

FIZIOLOŠKI PRISTUP ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA MASLINOVOG I ARGANOVOG ULJA METODOM GLOBALNOG ANTIOKSIDACIJSKOG ODGOVORA

Perković, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:428705>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivona Perković

**FIZIOLOŠKI PRISTUP ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG
KAPACITETA MASLINOVOG I ARGANOVOG ULJA METODOM
GLOBALNOG ANTIOKSIDACIJSKOG ODGOVORA**

Završni rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ivona Perković

**FIZIOLOŠKI PRISTUP ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG
KAPACITETA MASLINOVOG I ARGANOVOG ULJA METODOM
GLOBALNOG ANTIOKSIDACIJSKOG ODGOVORA**

Završni rad

Rijeka, 2019.

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Jeleni Marinić na prenesenom znanju, strpljenju i vodstvu pri izradi ovoga završnog rada. Hvala Vam na izdvojenom vremenu te korisnim savjetima i potpori koji su mi omogućili najbolju realizaciju završnog rada.

Također, zahvaljujem se svim profesorima i asistentima sa zavoda za kemiju i biokemiju na suradnji i ugodnom boravku pri izradi praktičnog dijela rada.

Na kraju se zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je bila podrška i vjerovali u mene u svakom trenutku tokom studiranja i pisanja završnog rada.

Mentor rada: Jelena Marinić, doc. dr. sc. Jelena Marinić

Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima _____ stranica, _____ slika, _____ tablica, _____ literaturnih navoda.

SAŽETAK

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta popularan je cilj istraživanja znanosti o hrani, budući je ovo pitanje vezana za rok trajanja, senzorsku kvalitetu kao i uz potencijalne zdravstvene dobrobiti hrane, uključujući maslinovo i arganovo ulje koji su istaknut izvor fenolnih antioksidansa u prehrani.

U ovom radu, za određivanje antioksidacijskog kapaciteta maslinovog i arganovog ulja primjenjena je ABTS metoda. Kao bi se ovaj parametar relevantnije procijenio, antioksidacijski kapacitet ulja određen je u (a) vodeno-organskim ekstraktima izdvojenim iz ulja kemijskom ekstrakcijom i (b) u topljivoj bioraspoloživoj frakciji i netopljivoj rezidualnoj frakciji koje zaostaju nakon procesa probave *in vitro*. Potonji pristup čini osnovu metode globalnog antioksidacijskog odgovora, utemeljene na primjeni enzima i osmišljene tako da oponaša probavu u gastrointestinalnom traktu.

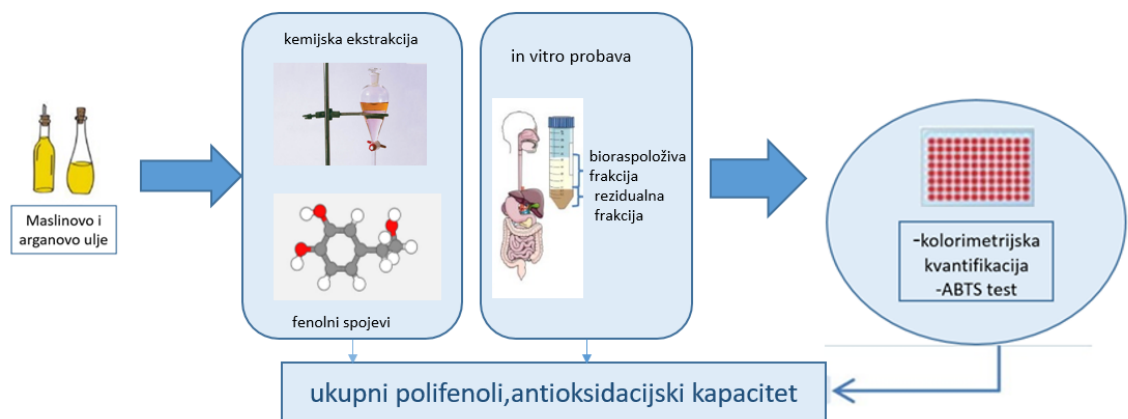
Postupak probave *in vitro* povećao je sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka i antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom u bioraspoloživim frakcijama uzoraka ulja u usporedbi s kemijskim ekstraktima. Nadalje, značajan udio fenola od ukupnog sadržaja fenolnih sastojaka zaostaje u netopljivoj rezidualnoj frakciji analiziranih ulja nakon probave *in vitro*. Ove frakcije treba uzeti u obzir zajedno s onim topljivim pri procjeni antioksidacijskog kapaciteta ulja, jer zadržavaju značajnu antiradikalnu aktivnost prema ABTS radikalima.

Primjena GAR metode za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta mogla bi pridonijeti boljem poznavanju stvarne bioaktivne snage i zdravstvenog potencijala maslinovog i arganovog ulja, obzirom da doprinosi potpunijem oslobađanju fenolnih sastojaka iz matriksa ulja te omogućuje mjerenje antiradikalne aktivnosti u rezidualnoj netopljivoj frakciji, koja se

ne uzima u obzir pri određivanju antioksidacijskog kapaciteta tradicionalnim metodama koje se oslanjaju na primjenu organskih otapala za kemijsku ekstrakciju bioaktivnih sastojaka.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, ABTS, fenolni sastojci, maslinovo ulje, arganovo ulje, probava *in vitro*

Grafički sažetak



Slika 1. Shema određivanja antioksidacijskog kapaciteta maslinovog i arganovog ulja metodom globalnog antioksidacijskog odgovora

SUMMARY

The assessment of food antioxidant capacity is a popular objective of food science research, as this issue is related to shelf life, sensory quality and potential health benefits of foods, including olive and argan oil, which are prominent source of phenolic antioxidants in the diet. In this study, antioxidant capacity of oils was determined by the ABTS assay. Within the aim to provide more relevantly assess this parameter, antioxidant capacity was measured in (a) aqueous-organic extracts prepared by traditional chemical method, and (b) in both soluble and insoluble fractions obtained by Global Antioxidant Response (GAR) method, designed as an *in vitro* enzyme-based approach that mimics digestion in the gastrointestinal tract.

The *in vitro* digestion process increased the content of total phenolic constituents and the antioxidant capacity in the bioavailable fractions of oil samples compared to the initial chemical chemical extracts. Moreover, a significant proportion of phenolics remained in the insoluble fractions of analysed oils after *in vitro* digestion. These fractions should be taken into account together with the soluble ones when assessing antioxidant capacity of oils, as they are characterized by significant antiradical activity against ABTS radical.

GAR method enabled more complete release of phenolics from the oil matrix and permitted the measurement of the antiradical activity in the insoluble fraction, which is excluded from the traditional extraction methods employing organic solvents to extract bioactive compounds. Hence, the application of GAR method for measurement of antioxidant capacity could contribute to a better knowledge of the bioactive power and health potential of olive and argan oil.

Keywords: antioxidant capacity, ABTS, phenolic compounds, olive oil, argan oil, *in vitro* digestion

Graphical abstract

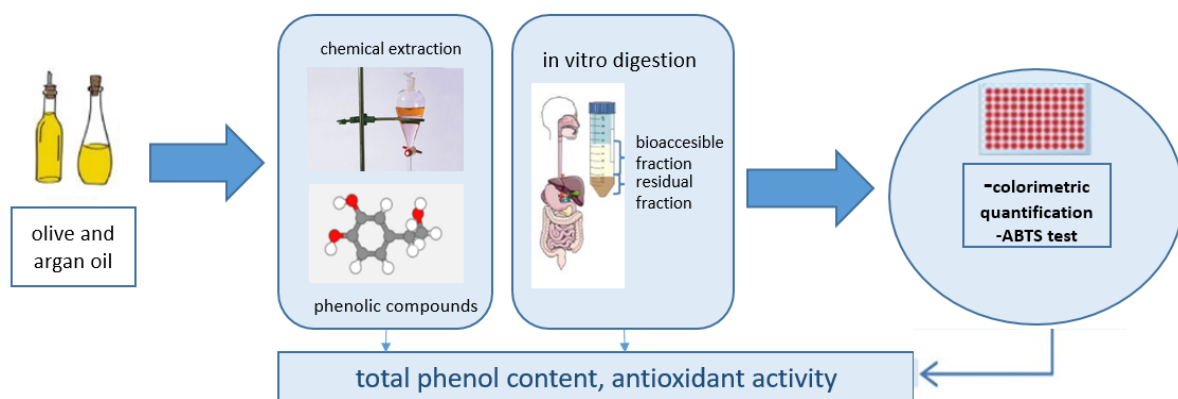


Figure 1. Scheme of determination of antioxidant capacity of olive and argan oil by global antioxidant response method

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 FENOLNI SASTOJCI.....	1
1.1.1 Polifenolni sastojci u maslinovom ulju.....	7
1.1.2 Polifenolni sastojci u arganovom ulju.....	10
1.2 PROBAVA FENOLNIH SASTOJAKA	11
1.3 BIORASPOLOŽIVOST POLIFENOLA	13
1.4 ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA FENOLNIH SASTOJAKA	15
1.5 METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA	17
1.5.1 TEAC/ABTS METODA.....	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	22
3. MATERIJALI I METODE.....	25
3.1 MATERIJALI.....	25
3.1.1 UZORCI ZA ANALIZU	25
3.1.2 KEMIČALIJE I REAGENSI.....	25
3.2 METODE.....	26
3.2.1 Kemijska ekstrakcija fenolnih sastojaka	26
3.2.2 <i>In vitro</i> model procesa probave.....	28
3.2.3 Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih sastojaka.....	29
3.3 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS (2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) metodom.....	31
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	33
4. REZULTATI	35
5. RASPRAVA.....	43
6. ZAKLJUČAK.....	61

1. UVOD

Maslinovo ulje je poznato od davnina a proizvodi se već oko 600 godina. Njegova popularnost se opravdava ljekovitim svojstvima stoga ne čudi što se bilježi povećani interes za njegovom konzumacijom posljednjih nekoliko desetljeća. Popularnost zahvaća sve veće razmjere kako u kuhinjama diljem svijeta tako i u kozmetičkoj industriji. Maslinovo ulje se smatra glavnim sastojkom Mediteranske prehrane koja je poznata po mnogim dobrobitima za zdravlje, a osobito djevičansko maslinovo ulje (Carrasco-Pancorbo i sur., 2005).

Arganovo ulje je karakteristično za Maroko gdje je poznato već stoljećima, a razlog tomu su njegova nutritivna i senzorska svojstva. Njegova popularnost također raste posljednjih nekoliko desetljeća te se često koristi kao kulinarska inačica maslinovom ulju (Seiquer i sur., 2015).

Razlog velike konzumacije i maslinovog i arganovog ulja diljem svijeta je povoljan masno-kiselinski sastav, koji proizlazi iz visokog udjela oleinske kiseline te visok sadržaj fenolnih sastojaka izražene antioksidacijske aktivnosti. I upravo ta aktivnost povoljno djeluje na zdravlje, prvenstveno na očuvanje zdravlja srca i krvožilnog sustava (Carrasco-Pancorbo i sur., 2005; Seiquer i sur., 2015).

1.1 FENOLNI SASTOJCI

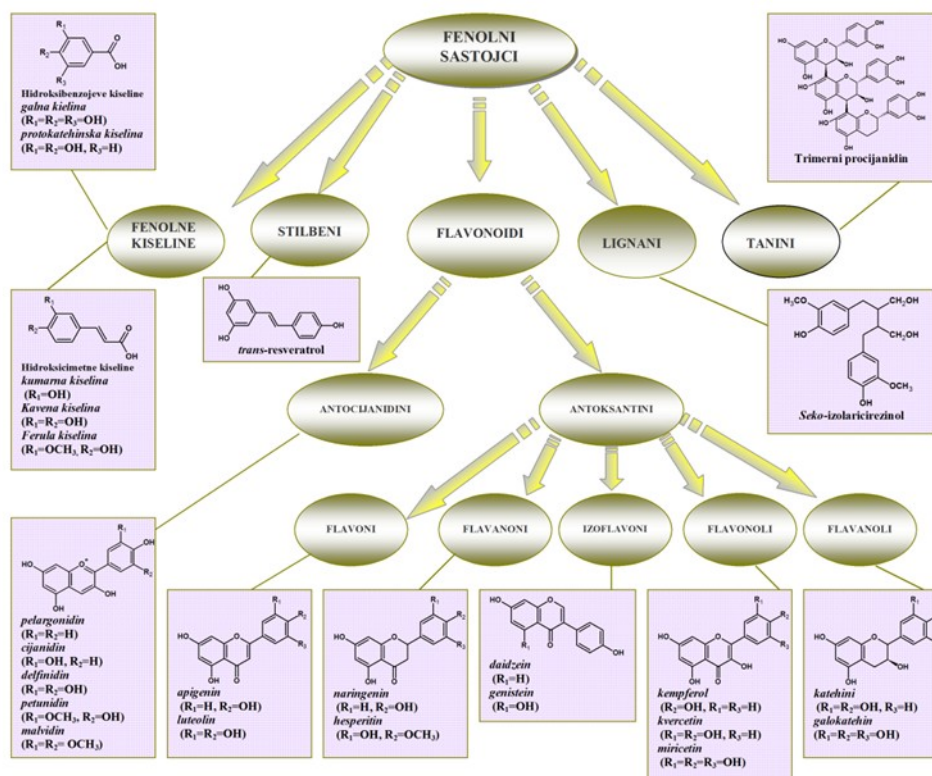
Posljednjih nekoliko godina znanstvenici pokazuju sve veći interes za fenolne sastojke, a glavni razlog tomu su njihova antioksidacijska svojstva koja imaju ulogu u

prevenciji raznih bolesti, kao što su karcinom, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Manach i sur., 2004).

Kao biljni sekundarni metaboliti, fenolni sastojci sintetiziraju se iz aminokiseline fenilalanina i/ili poliketidnim acetat/malonatnim putem te nisu neophodni za preživljavanje biljke, ali se smatra da su upravo ovi sastojci omogućili preživljavanje biljnih vrsta, obzirom da zaštićuju biljku od biotskog i abiotskog stresa, doprinoseći adaptaciji na različite ekološke uvjete (Visioli i sur., 2000; Stevenson i Hurst., 2007).

Unatoč strukturnoj raznolikosti, osnovno obilježje polifenola je prisutnost jedne ili više hidroksiliranih benzenskih prstena u molekuli. Postojeća radna definicija u skupinu „pravih polifenola“ ne svrstava sastojke s jednim benzenskim prstenom u molekuli, pa stoga nisu svi fenolni sastojci polifenoli (Visioli i sur., 2000; Stevenson i Hurst, 2007). Međutim, u ovom radu izraz „fenolni sastojci“ i „polifenoli“ rabiće se kao istoznačnice.

Ova skupina broji više od 25 000 sastojaka, koliko ih je do danas identificirano, različitih strukturnih karakteristika, u opsegu od jednostavnih (npr. fenolne kiseline) do viskopolimeriziranih molekula (npr. tanini), koje određuju njihova kemijska svojstva i biološku aktivnost, pa se temeljem strukture svrstavaju u nekoliko definiranih grupa: 1. fenolne kiseline, 2. flavonoidi, 3. stilbeni, 4. lignani (slika 2) (Manach i sur., 2004).



Slika2. Podjela i predstavnici pojedinih skupina fenolnih sastojaka.

Fenolne kiseline mogu se svrstati u dvije klase na temelju broja ugljikovih atoma u pobočnom lancu. Derivati hidroksibenzojeve kiseline većinom nisu zastupljenje u velikom udjelu u jestivim biljkama, no postoje iznimke. Jedan od derivata je galna kiselina, prisutna u listovima čaja. Dio je tanina, zajedno sa srodnom elaginskom kiselinom te je najzastupljenija kiselina u ovoj skupini (Crozier i sur., 2009, Manach i sur., 2004).

Druga klasa su derivati cimetine kiseline kojima je sadržaj u biljnom svijetu veći u usporedbi s derivatima hidroksibenzojeve kiseline. Najistaknutiji primjeri su kavena i kininska kiselina. Ove kiseline ulaze u strukturu klorogenske kiseline koja je sastojak kave te čini 10% zelenog zrna robusta kave. Klorogensku kiselinu unos od 1g dnevno u ljudi, čini najvažnijim fenolom u hrani (Crozier i sur., 2009, Manach i sur., 2004).

Flavonoide možemo podijeliti u šest podskupina, a njihovu osnovnu građu čine 2 aromatska prstena koji su povezani s jedinicom od 3 ugljikova atoma, a ona zajedno s kisikom tvori piranski prsten. Nadalje, prema boji razlikuju se kao antoksanтини i antocijanini. U antoksanтine spada prvih pet podskupina i za njih su karakteristični bezbojni do žuto obojeni sastojci, a za antocijanine su karakteristični različito obojeni sastojci u nijansama plave, purpurne, ružičaste i ljubičaste boje u voću, cvijeću i lišću (Manach i sur., 2004).

U prvu podskupinu flavonoida se ubrajaju flavonoli koji su ujedno najzastupljeniji flavonoidi u prehrani. Predstavnici flavonola, kvercetin i kempferol, najčešće se javljaju u glikozidnom obliku, a prisutni su brokuli, poriluku, kelju, borovnici i crvenom vinu i čaju. Razlog njihovog najvećeg udjela u vanjskim dijelovima biljaka je izloženost svjetlosti koja utječe na njihovu biosintezu (Manach i sur., 2004).

Najvažniji predstavnici druge podskupine, flavona, su apigenin i luteolin koji su zastupljeni u peršinu, celeru i začinskom bilju (Crozier i sur., 2009).

U sastojke soka iz citrus plodova se ubrajaju flavanoni koji čine treću podskupinu. U prirodi se flavanoni pojavljuju glikozilirani nekim od disaharida kao npr. neohesperidozom, nositeljem gorkog okusa i rutinozom koja je disaharid bez okusa (Manach i sur., 2004).

Četvrta podskupina flavonoida, izoflavoni, sadrže hidroksilne skupine na položaju 7' i 4' u molekuli zbog čega mogu imati slabo estrogensko i antiestrogensko djelovanje u organizmu, koje ostvaruje vezivanjem za receptore estrogena. Izoflavoni su najzastupljeniji u soji koju čine genistein, daidzein i glicitein u određenim omjerima. Konjugirani oblik izoflavona većinom nalazimo u nefermentiranim proizvodima, dok aktivan aglikonski oblik nalazimo u fermentiranim proizvodima. Cjelovito zrno sadrži veći sadržaj izoflavona nego prerađevine na bazi soje, a udio izoflavona ovisi još i o načinu proizvodnje, geografskom području, dijelu biljke i uvjetima uzgoja (Manach i sur., 2004; Scalbert i Williamson 2000).

Strukturno najsloženija podskupina su flavan-3-oli koji mogu biti građeni od jednostavnih monomera, katehina i njegovog izomera, ali i od složenih molekula. Katehini se mogu pronaći u jabukama, čokoladi, grožđu i crvenom vinu. Epikatehin, izomer katehina, čini velik udio u lišću čaja, a njegov udio se smanjuje na polovicu u crnom čaju zbog oksidacije jednostavnih monomera flavan-3-ola. Nastali spojevi daju crnom čaju karakterističnu boju i aromu.

Tanini, koji sadrže velik broj hidroksilnih skupina, tvore komplekse s proteinima i ugljikohidratima koji nisu toplivi. Iz navedenog razlog, kao i zbog inhibiranja probavnih enzima, tanini imaju antinutritivna svojstva i smanjuju probavljivost hrane. Razlikuju se dvije skupine tanina u biljkama: hidrolizirajući tanini kao primjerice u mangu i visokomolekulski ili kondenzirani tanini.

