrani fenolni spojevi su oleuropein, tirosol, 3-hidroksitirosol, 3-kumarinska kiselina, pinorezinol, para-hidroksifeniloctena kiselina. U tablici se može primjetiti da je koncentracija nakon dodavanja zeolita za sve zeolite manja za oleuropein, pinorezinol, 3-hidroksitirosol. Za tirosol sa PMA i zeolit A koncentracija je narasla od početne kocentracije. Koncentracija se povećala sa svim zeolitima za *p*-hidroksifenilocetenu kiselinu dok se isto dogodilo za 3-p-kumarinsku kiselinu s zeolitom A.

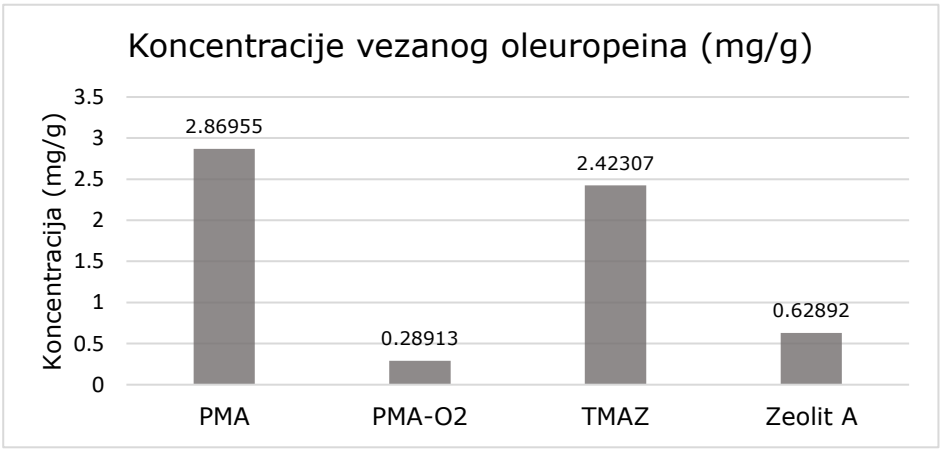
Tablica 7 *Koncentracije polifenola (oleuropein, tirsol, 3-hidroksitirosol, 3-p-kumarinska kiselina, pinorezinol p-hidroksifeniloctena kiselina) u uzorku prije i nakon dodavanja 4 različita zeolita.*

Koncentracija polifenola u uzorku (mg/g)	**Bez zeolita**	**PMA-O_2**	**PMA**	**TMAZ**	**Zeolit A**
Oleuropein	9,91810	9,62897	7,04855	7,49503	9,28918
Tirosol	0,16913	0,20643	0,16719	0,17260	0,21243
3-hiroksitirosol	0,87462	0,83520	0,60453	0,65075	0,64608
3-*p*-kumarinska kiselina	0,06805	0,06677	0,05166	0,05498	0,08683
Pinorezinol	1,84629	1,50171	1,00900	1,27484	1,04589
***p*-hidroksifenilocetena kiselina**	0,25927	0,29337	0,26645	0,27799	0,35243



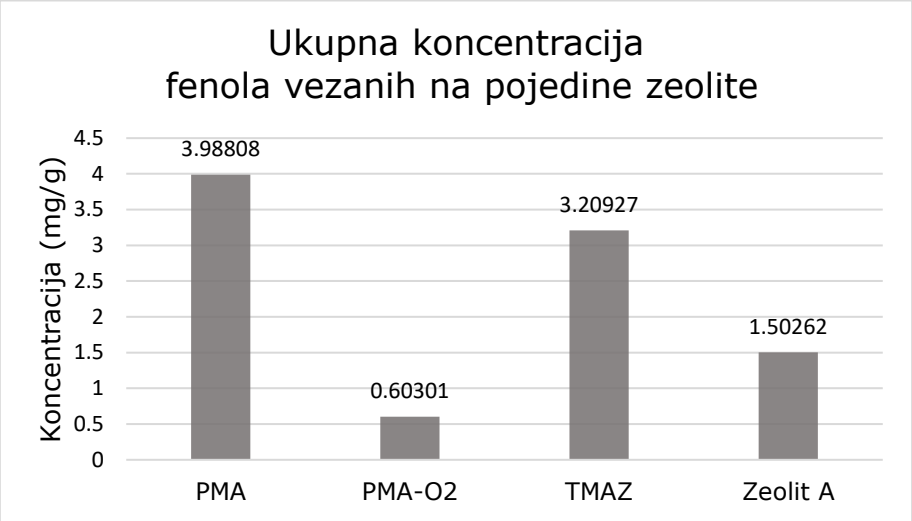
Slika 16 *Prikaz koncentracije oleuropeina u uzorku bez zeolita i s 4 različita zeolita (TMAZ, PMA, PMA-O_2); najmanja koncentracija oleuropeina primjećena je nakon dodatka zeolita PMA-O_2, dok je najveća koncentracija s PMA.*

