

# Ispitivanje inhibicije $\alpha$ -glukozidaze odabranim polifenolima

---

**Pavičić, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:896486>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



**Marija Pavičić**

**Ispitivanje inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze odabranim  
polifenolima**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju, kolegiju Farmakognozija 1 pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu, uloženom vremenu i trudu te pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala i asistentici Mateji Mervić, mag. pharm., na korisnim savjetima i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala svim mojim dragim prijateljicama i kolegicama koje su mi olakšale, uljepšale i obogatile studentske dane.*

*Veliko hvala mojoj obitelji, a najveće mami i tati na beskrajnoj podršci, razumijevanju, strpljenju i ljubavi. Posebno hvala sekama koje svojom pozitivnom energijom i smijehom sve čine boljim.*

*Neizmjerne hvala i mojoj ljubavi što mi je pouzdan i siguran oslonac kako u najljepšim, tako i najtežim trenucima.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Polifenoli .....	2
1.1.1. Flavonoidi .....	6
1.1.2. Fenolne kiseline .....	13
1.1.3. Stilbeni .....	17
1.2. Šećerna bolest .....	20
1.3. Antidiabetici .....	21
1.3.1. Inhibitori $\alpha$ -glukozidaze .....	23
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	25
3. MATERIJALI I METODE .....	27
3.1. MATERIJALI .....	28
3.1.1. Kemikalije .....	28
3.1.2. Ispitivani polifenolni spojevi .....	28
3.1.3. Instrumenti i pribor .....	29
3.1.4. Programski paketi .....	30
3.2. METODA .....	30
3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje sposobnosti inhibicije $\alpha$ -glukozidaze .....	30
3.2.2. Priprema reagensa i ispitivanih otopina .....	31
3.2.3. Ispitivanje inhibicije $\alpha$ -glukozidaze .....	32
3.2.4. Određivanje postotka inhibicije $\alpha$ -glukozidaze .....	33
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	34
4.1. Inhibicijski učinak flavonoida na aktivnost $\alpha$ -glukozidaze .....	35
4.2. Inhibicijski učinak fenolnih kiselina na aktivnost $\alpha$ -glukozidaze .....	38
4.3. Inhibicijski učinak resveratrola na aktivnost $\alpha$ -glukozidaze .....	40
4.4. Poveznica strukturnih obilježja i inhibicijskog učinka ispitivanih flavonoida .....	40
4.5. Poveznica strukturnih obilježja i inhibicijskog učinka ispitivanih fenolnih kiselina .....	44
4.6. Poveznica strukturnih obilježja i inhibicijskog učinka resveratrola .....	45
5. ZAKLJUČCI .....	46
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	48
7. LITERATURA .....	50
8. SAŽETAK/SUMMARY .....	56
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

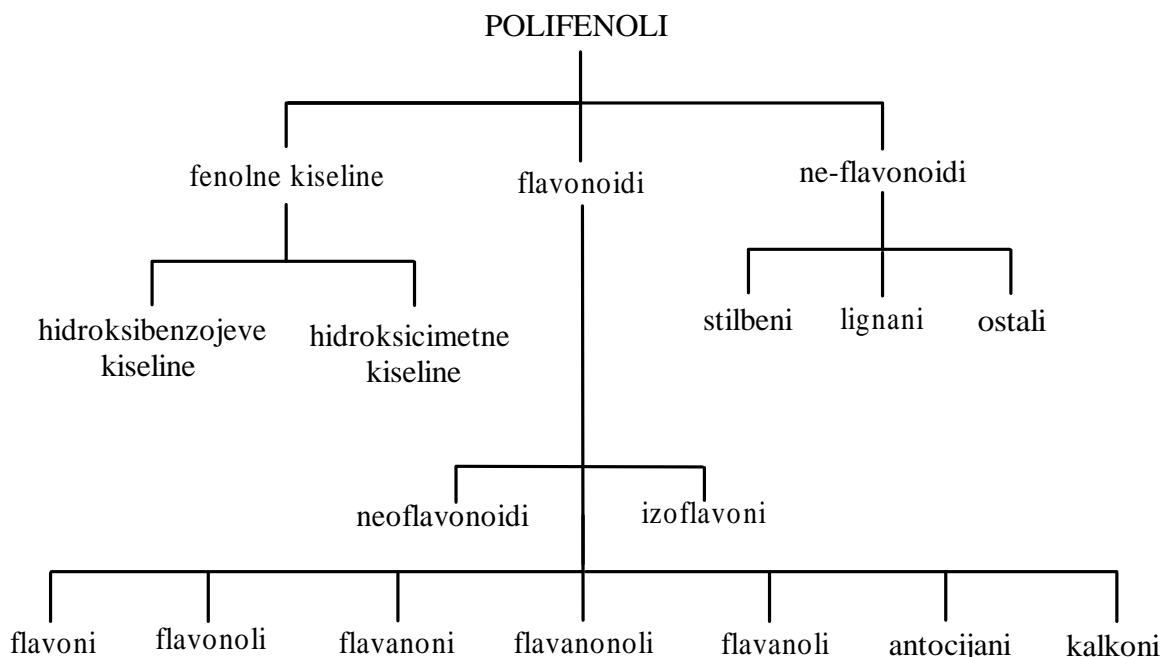
## **1. UVOD**

## 1.1. Polifenoli

Polifenoli su organski spojevi koji nastaju kao sekundarni produkti biljnog metabolizma i čine jednu od najbrojnijih i najzastupljenijih skupina tvari biljnoga porijekla. Riječ je o vrlo heterogenoj skupini spojeva koja obuhvaća preko 8000 različitih kemijskih struktura. Glavno strukturno obilježje svih polifenola jest prisutnost jedne ili više hidrosiliranih aromatskih jezgri (Di Lorenzo i sur., 2021).

Strukturni oblici polifenola variraju od jednostavnijih do složenijih, visokopolimeriziranih molekula. Primarno se pojavljuju u konjugiranom obliku s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na jednu ili više fenolnih funkcionalnih skupina. Šećernu komponentu mogu činiti monosaharidi, disaharidi i oligosaharidi. Najčešći vezani šećeri su glukoza, galaktoza, ramnoza, arabinoza, ksiloza, manosa te glukuronska i galakturonska kiselina. Osim sa šećerima, moguće je povezivanje i s drugim spojevima poput amina, lipida te karboksilnih i organskih kiselina (Escarpa i Gonzalez, 2001).

Klasifikacija polifenolnih spojeva u pojedine skupine temelji se na njihovoj raznolikoj kemijskoj strukturi. Podjela se tako može vršiti s obzirom na broj fenolnih prstenova/jedinica u strukturi te broj strukturnih elemenata koji te prstenove povezuju (Manach i sur., 2004). Stupanj oksidacije, hidrosilacije, metilacije i glikozilacije su najčešće varijacije u osnovnoj strukturi. Kao što je prikazano na Slici 1, polifenoli se mogu podijeliti u tri glavne klase: fenolne kiseline, flavonoidi i ne-flavonoidi (Bertelli i sur., 2021; Rambaran, 2020).