Kondenzirani tanini ili **proantocijanidi** su derivati flavan-3-ola i flavan-3,4-diola poznati kao proantocijanidi tipa B. Kondenzirani tanini utječu na senzaciju trpkosti raznog voća i napitaka, a pridonose i gorkom okusu čokolade i to tako što tvore komplekse sa salivarnim proteinima (Manach i sur., 2004; Bravo 1998, Crozier i sur., 2009; Scalbert i Williamson 2000).

Biljni pigment **antocijanin** je sastavni dio crvenog vina i raznog voća i može biti obojen ili bezbojan, ovisno pH vrijednosti sredine. Stabilnost antocijanidina, aglikonskih oblika antocijanina, povećava se esterifikacijom s organskim kiselinama, glikolizacijom i kopigmentacijom. Strukturu antocijanina čini flavilium ion na kojeg su vezane hidroksilne i metoksi skupine (Manach i sur., 2004; Scalbert i Williamson 2000).

Najistaknutiji **stilben** je *trans*-resveratrol kojeg dostupni literaturni podaci povezuju s brojnim povoljnim učincima na zdravlje, a može se pronaći u crvenom vinu i kikirikiju.

Strukturu stilbena čini 1,2-difeniletilenska jezgra na koju su vezani hidroksi supstituenti dnevno (D'Archivio i sur., 2007; Han i sur., 2007; Crozier i sur., 2009).

Laneno sjeme je najbogatiji izvor **lignana** od kojih su najistaknutiji *sekoizolaricirezinol* i *matairezinol*. Mogu se metabolizirati u spojeve koji se određuju u plazmi i urinu (D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2004; Scalbert i Williamson 2000).

Brojni su faktori koji utječu na sadržaj polifenola u biljkama. Osim sorte, važni čimbenici koji imaju utjecaj na polifenole su okolišni čimbenici, zrelost u vrijeme žetve i skladištenje. Pod okolišnim čimbenicima podrazumijevamo pedoklimatske uvjete, poput utjecaja sunčeve svjetlosti koja ima značajan učinak na flavonoide, vrste tla te količine padalina. Također, tu spadaju i agronomski čimbenici (Manach i sur., 2004) koji imaju značajan učinak na hidrofilne fenole maslinovog ulja. Jedan od glavnih čimbenika je navodnjavanje čiji učinak još nije u potpunosti razjašnjen. Motilva i sur. (2002) su zaključili da je najviša razina hidrofilnih fenola u maslinovom ulju dobivena pri ograničenoj opskrbi drva masline vodom, dok su Tovar i sur. (1997) zaključili da je koncentracija lignana bila niža u maslinovom ulju iz plodova uzgojenih u uvjetima obilnog navodnjavanja (Servilli i sur., 2004).

Također, mnoga istraživanja pokazuju da termička obrada hrane povećava razinu slobodnih polifenola (Bohn i sur., 2014). Tako primjerice pri povećanju vremena i temperature obrade dolazi do smanjenja koncentracije fenolnih alkohola i sekoiridoidnih aglikona u uljima (Servilli i sur., 2004).

Veliki učinak na polifenole u maslinovim uljima imaju uvjeti ekstrakcije koji spadaju u tehnološke čimbenike. Tijekom drobljenja nastaju sekoiridoidni aglikoni, i to hidrolizom oleuropeina i demetiloleuropeina. Nadalje, fenolni sastav maslinovog ulja se može razlikovati

prema količini demetiloleuropeina ili oleuropeina u izvornom plodu masline (Servilli i sur, 2004).

1.1.1 Fenolni sastojci u maslinovom ulju

Maslinovo ulje brojne dobrobiti koje možemo pripisati njegovom kemijskom sastavu. Većinska frakcija ulja koja iznosi 98%, sadrži triacilglicerole i u malom udjelu slobodne masne kiseline. Maslinovo ulje je bogato mononezasićenom oleinskom kiselinom koja čini 55-83% ukupnih masnih kiselina u triacilglicerolima, slijedi linolna kiselina koja je prisutna u udjelu 3-21% te su ostalih 2% sastojci iz neosapunjive frakcije u koju spadaju fenolni sastojci i mnogi drugi (Carrasco-Pancorbo i sur., 2005).

Fenolni sastojci (polifenoli) prisutni su u polarnoj frakciji maslinovog ulja (Carrasco-Pancorbo i 2004).

Od fenolnih sastojaka prikazanih u tablici 1. najzastupljeniji su *seko*-iridoidi kao npr. oleuropein (hidroksitirosol (3,4-DHPEA-EDA), tirosol (p-HPEA-EDA), te izomer oleuropein aglikona (3,4-DPHEA-EDA)).

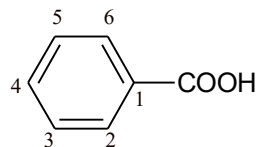
U fenolnu frakciju ubrajaju se još i flavonoidi kao npr. luteolin, a najznačajniji od lignana je (+)-1-acetoksipinorezinol. (Carrasco-Pancorbo i sur., 2005).

Za ekstrakciju fenolnih sastojaka iz maslinovog ulja se najčešće koriste dvije metode: ekstrakcija tekuće-tekuće i ekstrakcija na čvrstoj fazi. Ekstrakcija tekuće-tekuće je češća u uporabi i koristi se pretežno metanol ili metanol/voda različitih omjera (0-40% vode)(Carrasco-Pancorbo i sur., 2005).

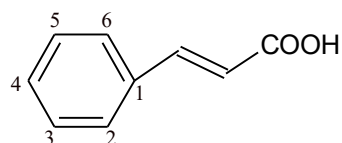
Sastojak	Supstituent	Struktura
----------	-------------	-----------

Benzojeve kiseline i derivati

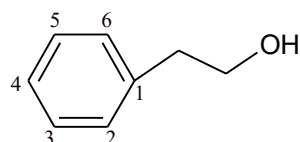
3-hidroksibenzojeva kiselina	3-OH
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	4-OH
3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (protokatehinska kiselina)	3,4-OH
2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (gentizinska kiselina)	2,5-OH
4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina (vanilinska kiselina)	3-OCH ₃ , 4-OH
3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina (galna kiselina)	3,4,5-OH
4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojeva kiselina (siringinska kiselina)	3,5-OCH ₃ , 4-OH

**Cimetne kiseline i derivati**

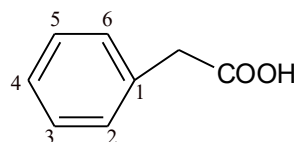
<i>o</i> -hidroksicimetna kiselina (<i>o</i> -kumarna kiselina)	2-OH
<i>p</i> -hidroksicimetna kiselina (<i>p</i> -kumarna kiselina)	4-OH
3,4-dihidroksicimetna kiselina (kavena kiselina)	3,4-OH
4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina (ferulinska kiselina)	3-OCH ₃ , 4-OH
4-hidroksi-3,5-dimetoksicimetna kiselina (sinapinska kiselina)	3,5-OCH ₃ , 4-OH

**Feniletilalkoholi**

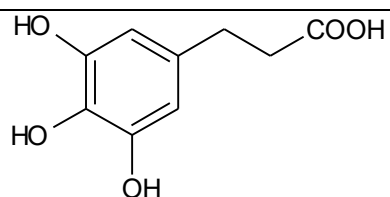
[(<i>p</i> -hidroksifenil)etanol] ili <i>p</i> -HPEA (tirozol)	4-OH
[(3,4-hidroksifenil)etanol] ili <i>p</i> -DHPEA (hidroksitirozol)	3,4-OH

**Ostale fenolne kiseline i derivati**

<i>p</i> -hidroksifeniloctena kiselina	4-OH
3,4-dihidroksifeniloctena kiselina	3,4-OH
4-hidroksi-3-metoksifeniloctena kiselina	3-OCH ₃ , 4-OH



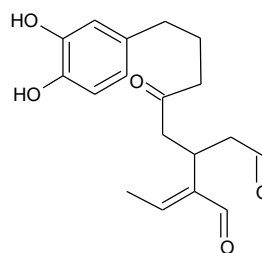
3-(3,4-dihidroksifenil)propanska kiselina



Dialdehidni oblici sekoiridoida

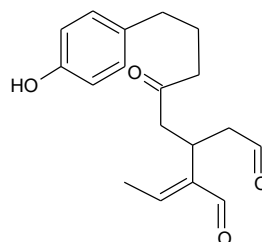
dekarboksimetiloleuropein aglikon
(3,4-DHPEA-EDA)

R₁-OH



dekarboksimetilligstrozid aglikon
(*p*-DHPEA-EDA)

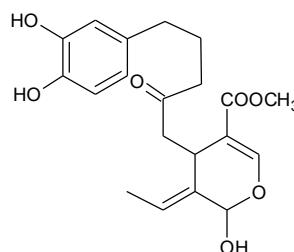
R₁-H



Seko-iridoidni aglikoni

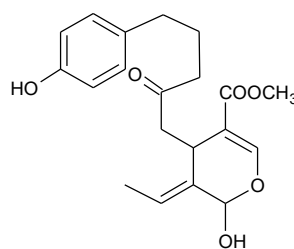
oleuropein aglikon
(3,4-DHPEA-EA)

R₁-OH



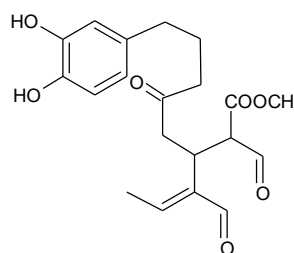
ligstrozid aglikon
(*p*-HPEA-EA)

R₁-H



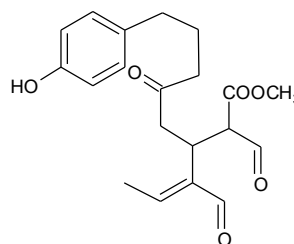
dialdehidni oblik oleuropein aglikona

R₁-OH

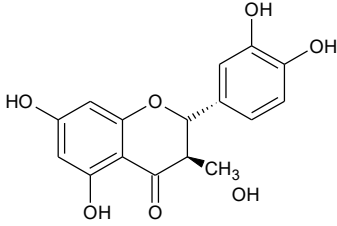
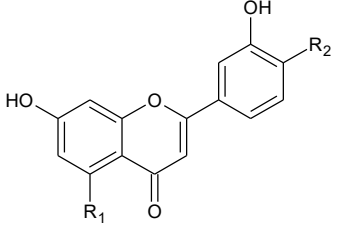
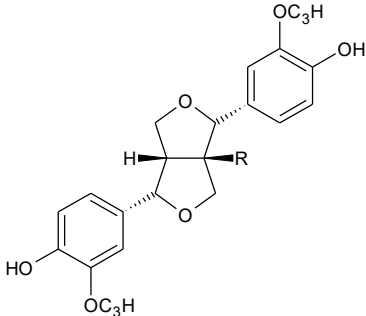
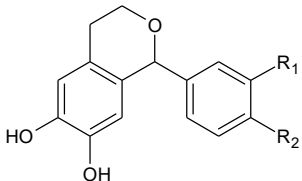


dialdehidni oblik ligstrozid aglikona

R₁-H



Flavonoli

(+)-taksifolin		
Flavoni		
apigenin	R ₁ -OH, R ₂ -H	
luteolin	R ₁ -OH, R ₂ -OH	
Lignani		
(+)-pinorezinol	R-H	
(+)-acetoksipinorezinol	R-OCOCH ₃	
(+)-hidroksipinorezinol	R-OH	
Hidroksiizokromani		
1-fenil-6,7-dihidroksiizokroman	R ₁ , R ₂ -H	
1-(3'-metoksi-4'-hidroksi)fenil-6,7-dihidroksiizokroman	R ₁ -OH, R ₂ -OCH ₃	

Tablica Fenolni sastojci u maslinovom ulju: naziv sastojka i opća kemijska struktura. (Servili i sur, 2004; Bendini i sur, 2007)

1.1.2 Fenolni sastojci u arganovom ulju

Danas, arganovo ulje bilježi porast popularnosti, ali se tradicionalno konzumira u mnogim mediteranskim zemljama. Postoje dvije metode njegove ekstrakcije iz plodova arganova stabla: tradicionalna i poluindustrijalizirana metoda. U obje metode se plodovi stabla suše na suncu. Kod tradicionalnog postupka, tijekom prerade dodaje se velika količina

vode, a izdvajanje ulja obavlja se ručnim prešanjem. Za razliku od tradicionalne metode, kod poluindustrijalizirane metode se ekstrakcija odvija mehaničkim hladnim pritiskom i to bez dodatka vode (Marfil et al., 2011).

Arganovo ulje karakterizira visok udio oleinske kiseline, a nakon nje je najzastupljenija linolna kiselina. Uz masne kiseline, fitosteroli su sastavni dio arganova ulja, od kojih su najznačajniji stigmastani. Arganovo ulje se razlikuje od ostalih biljnih ulja jer sadrži i više razine skvalena.

Pored toga, neosapunjive frakcije arganova ulja sadrže oko 20% triterpenskih alkohola koji se odvajaju od sterola kromatografijom (Khallouki i sur., 2017).

Također, arganovo ulje je bogato γ -tokoferolima, za razliku od maslinovog i suncokretovog ulja kod kojih prevladavaju α -tokoferoli (Khallouki i sur., 2017).

Arganovo ulje sadrži male količine polifenola, a smatra se da ne prelaze 5 mg kg^{-1} (Khallouki i sur., 2017).

1.2 PROBAVA FENOLNIH SASTOJAKA

Probava započinje u usnoj šupljini djelovanjem enzima α -amilaze. Hrana je kratkotrajno u ustima, stoga nema značajnog otpuštanja polifenola iz hrane. Međutim, u usnoj šupljini dolazi do smanjenja čestica hrane i povećanja površine te se tako olakšava pristup enzimima u narednim fazama probave (slika 3).

Najveća količina polifenola se otpušta tijekom druge, odnosno gastrične faze probave. Zajedničkim djelovanjem pojedinih faktora kao pepsina, niskog pH i kretnji peristaltike nastaju male čestice promjera $500 \mu\text{m}$. Također, niski pH povoljno djeluje na polifenole, pa ih tako možemo pronaći u nedisociranom obliku. Zbog prisutnosti polifenola u takvom obliku, dolazi do difundiranja iz matriksa u vodenu fazu kao rezultat smanjenja ionskih interakcija.

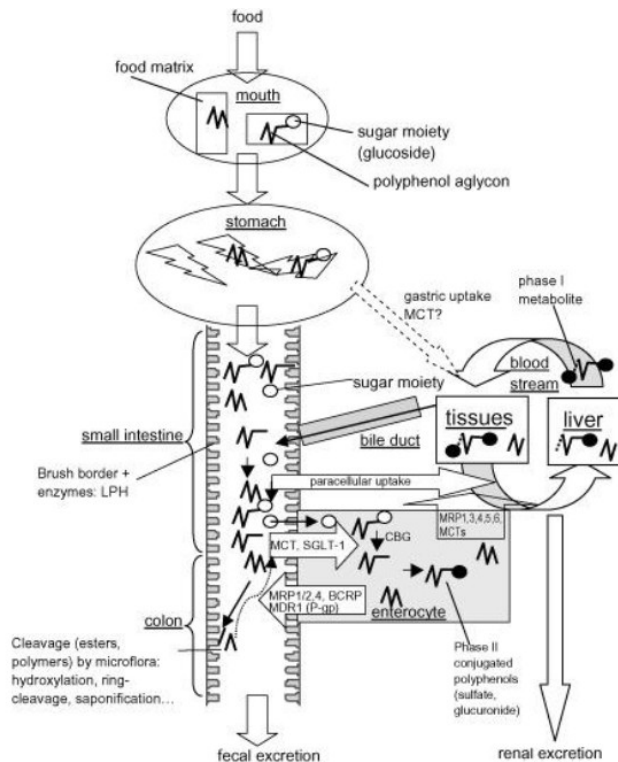
U tankom crijevu dolazi do povišenja pH vrijednosti na otprilike 7. To povišenje dovodi do aktivacije enzima koje izlučuje gušterača, kao primjerice fosfolipaza, kimotripsina karboksipeptidaze itd. Uslijed djelovanje lipaza i žučnih soli nastaju vodotopive micelle što može smanjiti bioraspoloživost nepolarnih polifenola i flavonoida, zbog njihove ugradnje u hidrofobnu srž tih struktura. Nadalje, porastom pH dolazi do razgradnje antocijana.

Za apsorpciju polifenola koji su vezani za ugljikohidrate u tankom crijevu, važno je da se odvoje od šećera. Glavni enzim u reakciji je laktaza-florizin hidrolaza (LPH).

U debelom crijevu polifenoli se metaboliziraju djelovanjem bakterija. Osim polifenola, metaboliziraju se i konjugati I i II faze metabolizma. U debelom crijevu posredstvom bakterija metaboliziraju se polifenoli i konjugati metabolizma nastali enterohepatičkom recirkulacijom.

Bioraspoloživost nativnih polifenola se smanjuje mikrobnom fermentacijom, ali se povećava bioraspoloživost metabolita koji su nastali.

Polarni polifenoli se većinom izlučuju iz organizma urinom. No, bioiskoristivost se ne može točno procijeniti zbog nemogućnosti detekcije metabolita u urinu. Nepolarni polifenoli se većinom izlučuju iz organizma bilijarnom ekskrecijom (Bohn, 2014).



Slika 3. Pregled svih procesa koji utječu na bioiskoristivost polifenola (Bohn, 2014)

1.3 BIORASPOLOŽIVOST FENOLNIH SASTOJAKA

Aktivnost polifenola ovisi o njihovoj bioraspoloživosti. Pod time podrazumijevamo dio nutrijenata koji se probavi, apsorbira, a potom i metabolizira. Također, aktivnost polifenola ne ovisi o zastupljenosti u prehrani, već o biološkoj aktivnosti sastojaka, stupnju apsorpcije u tankom crijevu, metabolizmu i eliminaciji iz organizma. Također, metaboliti mogu imati različitu biološku aktivnost od matičnih molekula (Manach i sur., 2004; D'Archivio i sur., 2007). Njihova apsorpcija i metabolizam ovise o kemijskoj strukturi a najviše se apsorbiraju izoflavoni i fenolne kiseline. Najniži stupanj apsorpcije imaju polifenoli visoke molekulske mase, a to su primjerice proantocijanidi, galoilkahetini te antocijanini (Han i sur., 2007). Polifenoli u hrani pretežito dolaze u obliku glikozida te se većina polifenola se

ne može apsorbirati u svom izvornom obliku , stoga se moraju hidrolizirati crijevnim enzimima (Scalbert i Williamson 2000; Manach i sur., 2004; Crozier i sur., 2009).

Flavonoidi se većinom nalaze u obliku glikozida, stoga se hidroliziraju pomoću crijevnog enzima laktoza-floridizin-hidrolaze te se oslobađa aglikon koji ulazi u epitelne stanice. Također, može se i hidrolizirati uz glukoznog prijenosnika ovisnog o natriju (SGLT1) aktivnim prijenosom u enterocit (Scalbert i Williamson 2000; Manach i sur., 2004; Crozier i sur., 2009).

Tijekom apsorpcije, te kasnije u jetri, iz oslobođenih aglikona djelovanjem enzima sulfottransferaza, uridin-5'-difosfat-glukuronoziltransferaza i katehol-*O*-metiltransferaza u reakcijama konjugacije nastaju sulfati, glukuronidi i metilirani metaboliti. Ovim procesom metaboličke detoksikacije povećava se hidrofilnost ksenobiotika radi lakšeg izlučivanja putem bubrega. Veće molekule metabolita se reapsorbiraju enterohepatičkom cirkulacijom, a manji metaboliti se luče urinom. Iz navedenog razloga, veći metaboliti se duže zadržavaju u organizmu. Metaboliti, koji se nisu apsorbirali u tankom crijevu, nastavljaju se metabolizirati mikrobiotom debelog crijeva. Također, mikrobiota u debelom crijevu hidrolizira glikozide neapsorbiranih polifenola (Manach i sur., 2004).