Kako bi se prikazala količina vezanog oleuropeina na zeolite, koncentracija izračunata pomoću kromatograma, prije i nakon dodatka zeolita se oduzela. Koncentracija koja se smanjila nakon dodatka zeolita odnosi se na količinu vezanog zeolita.



Slika 17 *Prikaz koncentracije vezanog oleuropeina u mg/g; koncentracija oleuropeina koja se smanjila dodatkom pojedinog zeolita; najveće vezanje dogodilo se dodatkom PMA-O_2, a najmanje s PMA.*

Kako bi se vidjelo koji od zeolita pokazuje najveći afinitet za vezanje fenola iz ekstrakta lišća masline izračunata je ukupna koncentracija vezanih fenola. Ispostavilo se da je PMA-O_2 vezao najviše ispitivanih fenola; odnosno dodatkom PMA-O_2 najviše se smanjila njihova koncentracija.



Slika 18 *Prikaz ukupne koncentracije fenola koja se vezala na pojedine zeolite; koncentracija fenola koja se smanjila nakon dodatka zeolita; najveći afinitet za vezanje fenola pokazuje zeolit PMA-O_2, a najmanji PMA.*

5. RASPRAVA

Prije vezanja spojeva iz ekstrakta lišća masline bilo je potrebno pripremiti uzorak te dokazati prisutnost pojedinih fenolnih spojeva. Mnoštvo radova bavilo se upravo optimizacijom uvijeta za što bolju ekstrakciju fenolnih spojeva te su u njima korištena različita otapala, temperature i pH. U većini radova najveći prinos fenola bio je korištenjem 80%-tnog etanola na višim temperaturama pri niskom pH (34) i 80%-tnim metanolom(35). Kako je primarni cilj ovakvog ekstrakta primjena na ljudima izbor otapala je bio 80%-tni etanol unatoč dobrim rezultatima s metanolom jer bi u tom slučaju ekstrakt bi bio toksičan za ljude. Visoke temperature poboljšale su prinos oleuropeina jer se time povećala i njegova topljvost. Stoga je ekstrakcija u ovom radu izvršena pomoću 80%-tnog etanola pri 70°.

HPLC metodom dokazana je prisutnost 6 fenolnih komponeti na temelju usporedbe retencijskog vremena komponenti ekstrakta lišća masline i standarda. **Slika 14** i **15** prikazuje kromatograme uzorka različite koncentracije snimljenih pri 280nm. Na kromatogramu koncentracije 1mg/ml od ispitivanih fenolnih komponenti moguće je uočiti samo pik oleuropeina jer je on najzastupljeniji fenol u etanolnom ekstraktu (**slika 14**), dok se pikovi ostalih fenole mogu zamjetiti tek pri većim koncentracijama (**slika 15**).

Kvantifikacijom 6 identificiranih fenola dobili su se rezultati sukladni sa literaturom. Najzastupljeniji fenolni spoj bio je oleuropein što je bilo očekivno, dok je ostalih 5 fenola manje zastupljeno. Razlike u točnim koncentracijama fenola dobivenih u radu i drugim literaturama može se pripisati različitoj vrsti maslina, starosti, vremenskim uvijetima tijekom godine, vrijeme rezidbe i sl.

Zeolit kao dodatak prehrani već je u uporabi kao komercijalan pripravak radi svoje mogućnosti detoksifikacije organizma. Zašto onda ne poboljšati proizvod koji ima mogućnost adsorpcije spojevima za koje je poznato da imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Vezanjem fenola za koje je

dokazano da imaju antioksidativna, antiinflamatorna, antihipertenzivna, hipoglikemijska te hipokolesterolemijska svojstva(6) na zeolite dobio bi se proizvod koji je siguran, a ulaskom u organizam otpušta vezane fenole koji vrše svoju funkciju. Sam po sebi zeolit bi mogao zadržati svoju funkciju detoksifikacije organizma.