**Slika 1.** Podjela polifenola (preuzeto i prilagođeno prema Rambaran, 2020).

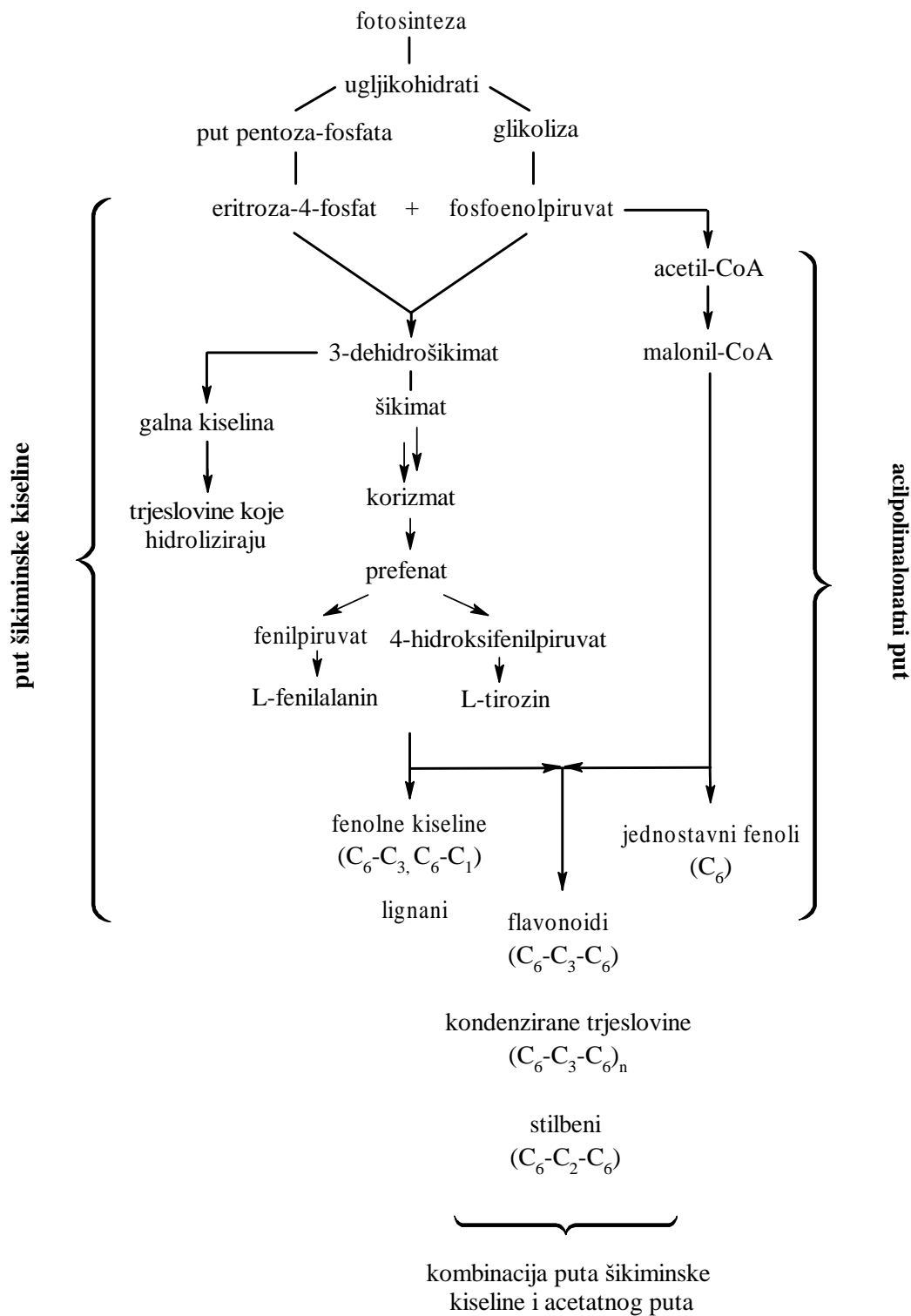
Sinteza polifenola odvija se putem dva glavna biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni (acilpolimalonatni) put (Slika 2). Put šikiminske kiseline dovodi do nastanka fenilpropana, fenolnih kiselina te kumarina i lignana, a acetatnim putem nastaju najjednostavniji fenoli. Kombinacijom puta šikiminske kiseline i acilpolimalonatnog puta nastaju stilbeni, flavonolignani, izoflavonoidi te flavonoidi kao najvažnija i najbrojnija skupina polifenolnih spojeva (Dewick, 2002; Escarpa i Gonzalez, 2001).

Općenito, put šikiminske kiseline glavni je biosintetski put nastanka prirodnih aromatskih spojeva. Šikiminska kiselina je tako glavni prekursor u sintezi aromatskih aminokiselina u višim biljkama i mikroorganizmima, ali ne i u životinja (Vladimir-Knežević, 2008). Put šikiminske kiseline započinje povezivanjem eritroze 4-fosfata, podrijetlom iz puta pentoza-fosfata, te fosfoenolpiruvata nastalog u procesu glikolize. Njihovom kondenzacijom te ciklizacijom nastalog C<sub>7</sub> spoja 3-deoksirabinoheptulozonata 7-fosfata nastaje 3-dehidrošikiminska kiselina. Njezinom dehidratacijom nastaje 3-dehidroksišikiminska kiselina koja se reducira do šikiminske kiseline. Vrlo važan spoj šikimatnog puta jest korizminska kiselina. Povezivanjem fosfoenolpiruvata s 3-

fosfošikimatom, nastalim ATP-ovisnom fosforilacijskom reakcijom, stvara se 3-fosfoenolpiruvilšikimat (EPSP), uz enzim EPSP sintazu. Daljnjom 1,4-trans-eliminacijom fosforne kiseline uz korizmat-sintazu nastaje korizmat. Pregradnjom korizmata uz korizmat-mutazu u prefenat započinje sinteza aromatskih aminokiselina. Dekarboksilacijom i aromatizacijom prefenata te transaminacijom nastalog fenilpiruvata nastaje L-fenilalanin. Sa druge strane L-tirozin nastaje transaminacijom 4-hidroksifenilpiruvata nastalog dehidracijom *p*-hidroksilne skupine prefenata uz odcjepljenje CO<sub>2</sub>. Nastale aromatske aminokiseline, L-fenilalanin i L-tirozin, dalje služe kao važni prekursori u biosintezi brojnih sekundarnih metabolita kao što su fenoli, fenolne kiseline, fenilpropani, flavonoidi, lignani i dr. (Dewick, 2002).

Acilpolimalonatni put uključuje aktivirani acetat te stvaranje poliketida koji se naknadno cikliziraju u polifenole (Bertelli i sur., 2021). Početni spoj jest acetil-CoA, tioester octene kiseline, nastao oksidativnom dekarboksilacijom pirogroždane kiseline nastale glikolizom iz glukoze. Acetil-CoA prevodi se u malonil-CoA reakcijom karboksilacije s ugljikovim dioksidom (CO<sub>2</sub>) uz ATP i koenzim biotin. ATP i ugljikov dioksid u obliku karbonata (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tvore miješani anhidrid koji karboksilira koenzim u biotinski enzimski kompleks. Pretvorbom acetil-CoA u malonil-CoA  $\alpha$ -vodikovi atomi postaju kiseliji jer su okruženi dvjema karboksilnim skupinama, što olakšava daljnje reakcije (Dewick, 2002). Malonil-CoA tako sudjeluju u nadograđivanju karboksilnih kiselina nastalih putem šikiminske kiseline prilikom sinteze flavonoida i stilbena. Da bi došlo do nadogradnje, karboksilna skupina kiseline se najprije prevodi u tioester pomoću CoA koji zatim reagira s tri molekule malonil-CoA, uz tvorbu poliketida. Formiranjem karbaniona između C(O) i COSCoA zatvara se šesteročlani prsten (A) zbog intramolekulskog napada nastalog karbanionana na keto skupinu udaljenu 6 mjesta od njega (Škalamera, 2020).