Tirosol, hidroksitirosol i oleuropein su tri sastojka na kojima je težište većine istraživanja biorasploživosti polifenola. Mali udio fenolnih sastojaka u urinu je pokazatelj brze apsorpcije polifenola. Apsorpcija hidroksitirosola i tirosola se odvija u tankom crijevu (Visioli i sur., 2000; Caruso i sur., 2001), a prisutni u emulziji maslinovog ulja veće su biorasploživosti (Tuck i sur., 2001). Nadalje, prema Vissers i sur. (2002) primjenjena doza hidroksitirosola i tirosola kao i ligstrozid-aglikona i oleuropein-aglikona apsorbira se 55-66% u ljudskom organizmu. Prema Miro-Casas i sur. (2001), 72% primjenjene doze hidroksitirosola i derivata oleuropeina pojavljuje se u urinu kao hidroksitirosol, a kao tirosol u urinu pojavljuje se 34% tirosola i derivata ligstrozida.

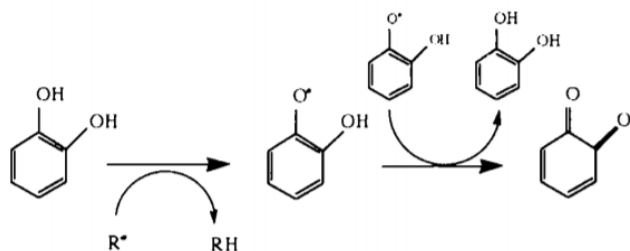
Apsorpcija polifenola i dalje nije u potpunosti objašnjena, ali smatra se da se polarni sastojci apsorbiraju pasivnom difuzijom, dok polarna molekula više molekulske mase, oleuropein-glikozid, difundira kroz lipidni dvosloj a potom se apsorbira uz pomoć glukoznog prijenosnika (Edgecombe i sur., 2000). Nadalje, ostaje nerazriješeno da li se razgradnja fenolnih sastojaka manje polarnosti odvija u tankom crijevu, odnosno prije apsorpcije ili u krvnom optoku, odnosno nakon apsorpcije (Vissers i sur., 2002). Pri metaboliziranju fenolnih sastojaka dolazi do konjugacije s glukuronskom kiselinom stoga iz približno 98% hidroksitirosola i tirosola nastaju glukuronidi ((D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2004; Scalbert i Williamson 2000). Stoga se smatra da je biološka aktivnost metabolita ključna za biološku aktivnost polifenola maslinovog ulja (Tuck i sur., 2002). Novija istraživanja bilježe inkorporaciju hidroksitirosola i derivata u LDL česticama nakon konzumiranja maslinovog ulja (Han i sur., 2007).

Postoje brojna istraživanja o utjecajima na bioraspoloživost polifenola, no razumijevanje mehanizama i samih enzimskih i kemijskih djelovanja zahtijevaju daljnja istraživanja. Uz to, razvitak novih metoda omogućuje opsežniji rad i detaljnije razumijevanje učinaka na bioraspoloživost polifenola (Bohn i sur., 2014).

1.4 ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA FENOLNIH SASTOJAKA

Nekoliko istraživanja pokazala su da fenolni sastojci imaju antoksidacijska svojstva odnosno da mogu izravno ili neizravno djelovati kao antioksidansi i to s nekoliko mogućih mehanizama.

Sposobnost uklanjanja slobodnih radikala je najistaknutiji mehanizam u kojem reaktivni oblici prekidaju reakcijski niz u izravnoj reakciji. Smatra se da antioksidacijska sposobnost proizlazi iz doniranja vodika s aromatskih jezgri te iz stabilizacije nastalog fenoksi-radikala. Raspored i broj supstituenata s aromatskih hidroksilnih skupina utječe na stupanj antioksidacijske aktivnosti (Cuvelier i sur., 1992). Također, *meta*-supstituirani spojevi imaju manje izražena antioksidacijska svojstva od *ortho* ili *para* supstituiranih spojeva. Izraženija antioksidacijska svojstva *ortho*- i *para*-difenola proizlaze iz stabilizacije fenoksi-radikala vodikovim vezama u molekuli i to preko druge –OH skupine u molekuli (Brand-Williams i sur., 1995; Visioli i sur., 1998; Visioli i sur., 2004). A osim toga, posljedica su i regeneracije molekule difenola koja je nastala u reakciji s fenoksi-radikalom (slika 4) (Brand-Williams i sur., 1995).



Slika 4. Mehanizam regeneracije *o*-difenola (Brand-Williams i sur., 1995).

Pokazano je da fenolni sastojci zadržavaju antioksidacijsku aktivnost u biološkim sustavima. Hidroksitirozol ima zaštitne učinke na nastanak $O_2 \rightarrow \bullet$ u krvnim žilama za kojeg se smatra da djeluje na povećani rizik razvoja kardiovaskularnih bolesti te smanjuje funkcije endotela (Schultz i sur., 2004). Hidroksitirozol zaštitini učinak postiže sprječavanjem oštećenja lipida i hemolize eritrocita (Manna i sur., 1999). Nadalje, hidroksitirozol je učinkovitiji od oleuropeina u uklanjanju $O_2 \rightarrow \bullet$ u polimorfonuklearnim leukocitima te

uklanjanju HOCl na mjestu upale (Visioli i sur., 1998). Također, hidroksitirozol može povoljno djelovati na sprječavanje oksidacijskih oštećenja i to povoljno djelujući na upalne bolesti (Manna i sur., 1997).

Antioksidacijska aktivnost polifenola maslinovog ulja proizlazi iz **sposobnosti keliranja** iona prijelaznih metala pri čemu hidroksitirozol i oleuropein mogu keliranjem iona spriječiti induciranu oksidaciju LDL čestica koje su važne u procesu ateroskleroze (Visioli i sur., 1995).

Također antioksidacijsko djelovanje može biti postignuto i vezanjem polifenola **uz druge antioksidanse** pri čemu se može postići obnavljanje α -tokoferola. Obnavljanje se postiže redukcijom njegovog radikalskog oblika. Cai i sur., 2002).

Neizravno antioksidacijsko djelovanje se također ubraja u učinke polifenola maslinovog ulja u koje spada **inhibicija prooksidacijskih enzima** koji su bitni na biokemijskom putu upale.

1.5 METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA

Postoje brojne metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta u znanstvenoj i istraživačkoj praksi. Upravo zbog kemijske raznolikosti prirodnih antioksidanasa, teško je izdvojiti jednu metodu kao relevantnu. No, prilikom odabira metode trebalo bi uzeti u obzir da metoda odgovara nekim uvjetima poput jednostavnosti, korištenja biološki relevantnog izvora radikala, ima definirane krajnje točke, dobrom reproduktivnošću unutar ciklusa i dana između itd. Također, različiti antioksidansi različito reagiraju na izvore radikala ili oksidanasa (Prior, 2015).

Razlikujemo dva mehanizma reakcije antioksidanasa kojima je krajnji rezultat isti, ali se razlikuju prema mehanizmima reakcija koji se odvijaju između antioksidansa i slobodnih radikala (Prior, 2015).

1. Metode temeljene na prijenosu elektrona (engl. *Electron Transfer*, ET)

2. Metode temeljene na prijenosu atomavodika (engl. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT)

Najčešće korištene metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti su (Prior, 2015):

ET metode:

- FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power)
- CUPRAC (engl. Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity)
- ABTS (reaktivnost prema radikalu 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina))
- FC (Folin-Ciocalteu metoda)

HAT metode:

- ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
- DPPH (reaktivnost prema radikalu 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil)
- TRAP (engl. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*)
- metoda koja se temelji na izbjeljivanju β -karotena

HAT i ET se mogu odvijati i paralelno, a koji će mehanizam u određenom sustavu prevladati ovisi o strukturi i svojstvima antioksidansa, svojstvima otapala, topljivosti i koeficijentu raspodjele antioksidanasa. Neke od najvažnijih metoda prikazane su u tablici 1.

Tablica 2. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta

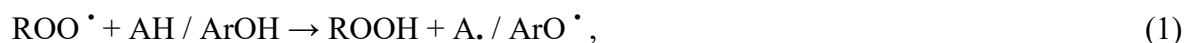
Vrsta metode	Princip rada	Određivanje završne točke
DPPH	Reakcija antioksidansa s organskim radikalom	Kolorimetrija
ABTS	Reakcija antioksidansa s organskim kationskim radikalom	Kolorimetrija
CUPRAC	Redukcija Cu (II) u Cu (I) pomoću antioksidansa	Kolorimetrija
FRAP	Reakcija antioksidansa s Fe (III) kompleksom	Kolorimetrija
ORAC	Reakcija antioksidansa s peroksidnim radikalom	Gubitak fluorescencije fluorescina
TRAP	Izbacivanje luminol-derivirane radikale pomoću antioksidansa	Kemiluminiscencijski signal

Općenito, HAT metode mjere sposobnost kojom neki antioksidans uklanja radikal doniranjem atoma vodika i temelje se na kinetici. Nadalje, ne ovise o pH vrijednost i otapalu i brze su, ali prisutnost redukcijskih sredstava može dovesti do nepoželjno visoke reaktivnosti.

ET metode mjere redukcijsku sposobnost antioksidansa, a temelje se na redoks reakciji izmjene elektrona između antioksidansa koji, reakcijom prijenosa jednog elektrona, reducira neki oksidans. Za razliku od HAT metoda, ET metode su pH ovisne i spore i stoga se izračunavanje kapaciteta antioksidanasa ne temelji na kinetici (Prior, 2015).

U reakciji fenolnih antioksidansa s nekim radikalom (npr. $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH \cdot$ i $\cdot O_2^-$) fenolni antioksidans prijenosom jednog elektrona ili atoma vodika ($H \cdot$) na radikale, ili pak gubitkom elektrona ili atoma vodika, prevodi se u oksidacijski produkt (npr. fenoksil- radikal ili semikinon) (Li i sur, 2018).

HAT mehanizmi antioksidacijskog djelovanja kojim se atom vodika ($H \cdot$) prenosi s fenola ($Ar-OH$) na $ROO \cdot$ radikal se može prikazati reakcijom (Apak i sur., 2007):



gdje AH označuje biomolekulu koju fenolni antioksidans, ArOH, štiti od oksidacije posredstvom peroksilnog radikala (ROO[•]).

Ariloksi radikal (ArO[•]) koji nastaje reakcijom fenolnog antioksidansa s peroksilnim radikalom je stabilizirana rezonancijom.

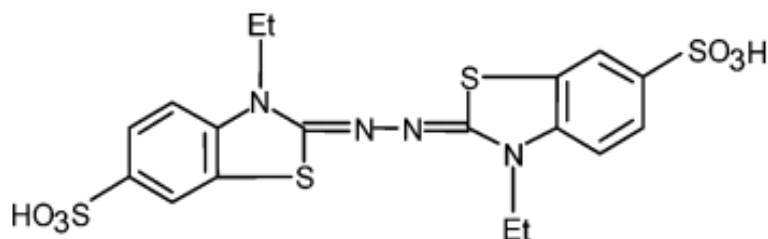
S druge strane, ET mehanizam antioksidacijskog djelovanja fenolnih antioksidanasa temelji se na reakcijama:



1.5.1 ABTS METODA

Metoda ABTS temelji se na ET reakciji, budući da ABTS^{•+} teži primiti elektrone od fenolnog antioksidanasa kako bi se neutralizacijom pozitivnog naboja stvorila stabilna molekula ABTS, a njena primjena je određivanje antioksidacijskog kapaciteta kod prehrambenih proizvoda (Li i sur., 2018).

ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) je kosupstrat peroksidaze kojeg oksidira do metastabilnog radikal-kationa u prisutnosti vodikovog peroksida (slika 5). Nastali radikal-kation je intenzivno obojen, a njegova koncentracija se može pratiti spektrofotometrijski. Spektrofotometrijsko određivanje obavlja se mjerenjem apsorbancije pri 600-750 nm.



Slika 5. Struktura 2,2' -azinobisa (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS •+)
(Prior i sur.,2005.)

Pri reakciji nastalog radikal-kationa s antioksidansima dolazi do obezbojenja stoga se antioksidacijski kapacitet povezuje sa smanjenjem apsorbancije otopine pri čemu se smanjuje i koncentracija ABTS radikal-kationa (Roginsky i Lissi, 2005). Trolox je mjerilo za dobivene rezultate. ABTS se zbog svoje jednostavnosti i brze reakcije s antioksidansima koristi u brojnim istraživanjima, a primjeren je i za proučavanje utjecaja pH na antioksidanse i objašnjavanje mehanizma. Također, na radikal ne utječe ionska snaga pa se antioksidacijske sposobnosti mogu odrediti u više medija, hidrofilne i lipofilne (Prior i sur., 2005).

No, osim prednosti postoje i neki nedostaci kod ABTS metode kao primjerice ograničen raspon koncentracija antioksidanasa koji su korisni za preciznu analizu. Također, moraju se kontrolirati i uvjeti reakcija kao što su uvjeti pohrane reagensa, sastav pufera, pH, temperatura itd. Također metoda može biti dugotrajna zbog spore reakcije polifenola s ABTS radikal-kationom (Apak i sur., 2013).

Nadalje, ABTS radikal se smatra „nefiziološkim“ izvorom jer nije pronađen kod sisavaca. Nadalje, spojevi koji imaju nizak redoks potencijale mogu reagirati s ABTS-om te tako usporiti reakcije (Prior i sur, 2005).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U posljednjem desetljeću postignut je značajan napredak u razumijevanju veze između prehrane bogate antioksidansima i smanjenja rizika od pojavnosti bolesti koje u podlozi imaju imaju oksidacijski stres, stanje povezano s neuravnoteženim stvaranjem slobodnih radikala (Siti i sur, 2015).

Između mikronutrijenata, vitamina C i vitamina E, fenolni sastojci prepoznati kao glavni prehrambeni antioksidansi koji mogu biti ključan posrednik korisnih učinaka mediteranske prehrane (Trichopoulou i Lagiou, 2001). Polifenoli mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko mogućih načina, a jedan od mehanizama je sposobnost uklanjanja slobodnih radikala u izravnoj reakciji, pri čemu prekidaju lančani reakcijski niz kojeg otpočinju ti reaktivni oblici, a učinci ovih sastojaka u sprječavanju oksidacijskog oštećenja lipida i DNA izraženiji su u odnosu na one vitamina E (de la Puerta i sur, 1999; Fito i sur, 2000; Owen i sur, 2000; Masella i sur, 2004). Iz toga razloga, značajan dio istraživačkih napora današnjice ulaže se u ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta hrane, a u tu svrhu razvijeni su brojni *in vitro* testovi kojima se, u reakciji s umjetnim radikalima, ukazuje na antioksidacijska svojstva različitih namirnica i proizvoda, uključujući i biljna ulja.

Iako postoje brojne metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta hrane, većina njih se oslanja na uporabu smjese organskih otapala i vode za ekstrakciju ciljnih sastojaka. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u tako izdvojenim vodenim organskim ekstraktima ograničene je vrijednosti, jer se značajan dio potencijalno bioaktivnih sastojaka ne može izdvojiti iz matrice hrane te zaostaje u ostatku nakon ekstrakcije (Saura-Calixto i sur., 2007).

Pored navedenog, temeljni preduvjet da bi sastojci s antioksidacijskim svojstvima iskazali svoje biološke učinke jeste njihova bioraspoloživost koja ovisi o oslobađanju iz matriksa hrane tijekom procesa probave. Samo oni fenolni sastojci koji se mogu oslobiti

djelovanjem probavnih enzima (tako crijevo) biodostupni su u crijevu, te su stoga i potencijalno bioraspoloživi (Saura-Calixto i sur., 2007).

S druge strane, fenolni sastojci u neprobavljivoj frakciji uglavnom zaostaju u matriksu hrane, a u analizi antioksidacijskog kapaciteta ova frakcija sustavno se u literaturi zanemaruje. Međutim, premda ne prolaze kroz crijevnu barijeru, ovi ne ekstraktibilni fenolni sastojci mogu iskazati antioksidacijsko djelovanje u tankom crijevu, ili se u debelom crijevu dijelom metaboliziraju djelovanjem crijevne mikrobiote do sastojaka izraženije biološke aktivnosti (Delgado-Andrade i sur., 2010).

Kao bi se što potpunije procjenio antioksidacijski kapaciteti složenih smjesa, kakva je hrana osmišljeni su *in vitro* pristupi koji oponašaju enzimski proces probave u gastrointestinalnom traktu, kao što je metoda globalnog antioksidacijskog odgovora (GAR) koju su razvili Pastorizia i sur. (2011). Ova metoda omogućuje potpunije oslobađanje antioksidanasa iz matriksa hrane, a u određivanju antioksidacijskog kapaciteta uzima u obzir topljivu, bioraspoloživu frakciju, jednako kao i netopljivu, rezidualnu frakciju u kojoj zaostaje dio sastojaka koji se ne mogu razgraditi niti apsorbirati u tankom crijevu.

u cilju relevantnije procjene antioksidacijski kapacitet maslinovog i arganovog ulja tradicionalnom metodom koja se temelji na ekstrakciji fenolnih sastojaka sastojaka vodenorganskim otapalima, primjenjena je i metoda globalnog antioksidacijskog odgovora, koja se oslanja na *in vitro* pristup utemeljen na enzimskoj probavi, osmišljen tako da oponaša probavu u gastrointestinalnom traktu.

U tu svrhu, fenolni sastojci izdvojeni su iz uzoraka maslinovog i arganovog ulja ekstrakcijom tekuće-tekuće primjenom otapala metanol:aceton:voda, dok će se metoda GAR sprovesti u kontroliranim uvjetima sredine (pH, temperatura, koncentracija žučnih, soli, vrijeme inkubacije) koji oponašaju proces probave u želucu i tankom crijevu.

Prethodno određivanju antioksidacijskog kapaciteta, u metanol:aceton vodenim ekstraktima te bioraspoloživa i rezidualna frakcija nakon *in vitro* probave okarakterizirati će se obzirom na sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka kolorimetrijskom Folin-Ciocalteu metodom.

Antioksidacijski kapacitet navedenih uzoraka procjenjuje se određivanjem sposobnosti uklanjanja radikal kationa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Uzorci za analizu

U radu su analizirani sljedeći uzorci maslinovog i arganovog ulja:

1. MU 1 – Ekstra djevičansko djevičansko maslinovo ulje „OI Istria“ proizvedeno Hrvatskoj (Agrolaguna d.d., Poreč) preradom mješavine sorti maslina uzgojenih u maslinicima na području Istre što uključuje geografsko područje Istarske županije i dio Primorsko goranske (Liburnija). Ulje je zaštićeno oznakom izvornosti, a kupljeno je u lokalnoj trgovini. Prema informacijama proizvođača, ulje je dobiveno hladnim postupkom prešanja.
2. MU 2 – maslinovo ulje lokalnog proizvođača (Punat, Krk). Prema informacijama proizvođača, proizvedeno je postupkom kontinuirane centrifugalne ekstrakcije u tri faze iz plodova autohtonih sorti maslina s područja otoka Krka.
3. AU 1 – arganovo ulje iz jugozapadnog dijela Maroka, komercijalno dostupno u specijaliziranim trgovinama u Marakešu. Prema informacijama proizvođača proizvedeno je tradicionalnim postupkom hladnog prešanja.
4. AU 2 – arganovo ulje koje je prema informacijama proizvođača proizvedeno industrijskim metodom i pakirano u Hrvatskoj (Biosativa, Hrvatska), a komercijalno je dostupno u specijaliziranim trgovinama u Hrvatskoj.