Vaganjem zeolita nakon što je ostavljen određeno vrijeme u otopini uzorka pokušalo se vidjeti veže li zeolit ikakve komponente iz ekstrakta lišća masline. Ukoliko dolazi do vezanja spojeva iz ekstrakta lišća masline na zeolite masa bi trebala biti veća od početne odvage zeolita. Na taj način nećemo saznati jesu li upravo fenolni spojevi ono što se vezalo ili pak neki drugi, ali ćemo znati da se dio iz ekstrakta lišća masline adsorbira na zeolite. Ukoliko je došlo do vezanja sljedeći korak bi bio utvrđivanje jesu li fenoli jedni od vezanih spojeva.

Vaganje se nije pokazalo uspješnom metodom dokazivanja adsorbiranja spojeva iz etanolnog ekstrakta. Dobivene mase zeolita nakon odvijenog vezanja bile su manje od početne odvage zeolita za sva 4 zeolita (**tablica 5**). Da su odvage zeolita prije i nakon vezanja bile jednake mogli bi zaključiti da do vezanja nije niti došlo nakon što je zeolit ostavljen u otopini uzorka. No kako je konačna masa bila manja od početne to nas je uputilo ili na nepreciznost metode, gdje dolazi do gubljenja mase u nekom od koraka ili na kvantitivan gubitak zeolita radi njegovih karakteristika. Gubitak zeolita moguć je tokom filtracije zbog veličine pora filter papira kroz koji prolazi dio zeolita koji je jako sitan, zaostajanja zeolita na posuđu, prilikom sušenja na liofilizatoru. Osim toga postoji mogućnost da se dio zeolita zadržava u otapalu zbog nanočestica koje se ne istalože u potpunosti i djelomičnog otapanja zeolita.

Radi predhodnih rezultata koji su ukazali na to da u nekom koraku dolazi do gubitka mase zeolita vagali su se zeoliti nakon dodatka otapala, provedene centrifuge (kako bi se sav zeolit istaložio), te sušenja taloga. Zeoliti su se promatrali zasebno u otapalima bez dodatka uzorka. Ispostavilo se da se masa zeolita i dalje smanjuje (**tablica 6**). Dolazi do

kvantitativnog gubljenja mase zeolita kada se zeolitu doda otapalo jer dio zeolita zaostaje u otapalu, te se dio gubi tokom izvođenja postupka. Sušenjem otapala koji zaostaje nakon centrifuge ostaje bijeli snježni talog koji ukazuje na to da dio zeolita zaista zaostaje u otapalu te da običnim vaganjem nije moguće dokazati da se dogodilo vezanje.

Za razliku od predhodnih postupaka gdje je fokus bio na zeolitu i potencijalno vezanim komponentama, u konačnom koraku kako bi utvrdili jesu li se fenoli vezali na zeolite promatralo se otapalo koje zaostaje nakon dodatka zeolita. Otapanjem ekstrakta lišća masline u odgovarajućem otapalu moguće je identificirati i kvantificirati spojeve koji se unutra nalaze HPLC metodom. Kada se zeolit doda u otopljeni etanolni ekstrakt, ukoliko se dogodi vezanje koncentracija vezanog spoja trebala bi se smanjiti u otapalu. Za koliko se njegova koncentracija smanji toliko se vezala na zeolit. Stoga je bilo potrebno kvantificirati željene spojeve prije i nakon dodavanja zeolita.