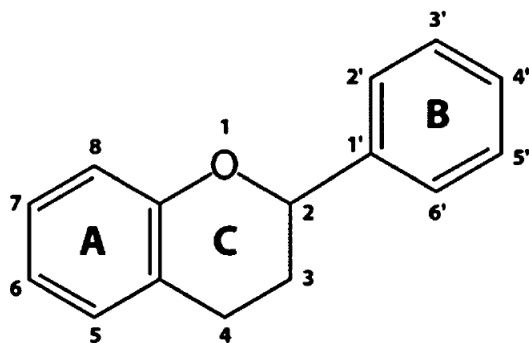


**Slika 2.** Shema glavna dva biosintetska puta nastanka polifenolnih spojeva (izrađeno prema Pevalek-Kozlina, 2003 i Dewick, 2002 ).

### 1.1.1. Flavonoidi

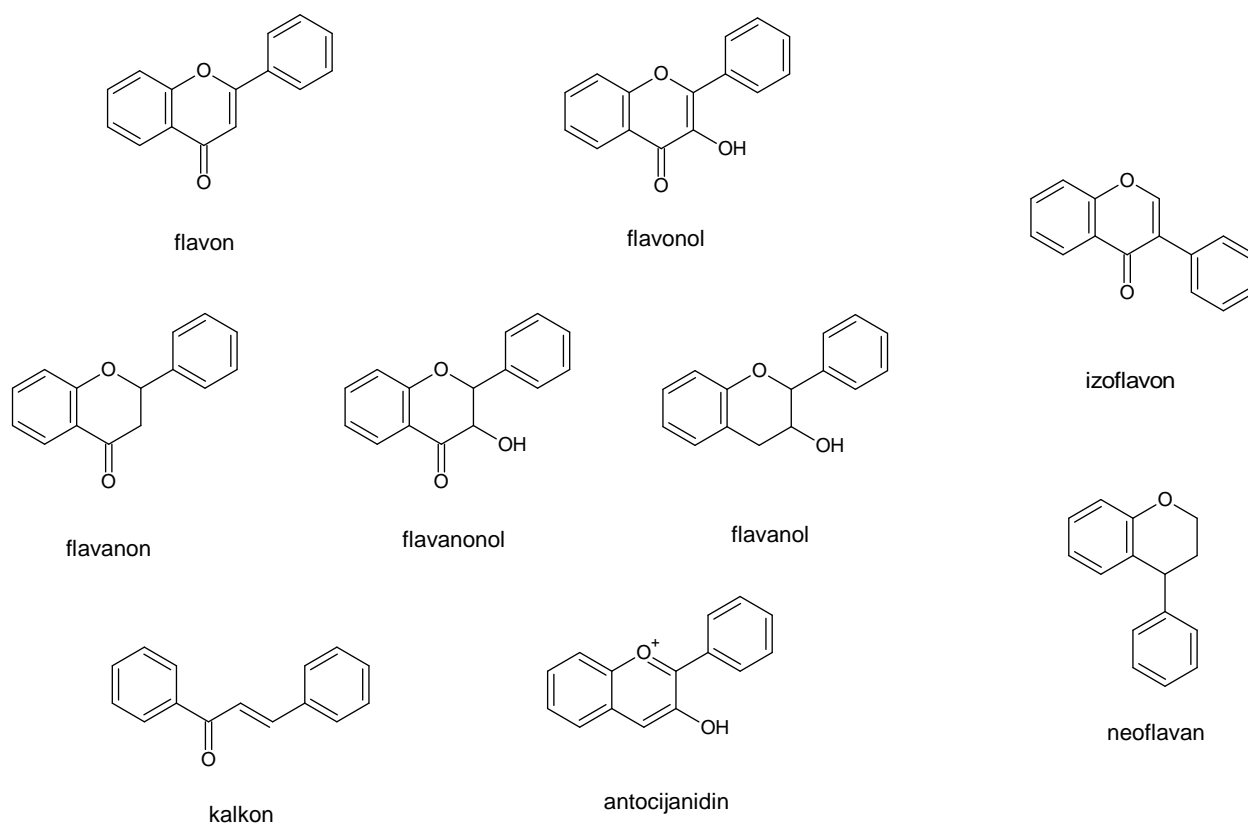
Flavonoidi čine najbrojniju skupinu polifenolnih spojeva. Sam naziv „flavonoid“ potječe od latinske riječi *flavus* (žuto) te upućuje na njihovu prirodnu obojenost. Prisutni su u cvjetovima i u drugim dijelovima biljaka gdje su odgovorni za pigmentaciju te pružanje zaštite od UV zračenja. Nadalje, reguliraju ekspresiju gena i moduliraju enzimsko djelovanje te imaju antivirusna i antibakterijska svojstva te visok antioksidacijski kapacitet. U velikoj se količini nalaze u hrani i piću biljnoga podrijetla. Najbogatiji izvori flavonoida su bobičasto voće, grašak, luk, kelj, tamna čokolada, peršin, origano te zeleni i crni čaj. Sadržaj flavonoida može uvelike varirati ovisno o sorti usjeva, preradi, klimi, sezoni, vrsti biljaka, proizvodnji i skladištenju. Zbog značajnih antioksidacijskih svojstava imaju vrlo važnu ulogu kako za biljke tako i za čovjeka jer doprinose ljekovitim svojstvima biljne hrane (Kozłowska i Szostak-Węgierek, 2019; Panche i sur., 2016).

Zajedničko strukturalno obilježje flavonoida kao derivata 1,3-difenilpropana jest osnovni C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> skelet. Čine ga dva benzenska prstena (A i B) međusobno povezana s tri ugljikova atoma koji su u većine flavonoida povezani s atomom kisika, zatvarajući tako središnji šesteročlani heterociklični prsten C (Slika 3) (Kozłowska i Szostak-Węgierek, 2019).



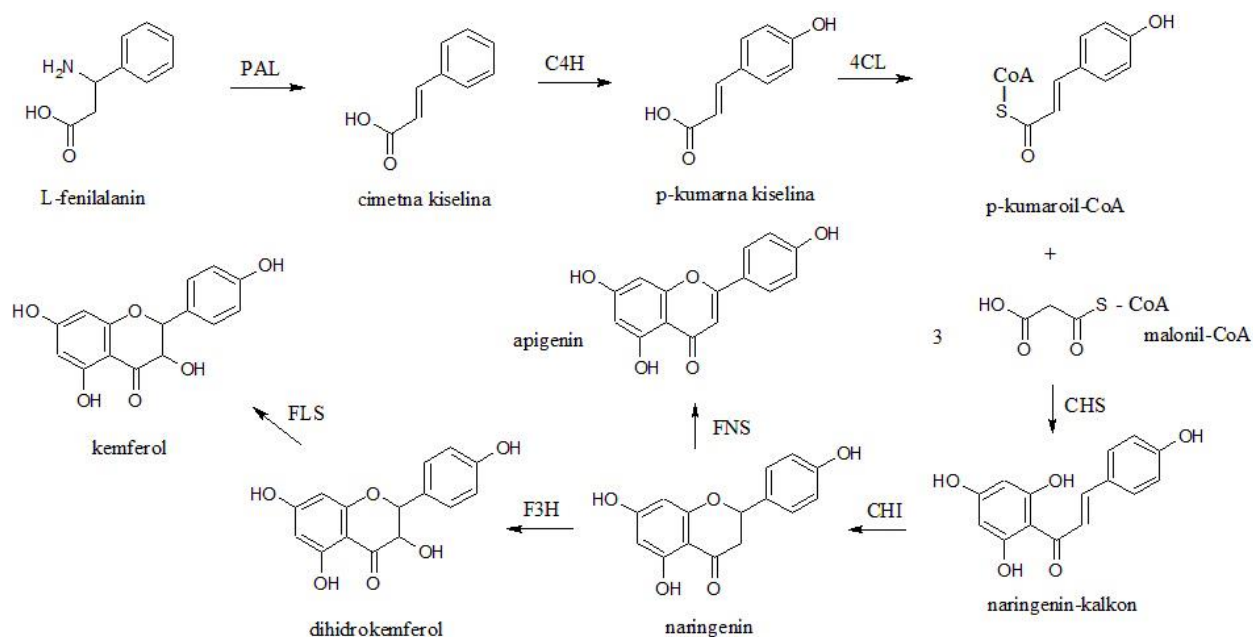
**Slika 3.** Osnovna struktura flavonoida (preuzeto iz Kozłowska i Szostak-Węgierek, 2019)