Uzorci ulja pohranjeni su u tamnoj staklenoj ambalaži na temperaturi 4 ° C do analize.

3.1.2 Kemikalije i reagensi

- Aceton, VWR International S.A.S., Fontenay-Sous-Bois
- Metanol, p.a., J.T.Baker, Deventer, Nizozemska

- Kloridna kiselina, p.a., Kemika, Zagreb
- Galna kiselina-1-hidrat, puriss, min 90%, $C_7H_6O_5 \cdot xH_2O$, $M=188,14$ g/mol
- Natrijev karbonat, Kemika, Zagreb
- Folin-Ciocalteu fenolni reagens, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- *n*-Heksan, ACS-For analysis, Carlo Erba (Milano, Italija)-Etanol 96%, Kemika, Zagreb
- Natrijev persulfat, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Pepsin, (izoliran iz želučane sluznice svinje), ≥ 250 U mg^{-1} , Sigma Aldrich, St. Louis
- Pankreatin, (izoliran iz gušterače svinje), aktivnost ekvivalentna 4x U.S.P., Sigma Aldrich, USA
- Žučne soli, Detroit, Michigan, USA

3.2. METODE

3.2.1 Kemijska ekstrakcija fenolnih sastojaka

Kemikalije i reagensi:

Metanol:voda (50:50, v/v, pH 2)

Aceton:voda (70:30, v/v)

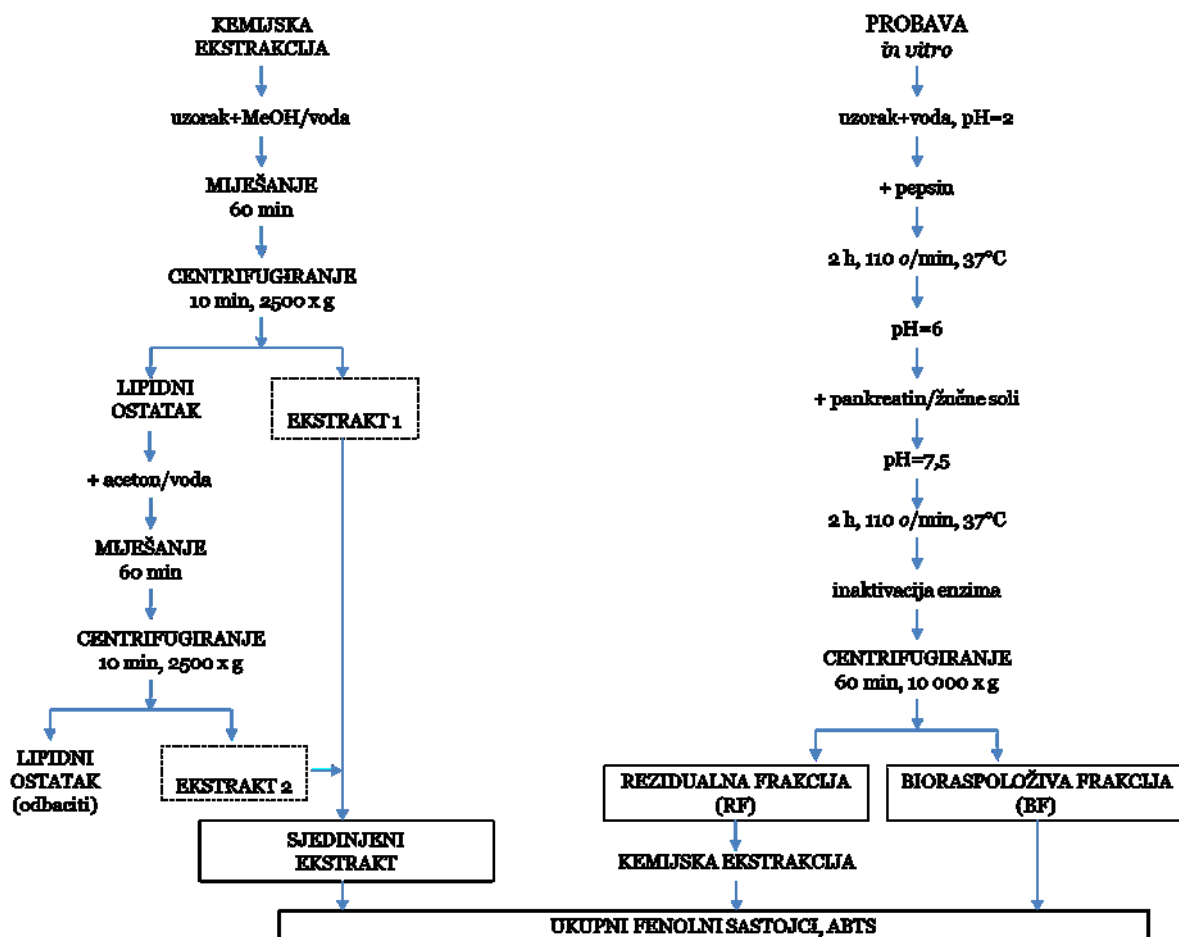
Uredaj:

Laboratorijska centrifuga HETTICH Rotina 420R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)

Tresilica

Postupak:

U cilju određivanja ukupnih fenolnih sastojaka i antioksidacijskog kapaciteta fenolni sastojci izdvajaju se ekstrakcijom tekuće-tekuće iz uzoraka ulja te iz bioraspoložive i rezidualne frakcije nakon provedene gastrointestinalne digestije (slika 6) prema Pérez-Jimenez and Saura-Calixto (2005). U 250 mg uzorka ulja ili ukupne rezidualne frakcije doda se 2,5 mL smjese metanola i vode (50:50, v/v, pH 2) te se miješa 60 minuta pri 220 oscilacijamin⁻¹ na tresilici. Uzorci se potom centrifugiraju na 2500 x g tijekom 10 minuta i 4°C, a dobiveni lipidni ostatak ekstrahira se s 2,5 mL smjese acetona i vode (70:30, v/v). Donji slojevi nakon prve i druge ekstrakcije se združe i koriste u susljednoj analizi.



Slika 6. Shematski prikaz postupka kemijske ekstrakcije i *in vitro* procesa probave.

3.2.2. *In vitro* model procesa probave

Postupak probave *in vitro* sproveden je prema metodi koju su izvorno opisali Seiquer i sur. (2015). Metoda se sastoji od dva slijedna koraka. U početnom koraku primjenjuje se suspenzija pepsina za simulaciju probave u želucu, nakon čega se dodaje suspenzija pankreatina i žučnih soli za simulaciju probave u tankom crijevu.

Kemikalije i reagensi:

Voda, ultračista

HCl, $c = 0,1 \text{ M}$ i $c = 1 \text{ M}$

NaHCO₃, $c = 0,1 \text{ M}$ i $c = 1 \text{ M}$

Suspenzija pepsina

- neposredno prije uporabe dispergira se 0,8 g pepsina u 5 mL 0,1 M HCl

Suspenzija pankreatina i žučnih soli

- 0,1 g pankreatina i 62,5 mg žučnih soli dispergira se u 25 mL 0,1 M NaHCO₃

Uređaji:

Ultracentrifuga L7-65, Beckman, USA

Tresilica

Ultrazvučna kupelj

Postupak:

U 1 g uzorka doda se 9 ml ultračiste vode te se podesi pH vrijednost na 2 dodatkom 1 M HCl. Nakon soniciranja u ultrazvučnoj kupelji, reakcijskoj smjesi doda se otopina pepsina u konačnoj koncentraciji 0,05 g pepsina po gramu uzorka, te se uzorci inkubiraju na 37 °C u vodenoj kupelji uz stalno miješanje pri 110 oscilacijamin⁻¹ tijekom 2 sata.

Za crijevnu fazu probave, podesi se pH vrijednost na 6 dodatkom 1 M NaHCO₃, a potom se u reakcijsku smjesu doda 2,5 ml smjese pankreatina i žučnih soli. Zatim se vrijednost pH podesi na 7,5 dodatkom 1 M NaHCO₃, te se uzorci inkubiraju na 37°C pri 110 oscilacijamin⁻¹ tijekom 1 sata.

Nakon simulacije procesa probave, enzimi se inaktiviraju u ledenoj kupelji, a uzorci se potom centrifugiraju na 10 000 x g tijekom 60 minuta na 4°C radi separacije rezidualne i biorasplošive frakcije. Obje frakcije pohrane se na -80°C do daljnje analize. Usporedo s uzorcima analizira se i slijepa proba kako bi se anulirale intreferencije reagenasa korištenih u procesu probave.

3.2.3. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih sastojaka

Kemikalije i reagensi:

Folin-Ciocalteu fenolni reagens reagens

Otopina Na₂CO₃, γ = 75 g/L

- 7,5 g bezvodnog Na₂CO₃ se otopi u 80 mL vode i prokuha. Nakon hlađenja doda se par kristala Na₂CO₃ i ostavi stajati 24 h. Otopina se nakon toga profiltrira kroz filter papir i nadopuni vodom u odmjerne tikvici do 100 mL.

Metanol-voda (50:50, v/v, pH 2)

Standardi:

3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina-1-hidrat (galna kiselina)

- iz matične otopine galne kiseline, (γ=100 mgL⁻¹) prirede se razjeđenja u opsegu koncentracije 0-100 mgL⁻¹

Uređaji:

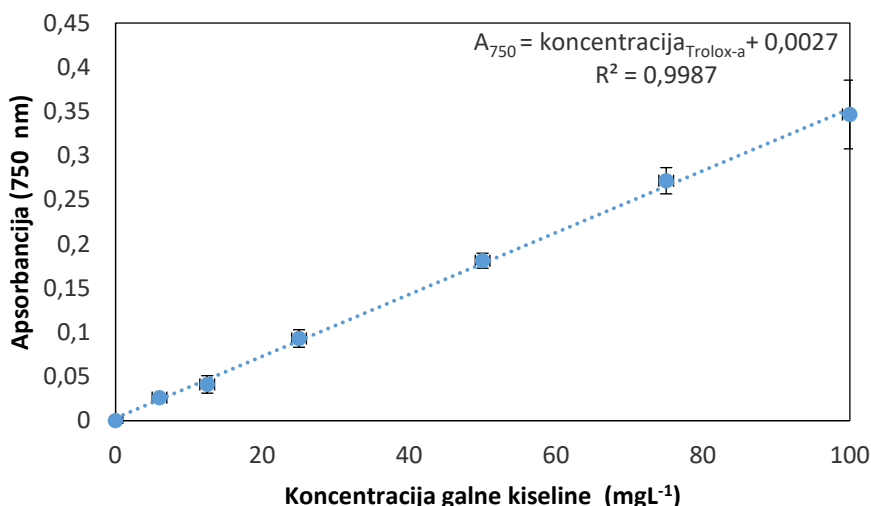
BIO-TEK EL808IU čitač mikrotitarskih pločica s programskom podrškom KC Junior (BIO-TEK Instrument, INC., Vermont, USA)

Postupak:

Ukupni polifenoli određuju se u vodeno-alkoholnom ekstraktu maslinovog ulja i rezidualnoj frakciji nakon provedene gastrointestinalne digestije prema metodi koju su opisali Saura-Calixto i Goñi, (2006) uz manje izmjene.

U odgovarajuće jažice mikrotitarske pločice doda se 10 μL uzorka i 10 μL Folin-Ciocalteu-ovog reagensa, a nakon 3 minute 200 μL otopine Na_2CO_3 . Volumen se podesi s destiliranom vodom na 250 μL , pomiješa i ostavi se stajati 1 sat u tami nakon čega se izmjeri apsorbancija plavo obojene otopine na 725 nm. Istovremeno s uzorcima, analizira se i slijepa proba reagensa. Isti se postupak primjeni za analizu različitih razrjeđenja matičnog standarda galne kiseline. Sva se mjerenja ponavljaju dva puta.

Sadržaj ukupnih polifenola računa se prema baždarnom dijagramu za galnu kiselinu (slika 7.). Rezultati se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline po kilogramu ulja.



Slika 7. Baždarni pravac za galnu kiselinu.

3.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) metodom

Kemikalije i reagensi:

140 mM otopina $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$

- otopi se 0,16667 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ u 5 mL deionizirane vode

7,0 mM otopina 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS)

- otopi se 0,019204 g ABTS reagensa u 5 mL deionizirane vode

Etanol, 96%

Standardi:

1mM otopina 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

- otopi se 0,012515 g Trolox-a u 50 mL etanola (50:50; v/v); razrijeđenja s vodom

- iz 1 mM otopine Troloxa dnevno se pripremaju radne otopine Trolox-a u rasponu koncentracija 0,01-0,1 mg/mL (0,0187 -0,3 mM)

Uređaji:

BIO-TEK EL808IU čitač mikrotitarskih pločica s programskom podrškom KC Junior (BIO-TEK Instrument, INC., Vermont, USA)

Postupak:

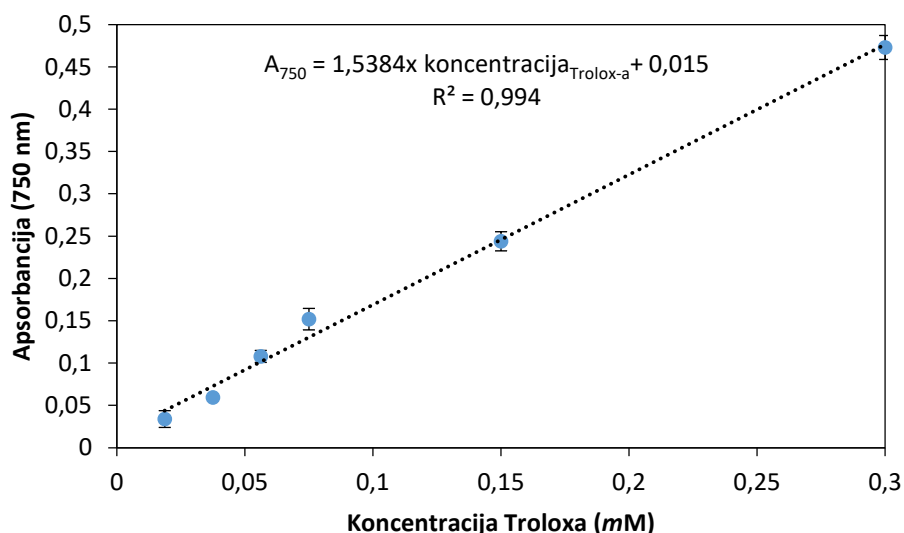
Antioksidacijski kapacitet uzoraka (kemijskog ekstrakta, rezidualne i bioraspložive frakcije) određuje se prema metodi koju su opisali Rufián-Henares i Delgado-Andrade, (2009) uz manje izmjene.

Stock otopina $ABTS^{\bullet+}$ priprema se oksidacijom 7 mM otopine ABTS reagensa s 140 mM otopinom $Na_2S_2O_8$ do konačne koncentracije otopine $Na_2S_2O_8$ od 2,45 mM. U tu svrhu pomiješa se 88 μL 140 mM otopine $Na_2S_2O_8$ te se nadopuni sa 7 mM otopinom ABTS reagensa do volumena od 5 mL. Otopina se zaštiti od utjecaja svjetlosti i ostavi se stajati u tami na sobnoj temperaturi 12-16 h sati prije uporabe. Pripravljena stock otopina $ABTS^{\bullet+}$ zaštiti se od utjecaja svjetlosti te je stabilna dva dana na sobnoj temperaturi, odnosno tjedan dana ukoliko se pohrani na 4°C. Radna otopina $ABTS^{\bullet+}$ pripremi se razrjeđivanjem sa smjesom etanola i vode (50:50; v/v) tako da apsorbanacija otopine na 750 nm iznosi $0,7 \pm 0,020$.

U alikvot od 20 μL uzorka doda se 280 μL $ABTS^{\bullet+}$ radne otopine te se reakcijska smjesa izmiješa 30 sekundi, a nakon sljedećih 30 sekundi započinje se mjeriti tijekom smanjenja apsorbanacije na 730 nm u vremenskim intervalima od 1 minute tijekom 20 minuta. Prema istom postupku odredi se apsorbanacija različitih razrjeđenja vodenih otopina standarda Trolox-a prema kojima se načini baždarni dijagram. Sva se mjerenja ponovljaju dva puta.

Svakodnevno se mjeri apsorbanacija radne otopine $ABTS^{\bullet+}$ koja ne sadržava uzorak (slijepa proba). Ujedno se i svakodnevno priprema svježa radna otopina $ABTS^{\bullet+}$ te se između mjerenja čuva zaštićena od utjecaja svjetlosti kako bi se umanjio gubitak aktivnosti slobodnog $ABTS^{\bullet+}$ radikala.

Izmjereno smanjenje apsorbanacije uzorka prevodi se u antioksidacijski kapacitet korištenjem Trolox-a kao standarda, a prema jednadžbi linearne regresije (slika 8). Rezultati su izraženi kao milimolarni ekvivalenti Trolox-a po kilogramu uzorka.



Slika 8. Baždarni pravac za Trolox.

3.4. Statistička obrada podataka

Primjenjena je jednosmjerna analiza varijance (One-Way ANOVA) kako bi se utvrdilo postoje li statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina tri ili više neovisnih (nepovezanih) uzoraka. Tukey-ev *post hoc* test višestruke usporedbe ili Hsu *post hoc* test višestruke usporedbe s najboljim (Hsu MCB) korišten je u cilju usporedbe aritmetičkih sredina koje su pokazale značajne razlike ($p < 0,05$).

Tukey-evim testom uspoređuju se aritmetičke sredine svih parova grupa, dok Hsu-ov MCB uspoređuje svaku skupinu s najvećom ili najmanjom aritmetičkom sredinom. Kao „najbolja“ odabrana je najveća srednja vrijednost te je svaka skupina uspoređena s najvećom aritmetičkom sredinom.

Odnos između različitih varijabli procijenjen je izračunavanjem odgovarajućeg koeficijenta korelacije (Pearsonova linearna korelacija) pri $p < 0,05$ razini pouzdanosti.

Statistička analiza podataka učinjena je pomoću programskog paketa Minitab 19 (Minitab, LLC, State College, Pennsylvania, SAD).

4. REZULTATI

U istraživanju antioksidacijskog kapaciteta uzoraka maslinovog i arganovog ulja u ovom radu primjenjena su dva pristupa. Prvi, kemijski pristup temelji se na određivanju ekstraktibilnih fenolnih sastojaka u metanol:aceton vodenim ekstraktima i antioksidacijskih svojstava tako priređenih ekstrakta.

Bioraspoloživost, definirana kao količina sastojka hrane koji je prisutan u crijevima kao posljedica njegovog oslobađanja iz matriksa hrane, prvi je preduvjet da bi bioaktivni spojevi mogli postići bilo kakav učinak u određenom tkivu ili organu (Saura-Calixto i sur., 2007).

Stoga je analiziran i sadržaj fenolnih sastojaka i antioksidacijski kapacitet u bioraspoloživim frakcijama dobivenim nakon postupka probave ulja *in vitro*, te je izračunato povećanje u odnosu na vrijednosti početnih kemijskih ekstrakata (povećanje puta). Ti su podaci prikazani u tablici 2.