Za oleuropein, hidroksitirosol i pinorezinol koncentracije su bile manje nakon dodatka sva četiri različita zeolita (**tablica 7**). Došlo je do razlike u vezanju između pojedinih zeolita što je bilo očekivano jer je otprije primjećeno da smanjenje veličine čestica i povećanje aktivne površine mogu značajno utjecati na adsorpciju i svojstva ionske izmjene klinoptilolita. Zeoliti su prošli kroz različite postupke aktivacije i imaju različitu aktivnu površinu zbog čega ima smisla da se spojevi neće u jednakoj mjeri vezati na sve zeolite. U ova tri slučaja zeolit PMA pokazao je najveću mogućnost vezanja. Mikronizacijski proces kroz koji su prošli PMA i PMA-O_2 u usporedbi s TMAZ-om doveli su do općenito smanjenja veličine čestica, povećanja aktivne površine, promjene površinskog omjera Al/Si u korist siliciju te izmjene strukture u korist neuređenoj fazi za PMA-O_2. Razlike u omjeru Si/Al između pojedinih zeolita mogu se vidjeti na slici 19. PMA-O_2 za razliku od PMA posjeduje još sitnije čestice i povećan negativni naboj na površini zbog čega je lako spreman za adsorpciju i/ili izmjenu kationa.(41)

Na **slici 18** moguće je vidjeti ukupnu koncentraciju fenola vezanih na pojedine zeolite. Najveći afinititet vezanja pokazuje PMA moguće radi prije spomenutih razloga, dok najmanji pokazuje PMA-O_2. **Slika 19** pokazuje da PMA ima najveći omjer Si/Al odnosno upravo on ima najveći udio silicija te najmanji aluminija na svojoj površini. Aluminij zeolitu daje negativan naboj što bi značilo da PMA ima najmanji negativan naboj na površini. To može biti razlog njegovog vezanja fenola unatoč tome što primjerice PMA-O_2 ima veću aktivnu površinu i manje čestice. Nakon PMA najveću koncentraciju fenola vezao je TMAZ. Dalo bi se zaključiti da naboj na površini zeolita ima veći utjecaj od veličine čestica i aktivne površine u vezanju fenolnih spojeva iz ovog rada.

Zeolite type	Si/Al ratio (EDS)	Si/Al ratio (XPS)
Zeolite A	1.0	1.1
TMAZ	3.5	4.6
PMA	5.5	5.9
PMA-O2	4.9	4.8

Slika 19 *Prikaz omjera Si/Al na površini 4 zeolita korištena u ovom radu. (Kraljević Pavelić S, 2017.)*

Za pojedine fenole došlo je do rasta njihove koncentracije nakon dodatka određenog zeolita. Koncentracija *p*-hidroksifeniloctene kiseline povećala se za sve zeolite. Za tirosol se povećala sa svim zeolitima osim s PMA, dok se za 3-*p*-kumarinsku kiselinu povećala samo s zeolitom A. Potrebno bi bilo ponoviti eksperimet i provjeriti koncentracije fenola prije i nakon dodatka zeolita dodatnim metodama kako bi se vidjelo ima li metoda veze s takvim rezultatima. Poznato je da uslijed kemijskih i enzimskih reakcija dolazi do nastanka drugih spojeva primjerice oleuropein se hidrolizira u hidroksitirosol nakon čega njegov udio opada. Neki od fenola ispitivanih u ovom radu strukturno nalikuju i moguće je da dolazi do izmjene spojeva nakon otapanja ekstrakta i dodatka zeolita. Zeolit kao katalizator reakcija može dovesti do strukturne promjene spojeva zbog kojih je onda moglo doći do promjene u koncentracijama fenola. Stoga bilo bi poželjno ispitati

vežu li se spojevi u svom obliku i nakon toga otpuštaju u istom, ili pak dolazi do njihove izmjene.

Na **slikama 16** i **17** prikazana je koncentracija oleuropeina u otopljenom ekstraktu bez zeolita te nakon dodatka 4 različita zeolita te koncentracija vezanog oleuropeina, odnosno koncentracija koja se smanjila nakon dodatka zeolita. Ova dva dodatna prikaza koncentracije oleuropeina, su prisutni jer je upravo on najzastupljeniji u ekstraktu lišća masline te se mnoštvo istraživanja fokusiralo upravo na njega i na njegove pozitivne učinke na ljudsko zdravlje.

Potrebno je uvesti nove metode u svrhu detekcije i kvantifikacije vezanih fenola na zeolite. Jednom kada se fenol veže na zeolit potrebno je ispitati dodatne parametre kako bi se utvrdila točna kinetika vezanja, njegovo otpuštanje, te otpusti li se fenolni spoj u istom vezanom obliku koji posjeduje željene karakteristike.