Podjelu flavonoida moguće je izvršiti s obzirom na to koji je ugljikov atom C prstena povezan s prstenom B te s obzirom na stupanj oksidacije i nezasićenost prstena C (Slika 4). Flavonoidi u kojih je prsten B povezan sa ugljikovim atomom na položaju 4 u prstenu C nazivaju se neoflavonoidima, dok u izoflavone svrstavamo one u kojih je prsten B vezan za ugljikov atom na položaju 3. Prsten B je najčešće vezan na heterociklični prsten preko ugljikovog atoma na položaju 2, a ti se flavonoidi dijele u podskupine, ovisno o strukturnim karakteristikama središnjeg prstena C: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli ili katehini, antocijani i kalkoni (Kozłowska i Szostak-Węgierek, 2019; Panche i sur., 2016).



**Slika 4.** Osnovne strukture flavonoida

Flavonoidi se biosintetiziraju kombinacijom puta šikiminske kiseline i acilpolimalonatnog puta pri čemu je prsten A podrijetlom iz acetatnog puta, a prsten B je produkt puta šikiminske kiseline. Početni spoj u sintezi jest fenilalanin, podrijetlom iz šikiminskog dijela puta, koji se deaminira dajući cimetnu kiselinu koja se potom hidroksilira do *p*-kumarne kiseline. Vezanjem koenzima A (CoA) nastaje *p*-kumaroil-CoA koji potom reagira s tri molekule malonil-CoA, stvorenom iz acetata, pri čemu nastaje naringenin-kalkon, uz djelovanje kalkon sintaze. Djelovanjem kalkon izomeraze naringenin-kalkon se prevodi u naringenin zatvaranjem središnjeg prstena. Slika 5 prikazuje shemu sinteze flavonoida s naznačenim enzimima koji kataliziraju pojedine reakcije. Za nastanak strukturno različitih flavonoida odgovorne su naknadne reakcije redukcije, hidroksilacije i metilacije. Tim reakcijama nastaju aglikoni kao slobodni oblici flavonoida koji se mogu detektirati u biljkama. Ipak, većina flavonoida je prisutna u obliku glikozida koji nastaju u glikozilaciji, posljednjem koraku biosinteze. U glikozilaciji može sudjelovati više vrsta šećernih jedinica koje se vežu preko kisika ili ugljika. Raznolikosti glikozida doprinosi vrsta i brojnost šećernih komponenti (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011; Vladimir-Knežević, 2008).

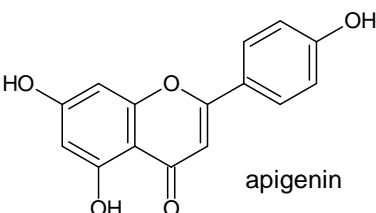
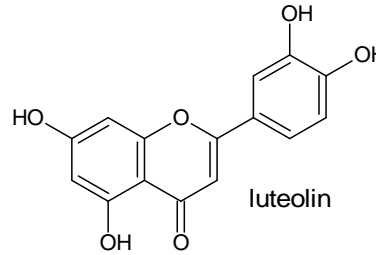


**Slika 5.** Shema biosinteze flavonoida. Enzimi uključeni u reakcije: PAL – fenilalanin amonij liaza; C4H – cinamat 4-hidroksilaza; 4CL - *p*-kumarat-CoA ligaza; CHS – kalkon sintaza; CHI – kalkon izomeraza; F3H – flavanon 3-hidroksilaza; FLS – flavonol sintaza; FNS – flavon sintaza (izrađeno prema Vladimir-Knežević, 2009 i Crozier i sur., 2009)

## Flavoni

Flavoni čine vrlo raširenu podskupina flavonoida prisutnu u listovima, plodovima i cvjetovima biljaka najčešće u obliku glikozida. Osnovu strukture svih flavona čini 2,3-dehidroflavan-4-on. U većine flavona prisutna je hidroksilna skupina na položaju 5 i 7 u prstenu A, a postoji mogućnost hidroksilacije u prstenu B na položajima 3' i 4'. Najpoznatiji flavoni su apigenin i luteolin koji stvaraju O-glikozide ili C-glikozide vezanjem šećera, najčešće glukoze (Tablica 1) (Panche i sur., 2016).

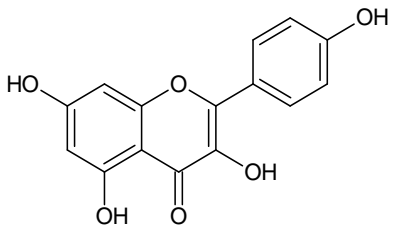
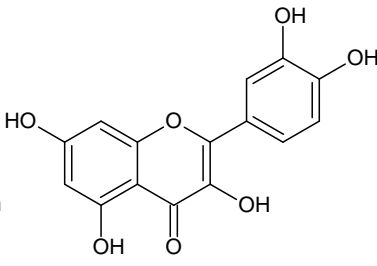
**Tablica 1.** Flavonski aglikoni te O- i C-glikozidi

aglikon	O-glikozidi	C-glikozidi
 apigenin	apigenin-7-O-glukozid	viteksin (apigenin-8-C-glukozid)
	apigenin-4'-O-glukozid	izoviteksin (apigenin-6-C-glukozid)
 luteolin	apigenin-7-O-rutinozid	orientin (luteolin-8-C-glukozid)
	luteolin-7-O-glukozid	izoorientin (luteolin-6-C-glukozid)

## Flavonoli

Flavonoli su uz flavone jedna od najraširenijih podskupina flavonoida. Nalaze se u raznom voću i povrću kao što su kelj, luk, zelena salata, rajčice, jabuke, bobičasto voće i grožđe, ali i u čaju i crnom vinu. Strukturno su slični flavonima jer im osnovu strukture čini 2,3-dehidro-3-hidroksiflavan-4-on. Razliku čini hidroksilna skupina u prstenu C na položaju 3, na koju se najčešće veže šećer. Najpoznatiji aglikoni iz ove podskupine su kvercetin, kempferol, izoramnetin i miricetin. Glukoza, galaktoza, ramnoza te glukuronska kiselina su šećeri koji najčešće sudjeluju u glikozilaciji (Panche i sur., 2016; Escarpa i Gonzalez, 2001). Tablica 2 prikazuje najpoznatije flavonolske O-glikozide.