Osim toga, ispitan je sadržaj fenola i antioksidacijski kapacitet u rezidualnoj frakciji te su relativne bioraspoložive i rezidualne frakcije iskazane kao postotak od ukupne količine fenolnih sastojaka koja se oslobodi nakon postupka simulirane probave (slika 9 i slika 10).

Ukupni fenolni sastojci kvantificirani su kolorimetrijski, u reakciji Folin-Ciocalteu-ovog reagensa s funkcionalnim hidroksilnim skupinama fenolnih spojeva, dok je kapacitet uklanjanja slobodnih radikala kemijskih ekstrakata i frakcija dobivenih tijekom procesa probave (biološki raspoloživa i rezidualna frakcija) izmjeren ABTS testom.

Tablica 2. Ukupni fenolni sastojci i antioksidacijski kapacitete u kemijskom ekstraktu i bioraspoloživoj frakciji nakon *in vitro* probave uzoraka ulja*.

	MU 1	MU 2	AU 1	AU 2
<i>Ukupni fenoli (GAEkg⁻¹)</i>				
Kemijski ekstrakt	339,42±8,01 ^{a,b}	371,99±8,39 ^a	293,91±27,86 ^{b,c}	246,56±6,69 ^c
Bioraspoloživa frakcija	560,68±27,20 ^b	601,27±8,12 ^a	569,40±18,0 ^b	642,81±11,41 ^a
Povećanje nakon probave (puta)	1,65±0,12 ^b	1,62±0,01 ^b	1,94±0,12 ^b	2,61±0,12 ^a
<i>ABTS (mM ekvivalenti Troloxakg⁻¹)</i>				
Kemijski ekstrakt	1,52±0,21 ^a	1,48±0,13 ^a	0,65±0,15 ^b	0,67±0,07 ^b
Bioraspoloživa frakcija	3,85±0,04 ^b	4,12±0,01 ^a	4,23±0,01 ^a	3,94±0,05 ^a
Povećanje nakon probave (puta)	2,56±0,37 ^c	2,80±0,24 ^{b,c}	6,67±1,50 ^a	6,32±0,76 ^{a,b}

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dva nezavisna mjerenja ± standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima su statistički značajno različite ($p < 0,05$; ANOVA i Tukey-ev *post hoc* test).

* MU 1, maslinovo ulje proizvedeno industrijskim postupkom; MU 2, maslinovo ulje lokalnog proizvođača; AU 1, arganovo ulje lokalnog proizvođača; AU 2, arganovo ulje proizvedeno industrijskim postupkom.

Jednosmjernom analizom varijance ustanovljena je je statistički značajna razlika u sadržaju fenolnih sastojaka između uzoraka ulja. Najviši sadržaj fenolnih sastojaka pronađen je u kemijskim ekstraktima lokalno proizvedenog maslinovog ulju, a najniži u ekstraktima arganovog ulja proizvedenog industrijskim postupkom (tablica 2). Tukey-ev *post hoc* test je pokazao da je sadržaj fenolnih sastojaka statistički značajno viši u maslinovom ulju lokalnog proizvođača u odnosu na lokalno proizvedeno arganovo ulje i industrijsko arganovo ulje, dok je sadržaj fenolnih sastojaka industrijski proizvedenog maslinovog ulja statistički značajno viši u odnosu na industrijski proizvedeno arganovo ulje. Nije bilo statistički značajnih razlika između lokalno i industrijski proizvedenog maslinovog ulja, kao niti između lokalno i industrijski proizvedenog arganova ulja.

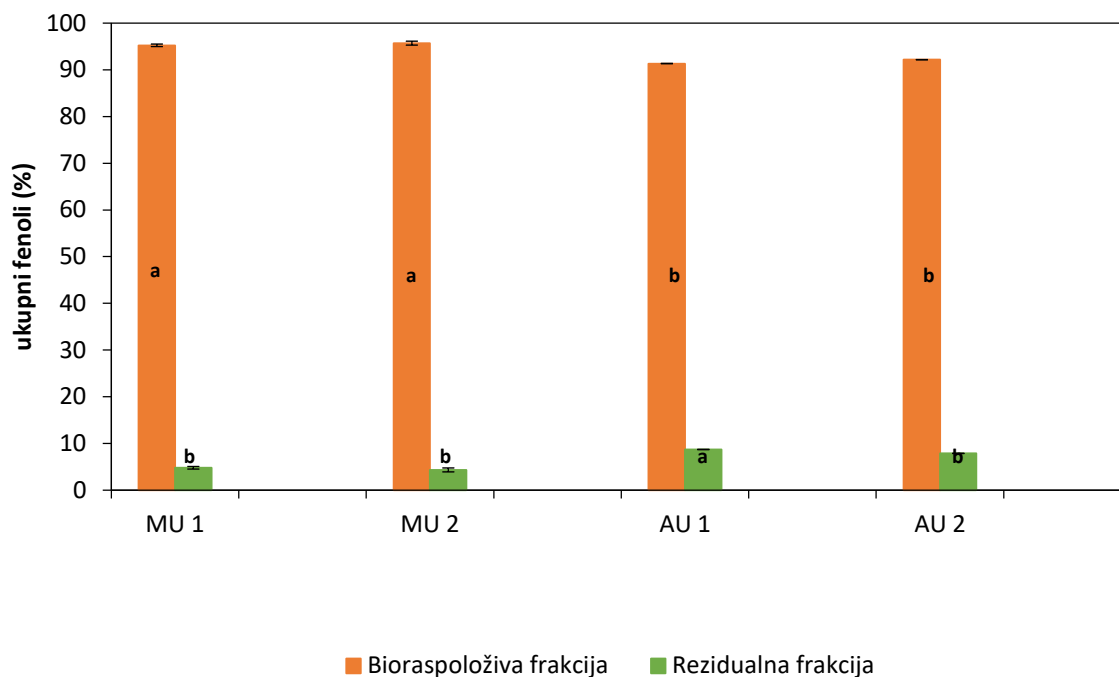
Analiza bioraspoloživih frakcija ulja pokazala je da se nakon *in vitro* procesa probave sadržaj fenolnih sastojaka povećava u svim uzorcima u usporedbi s kemijskim ekstraktima (tablica 2). Najviše vrijednosti sadržaja fenolnih sastojaka zabilježene su za bioraspoložive

frakcije arganovog ulja proizvedenog industrijskim postupkom, a slične vrijednosti određene su i u bioraspoloživim frakcijama maslinovog ulja lokalnog proizvođača. Sadržaj fenolnih sastojaka u araganovom ulju lokalnog proizvođača te industrijski proizvedenom maslinovom ulju bio je statistički značajno niži u odnosu na industrijski proizvedeno araganovo ulje. Nisu pronađene statistički značajne razlike između bioraspoloživih frakcija uzoraka maslinovog ulja u pogledu sadržaja fenolnih sastojaka.

Jednako tako, u uzorcima industrijski proizvedenog arganovog ulja ustanovljeno je i najveće povećanje sadržaja fenolnih sastojaka nakon probave *in vitro* u usporedbi s kemijskom ekstrakcijom, a ono je bilo statistički značajno više u odnosu na povećanje pronađeno za lokalno proizvedeno arganovo i maslinovo ulje, jednako kao i u odnosu na industrijski proizvedeno maslinovo ulje (tablica 2). S druge strane, proces probave je u manjoj mjeri utjecao na maslinovo ulje lokalnog proizvođača u kojem se bilježe i najniže vrijednosti porasta sadržaja fenolnih sastojaka nakon simulacije probave u odnosu na kemijsku ekstrakciju. Razlike u porastu sadržaja fenolnih sastojaka nakon *in vitro* probave između uzoraka maslinovog ulja te između uzoraka maslinovog ulja i lokalno proizvedenog arganovog ulja nisu bile statistički značajne.

Unatoč tome što su za industrijski proizvedeno arganovo ulje zabilježene najviše vrijednosti fenolnih sastojaka u bioraspoloživoj frakciji i najveće povećanje njihovog sadržaja nakon probave *in vitro*, prema našim rezultatima između 91% i 92% od ukupnih fenolnih sastojaka oslobodi se iz matriksa uzoraka arganovog ulja što je statistički značajno niže u odnosu na uzorke maslinovog ulja (približno 95%) (slika 9). Od ukupnog sadržaja fenola, u statistički značajno većem opsegu fenolni sastojci oslobađaju se iz maslinovog ulja lokalnog proizvođača ($95,69 \pm 0,42$)% u odnosu na uzorke arganovog ulja, dok se približno isti udjel od ukupnih fenolnih sastojaka oslobodi iz maslinovog ulja dobivenog industrijskim postupkom ($95,23 \pm 0,27$)% . U bioraspoložive frakcije industrijski proizvedenog maslinovog ulja

oslobađa se statistički značajno više fenolnih sastojaka u usporedbi s industrijski proizvedenim arganovim uljem. Postotak fenolnih sastojaka koji se od ukupnog sadržaja oslobodi u u bioraspoložive frakcije industrijski i lokalno proizvedenog arganovog ulja nije se statistički značajno razlikovao.



Slika 9. Doprinos bioraspoložive i rezidualne frakcije (%) udjelu ukupnih fenola nakon *in vitro* probave uzoraka ulja. Različita slova označuju statistički značajnu razliku unutar bioraspoložive ili rezidualne frakcije ($p < 0,05$; ANOVA i Tukey-ev *post hoc* test
* MU 1, maslinovo ulje proizvedeno industrijskim postupkom; MU 2, maslinovo ulje lokalnog proizvođača; AU 1, arganovo ulje lokalnog proizvođača; AU 2, arganovo ulje proizvedeno industrijskim postupkom.

Zajedno s bioraspoloživom frakcijom, analizirana je i rezidualna frakcija nakon *in vitro* probave ulja. Prema rezultatima u ovom radu, od ukupnog sadržaja fenolnih sastojaka, u rezidualnoj frakciji zaostaje 4,3-8,6% fenola nakon simulacije probave (slika 9). Taj je postotak statički značajno viši u rezidualnim frakcijama arganovog ulja [$(8,68 \pm 0,04)\%$ za arganovo ulje lokalnog proizvođača i $(7,84 \pm 0,02)\%$ za arganovo ulje proizvedeno industrijskim postupkom] nego u rezidualnoj frakciji uzoraka maslinovog ulja [$(4,77 \pm 0,27)\%$ za industrijsko maslinovo ulje i $(4,30 \pm 0,42)\%$ za maslinovo ulje lokalnog proizvođača], dok

između industrijski i lokalno porizvedenog arganovog ulja te industrijski i lokalno proizvedenog maslinovog ulja nisu pronađene statistički značajne razlike.

Tablica 2. prikazuje antioksidacijski kapacitet uzoraka maslinovog i arganovog ulja određen ABTS testom nakon kemijske ekstrakcije i *in vitro* procesa probave. U kemijskim ekstraktima maslinovog ulja proizvedenog industrijskim postupkom zabilježene su najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, koje su bile slične vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta određenog u kemijskim ekstraktima maslinovog ulja lokalnog proizvođača. Pri tome, vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kemijskih ekstrakta maslinovog ulja (neovisno o proizvodnom postupku) statistički su značajno više u usporedbi s vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta određenog u kemijskim ekstraktima industrijski i lokalno proizvedenog arganovog ulja. Razlike između industrijski i lokalno proizvedenih uzoraka maslinovog te između arganovog ulja nisu bile statistički značajne.

Tablica 3. Povezanost između sadržaja fenolnih sastojaka i antioksidacijskog kapaciteta prije i nakon probave *in vitro*.

Varijabla 1	Varijabla 2	r	p
ABTS	ukupni fenoli u kemijskom ekstraktu	0,953	< 0,001
ABTS	ukupni fenoli u bioraspoloživoj frakciji	0,904	< 0,001

Odnos između varijabli procjenjen je izračunavanjem koeficijenta Pearsonove linearne korelacije; $p < 0,05$.

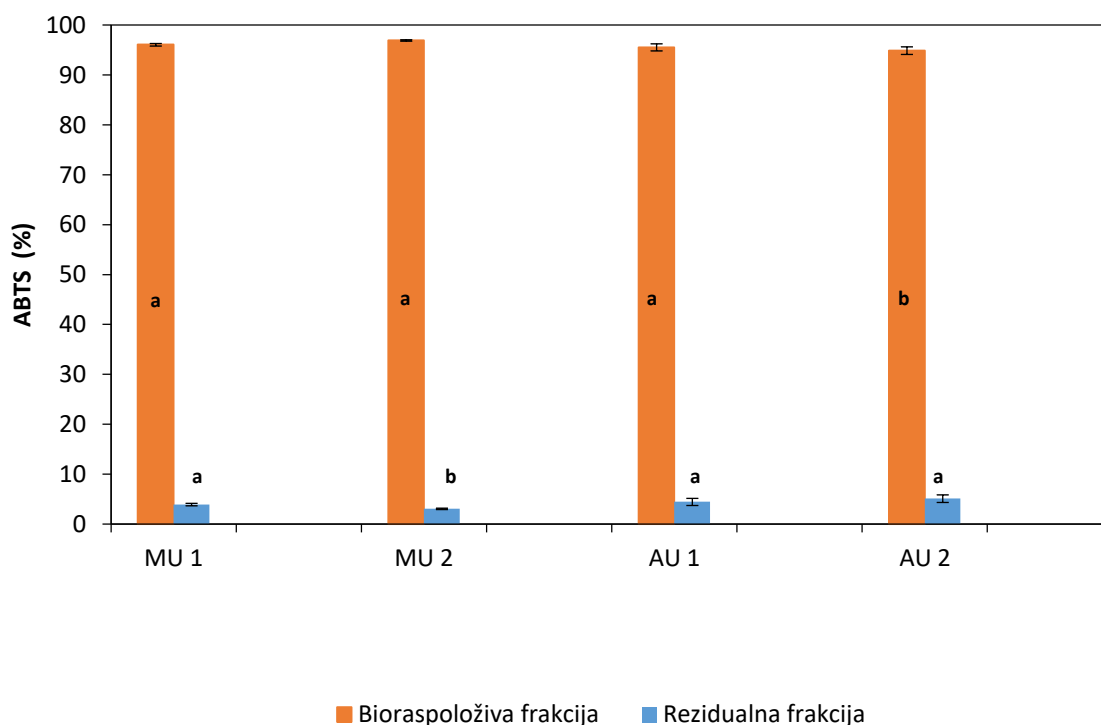
Nadalje, u kemijskim ekstraktima primjećena je značajna pozitivna korelacija (tablica 3) između sadržaja ukupnih fenolnih sastojaka i antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom ($r = 0,953$; $p < 0,001$).

U bioraspoloživoj frakciji, vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta statistički su se značajno razlikovale između industrijski proizvedenog maslinovog ulja (najniža vrijednost) i

vrijednosti određenih u arganovom ulja lokalnog proizvođača (najviša vrijednost), koje su zauzvrat bile slične vrijednostima za industrijski proizvedeno arganovo ulje te maslinovo ulje lokalnog proizvođača.

Antioksidacijski kapacitet uzoraka povećao se nakon probave *in vitro* (tablica 2), s višim vrijednostima u uzorcima arganovog ulja nego u maslinovim uljima. U uzorcima arganovog ulja uočene su približno šest puta više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u biorasploživim frakcijama u usporedbi s kemijskom ekstrakcijom, dok je taj porast za uzorke maslinovog ulja bio do približno 2,6 puta niži. U usporedbi s maslinovim uljem proizvedenim industrijskim postupkom, statistički značajne niže vrijednosti pronađene su u arganovim uljima, kako onima lokalnog proizvođača, tako i onima proizvedenog industrijski. Jednako tako, porast antioksidacijskog kapaciteta bio je statistički značajno niži u uzorcima lokalno proizvedenog arganovog ulja u odnosu na vrijednosti zabilježene za maslinovo ulje lokalnog proizvođača.

Kao i u slučaju za kemijske ekstrakte ulja, antioksidacijski kapacitet biorasploživih frakcija povezan je s fenolnim sastojcima, obzirom je nakon *in vitro* probave utvrđena je visoka pozitivna korelacija između sadržaja fenola i antioksidacijskog kapaciteta biorasploživih frakcija ($r = 0,904$; $p < 0,0001$) (tablica 3).



Slika 10. Doprinos bioraspoločive i rezidualne frakcije (%) antioksidacijskom kapacitetu nakon *in vitro* probave uzoraka ulja. Različita slova označuju statistički značajnu razliku unutar bioraspoločive ili rezidualne frakcije ($p < 0,05$; ANOVA i Hsu MCB test višestruke usporedbe s najvećom aritmetičkom sredinom - a).

* MU 1, maslinovo ulje proizvedeno industrijskim postupkom; MU 2, maslinovo ulje lokalnog proizvođača; AU 1, arganovo ulje lokalnog proizvođača; AU 2, arganovo ulje proizvedeno industrijskim postupkom.

Analiza bioraspoločivih i rezidualnih frakcija digesta (slika 10) pokazala je da u bioraspoločivim frakcijama zaostaje najveći udio antiradikalne aktivnosti koja čini od 94,9% do 96,9% od ukupnog antioksidacijskog kapaciteta nakon probave *in vitro*, dok su u rezidualnim frakcijama te vrijednosti u rasponu od 3,06 do 5,1% od ukupnog antioksidacijskog kapaciteta.

Hsu MCB test višestruke usporedbe s najvišom aritmetičkom sredinom pokazao je da najveći udio antiradikalne aktivnosti nakon probave u bioraspoločivim frakcijama maslinovog ulja lokalnog proizvođača ($96,94 \pm 0,12$)%, a te se vrijednosti statistički značajno više u odnosu na bioraspoločive frakcije industrijski proizvedenog arganovog ulja ($94,89 \pm 0,76$)%. U bioraspoločivim frakcijama ostalih ulja (industrijsko maslinovo ulje i arganovo ulje lokalnog

proizvođača nisu pronađene statistički značajne razlike, odnosno u ostalim uzorcima udio antiradikalske aktivnosti bioraspoloživih frakcija u ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti nakon probave sličan je onoj u bioraspoloživim frakcijama maslinovog ulja lokalnog proizvođača.

Istim *post hoc* testom ustanovljeno je kako najveći udio antiradikalske aktivnosti ostaje neapsorbiran u rezidualnoj frakciji arganovog ulja proizvedenog industrijskim postupkom ($5,10 \pm 0,76$)%, dok je u rezidualnoj frakciji lokalno proizvedenog maslinovog ulja neapsorbirani udio antioksidacijskog kapaciteta ($3,06 \pm 0,14$)%, statistički značajno niži u odnosu na industrijski proizvedeno arganovo ulje. Ostali uzorci statistički se značajno ne razlikuju od industrijski proizvedenog arganovog ulja (slika 10).

5. RASPRAVA

Djevičansko maslinovo ulje jedan je od najpoznatijih sastojaka mediteranske prehrane. Cijenjeno je zbog svojih nutritivnih i senzorskih svojstava te zdravstvenih blagodati. Tako se konzumacija ovog ulja povezuje s nižom učestalosti koronarne bolesti srca, karcinoma različite lokalizacije te nerodegenerativnih bolesti (López-Miranda i sur., 2008; Frankel, 2011; Borges i sur. 2017; Chiesi i sur., 2015; Servili i sur., 2014; Manach i sur., 2004).

Međutim, u nekim zemljama, prvenstveno onima na području Magreba, djevičansko arganovo ulje sastojak je uobičajene prehrane. Danas je djevičansko arganovo ulje također u sve većem opsegu prisutno na međunarodnom tržištu visokokvalitetnih jestivih ulja zbog specifičnog kemijskog sastava i osebujnih organoleptičkih značajki (Gharby i sur., 2011), ali i blagotvornih učinaka na zdravlje među kojima su kardioprotektivni učinci, iznimno cijenjeni u zemljama koje karakterizira „zapadnjački“ stil prehrane (Z. Charrouf i D. Guillaume, 2007.)