6. ZAKLJUČAK

Lišće masline, biomasa nastala pri industrijskoj proizvodnji maslinovog ulja ne bi se trebala smatrati glomaznim otpadom već izvorom bioaktivnih komponenti koje se mogu koristiti u razne svrhe. Puno je učinjeno kako bi se pokušao iskoristiti ovaj nusprodukt te na taj način poboljšala profitabilnost u sektoru koji se bavi maslinama i riješio problem njegovog odlaganja. Taj nusprodukt visokog antioksidativnog potencijala stekao je veliki interes zahvaljujući općem zanimanju za prirodne anitoksidanse. Zahvaljujući bogatom udjelu antioksidansa, polifenola, lišće masline može se koristiti kao dodatak u prehrambenoj industriji u svrhu napretka zdravlja potrošača. Pokazano je da je antioksidativni kapacitet ekstrakta lišća masline veći onog od vitamina C i E te čistog hidroksitirosola, koji se smatraju jakim antioksidansima. Ekstrakt lišća masline stavljen je na tržište kao dijetetski proizvod. Ovi proizvodi su dostupni kao sušeno lišće, prah, ekstrakt ili kapsule. Tijekom poslijednjih godina nutritivna sredstva smatraju se sastojci hrane koji promiču zdravlje, kao primjerice fenoli iz lišća masline.

Zeoliti se zbog svojih adsorptivnih sposobnosti mogu koristiti kao nosači spojeva, primjerice fenola iz lišća masline. Vezanjem fenola na zeolit dobio bi se dodatak prehrani s jakim antioksidativnim sposobnostima. U ovom radu identificirali smo šest polifenola iz lišća masline (iz Umaga) koje smo htjeli vezati na 4 različita zeolita. Pojedinim fenolima (oleuropein, 3-hidroksitirosol, pinorezinol) u prisutnosti svih ispitivanih zeolita koncentracija se smanjuje. Dok za ostala tri fenola (tirosol, 3-p-kumarinska kiselina, p-hidroksifenilocetna kiselina) to nije slučaj za sve zeolite. Potrebno je pronaći nove metode detekcije i kvantifikacije fenola koji su se potencijalno vezali na zeolite te detaljnije promotriti vezanje fenola i zeolita te njegovo otpuštanje.

7. LITERATURA

1. Vossen P. Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils. HortScience. 2007 Aug 1;42(5):1093–100.

2. Erbay Z, Icier F. The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. Food Rev Int. 2010 Oct 1;26:319–34.

3. Olive Oil Production by Country - WorldAtlas.com [Internet]. [cited 2018 Nov 14]. Available from: https://www.worldatlas.com/articles/olive-oil-production-by-country.html

4. Angeloni C, Malaguti M, Barbalace M, Hrelia S. Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. Int J Mol Sci. 2017 Oct 25;18(11):2230.

5. Herrero M, Temirzoda TN, Segura-Carretero A, Quirantes R, Plaza M, Ibañez E. New possibilities for the valorization of olive oil by-products. J Chromatogr A. 2011 Oct 21;1218(42):7511–20.

6. El SN, Karakaya S. Olive tree (Olea europaea) leaves: potential beneficial effects on human health. Nutr Rev. 2009 Nov;67(11):632–8.

7. Martín-García I, Molina-Alcaide E. Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (Olea europaea var. europaea) leaves for ruminants. Anim Feed Sci Technol - ANIM FEED SCI TECH. 2008 May 1;142:317–29.

8. Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Analyst. 2000 Jan 1;125.

9. Japón-Luján R, Luque-Rodríguez JM, Luque de Castro MD. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. J Chromatogr A. 2006 Mar 3;1108(1):76–82.

10. G Kontogianni V, Gerothanassis I. Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. Nat Prod Res. 2011 Nov 7;26:186–9.

11. Abaza L, Taamalli A, Nsir H, Zarrouk M. Olive Tree (Olea europeae L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. Vol. 4. 2015. 682 p.

12. Omar SH. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. Saudi Pharm J SPJ. 2010 Jul;18(3):111–21.

13. Ranalli A, Contento S, Lucera L, Di Febo M, Marchegiani D, Di Fonzo V. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (Olea europaea L.). J Agric Food Chem. 2006 Jan 25;54(2):434–40.