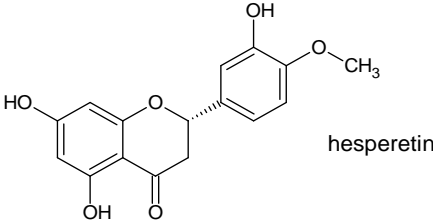
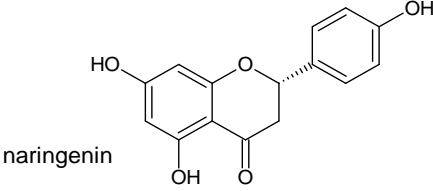
**Tablica 2.** Flavonolski aglikoni i O-glikozidi

aglikon	O-glikozidi
 kemferol	hiperozid (kvercetin-3-O-galaktozid)
	kvercitrin (kvercetin-3-O-ramnozid)
 kvercetin	izokvercitrin (kvercetin-3-O-glukozid)
	rutin (kvercetin-3-O-rutinozid)
	astragalin (kemferol-3-O-glukozid)

### Flavanoni

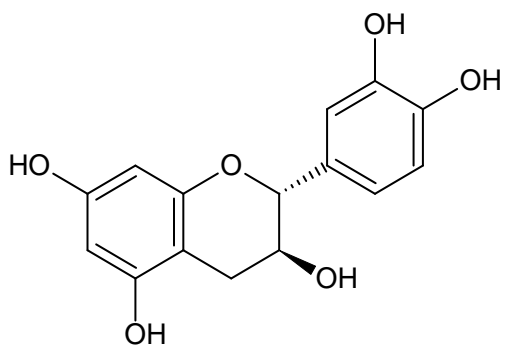
Flavanoni predstavljaju manju podskupinu flavonoida čiju osnovu strukture čini flavan-4-on. Karakteristično se mogu pronaći u vrstama roda *Citrus* tj. agrumima (limun, naranča), čijoj kori i soku daju gorak okus. Osim toga, pokazuju biološka svojstva poput sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, smanjenja upale i snižavanja razine lipida i kolesterola u krvi. Najčešći aglikoni iz ove podskupine su hesperetin i naringenin, a od glikozida se ističu hesperidin i naringin (Tablica 3). Slično kao u flavona, glikozilacija se odvija na hidroksilnoj skupini na C-7 u prstenu A, a najčešće sudjeluju monisaharidi i disaharidi, uglavnom sastavljeni od glukoze i ramnoze (Panche i sur., 2016; Vladimir-Knežević, 2008; Escarpa i Gonzalez, 2001).

**Tablica 3.** Flavanonski aglikoni i O-glikozidi

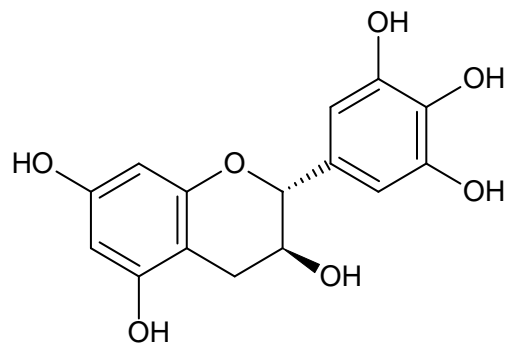
aglikon	O-glikozid
 <p>hesperetin</p>	<p><b>hesperidin</b> (hesperetin-7-rutinozid)</p>
 <p>naringenin</p>	<p><b>naringin</b> (naringenin-7-neohesperidoza)</p>

## Flavanoli

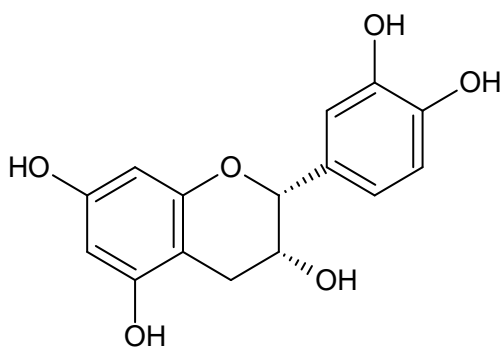
Flavanoli ili katehini su podskupina flavonoida koje karakterizira zasićeni prsten C zbog nedostatka dvostruke veze između C-2 i C-3 te prisutnost hidroksilne skupine na položaju 3 zbog čega još i nose naziv flavan-3-oli. Prisutni su u jabukama, bananama, kruškama, breskvama te borovnicama. Strukturno gledano, flavanole u odnosu na druge flavonoide u biljnom svijetu pronalazimo u obliku aglikona, ali ne i u obliku glikozida (Panche i sur., 2016). Katehin, epikatehin, galokatehin i epigalokatehin su najvažniji predstavnici (Slika 6). Galokatehin i epigalokatehin stvaraju estere galne kiseline preko hidroksilne skupine na C-3 koji su inače najzastupljeniji katehini u zelenom čaju. Flavan-3-oli, kao glavni monomerni strukturni elementi, sudjeluju u izgradnji kondenziranih/katehinskih trjeslovina. One se dijele na oligomerne i polimerne proantocijanidine nastale povezivanjem i do 50 monomernih jedinica. Kora hrasta i podanak uspravne petoprste sadrže trjeslovine među kojima i katehinske (Escarpa i Gonzalez, 2001).



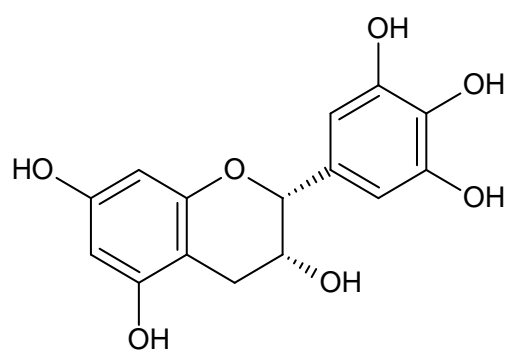
(+)-katehin



(+)-galokatehin



(-)-epikatehin



(-)-epigalokatehin

**Slika 6.** Osnovne strukture flavan-3-ola (izrađeno prema Aron i Kennedy, 2008).

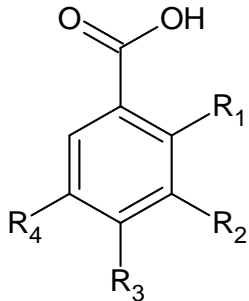


### 1.1.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su niskomolekularni fenolni spojevi koji sadrže karboksilnu skupinu te jednu ili više hidroksilnih skupina na aromatskoj jezgri, a ubrajaju se u skupinu polifenolnih spojeva. Široko su rasprostranjene u biljnome svijetu, pa tako i u biljnim namirnicama kao što su sjemenke, listovi te plodovi voća i povrća. U biljaka su uključene i u biološke funkcije klijanja i rasta. Predmetom su znanstvenih istraživanja zbog antioksidacijskih, ali i drugih za zdravlje korisnih svojstava. Fenolne kiseline se rijetko pojavljuju u slobodnom obliku jer češće formiraju amide, estere ili glikozide s drugim prirodnim spojevima. Razlikuju se dvije podskupine fenolnih kiselina: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Valanciene i sur., 2020; Kumar i Goel, 2019).

Hidroksibenzojeve kiseline su derivati benzojeve kiseline sa zajedničkom strukturom C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Osim u slobodnom obliku, javljaju se vezane kao esteri i glikozidi. Od velikog broja hidroksibenzojevih kiselina (Tablica 4) najzastupljenije su *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siringična kiselina (Kumar i Goel, 2019). Slabije su rasprostranjene od hidroksicimetnih kiselina, a mogu se pronaći u crvenom voću, crvenoj rotkvici i luku (Manach i sur., 2004).