Zdravstvene prednosti konzumiranja djevičanskog maslinovog i arganovog ulja dijelom se pripisuju fenolnim sastojcima.

Dok se lipofilni fenoli, između kojih se ističu tokoferoli, mogu naći u ostalim biljnim uljima, neki hidrofilni fenoli svojstveni su isključivo maslinovom i arganovom ulju (Velasco i Dobarganes, 2002; Carrasco-Pancorbo, 2005, Rueda i sur., 2016). Fenolne kiseline, fenolni alkoholi, flavonoidi i lignani prateći su sastojci mnogih biljnih vrsta iz različitih botaničkih porodica, za razliku od *seko*-iridoida koji su prisutni isključivo u biljkama iz porodice *Oleaceae*, u koje se ubraja i *O. europea*, odnosno maslina, te *Argania spinosa*, odnosno plodovi arganovog stabla (Servilli i sur, 2004, Khallouki i sur., 2017).

Fenolna frakcija maslinovog ulja sastoji se od različitih skupina polarnih fenolnih sastojaka, uključujući fenolne alkohole (hidroksitirosol i tirosol), *seko*-iridoidne derivate (dialdehidinski

i aldehidni oblik elenolne kiseline povezane s hidroksitirosolom, i odgovarajuće derivate povezane s tirosolom), fenolne kiseline (vanilinska i *p*-kumarinske kiseline), lignani (pinoresinol i 1-acetoksinoresinol) i flavonoidi (luteolin i apigenin) (Quintero-Flórez, 2018).

S druge strane, glavni fenolni sastojci do sada identificirani u djevičanskom arganovom ulju su kavena kiselina, oleuropein, vanilinska kiselina, tirosol, ferulinska kiselina, siringinska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, katehol i rezorcinol (Rueda i sur., 2016).

Fenolni sastojci, kao aktivne tvari u maslinovom i arganovom ulju, imaju niz specifičnih bioloških djelovanja. Pokazalo se da mogu ujecati na funkciju trombocita, inhibirati proliferaciju tumorskih stanica, modulirati aktivnost širokog spektra enzima i staničnih receptora, a pokazuju i protuupalno, antimikrobno i antivirusno djelovanje (Borges i sur. 2017; D'Archivio i sur. 2010; Manach i sur., 2004; El Monfalouti, 2010). Povrh toga, fenolni sastojci jedni su od najzastupljenijih prehrambenih antioksidanasa, za koje postoji sve veći broj znanstvenih dokaza da mogu biti ključan posrednik korisnih učinaka mediteranske prehrane (Trichopoulou i Lagiou, 2001; Saura-Calixto i Goñi, 2006). Antioksidacijska svojstva polifenola dijelom su povezana s njihovom sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala zbog čega ovi sastojci mogu inhibirati oksidacijske procese, kao što je peroksidacija lipida u biološkim membranama i LDL-česticama (Borges i sur. 2017; D'Archivio i sur. 2010.; Manach i sur., 2004) i, općenito, ograničiti opseg oksidacijskog stresa koji se povezuje s etiopagenezom više od 100 različitih bolesti, ali i s procesom starenja (Cesaratto i sur. 2004, Devasagayam i sur. 2004).

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u hrani i prehrambenim proizvodima popularan je cilj istraživanja znanosti o hrani, budući je ovo pitanje vezana za rok trajanja,

senzorsku kvalitetu kao i uz potencijalne zdravstvene dobrobiti (Carrillo i sur. 2017; Serpen i sur., 2007)

U posljednjih 20 godina razvijeno je nekoliko metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti, a rasprava o pravom značenju i korisnosti ove vrste mjerenja još uvijek je otvorena (Cao i sur., 1995; Ghiselli i sur., 1995; Benzie i Strain, 1999). Premda se postavlja relevantnost *in vitro* testova kojima se u reakciji s umjetnim radikalima koji nemaju fiziološki značaj ukazuje na antioksidacijska svojstva fenolnih sastojaka, smatra se da mogu poslužiti za kategorizaciju različite hrane prema antioksidacijskom kapacitetu. Ovi podaci, zajedno s podacima o bioraspoloživosti te utjecaju prerade i načina konzumacije namirnice mogu poslužiti za procjenu prehrambenog unosa antioksidanasa te, u kombinaciji s fiziološki relevantnim biomarkerima, i za razjašnjavanje utjecaja dotičnog antioksidanasa na zdravlje (Halvorsen i sur., 2002)

Pored tradicionalnih metoda koje se temelje na praćenju oksidacije masti (Frankel, 1993), formiranju dienskih konjugata (Pryor i sur., 1993) i mjerenjima reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (Mitsuda i sur., 1981), uporaba obojenih radikalskih spojeva za procjenu antioksidacijskog kapaciteta uglavnom je u primjeni zbog niske cijene i dobre reproducibilnosti razvijenih postupaka (Re i sur., 1999; Pellegrini i sur., 1999).

Antioksidacijski kapacitet ulja obično se procjenjuje u kemijskim ekstraktima primjenom metoda za određivanje kapaciteta uklanjanja umjetnih radikala (DPPH metoda i ABTS metoda) i metoda izmjene jednog elektrona kojom se mjeri sposobnost redukcije (FRAP metoda; engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) (Kalogeropoulos i sur., 2014; Samaniego Sanchez i sur., 2007) .

U ovom radu za određivanje antioksidacijskog kapaciteta primjenjena je ABTS metoda, obzirom je osjetljivija u odnosu na DPPH metodu, a osim toga, ABTS test

sprovedenje pri blago alkalnoj vrijednosti pH, te je stoga primjereniji za procjeni antioksidacijskog kapaciteta u crijevnim digestima u usporedbi s FRAP metodom koja je prikladnija za ispitivanja u želučanim digestima (Bouayed i sur., 2011). Osim toga, za razliku od DPPH radikala koji u reakciji s antioksidansom uspostavlja stacionarno stanje tek nakon osam sati, ABTS radikal kation reagira brzo s aktivnim sastojcima uzorka i postiže stacionirano stanje unutar 30 minuta (Kopjar i sur., 2013).

Ekstrakcija tekuće-tekuće najčešće je korištena metoda izolacije fenolnih sastojaka iz ulja, a temelji se na izdvajanju fenolnih sastojaka pretežito metanolom ili vodenom otopinom metanola različitih omjera (Carrasco-Pancorbo i sur., 2005), ali tako pripremljena otopina obično nije zakiseljena, što se pokazalo kako poboljšava ekstrakciju (Peárez-Jimeánez i Saura-Calixto, 2005; Awika i sur., 2005).

Ipak, uporaba ekstrakcijskih postupaka s organskim otapalima možda nije pravi fiziološki pristup za mjerenje potencijalnih *in vivo* učinaka fenolnih sastojaka.

Uobičajena pretpostavka spomenutih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta je da se svi antioksidacijski spojevi prisutni u hrani mogu u potpunosti ekstrahirati različitim postupcima ekstrakcije. Međutim, složena struktura hrane, zajedno s položajem antioksidansa u takvom matriksu i njihovom topljivošću utječe na učinkovitost ekstrakcija.

Naime, većina namirnica sadrži lipofilne i hidrofilne antioksidacijske spojeve koji su prisutni u topljivom ili netopljivom obliku. Njihova topljivost ovisi o njihovom položaju unutar hrane i makromolekulama s kojima su povezane u prehranbenom matriksu (Huang i sur., 2002; Wu i sur., 2004; Cömert i Gökmen, 2017)

Tako se antioksidansi u hrani obično mogu naći u 2 oblika: slobodni (I) i vezani oblici (II, III i IV). Njihov se položaj u hrani može podijeliti u 5 kategorija: (I) bez kemijskih ili fizičkih interakcija s drugim makromolekulama; (II) kemijski vezani za makromolekule visoke

molekulske mase poput dijetalnih vlakana; (III) ionsko vezan na matricu hrane; (IV) fizički zatvoreni u matricu hrane; i (V) fizički zarobljeni u različitim staničnim strukturama. Štoviše, isti antioksidans može biti prisutan u oba oblika (slobodan ili vezan) u različitim namirnicama. Na primjer, ferulinska kiselina, jedna od glavnih fenolnih kiselina, prisutna je u slobodnom obliku u mnogim plodovima, dok se u žitaricama povezuje s polisaharidima stanične stijenke esterskim vezama. Netopljivi antioksidansi preferirano su lokalizirani na staničnoj stijenci kovalentnim vezama s netopljivim makromolekulama poput celuloze, arabinoglikana i proteina ili zbog samo-polimerizacije (Cömert i Gökmen, 2017).

Iz navedenih razloga, ne postoji jedinstveno otapalo ili smjesa za otapanje svih spojeva s antioksidacijskom aktivnošću prisutnih u strukturi hrane, a rezultirajući ekstrakti nisu reprezentativni za ukupni antioksidativni kapacitet dotične hrane.

Osim toga, nakon konzumacije, procesi probave mijenjaju fizičku strukturu hrane i reguliraju bioraspoloživost, kao i antioksidacijsku aktivnost vezanih antioksidanata u okolišu gastrointestinalnog trakta (Papillo i sur., 2014).

Stoga, pored koncentracije i kemijskih oblika antioksidanasa u hrani, općenito je prihvaćeno da je bioraspoloživost spoja prvi zahtjev kojeg mora zadovoljiti sastojak hrane da bi iskazao *in vivo* antioksidacijski potencijal (Pastoriza i sur., 2011). Ovaj zahtjev podrazumijeva da se bioaktivni sastojak mora osloboditi iz matriksa hrane tijekom probave, a na taj način postaje dostupan za apsorpciju u stanice crijeva (Borges 2017: Carbonell-Capella, Buniowska, Barba, Esteve, & Frígola, 2014).

Štoviše, literaturni podaci o polifenolima u hrani obično se odnose na polifenole analizirane u vodenim organskim ekstraktima hrane, a podrazumijevaju topljive ili ekstraktibilne fenolne sastojke niske ili srednje molekulske mase koji se lako ekstrahiraju različitim otapalima (voda, metanol, vodena/acetona, itd.). Pri tome, značajne količine potencijalno bioaktivnih

polifenola zaostaju u rezidualnoj frakciji (polifenoli koji se ne mogu ekstrahirati) i koji se ne uzimaju u obzir u kemijskim i biološkim istraživanjima. Stoga, često korišten izraz „ukupan sadržaj fenola " može biti nepotpun jer se odnosi samo na ekstraktibilne polifenole; stvarni ukupni sadržaj polifenola u hrani je sačinjeni od polifenola koji se mogu ekstrahirati i neekstraktibilnih polifenola (Saura-Calixto i sur., 2007). Prisutnost značajnih količina polifenola koji se ne mogu ekstrahirati zabilježena je u različitim namirnicama biljnog podrijetla (Bravo i sur., 1994; Bravo i sur. 1993), a uglavnom obuhvaćaju proantocijanidine-fenole visoke molekulske mase (preko 5000) od kojih su neki u slobodnom obliku, a neki su vezani za proteine i vlakna, (Bravo i sur., 1994). Iako je procijenjeno da je sadržaj polifenola koji se ne mogu ekstrahirati gotovo dvostruko veći od ekstraktibilnih polifenola, njihovi fiziološki učinci usko su povezani s njihovim stupnjem bioraspoloživosti (Saura-Calixto i sur., 2007).

U cilju proučavanja bioraspoloživosti i biološke aktivnosti spojeva iz hrane razvijeni su modeli probave *in vitro* koji mogu pružiti više informacija od onih dobivenih kemijskom analizom hrane. Ovi modeli omogućuju karakterizaciju spojeva uvjetima koji su bliski onim fiziološkim, uzimajući u obzir prisutnost probavnih enzima i njihove koncentracije, pH, i vrijeme potrebno za razgradnju, koncentraciju soli - između ostalih čimbenika (Minekus i sur., 2014). Pored toga, povezani s modelima staničnih linija omogućavaju istraživanje biljega antioksidacijske aktivnosti sastojaka hrane i njihovu apsorpciju u tanko crijevo, rasvjetljavajući potencijalni utjecaj ovih spojeva na zdravlje ljudi (Borges i sur., 2015; Soler i sur., 2010). Nadalje, pokazano je da bioraspoloživost procijenjena u *in vitro* modelima dobro korelira s rezultatima istraživanja na ispitanicima i životinjskim modelima (Borges i sur., 2015).

U skladu s tim, Pastoriza i sur. (2011) razvili su metodu za mjerenje globalnog antioksidacijskog odgovora hrane nakon probava *in vitro*. Metoda globalnog

antioksidacijskog odgovora (GAR) temelji se na primjeni probavnih enzima za oslobađanje antioksidanasa iz hrane, a pored topljive frakcije, uzima u obzir i netopljive frakcije zaostale nakon probave, u kojima potencijalno prisutni biološki aktivni spojevi mogu iskazati antioksidacijsku aktivnost fenomenom površinske reakcije (Carillo i sur., 2017). Pretpostavlja se da se u tom slučaju, reakcija gašenja slobodnih radikala odvija na sučelju između dvije heterogene faze pri čemu slobodne funkcionalne skupine na površini netopljivih sastojaka hrane dolaze u kontakt sa slobodnim radikalima prisutnim u otapalu (Serpén i sur., 2007).

Premda prvotno osmišljena za određivanje antioksidacijskog kapaciteta svježeg mesa, GAR metoda je prikladna za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ostale svježe i kuhane hrane, poput kruha, žitarica za doručak, svježe rajčice i mrkve, goveđeg odreska na žaru i maslina (Pastorizia i sur. 2011), ali biljnih ulja, kako su pokazali Seiquier i sur. (2015).

Stoga je u ovom radu za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih sastojaka i antioksidacijskog kapaciteta u uzorcima maslinovog i arganovog ulja, uz kemijski, primjenjen i fiziološki pristup temeljen na modelu *in vitro* probave, a podrazumjeva sukcesivnu inkubaciju uzorak probavnim enzimima (pepsin, pankreatina) u uvjetima koji oponašaju uvjete u probavnom sustavu (pH, temperatura, vremena inkubacije, otapalo, žučne soli). Primjenjeni preparat pankreatina sadrži lipazu iz gušterače koja hidrolizira triacilglicerole te bi trebala pogodovati oslobađanju polifenola vezanih ili adsorbiranih na te makronutrijente.

Postojeći bibliografski podaci pokazuju velike varijacije koncentracije fenolnih sastojaka u maslinovom ulju, od nekoliko do približno 1200 mg GAEkg¹ (Borges i sur., 2019), ovisno o sorti, uvjetima okoliša (tlo, klima), agronomskim čimbenicima (navodnjavanje, gnojidba), uzgoju (vrijeme ubiranja plodova, stupanj zrelosti) i tehnološkim aspektima proizvodnje ulja (sustav za skladištenje i ekstrakciju ulja), a za kemijske ekstrakte važna je i metoda ekstrakcije i polarosti korištenih otapala (Borges i sur.,

2015). U ovom radu analizom fenolnih sastojaka u kemijskom ekstraktu maslinovog ulja utvrđena je koncentracija ukupnih polifenola koja je iznosila $326,23 \pm 4,27$ mg GAEkg⁻¹ ulja. Usporedbom s podacima Montedoro i sur. (1992), analizirana maslinova ulja mogu se svrstati u kategoriju ulja sa srednjom koncentracijom ukupnih polifenola (200-500 mg GAEkg⁻¹ ulja).

Sadržaj fenolnih sastojaka u kemijskim ekstraktima arganovog ulja nešto je viši u odnosu na onaj određen u prethodnim istraživanjima. Tako Marfil i sur. (2011) izvješćuju kako je sadržaj fenolnih sastojaka u kemijskim ekstraktima metanola i vode (40:60; v/v) u rasponu između 6,07 i 152,04 mg GAEkg⁻¹. Ove razlike mogu biti posljedica genetskih karakteristika sorte, agronomskih praksi i tehnologije prerade, kao što su temperatura i vrijeme prženja sjemena, količina vode dodana tijekom postupka ekstrakcije ulja i uvjeti skladištenja, te metode ekstrakcije fenolnih sastojaka (Marfil i sur., 2011). Unatoč tome, vrijednosti u uzorcima maslinovog ulja bile su značajno više, što je u skladu s literaturnim podacima prema kojima arganovo ulje ima niži sadržaj polifenola u nego maslinovo ulje, ali viši sadržaj od ostalih jestivih biljnih ulja (Marfil i sur., 2011).

Digestivni čimbenici su među najvažnijim čimbenicima koji utječu na bioraspoloživost fenola, a oprečni rezultati zabilježeni su za sadržaj ukupnih fenola nakon probave ulja. Neki autori sugeriraju da se samo manji dio fenola u maslinovom ulju može smatrati bioraspoloživima (Dinella i sur., 2007), dok drugi vjeruju da je veliki udio bioraspoloživ (D'Archivio i sur., 2010). Posljedično, različita istraživanja izvijestila su o povećanom ili smanjenom sadržaju fenola nakon procesa probave (Huang i sur., 2014; Chen i sur., 2014; Wootton-Beard i sur., 2011).

Rezultati u ovom radu u skladu su s istraživanjima koja su otkrila porast sadržaja ukupnih fenola nakon probave ulja, obzirom da je sadržaj ukupnih fenola u bioraspoloživoj frakciji bio veći u usporedbi s kemijskom ekstrakcijom. Stoga ovi rezultati ukazuju na pozitivne učinke

procesa probave na otpuštanje bioaktivnih spojeva iz prehrambenog matriksa kako je već opaženo u uljima (Seiquer i sur., 2015; Quintero-Flórez i sur., 2018). Učinak procesa probave na sadržaj ukupnih fenola u odnosu na kemijski ekstrakciju varirao je od porasta od $1,62 \pm 0,01$, zabilježenog za maslinovo ulje lokalnog proizvođača, do $2,61 \pm 0,12$ za industrijski proizvedeno arganovo ulje. Ipak, sadržaj biorasploživih fenolnih sastojaka ostao je značajno veći u uzorcima maslinovog nego u uzorcima arganovog ulja zbog veće početne razlike, ali vjerojatno i različitog fenolnog profila maslinovog i arganovog ulja, obzirom da se, ovisno o kemijskoj strukturi, fenolni sastojci hidroliziraju na različit način, a također prolaze različite strukturne modifikacije zbog procesa konjugacije (D'Archivio i sur., 2010). Primjećeno je kako svi glavni fenoli maslinovog ulja pokazuju dobru stabilnost u želučanoj fazi probave, iako su iznimno osjetljivi na blago alkalne uvjete sredine, pa se stoga u tankom crijevu najveći dio ovih sastojaka transformira u druge nepoznate i/ili nedetektirane strukturne oblike različitih kemijskih svojstava i, posljedično, različite biorasploživosti i biološke aktivnosti (Soler i sur., 2010). Stoga, moguće je da nakon oslobađanja iz matriksa ulja ovi sastojci, podliježu daljnjim i različitim metaboličkim transformacijama te se, ovisno o strukturnim značajkama, hidroliziraju na različit način, a također prolaze različite strukturne modifikacije zbog procesa konjugacije. Za primjer, kavena kiselina može nastati hidrolizom klorogenične kiseline u tankom crijevu (Sato i sur., 2011), ili može nastati kao posljedica razgradnje *p*-kumarinske kiseline (Sato, 1969). Ovakve modifikacije fenolnih sastojaka u konačnici mogu uvjetovati da se sadržaj ukupnih fenola nakon probave ulja razlikuje od vrijednosti u kemijskim ekstraktima, ali i između uzoraka maslinovog ulja i arganovog ulja.