14. Samouris G. Antonios Petridis1 and Ioannis Therios. 2012;47:4.

15. Soni MG, Burdock GA, Christian MS, Bitler CM, Crea R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. Food Chem Toxicol. 2006 Jul 1;44(7):903–15.

16. Stoclet J-C, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak M-H, El Bedoui J, Chataigneau M, et al. Vascular protection by dietary polyphenols. Eur J Pharmacol. 2004 Oct 1;500(1–3):299–313.

17. Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends Food Sci Technol. 2006 Sep;17(9):505–12.

18. Vogel P, Kasper Machado I, Garavaglia J, Zani VT, de Souza D, Morelo Dal Bosco S. Polyphenols benefits of olive leaf (Olea europaea L) to human health. Nutr Hosp. 2014 Dec 17;31(3):1427–33.

19. Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Mario Arciello, Tarocchi M, Galli A, et al. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. Int J Mol Sci. 2014 Oct 14;15(10):18508–24.

20. Casaburi I, Puoci F, Chimento A, Sirianni R, Ruggiero C, Avena P, et al. Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: a review of in vitro studies. Mol Nutr Food Res. 2013 Jan;57(1):71–83.

21. Waterman E. Active Components and Clinical Applications of Olive Oil. Olive Oil. 2007;12(4):12.

22. Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. J Nutr Biochem. 2002 Nov;13(11):636–44.

23. Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J. Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. Planta Med. 2011 Nov;77(17):1890–7.

24. Echeverría F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla L. Hydroxytyrosol and Cytoprotection: A Projection for Clinical Interventions. Int J Mol Sci. 2017 Apr 28;18(5):930.

25. Je I-G, Kim D-S, Kim S-W, Lee S, Lee H-S, Park EK, et al. Tyrosol Suppresses Allergic Inflammation by Inhibiting the Activation of Phosphoinositide 3-Kinase in Mast Cells. Dileepan KN, editor. PLOS ONE. 2015 Jun 11;10(6):e0129829.

26. Guven M, Aras AB, Akman T, Sen HM, Ozkan A, Sehitoglu I, et al. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. Iran J Basic Med Sci. 2015;18(4):8.

27. Lou Z, Wang H, Rao S, Sun J, Ma C, Li J. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. Food Control. 2012 Jun 1;25(2):550–4.

28. Alam MA, Subhan N, Hossain H, Hossain M, Reza HM, Rahman MM, et al. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. Nutr Metab [Internet]. 2016 Apr 11 [cited 2018 Nov 30];13. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4827240/

29. González ML, Vera DMA, Laiolo J, Joray MB, Maccioni M, Palacios SM, et al. Mechanism Underlying the Reversal of Drug Resistance in P-Glycoprotein-Expressing Leukemia Cells by Pinoresinol and the Study of a Derivative. Front Pharmacol [Internet]. 2017 Apr 25 [cited 2018 Dec 5];8. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00205/full

30. During A, Debouche C, Raas T, Larondelle Y. Among Plant Lignans, Pinoresinol Has the Strongest Antiinflammatory Properties in Human Intestinal Caco-2 Cells. J Nutr. 2012 Oct 1;142(10):1798–805.

31. López-Biedma A, Sánchez-Quesada C, Beltrán G, Delgado-Rodríguez M, Gaforio JJ. Phytoestrogen (+)-pinoresinol exerts antitumor activity in breast cancer cells with different oestrogen receptor statuses. BMC Complement Altern Med [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Dec 5];16(1). Available from: http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-016-1233-7

32. Biskup I, Golonka I, Gamian A, Sroka Z. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. Postępy Hig Med Dośw. 2013 Sep 10;67:958–63.

33. Pubchem. P-Hydroxyphenylacetic acid [Internet]. [cited 2018 Dec 5]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/127

34. St A, Sahour B. Optimum Conditions for Oleuropein Extraction from Olive Leaves. 2014;4(5):5.

35. Abaza L, Ben Youssef N, Manai H, Mahjoub Haddada F, Methenni K, Zarrouk M. Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. Grasas Aceites. 2011 Mar 30;62(1):96–104.