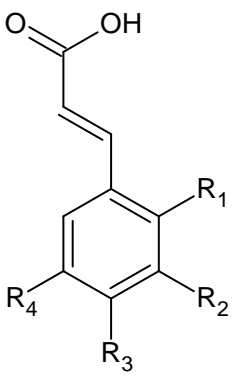
**Tablica 4.** Hidroksibenzojeve kiseline

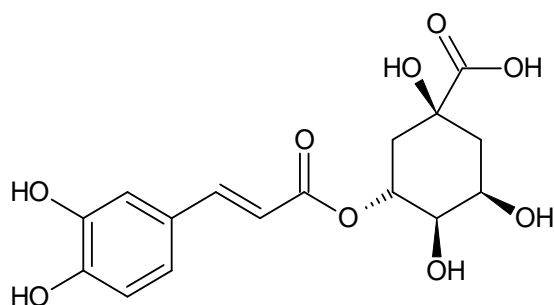
	<b>Hidroksibenzojeva kiselina</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
	<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	H	H	<b>OH</b>	H
	salicilna kiselina	<b>OH</b>	H	H	H
	vanilinska kiselina	H	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	<b>OH</b>	H
	izovanilinska kiselina	H	<b>OH</b>	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	H
	galna kiselina	H	<b>OH</b>	<b>OH</b>	<b>OH</b>
	protokatehinska kiselina	H	<b>OH</b>	<b>OH</b>	H
	siringična kiselina	H	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	<b>OH</b>	<b>CH<sub>3</sub>O</b>

Hidroksicimetne kiseline su fenolne kiseline zajedničke strukture C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Učestalije su u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline, a u najvećim koncentracija se mogu pronaći u vanjskim

dijelovima zrelih voćnih plodova. Češće se javljaju u esterificiranom nego u slobodnom obliku, pri čemu estere formiraju s alifatskim alkoholima i kina kiselinom, a mogu se pronaći u obliku amida i glikozida. Široko rasprostranjene hidroksibenzojeve kiseline (Tablica 5) su *p*-kumarinska, kavena, ferulična i sinapna kiselina. Klorogenska kiselina (Slika 7) je najrasprostanjenija vezana kiselina, nastala esterifikacijom kavene i kina kiseline, a u visokim koncentracijama je prisutna u kavi i različitim vrstama voća (Kumar i Goel, 2019; Manach i sur., 2004).

**Tablica 5.** Hidroksicimetne kiseline

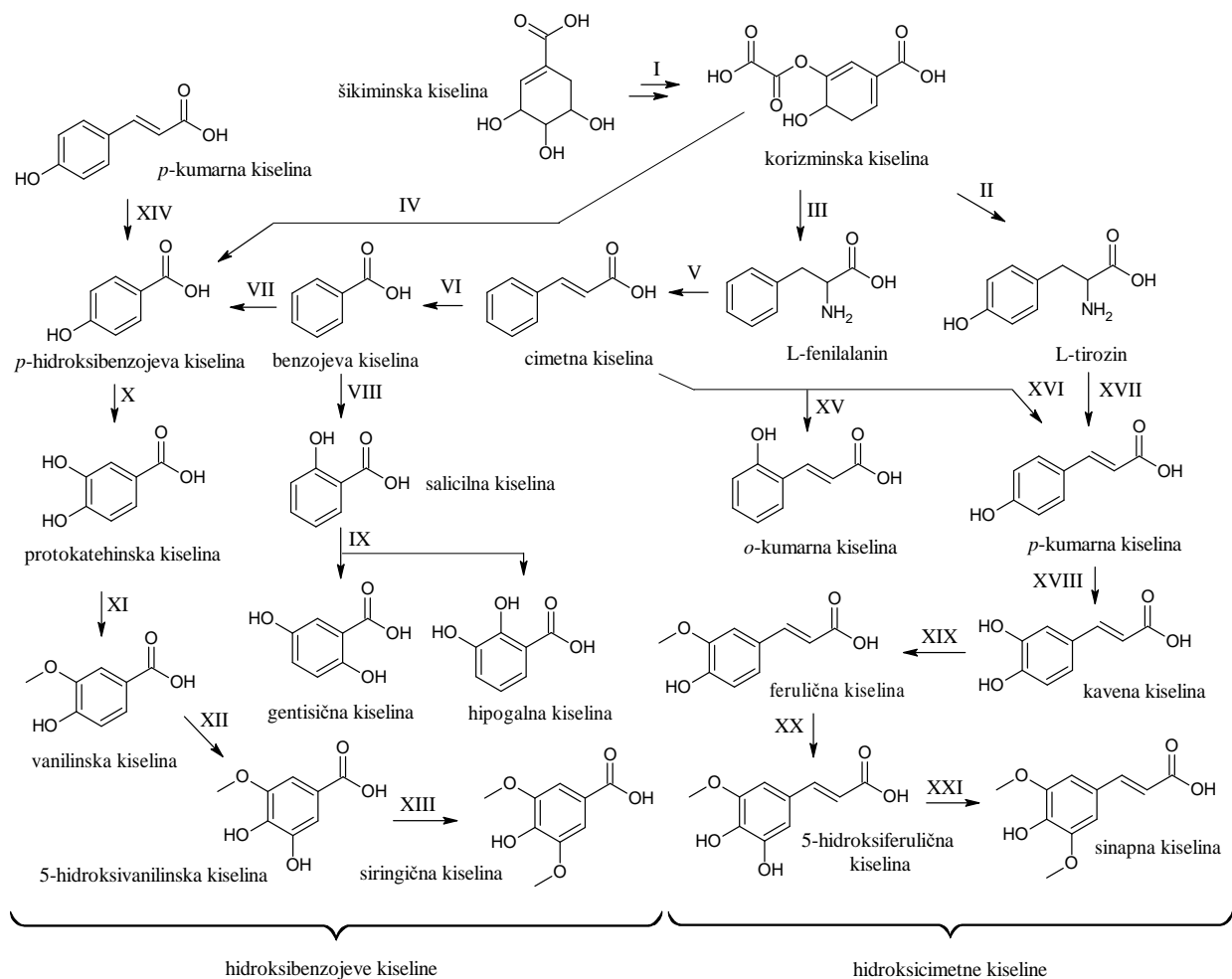
	<b>Hidroksicimetna kiselina</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	H	H	<b>OH</b>	H
kavena kiselina	H	<b>OH</b>	<b>OH</b>	H	H
ferulična kiselina	H	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	<b>OH</b>	H	H
izoferulična kiselina	H	<b>OH</b>	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	H	H
sinapna kiselina	H	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	<b>OH</b>	<b>CH<sub>3</sub>O</b>	<b>CH<sub>3</sub>O</b>



**Slika 7.** Struktura klorogenske kiseline

Biosinteza fenolnih kiselina odvija se iz aromatskih aminokiselina, L-fenilalanina i L-tirozina, nastalih iz korizmata biosintetskim putem šikiminske kiseline (Slika 8). L-fenilalanina se

naknadno prevodi u različite hidroksicimetne kiseline putem sinteze fenilpropanoida koji uključuje tri koraka i zajednički je put sinteze većine sekundarnih metabolita. Prvi korak uključuje stereospecifičnu deaminaciju fenilalanina uz nastanak *trans* dvostruke veze bočnog lanca cimetne kiseline. Potom dolazi do hidroksilacije aromatskog prstena u *para* položaju uz nastanak *p*-kumarne kiseline. Daljnjim enzimski kataliziranim reakcijama hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena nastaju različite hidroksicimetne kiseline kao što su kavena, ferulična i sinapna kiselina. Glavni put nastanka hidroksibenzojevih kiselina jest degradacija bočnog lanca fenilpropana, odnosno hidroksicimetnih derivata. Tako se  $\beta$ -oksidacijom skraćuje postranični lanac *p*-kumarne kiseline (prethodno aktivirane CoA) uz nastanak *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Eliminacija postranog lanca moguća je i u ranijoj fazi biosinteze kada *p*-hidroksibenzojeve kiselina nastaje iz prefenata nastalog iz korizminske kiselina. Daljnjim enzimski kataliziranim reakcijama hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena nastaju različite hidroksibenzojeve kiseline (protokatehinska, vanilinska, siringinska) (Valanciene i sur. 2020; Robbins, 2003).