U dosadašnjim istraživanjama (Soler i sur. 2010; Dinnela i sur., 2007; Rubió i sur., 2014) uočeno je da su neki od glavih sastojaka maslinovog ulja, tirosol i hidroksitirosol, relativno stabilni nakon procesa probave *in vitro*, a jednako tako zabilježene su visoke vrijednosti biorasploživosti ovih sastojaka. Dinnela i sur. (2007) izvijestili su da je u ekstra

djevičanskim maslinovim uljima samo određeni udio fenola bioraspoloživ nakon *in vitro* probave i procesa dijalize te da ta vrijednost varira od 37 do 90%. Čini se da je hidroksitirozol presudan za bioraspoloživost fenola jer se tijekom probave oslobađa hidrolizom iz svojih prekursora, *seko-iridoida*, a njegova bioraspoloživost može biti veća od 100% (Rubió i sur., 2014).

S druge strane, prema rezultatima Rubio i sur. (2014) udio fenolnih sastojaka koji se oslobađa u bioraspoloživu frakciju maslinovog ulja veći je od onog u bioraspoloživoj frakciji arganovog ulja. Ovi su autori zabilježili nižu koncentraciju fenolnih sastojaka u bioraspoloživoj frakciji arganovog ulja nego u početnom ekstraktu ulja. Premda su u bioraspoloživoj frakciji detektirani različite fenolne kiseline, kao što su 4-dihidroksibenzojeva kiselina, tirozol, vanilinska kiselina, kavena kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, *o*-kumarinska kiselina i ferulinska kiselina, najviše koncentracije zabilježene su za vanilinsku kiselina, *p*-kumarinska i *o*-kumarinska kiselina. Premda je ustanovljeno smanjenje koncentracije nekih fenolnih spojeva u bioraspoloživoj frakciji u usporedbi s ishodnim kemijskim ekstraktom, koncentracija nekih spojeva se povećala, u prvom redu kavene kiseline. S izuzetkom luteolina, koji je otkriven u kemijskim ekstraktima, ali ne nakon *in vitro* probave, vrijednosti bioraspoloživosti varirali su od 2% (hidroksifeniloctena kiselina) do 84% (*p*-kumarinska kiselina). Vrijednost 100% dodijeljena je kavenoj kiselini, jer je otkrivena samo u bioraspoloživoj frakciji.

Zajedno s topljivom ili bioraspoloživom frakcijom, analizirana je rezidualna ili netopljiva frakcija nakon *in vitro* probave. Ta se frakcija obično odbacuje pri proučavanju bioraspoloživosti bioaktivnih spojeva, ali još uvijek može sadržavati metabolički aktivni fenolne sastojke. Prethodno je opisano da u rezidualnoj frakciji *Arbequina* maslinovog ulja nakon probave zaostaje 18-52% ukupnih fenola od ukupnog sadržaja (Borges i sur., 2019). Nasuprot tome, Seiquer i sur. (2015) pokazali su kako je u rezidualnoj frakciji nakon *in vitro*

probave maslinovog ulja prisutno 2,82% od ukupnih fenolnih sastojaka, dok oko oko 11% ukupnih fenola zaostaje u rezidualnoj frakciji nakon probave arganovog ulja. Saura-Calixto i sur. (2007) proučavali su bioraspoloživost ukupnih polifenola u ukupnoj prehrani te su također pokazali kako su male količine (10%) prisutne u rezidualnoj frakciji i zaostaju u matrici hrane nakon procesa probave. U skladu s tim su i rezultati u ovom radu, obzirom je određeno da od ukupnog sadržaja fenolu rezidualnoj frakciji maslinovog ulja zostaje od 4,33% do 4,7% fenolnih sastojaka, dok su te vrijednosti za arganovo ulje u rasponu od 7,84% do 8,68%. Razlike koje su utvrđene kod drugih autora mogu biti povezane s razlikama u kemijskoj strukturi ispitivanih fenolnih sastojaka, karakteristikama prehrambenog matriksa ili uvjetima *in vitro* probave.

Naime, bitan faktor koji određuje raspodjelu fenolnih sastojaka između topljive (vodene) frakcije i netopljive (lipidne) frakcije je njihova polarnost. Polarniji spojevi, fenolni alkoholi i kiseline, detektirani su uglavnom u vodenoj fazi, dok su hidrofobni spojevi (lignani i flavonodi) pretežno prisutni u lipidnoj frakciji. Lipidna frakcija može utjecati na probavljivost fenolnih sastojaka, prije svega onih lipofilnijih. Ovakvi sastojci pokazuju veći afinitet prema žučnim solima, a time i prema tvorbi micela, pri čemu se orijentiraju u hidrofobnu srž ovih struktura. Nastale micelle osiguravaju bolju topljivost tih sastojaka u lipidnom matriksu i bolju zaštitu tijekom probave (Ortega i sur., 2009). No, nema podataka o tome jesu li fenoli koji se prenose micelama više ili manje bioraspoloživi za crijevni unos (Quintero-Flórez i sur., 2018).

Nadalje, pored metaboličkih transformacija, na topljivost i bioraspoloživost fenolnih sastojaka utječu i interakcije s ostalim sastojcima hrane, kao što su željezo i drugi minerali, prehrambena vlakna i proteini s kojima fenoli mogu tvoriti komplekse koji nakon procesa probave zaostaju u rezidualnoj frakciji (Bouayed i sur., 2011).

Premda se rezidualna frakcija nakon probave ne uzima se u obzir pri proučavanju bioraspoloživosti fenolnih sastojaka, biološka aktivnost ovih spojeva ne smije se zanemariti budući da dopijevaju do debelog crijeva gdje se mogu izravno apsorbirati kroz epitel debelog crijeva u krvotok ili se pak metaboliziraju djelovanjem crijevne mikrobiote do niza spojeva niske molekulske mase koji se potencijalno mogu apsorbirati u krvotok (Cardona i sur., 2013).

Fenolni spojevi iz rezidualne frakcije maslinovog ulja uglavnom su *seko*-iridoidni derivati, lignani i flavonoli. Corona i sur. (2009) izvijestili su kako razgradnjom sekoiridoida djelovanjem crijevne mikrobiote nastaju tri glavna produkta, od kojih je jedan identificiran kao hidroksitrosol. Metabolizam posredovan bakterijskim vrstama u debelom crijevu može imati učinak na povećanje ukupne bioraspoloživosti hidroksitrosola, jer se oslobođeni hidroksitrosol može apsorbirati u debelo crijevo. Pored toga, ovi su autori zaključili da *seko*-iridoidni spojevi mogu posjedovati potencijalna prebiotska svojstva za bakterije roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* koje su ih u mogućnosti iskoristiti kao izvor ugljika. Lignani se metaboliziraju djelovanjem mikrobiote u proksimalnom dijelu debelog crijeva, u tzv. „lignane sisavaca“, enterodiol i enterolakton (Borriello i sur., 1985; Glitsø i sur., 2000). Pokazalo se da i enterodiol i enterolakton djeluju estrogeno *in vivo* i smanjuju rast stanica karcinoma dojke i prostate putem mehanizama ovisnih o estrogenu (Wang, 2002) i o estrogenu neovisnih mehanizama (Sung i Lautens, 1988). Flavonoidi se u debelom crijevu hidroliziraju u jednostavne fenolne kiseline, koje se apsorbiraju i dalje metaboliziraju u jetri (Moskaug i sur., 2005).

Povrh toga, neapsorbirani polifenoli u debelom crijevu mogu ograničiti učinke prooksidanasa iz hrane koji nastaju tijekom metabolizma bakterija u debelom crijevu (Williamson i Manach, 2005). Stoga, mora se uzeti u obzir i doprinos fenolnih sastojaka u rezidualnoj frakciji

globalnom antioksidacijskom kapacitetu probavljenih ulja. Štoviše, rezultati u ovom radu pokazuju kako nakon probave *in vitro* frakcije mogu biti nositelji antioksidacijskog kapaciteta maslinovog i arganovog ulja.

U literaturi postoji malo podataka o antioksidacijskim svojstvima maslinovog ulja tijekom probave *in vitro*, a tek jedno istraživanje u vezi s arganovim uljem. U ovom radu, karakteristike kemijskih ekstrakta maslinovog ulja bile su slične, sa značajno višim sadržajem ukupnih fenola i sa značajno višim vrijednostima kapaciteta uklanjanja ABTS radikala u usporedbi s onima u kemijskim ekstraktima arganovog ulja, što je i u skladu s rezultatima Seiquer i sur. (2015). Pronađene su i razlike u bioraspoloživim frakcijama, ali u suprotnom smislu. Slično kao i za ukupne fenolne sastojke, nakon procesa probave zabilježeno je veće povećanje antioksidacijskog kapaciteta za arganova ulja u odnosu na maslinova ulja, gdje je, arganovo ulje lokalnog proizvođača pokazalo najviši antioksidacijski kapacitet nakon *in vitro* probave, s vrijednostima koje su bile slične vrijednostima za industrijski proizvedeno arganovo ulje te maslinovo ulje lokalnog proizvođača, ali koje su se statistički značajno razlikovale u odnosu na industrijski proizvedeno maslinovo ulje. Antioksidacijski kapacitet u bioraspoloživim frakcijama povećao se nakon procesa probave u odnosu na vrijednosti određene u kemijskim ekstraktima, i to između 6,32 do 6,67 puta u uzorcima arganovog ulja te u rasponu od 2,5 do 2,80 puta za uzorke maslinovog ulja. Nadalje, pronadene su značajne korelacije između sadržaja fenola i antioksidacijskog kapaciteta prije i nakon *in vitro* probave, što podupire mišljenje da su fenolni sastojci uglavnom odgovorni za antioksidacijsku aktivnost uzoraka, kao što je prethodno sugerirano (Samaniego Sánchez i sur., 2007; Dinnella i sur., 2007).

Može se zaključiti da se fenolni spojevi brzo oslobađaju iz matrice ulja u fiziološkim uvjetima procesa probave te da ovi spojevi zadržavaju antiradikalna svojstva prema ABTS radikalu.

Potvrđujući rezultate u ovom radu, drugi autori izvješćuju o višim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta nakon probave svježe i prerađene hrane (Pastoriza i sur., 2011), različitih plodova voća (Chen i sur., 2014.) maslinovog i arganovog ulja (Seiquier i sur. 2015), u usporedbi s početnim kemijskim ekstraktima. Naprotiv, Dinnella i sur. (2007) izvjestili su o negativnom učinku procesa probave na antioksidacijski kapacitet ekstra djevičanskog maslinovog ulja mjerenjem kapaciteta uklanjanja ABTS radikala u dijaliziranoj frakciji dobivenoj nakon *in vitro* probave.

Tijekom procesa probave fenolni sastojci prolaze opsežnu biotransformaciju, proizvodeći različite metabolite tijekom hidrolize ili konjugacije koji zadržavaju ili poboljšavaju potencijalni blagotvorni učinak izvornih spojeva (Deiana i sur., 2018). Kako su ustanovili Borges i sur. (2019), nakon procesa probave izrazito se povećava koncentracija hidroksitirosola uslijed hidrolize derivata *sekoiridoida*. Prema literaturi, hidroksitirosol i ostali spojevi *ortho*-difenolne strukture, kao što su derivati aglikona oleuropeina, prepoznati su kao najučinkovitiji sredstvo za uklanjanje slobodnih radikala i prekidanje lančanih radikalskih reakcija te posjeduju značajno veću antioksidacijsku aktivnost od tirosola i srodnih monofenola (Quintero-Flórez i sur., 2018; Deiana i sur., 2018). Dakle, ovisno o profilu bioaktivnih spojeva u uljima, antioksidacijska svojstva će se tijekom probavnog procesa različito razvijati. Uzimajući u obzir da su *o*-difenoli povezani s visokom razinom antioksidacijskog kapaciteta u uljima, može se pretpostaviti da njihovo prisustvo može pridonijeti povećanju antioksidacijske aktivnosti tijekom probave.

Osim kemijske strukture, koncentracija fenolnih spojeva također može utjecati na antioksidacijski kapacitet crijevnog digesta, kako je naglašeno u ovom, ali i ranijim istraživanjima koja su ukazala na pozitivne korelacije između ukupnih fenolna i flavonoida i ukupne antioksidacijske aktivnosti (Bouayed i sur., 2011; Bouayed i sur., 2007). Uz to, reaktivnost antioksidanasa iz hrane posebno je pod utjecajem pH vrijednosti, faktora poznatog

da utječe na racemizaciju molekula uz posljedičan nastanak enantiomera s različitom biološkom reaktivnošću (Wootton-Beard, Moran, i Ryan, 2011). Kao rezultat, mogu nastati novi spojevi s višim kapacitetom uklanjanja slobodnih radikala i većom sposobnosti redukcije oksidanasa. Štoviše, smatra se prijelaz iz kiselog u alkalno okruženje pojačava antioksidacijsku moć fenolnih sastojaka, što potvrđuju i rezultati prethodnog istraživanja *in vitro* koji sugeriraju da fenoli grožđa pokazuju veće zaštitne učinke u crijevima u usporedbi s želucem, budući da pojedini fenoli uključujući, kvercetin i resveratrol iz ekstrakta grožđa, pokazuju veći antioksidacijski kapacitet izmjeren ABTS testom u neutralnim do blago alkalnim uvjetima crijeva u usporedbi s želucem (Tagliazucchi i sur., 2010). Pored pH vrijednosti i ostali uvjeti okoline utječu na aktivnost fenolnih sastojaka, poput interakcija fenola s mineralima koji se oslobađaju tijekom probave hrane. Na primjer, pokazalo se da je antioksidacijski kapacitet slobodnih fenola veći nego antioksidacijski kapacitet kelata fenola i željeza (Argyri i sur., 2006; El Hajji i sur., 2006).

Pored topljive frakcije, GAR metoda omogućuje i određivanje antioksidacijskog kapaciteta netopljive frakcije hrane, koja je zanemarivana u metodama za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta koje su temeljene na ekstrakciji biološki aktivnih sastojaka hrane.

Analiza rezidualnih frakcija digesta pokazala je da značajan udio antiradikalske aktivnosti ostaje ne apsorbiran nakon *in vitro* probave uzoraka arganovog ulja, dok su te aktivnosti u rezidualnoj frakciji maslinovog značajno niže. Ovi rezultati potvrđuju da rezidualne frakcije pokazuju potencijalnu biološku aktivnost pa, iako se ne mogu apsorbirati u sluznicu tankog crijeva, mogu iskazati antioksidacijsko djelovanje fenomenom površinskih reakcija, ili se metabolizirati djelovanjem crijevne mikrobiote te potom djelomično apsorbirati u završnim segmentima debelog crijeva gdje mogu pokazati značajne biološke učinke (Pastoriza i sur., 2011).

Naime, želudac i probavni trakt stalno su izloženi reaktivnim vrstama kisika (ROS), koji između ostalog, nastaju kao posljedica brojnih reakcija koje se odvijaju u organizmu, poput respiracijskog praska imunoloških stanica nakon njihove aktivacije bakterijama i toksinima iz hrane (Halliwell i sur., 2005). Stoga, u probavnom sustavu, antioksidansi mogu sudjelovati u održavanju redoks ravnoteže, neutraliziranjem prisutnih oksidansa i time smanjiti rizik od bolesti gastrointestinalnog trakta povezanih sa stvaranjem ROS tijekom procesa probave.

Naši rezultati su pokazali da su fenoli oslobođeni tijekom simulirane probave sposobni ukoniti slobodne radikale doniranjem elektrona, kao što je procijenjeno ABTS testom. Zbog višestruke prirode antioksidansa, ne smiju se zanemariti drugi mehanizmi antioksidacijskog djelovanja, kao što je sposobnost redukcije prooksidansa. Vjerojatno prevladava mehanizam koji se temelji na prijenosu elektrona jer zahtjeva nižu energiju (Bouayed i sur., 2011).

Izravni antioksidacijski učinci fenolnih sastojaka u gastrointestinalnom traktu vjerojatnije su značajniji od onih na drugim mjestima u organizmu (Corona i sur., 2009). Osim što štite stanice debelog crijeva od ozljeda izazvanog vodikovim peroksidom (Seiquer i sur, 2015; Manna i sur., 2002), izravni antioksidativni učinci fenolne frakcije arganovog i maslinovog ulja u gastrointestinalnom traktu uključuju: zaštitni učinak protiv oštećenja membrane izazvanih oksidiranim LDL-om, modifikacije citoskeletne mreže, očuvanje mikrotubularne organizacije, kontakta među stanicama i kontakta između stanica te zaštita od smrti stanica (Giovannini i sur., 1999). Stoga, osim izravnog antioksidacijskog djelovanja, fenolni spojevi mogu imati i neizravna djelovanja vezana uz utjecaj na različite unutarstanične signalne putove u stanicama sisavaca (Spencer i sur., 2004). Među tim djelovanjima, ističu se kemoprevencijski učinak u gastrointestinalnom traktu kojeg ovi sastojci ostvaruju u interakciji sa staničnim signalnim putovima, važnima u kontroli rasta, diferencijacije i

metastaza stanica tumora (Nair i sur., 2007). Iz toga razloga, buduća istraživanja antioksidacijskog kapaciteta maslinovog i arganovog ulja nakon probave in vitro, pored biorasplošive frakcije, trebala bi uzeti u obzir rezidualnu frakciju, u kojoj može zaostati značajan dio neapsorbiranih fenolnih sastojaka izražene biološke aktivnosti

Općenito naši rezultati potvrđuju da je proces probave ključan za definiranje antioksidacijskih svojstava ulja. Treba primjetiti da su količine polifenola, a samim tim i antioksidacijski kapacitet probavnih ekstrakata svih uzoraka, značajno više nego u vodeno-organskim ekstraktima. To sugerira da količina antioksidansa koji se iz matrice ulja otpuštaju u crijevu, i stoga antioksidacijski kapacitet ovih uzoraka, može biti veći nego što se može očekivati od podataka temeljenih na kemijskoj ekstrakciji. Stoga bi se promjene nastale tijekom probave trebale uzeti u obzir za predviđanje zdravstvenog potencijala ulja in vivo. Također, postupak in vitro probave može s nutricionističkog stajališta pridonijeti boljem poznavanju stvarne bioaktivne snage maslinovog i arganovog ulja, budući se procjena količine dostupnih hranjivih sastojaka i fitokemikalija iz svakodnevne prehrane ili u pojedinim organima, a jednako tako i mnoge preporuke o prehranbenog unosu temelje na podacima dobivenim analizom kemijskih ekstrakta, ne uzimajući u obzir promjene koje se događaju tijekom probave u gastrointestinalnom traktu (Bouayed i sur., 2011; Brat i sur., 2006).

Praktično bi to primjerice značilo sljedeće. Iz podataka o antioksidacijskom kapacitetu određene namirnice i uobičajene porcije koja se konzumira moguće je izračunati antioksidacijski kapacitet dotične namirnice po jedinici serviranja. Uzme li se da je antioksidacijski kapacitet maslina određen ABTS metodom 98,02 $\mu\text{mol TE}$, uz podatak da je uobičajena jedinica serviranja maslina u španjolskoj populaciji 51,01 g tada proizlazi da je antioksidacijski kapacitet maslina po jedinici serviranja 5000 $\mu\text{mol TE}$ /jedinici serviranja. Zna li se da u Španjolskoj svaki stanovnik prosječno konzumira 1,21 g maslina dnevno, slijedi da

je dnevni unos antioksidanasa iz maslina za opću populaciju 81 $\mu\text{mol TE/dan}$ (Pastorizia i sur., 2011).