36. Luo H. Extraction of antioxidant compounds from olive (Olea europaea) leaf. :183.

37. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds | SpringerLink [Internet]. [cited 2019 Jan 18]. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61779-624-1_17

38. Harvey D. Modern analytical chemistry. Boston: McGraw-Hill; 2000. 798 p.

39. Laurino C. Zeolita: "la Piedra Mágica"; Principales Campos Nutricionales,. 2015 Aug 1;(2):573–581.

40. Moshoeshoe M, Nadiye-Tabbiruka MS, Obuseng V. A Review of the Chemistry, Structure, Properties and Applications of Zeolites. Am J Mater Sci. 2017;7(5):196–221.

41. Kraljević Pavelić S, Micek V, Filošević A, Gumbarević D, Žurga P, Bulog A, et al. Novel, oxygenated clinoptilolite material efficiently removes aluminium from aluminium chloride-intoxicated rats in vivo. Microporous Mesoporous Mater. 2017 Sep 1;249:146–56.

42. Pramatha Payra, Prabir K. Dutta. Zeolites: A Primer [Internet]. [cited 2018 Nov 12]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/250459592_Zeolites_A_Primer

43. Demone C. Partial Atomic Charge Methods for Simulating Porous Frameworks with a Net Charge and their Applications to Gas Separations in Zeolites [Internet] [Thesis]. Université d'Ottawa / University of Ottawa; 2018 [cited 2019 Mar 29]. Available from: http://ruor.uottawa.ca/handle/10393/38180

44. Bacakova L, Vandrovcova M, Kopova I, Jirka I. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. Biomater Sci. 2018 May 1;6(5):974–89.

45. Moshoeshoe M, Nadiye-Tabbiruka MS, Obuseng V. A Review of the Chemistry, Structure, Properties and Applications of Zeolites. Am J Mater Sci. 2017;7(5):196–221.

46. Ambrozova P, Kynicky J, Urubek T, Nguyen V. Synthesis and Modification of Clinoptilolite. Molecules. 2017 Jul 4;22(7):1107.

47. Dimowa LT, Petrov SL, Shivachev B. Natural and Zn exchanged clinoptilolite: In situ high temperature XRD study of structural behavior and cation positions. Bulg Chem Commun. 2013 Jan 1;45:466–73.

48. Kraljević Pavelić S, Simović Medica J, Gumbarević D, Filošević A, Pržulj N, Pavelić K. Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applications in vivo. Front Pharmacol [Internet]. 2018 Nov 27 [cited 2019 Mar 26];9. Available from: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01350/full

49. Aarts A, Berends A, Boeije G, Calcinai D, Cerbelaud E, Certa H, et al. Members of the HERA Environmental Task Force. :53.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Vedrana Tolić

Blažićevo C 12 b

051269139 0918892648

vedrana.tolic0100@gmail.com

Datum rođenja 23/21995 | Državljanstvo Hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

2018-2019

Diplomant

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Hrvatska

Diplomski smjer Biotehnologija u medicini

Tema: „Ispitivanje adsorpcije ekstrakta lišća masline na zeolitne nosače“, metor: dr.sc. Dean Marković

05/2016-06/2016

Studentska praksa

JGL d.d. Rijeka, Hrvatska

Praksa na „Odjelu kontrole kvalitete“

06/2012-07/2012

Školska praksa

Ljekarne „JADRAN“, Hrvatska

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2016-danas

Studentica

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Hrvatska

Diplomski smjer Biotehnologija u medicini

Tema: „Ispitivanje adsorpcije ekstrakta lišća masline na zeolitne nosače“, metor: dr.sc. Dean Marković

2013-2016

Sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) biotehnologije i istraživanja lijekova

Odjel za biotehnologiju Rijeka

2009-2013

Farmaceutski tehničar

Medicinska škola u Rijeci

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski jezik

Ostali jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski jezik	C1	C1	C1	C1	C1

Stupnjevi: A1/2: Temeljni korisnik - B1/B2: Samostalni korisnik - C1/C2 Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine

Dobre komunikacijske vještine stečene tijekom:
- obrazovanja (seminarski radovi – izlaganja)
- studentskih poslova u radu s ljudima (prodavač)

Digitalne vještine

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

Stupnjevi: Temeljni korisnik - Samostalni korisnik - Iskusni korisnik

- poznavanje rada u Microsoft Office tools (Word, Excel, PowerPoint)
- poznavanje rada u programima (Avogadro, PyMOL, Chimera, VMD)

Vozačka dozvola B