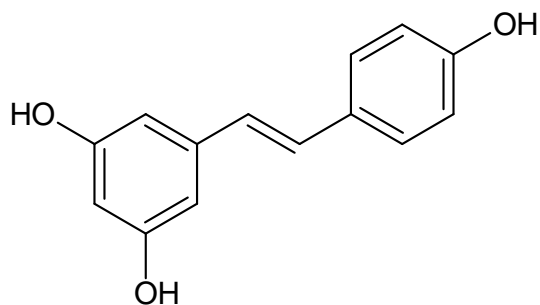
**Slika 8.** Osnovna shema biosinteze fenolnih kiselina šikiminskim putem. Enzimi uključeni u reakcije: (I) šikimat kinaza, 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaza i korizmat sintaza; (II) korizmat mutaza i p-fenat dehidrogenaza; (III) korizmat mutaza, p-fenat aminotransferaza i arogenat dehidrataza; (IV) korizmat-piruvat liaza; (V) L-fenilalanin amonij liaza (PAL); (VI) oksidaza; (VII) benzojeva kiselina 4-hidroksilaza; (VIII) benzojeva kiselina 2-hidroksilaza; (IX) salicilna kiselina 3-hidroksilaza (S3H); (X) 4-hidroksibenzojeva kiselina 3-hidroksilaza; (XI) protokatehinska kiselina 3-O-metiltransferaza; (XII) vanilinska kiselina 5-hidroksilaza; (XIII) 5-hidroksivanilinska kiselina 5-O-metiltransferaza; (XIV) 4-hidroksibenzaldehid sintaza i 4-hidroksibenzaldehid dehidrogenaza; (XV) cimetna kiselina 2-hidroksilaza; (XVI) cimetna kiselina 4-hidroksilaza; (XVII) tirozin amonij liaza (TAL); (XVIII) 4-kumarna kiselina 3-hidroksilaza; (XIX) kavena kiselina 3-O-metiltransferaza; (XX) ferulična kiselina 5-hidroksilaza; (XXI) kavena/5-hidroksiferulična kiselina 5-O-metiltransferaza (COMT) (preuzeto i prilagođeno prema Valanciene i sur. 2020)

### 1.1.3. Stilbeni

Stilbeni čine klasu polifenolnih spojeva s 1,2-difeniletilenskom jezgrom (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>). Posjeduju jaka antioksidacijska svojstva te lako stvaraju oligomere povezivanjem heterogenih ili homogenih monomernih stilbena. Raznolika oligomerizacija te složena konfiguracija doprinose strukturnoj raznolikosti oligomernih stilbena. Iako nisu široko rasprostranjeni poput drugih polifenolnih spojeva, stilbeni i njihovi hidroksilirani derivati stilbenoidi se opsežno istražuju. Svakodnevno se otkrivaju nove molekule stilbena koje pokazuju različitu bioaktivnost. Ističu se njihova antioksidacijska, antimikrobna, antimalarijska, citotoksična, hepatoprotektivna i protuupalna svojstva. Glavni i ujedno najistaknutiji izvori ovih spojeva su grožđe i crveno vino, a najpoznatiji spoj iz ove skupine jest resveratrol (Andrei i sur., 2019; Shen i sur., 2009).

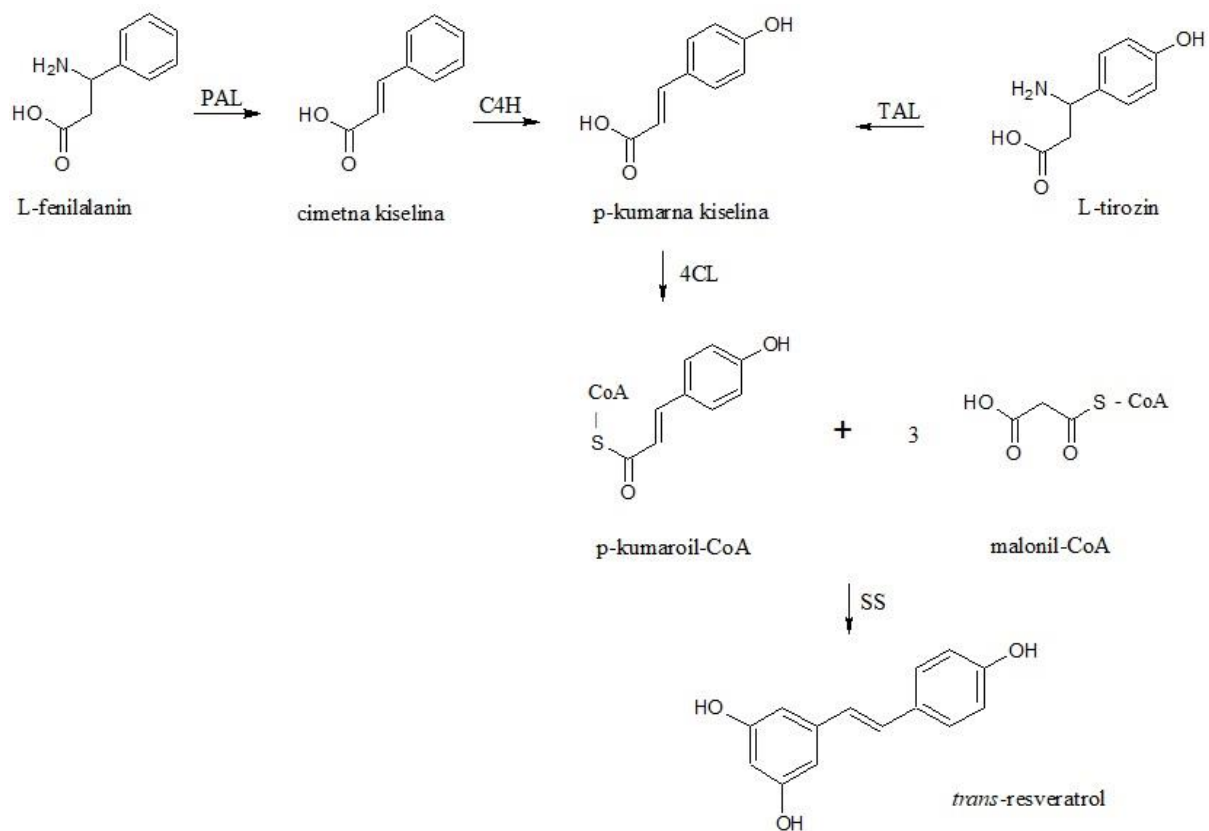
#### Resveratrol

Stilben resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) ubraja se u grupu fitoalksina, spojeva koji se *de novo* sintetiziraju u biljaka kao odgovor na stres, primjerice, infekciju patogenima. U biljkama se javlja u obliku smjese *cis* i *trans* izomera, pri čemu *trans* oblik (Slika 9) pokazuje bolju biološku aktivnost. Zbog jakog antioksidacijskog potencijala *trans*-resveratrol pokazuje potencijal u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, zaštiti od pojavnosti dijabetesa, pojedinih vrsta raka te neurodegenerativnih oboljenja (Andrei i sur., 2019; Donnez i sur., 2009). Resveratrol je prvi put izoliran iz korijena čemerike *Veratrum grandiflorum* 1939. godine, a potom iz biljke tradicionalne kineske medicine *Polygonum cuspidatum*. Crno vino je danas najpoznatiji izvor resveratrola, a kojemu se upravo zbog njegove prisutnosti pripisuje pozitivan učinak na kardiovaskularni sustav. Osim u vinu, resveratrol se može pronaći i u crnom grožđu, borovnicama, brusnicama, crnom duđu i kikirikiju (Tian i Liu, 2020; Huang i sur., 2020; Donnez i sur., 2009).