Međutim, treba istaknuti da u ovom radu model probave in vitro primjenjen za simulaciju samo nekoliko aspekata procesa probave in vivo, a može se poboljšati promjenom staničnih kultura kao što je stanična linija Caco-2 (Jailani i Williamson, 2014; Mesías, i sur., 2009). U kulturi, ova stanična linija ima svojstva slična crijevnom epitelu, pa se koristi kao pogodan model za proučavanje apsorpcije fenola (Soler i sur., 2010) i antioksidacijskog odgovora na staničnoj razini (Ruiz-Roca i sur., 2011). Potrebna su i dodatna istraživanja uz primjenu HPLC analize radi određivanja različitih skupina fenola te pojedinih fenolnih sastojaka u vodenim organskim ekstraktima i ostacima nakon probave što bi moglo dati dodatne informacije o spojevima odgovornim za antioksidacijski kapacitet maslinovog i arganovog ulja.

6. ZAKLJUČAK

U cilju određivanja sadržaja ukupnih fenolnih sastojaka i antioksidacijskog kapaciteta maslinovog i arganovog ulja u ovom radu primjenjen je kemijski pristup, koji se temelji na određivanju ekstraktibilnih fenolnih sastojaka u organsko-vodenim ekstraktima ulja i antiradikalske aktivnosti tako priređenih ekstrakata te model *in vitro* probave koji omogućuje karakterizaciju fenolnih sastojaka u uvjetima koji su slični onim fiziološkim.

Rezultati su pokazali da je sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka i antioksidacijski kapacitet u bioraspoloživim frakcijama dobivenim nakon probave uzoraka ulja značajno viši nego u vodeno-organskim ekstraktima, što ukazuje da se fenolni spojevi brzo oslobađaju iz matriksa ulja u fiziološkim uvjetima procesa probave te da ovi spojevi zadržavaju antiradikalska svojstva prema ABTS radikal. Pri tome, to je povećanje bilo više u uzorcima arganovog ulja nego u maslinovim uljima. Statistički značajna korelacija između sadržaja fenola i antioksidacijskog kapaciteta prije i nakon *in vitro* probave podupire mišljenje da su fenolni sastojci glavi nositelji antioksidacijske aktivnosti uzoraka. Međutim značajan udio fenola od ukupnog sadržaja fenolnih sastojaka zaostaje u rezidualnoj frakciji analiziranih ulja nakon probave *in vitro*, a te su vrijednosti statistički značajno više u rezidualnim frakcijama arganovog ulja. Iako se ne mogu apsorbirati u sluznicu tankog crijeva, rezidualne frakcije

valjalo bi uzeti u obzir pri određivanju globalnog antioksidacijskog kapaciteta ulja obzirom da ih odlikuje značajna antiradikalska aktivnost. Stoga obje frakcije dobivene nakon postupka probave *in vitro* mogu biti nositelji zdravstvenih učinaka fenolnih sastojaka iz maslinovog i arganovog ulja.

Ukratko, antioksidacijski kapacitet maslinovog i arganovog ulja može biti podcijenjen jer otapala koja se obično koriste za ekstrakciju ne omogućuju izdvajanje neekstraktibilnih fenolnih sastojaka visokog antioksidacijskog kapaciteta, niti omogućuju potpuno oslobađanje sastojaka s antioksidacijskim djelovanjem iz matriksa ulja. S druge strane, analiza fenolnih sastojaka nakon enzimske probave *in vitro*, koja uzima u obzir bioraspoložive i rezidualne frakcije, sugerira da antioksidacijsko djelovanje maslinovog i arganovog ulja u crijevu ljudi može biti više nego što se može očekivati od podataka utemeljenih na mjerenjima vodenorganskih ekstrakata koji se uglavnom nalaze u literaturi. To se prije svega odnosi na rezidualne frakcije arganovog ulja u kojima zaostaje najveći udio antiradikalskog kapaciteta.

Može se postaviti hipoteza da pri ocjenjivanju antioksidacijskog kapaciteta ulja treba uzeti u obzir i metabolite koji nastaju duž gastrointestinalnog trakta tijekom metaboličkih transformacija matične komponente nakon njenog oslobađanja iz matriksa ulja, obzirom da ti metaboliti zadržavaju ili poboljšavaju potencijalni blagotvorni učinak izvornih spojeva. Temeljem toga može se predložiti da se pri ocjenjivanju antioksidacijskog kapaciteta maslinovog i arganovog ulja može dati prednost metodi globalnog antioksidacijskog odgovora nad metodama temeljenim na kemijskoj ekstrakciji, a time bi se i dostupne informacije o doprinosu ovih ulja antioksidacijskom kapacitetu cjelokupne prehrane trebale revidirati i prilagoditi fiziološkom GAR pristupu.

7. LITERATURA

- Argyri K., Komaitis M., & Kapsokefalou M. (2006). Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry*, 96(2), 281–289.
- Awika J. M., Rooney L. W., & Waniska, R. D. (2005). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90(1-2), 293–301.
- Benzie I. F. F., & Strain J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 15–27.
- Bohn T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429–452.
- Borges T. H., Cabrera-Vique C., & Seiquer I. (2015). Antioxidant properties of chemical extracts and bioaccessible fractions obtained from six Spanish monovarietal extra virgin olive oils: Assays in Caco-2 cells. *Food & Function*, 6(7), 2375–2383.

- Borges T. H., Pereira J. A., Cabrera–Vique C., & Seiquer I. (2017). Study of the antioxidant potential of Arbequina extra virgin olive oils from Brazil and Spain applying combined models of simulated digestion and cell culture markers. *Journal of Functional Foods*, 37, 209–218.
- Borges T. H., Serna A., López L. C., Lara L., Nieto R., & Seiquer I. (2019). Composition and Antioxidant Properties of Spanish Extra Virgin Olive Oil Regarding Cultivar, Harvest Year and Crop Stage. *Antioxidants*, 8(7), 217.
- Borrellio S. P., Setchell K. D. R., Axelson M., & Lawson A. M. (1985). Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. *Journal of Applied Bacteriology*, 58(1), 37–
- Bouayed J., Hoffmann L., & Bohn T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14–21.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., & Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Bravo L., Abia R., & Saura-Calixto F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1481–1487.
- Bravo L., Man˜as E., & Saura-Calixto F. (1993). Dietary non-extractable condensed tannins as indigestible compounds: effects on faecal weight, and protein and fat excretion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63, 63–68.
- Cai J, Sun WM, Lu SC. Hormonal and cell density regulation of hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression. *Mol Pharmacol*. 1995 Aug;48:212-8.

- Cao G.; Verdon C. P.; Wu A. H. B.; Wang H.; Prior R. L. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the Cobas Fara II. *Clin. Chem.* 1995, 41, 1738–1744.
- Figure 5. Percentage contributions of insoluble and soluble matters to the antioxidant capacities of some foods and food ingredients. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 55, No. 19.
- Carbonell-Capella J. M., Buniowska M., Barba F. J., Esteve M. J., & Frígola A. (2014). Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171.
- Cardona F., Andrés-Lacueva C., Tulipani S., Tinahones F. J., & Queipo-Ortuño M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422.
- Cardona F., Andrés-Lacueva C., Tulipani S., Tinahones F. J., & Queipo-Ortuño M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422.
- Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Gallina-Toschi T., & Fernández-Gutiérrez A. (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of Separation Science*, 28(9-10), 837–858.
- Carrillo C., Barrio Á., del Mar Cavia M., & Alonso-Torre S. (2016). Global antioxidant response of meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), 2358–2365.
- C. Dinnella P. Minichino A. M. D’Andrea and E. Monteleone J. Agric (2007.). Bioaccessibility and Antioxidant Activity Stability of Phenolic Compounds from Extra-Virgin Olive Oils during in Vitro Digestion. *Food Chem.*, 2007, 55, 8423–8429.

- Cesaratto L., Vascotto C., Calligaris S., & Tell G. (2004). The importance of redox state in liver damage. *Annals of Hepatology*, 3(3), 86–92.
- Chen G.-L., Chen S.-G., Zhao Y.-Y., Luo C.-X., Li, J., & Gao Y.-Q. (2014). Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. *Industrial Crops and Products*, 57, 150–157.
- Chiesi C., Fernandez-Blanco C., Cossignani L., Font G., & Ruiz M. J. (2015). Alternariol-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oil. *Toxicon*, 93, 103–111.
- Cömert E. D., & Gökmen V. (2017). Antioxidants Bound to an Insoluble Food Matrix: Their Analysis, Regeneration Behavior, and Physiological Importance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 382–399.
- Corona G., Spencer J., & Dessì M. (2009). Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicology and Industrial Health*, 25(4-5), 285–293.
- Corona G, Spencer JPE, Dessì MA (2009) Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol Ind Health* 25:285–293
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001.
- Cuvelier, M. E., Richard, H., and Berset, C. (1992): Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-Phenols - Structure Activity Relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56, 324-325.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342.

- Deiana, M., Serra, G., & Corona, G. (2018). Modulation of intestinal epithelium homeostasis by extra virgin olive oil phenolic compounds. *Food & Function*, 9(8), 4085–4099.
- Devasagayam PA, Tilak JC, Boloor KK, Sane Ketaki S, Ghaskadbi Saroj S, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India* 2004;52:794-804.
- Quintero-Flórez, A., Pereira-Caro, G., Sánchez-Quezada, C., Moreno-Rojas, J. M., Gaforio, J. J., Jimenez, A., & Beltrán, G. (2017). Effect of olive cultivar on bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic fraction of virgin olive oil. *European Journal of Nutrition*, 57(5), 1925–1946.
- El Hajji, H., Nkhili, E., Tomao, V., & Dangles, O. (2006). Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Research*, 40, 303–320.
- Frankel, E. N. (2011). Nutritional and Biological Properties of Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 785–792.
- Frankel, E. N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology*, 4(7), 220–225.
- Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 2002 Aug 1;177:91-104.
- Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Haddad, A., Matthäus, B., & Charrouf, Z. (2011). Oxidative stability of edible argan oil: A two-year study. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 1–8.

- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., & Ferro-Luzzi, A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 29–36.
- Giovannini, C., Straface, E., Modesti, D., Coni, E., Cantafora, A., De Vincenzi, M., ... Masella, R. (1999). Tyrosol, the Major Olive Oil Biophenol, Protects Against Oxidized-LDL-Induced Injury in Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1269–1277.
- Glitsø LV, Mazur WM, Adlercreutz H, Wähälä K, Mäkelä T, Sandström B, Bach Knudsen KE (2000) Intestinal metabolism of rye lignans in pigs. *British Journal of Nutrition* 84:429–437
- Halliwell, B., Rafter, J., & Jenner, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: Direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 268S–276S.
- Halvorsen, B. L., Holte, K., Myhrstad, M. C. W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S. F., ... Blomhoff, R. (2002). A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461–471.
- Han, X. Z., Shen, T., and Lou, H. X. (2007): Dietary polyphenols and their biological significance [Review]. *International Journal of Molecular Sciences* 8, 950-988.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated β -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1815–1821.
- Huang, H., Sun, Y., Lou, S., Li, H., & Ye, X. (2014). In vitro digestion combined with cellular assay to determine the antioxidant activity in Chinese bayberry (*Myrica rubra*

- Sieb. et Zucc.) fruits: A comparison with traditional methods. *Food Chemistry*, 146, 363–370.
- Kalogeropoulos, N., Kaliora, A. C., Artemiou, A., & Giogios, I. (2014). Composition, volatile profiles and functional properties of virgin olive oils produced by two-phase vs three-phase centrifugal decanters. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 272–279.
 - Khallouki, F., Eddouks, M., Mourad, A., Breuer, A., & Owen, R. (2017). Ethnobotanic, Ethnopharmacologic Aspects and New Phytochemical Insights into Moroccan Argan Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2277.
 - López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., Ros, E., De Caterina, R., Badimón, L., Covas, M. I., ... Yiannakouris, N. (2010). Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(4), 284–294.
 - Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
 - Manna C, D'Angelo S, Migliardi V, Loffredi E, Mazzoni O, Morrica P, Galletti P, Zappia V (2002) Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *J Agric Food Chem* 50:6521–6526
 - Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Montedoro, G., and Zappia, V. (1999): Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *Journal of Nutritional Biochemistry* 10, 159-165
 - Marfil, R., Giménez, R., Martínez, O., Bouzas, P. R., Rufián-Henares, J. A., Mesías, M., & Cabrera-Vique, C. (2011). Determination of polyphenols, tocopherols, and

- antioxidant capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa*, Skeels). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(7), 886–893.
- M. D’Archivio, C. Filesi, R. Vari, B. Scazzocchio and R. Masella (2010). Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, 11, 1321–1342
 - Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113–1124.
 - Mitsuda, H., Yasumoto, K., & Iwami, K. (1966). Antioxidative Action of Indole Compounds during the Autoxidation of Linoleic Acid. *Eiyo To Shokuryo*, 19(3), 210–214.
 - Monfalouti, H. E., Guillaume, D., Denhez, C., & Charrouf, Z. (2010). Therapeutic potential of argan oil: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(12), 1669–1675.
 - Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., & Miniati, E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1571–1576.
 - Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M. C., & Blomhoff, R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 277S–283S.
 - Ortega, N., Reguant, J., Romero, M.-P., Macià, A., & Motilva, M.-J. (2009). Effect of Fat Content on the Digestibility and Bioaccessibility of Cocoa Polyphenol by an in Vitro Digestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5743–5749.

- Papillo, V. A., Vitaglione, P., Graziani, G., Gokmen, V., & Fogliano, V. (2014). Release of Antioxidant Capacity from Five Plant Foods during a Multistep Enzymatic Digestion Protocol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4119–4126.
- Pastoriza, S., Delgado-Andrade, C., Haro, A., & Rufián-Henares, J. A. (2011). A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chemistry*, 129(4), 1926–1932.
- Pellegrini, N.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Screening of dietary carotenoids and carotenoids-rich fruits extracts for the antioxidant activities applying ABTS radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol.* 1999, 299, 379–389.
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2005). Literature Data May Underestimate the Actual Antioxidant Capacity of Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 5036–5040.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Pryor, W. A., Cornicelli, J. A., Devall, L. J., Tait, B., Trivedi, B. K., Witiak, D. T., & Wu, M. (1993). A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(13), 3521–3532.
- Quintero-Flórez, A., Pereira-Caro, G., Sánchez-Quezada, C., Moreno-Rojas, J. M., Gaforio, J. J., Jimenez, A., & Beltrán, G. (2017). Effect of olive cultivar on bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic fraction of virgin olive oil. *European Journal of Nutrition*, 57(5), 1925–1946.
- Reşat Apak,†, Shela Gorinstein, Volker Böhm, Karen M. Schaich, Mustafa Özyürek, and Kubilay Güçlü. (2009.). *Methods of Measurement and Evaluation of Natural*

Antioxidant Capacity/Activity. *Chemistry International -- Newsmagazine for IUPAC*, 31(4).

- Roginsky, V., Lissi, E. A. (2005) Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92, 235.
- Rubió, L., Macià, A., Castell-Auví, A., Pinent, M., Blay, M. T., Ardévol, A., et al. (2014). Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models. *Food Chemistry*, 149, 277–284.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Rueda, A., Cantarero, S., Seiquer, I., Cabrera-Vique, C., & Olalla, M. (2017). Bioaccessibility of individual phenolic compounds in extra virgin argan oil after simulated gastrointestinal process. *LWT*, 75, 466–472.
- Samaniego Sánchez, C., Troncoso González, A. M., García-Parrilla, M. C., Quesada Granados, J. J., López García de la Serrana, H., & López Martínez, M. C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593(1), 103–107.
- Satô M. (1969). The conversion of phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid. *Phytochemistry*, 8(2), 353–362.
- Sato Y., Itagaki S., Kurokawa T., Ogura J., Kobayashi M., Hirano T., Sugawara M. & Iseki K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 403, 136–138.
- Saura-Calixto F., & Goñi I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94(3), 442–447.

- Saura-Calixto F., Serrano J., & Goñi I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501.
- Seiquer I., Rueda A., Olalla M., & Cabrera-Vique C. (2015). Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, 188, 496–503.
- Serpen A., Capuano E., Fogliano V., & Gökmen V. (2007). A New Procedure To Measure the Antioxidant Activity of Insoluble Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7676–7681.
- Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G., & Morozzi G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 113–127.
- Servili M., Sordini B., Esposto S., Urbani S., Veneziani G., Di Maio I., ... Taticchi A. (2013). Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*, 3(1), 1–23.
- Schultz E., Anter E., and Keaney J. F. (2004): Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function [Review]. *Current Medicinal Chemistry* 11, 1093-1104.
- Soler A., Romero M. P., Macià A., Saha S., Furniss C. S. M., Kroon P. A., & Motilva M. J. (2010). Digestion stability and evaluation of the metabolism and transport of olive oil phenols in the human small-intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line. *Food Chemistry*, 119(2), 703–714.
- 86. Spencer J. P. ., Abd El Mohsen M. M., & Rice-Evans C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423(1), 148–161.

- Sung M., Lautens M., Thompson LU (1998) Mammalian lignans inhibit the growth of estrogen-independent human colon tumor cells. *Anticancer Res* 18:1405–1408.
- Tagliazucchi D., Verzelloni E., Bertolini D., & Conte A. (2010). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599–606.
- Trichopoulou A., Martínez-González M. A., Tong T. Y., Forouhi N. G., Khandelwal S., Prabhakaran D., de Lorgeril M. (2014). Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. *BMC Medicine*, 12(1).
- Trujillo M., Mateos R., Collantes de Teran L., Espartero J. L., Cert R., Jover M., ... Parrado, J. (2006). Lipophilic Hydroxytyrosyl Esters. Antioxidant Activity in Lipid Matrices and Biological Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3779–3785.
- Wang L. Q. (2002). Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *Journal of Chromatography B*, 777(1-2), 289–309.
- Williamson G., & Manach C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 243S–255S.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217–224.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026–4037.

- Visioli, F., Bellosta, S., and Galli, C. (1998): Oleuropein, the Bitter Principle of Olives, Enhances Nitric Oxide Production by Mouse Macrophages. *Life Sciences* 62, 541-546.
- Visioli, F., Bogani, P., Grande, S., and Gail, C. (2004): Olive oil and oxidative stress [Review]. *Grasas y Aceites* 55, 66-75.
- Z. Charrouf and D. Guillaume .Phenols and Polyphenols from *Argania spinosa*. *American Journal of Food Technology*. 2 (7): 679-683, 2007.

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Ivona Perković

Datum rođenja: 19. rujna 1997.

Mjesto rođenja: Zadar

Državljanstvo: hrvatsko

Narodnost: Hrvatica

Adresa: Put Gospe od Zečeva 81,

23235 Vrsi

Telefon: +385921888753

E-mail: ivona.perkovic@gmail.com

Obrazovanje:

2004.-2012. Osnovna škola Petra Zoranića Nin, Ul. Jurja Barakovića 24, 23232,
Nin

2004.-2012. Područna škola Vrsi, Dr. Franje Tuđmana 33, 23235, Vrsi

2012.-2016. Gimnazija Vladimira Nazora Zadar, Ulica Perivoj Vladimira Nazora,
23000, Zadar

2016.-2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Preddiplomski sveučilišni
studij sanitarnog inženjerstva, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka

Radno iskustvo:

srpanj 2018. – rujan 2018. Prodavač, suvenirnica Klen d.o.o, Vrsi

srpanj 2019. – rujan 2019. Prodavač, suvenirnica Klen d.o.o, Vrsi

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezik: engleski, talijanski