**Slika 9.** Struktura *trans*-resveratrola

Sinteza resveratrola, slično kao i kod flavonoida, odvija se kombinacijom puta šikiminske kiseline i acetatnog puta. Početni spoj u sintezi jest L-fenilalanin odnosno L-tirozin, oba nastala iz šikiminske kiseline. Djelovanjem fenilalanin amonij liaze, L-fenilalanin se prevodi u cimetnu kiselinu koja djelovanjem cinamat 4-hidroksilaze prelazi u *p*-kumarnu kiselinu. Ona može nastati i iz L-tirozina djelovanjem tirozin amonij liaze. Vezanjem konzima A (CoA) na *p*-kumarnu kiselinu nastaje *p*-kumaroil-CoA koji potom reagira s tri molekule malonil-CoA dajući *trans*-resveratrol, uz enzim stilben sintazu (Donnez i sur., 2009; Crozier i sur., 2009). Slika 10 prikazuje sintezu *trans*-resveratrola s pripadajućim enzimima.



**Slika 10.** Biosinteza resveratrola. Enizimi uključeni u reakcije: PAL – fenilalanin amonij liaza; C4H – cinamat 4-hidroksilaza; TAL – tirozin amonij liaza; 4CL - *p*-kumarat-CoA ligaza; SS – stilben sintaza (preuzeto i prilagođeno prema Donnez i sur., 2009)

## 1.2. Šećerna bolest

Šećerna bolest ili dijabetes (lat. *diabetes mellitus*) kronična je metabolička bolest karakterizirana dugotrajno povećanom razinom glukoze u krvi zbog prisutne inzulinske rezistencije i/ili izostanka ili nedostatne sekrecije inzulina. U posljednjih nekoliko desetljeća stalno se povećava prevalencija šećerne bolesti, najviše u nisko i srednje razvijenim zemljama. Dijabetes je postao globalni zdravstveni problem. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije čak 422 milijuna ljudi diljem svijeta boluje od ove bolesti, a godišnje od nje umire oko 1,5 milijuna ljudi. Prema patologiji i etiologiji razlikuju se četiri tipa šećerne bolesti: šećerna bolest tipa 1, šećerna bolest tipa 2, drugi tipovi šećerne bolesti te gestacijski dijabetes (Nolte Kennedey i Masharani, 2020).

Šećerna bolest tipa 1 ili dijabetes ovisan o inzulinu posljedica je oštećenja  $\beta$ -stanica gušterače odgovornih za stvaranje inzulina. Genetska predispozicija te virusne infekcije ili autoimune bolesti mogu dovesti do degradacije  $\beta$ -stanica, što za posljedicu ima teški ili apsolutni nedostatak inzulina, pa je inzulinska terapija neophodna za kontrolu glukoze u oboljelih. Dijabetes tipa 1 javlja se u 5-10 % oboljelih i to uglavnom u mladenačkoj dobi zbog čega se još i naziva juvenilnim dijabetesom. U serumu oboljelih od dijabetesa tipa 1 mogu se pronaći protutijela na  $\beta$ -stanice, a u nekih i inzulinska protutijela (Nolte Kennedey i Masharani, 2020; Guyton i Hall, 2017; Božikov, 2003).

Tip 2 je najčešći oblik šećerne bolesti jer se javlja u oko 90-95 % svih dijagnosticiranih slučajeva i predstavlja značajan javnozdravstveni problem kao vodeći uzrok morbiditeta i rane smrti. Bolest se razvija postupno te se uglavnom manifestira nakon 30. godine života zbog čega je poznata i kao šećerna bolest odrasle dobi. Razvoj bolesti povezuje se sa pretilošću, sjedilačkim načinom života, nedostatkom tjelesne aktivnosti, nezdravim prehrambenim i životnim navikama, odnosno s čimbenicima koji doprinose razvoju inzulinske rezistencije. U bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2 hiperglikemija se javlja zbog smanjene osjetljivosti ciljanih tkiva na inzulin te smanjenog utoka glukoze u stanice perifernih tkiva. Posljedično se potiče kompenzacijski odgovor  $\beta$ -stanica u vidu povećanog izlučivanja inzulina (hiperinzulinemija), što dugoročno može dovesti do iscrpljivanja i progresivnog propadanja  $\beta$ -stanica te potrebe za uvođenjem inzulinske terapije. Osim na metabolizam ugljikohidrata, smanjeni učinak inzulina utječe i na metabolizam masti, što



dovodi do smanjene razine HDL-kolesterola, a povećane razine slobodnih masnih kiselina i triglicerida u krvi. Navedeni metabolički poremećaji koji su u pozadini ove bolesti povećavaju rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti, retinopatije, nefropatije, neuropatije, dijabetičke kardiomiopatije i drugih komplikacija šećerne bolesti (Nolte Kennedey i Masharani, 2020; Guyton i Hall, 2017; Božikov, 2003).

Drugi tipovi šećerne bolesti obuhvaćaju druge specifične uzroke hiperglikemije kao što su pankreatektomija, pankreatitis, terapija lijekovima, druge bolesti koje nisu povezane sa gušteračom i dr. Gestacijski dijabetes (GDM) se pojavljuje u trudnoći jer posteljica i njezini hormoni dovode do povećanog lučenja inzulina i smanjene inzulinske osjetljivosti. Na kraju gestacijskog razdoblja ovaj se oblik dijabetesa uglavnom povlači, ali tijekom trudnoće može povećati rizik od smrtnosti, a ukoliko se razvije dijabetička nefropatija raste rizik od pojavnosti preeklampsije i posljedično rizik od intrauterinog usporenog rasta, prijevremenog poroda ili mrtvorodenja (Nolte Kennedey i Masharani, 2020; Kaul i sur. 2012).

### **1.3. Antidijabetici**

Hipoglikemijski lijekovi za terapiju šećerne bolesti tipa 2 (ŠBT2) djeluju različitim mehanizmima. Većinom su to oralni antidijabetici, uz izuzetak agonista receptora za GLP-1 koji se primjenjuju supkutano.

Derivati sulfonilureja, meglitinidi i derivati D-fenilalanina čine skupinu lijekova koji vezanjem za receptore sulfonilureje potiču otpuštanje već stvorenog inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače zatvaranjem kalijevih kanala koje uzrokuje depolarizaciju i posljedično otvaranje o naponu ovisnih kalcijevih kanala. Kao inzulinski sekretagozi učinkovito snižavaju razinu glukoze u krvi samo u onih pacijenta u kojih je zadržana funkcija  $\beta$ -stanica. Najčešće nuspojave jesu hipoglikemija te porast tjelesne mase.

Bigvanidi i tazolidindioni djelovanjem na jetru, mišiće i masno tkivo uzrokuju snižavanje razine glukoze u krvi. Glavni bigvanid metformin prvenstveno smanjuje glukoneogenezu u jetri te ne dovodi do pojavnosti hipoglikemije, hiperinzulinemije i povećanja tjelesne mase. Dokazano smanjuje rizik od makro- i mikrovaskularnih oboljenja te rizik od kardiovaskularne smrtnosti. Zbog

navedenoga zlatni je standard u terapiji ŠBT2. Najčešći neželjeni učinci jesu probavnog tipa (mučnina, abdominalna nelagoda, povraćanje, proljev), a javljaju se uglavnom na početku terapije i obično su prolazni. Tiazolidindioni smanjuju inzulinsku rezistenciju vezanjem na PPAR- $\gamma$  receptore smještene u jetri te mišićnom i masnom tkivu modulirajući ekspresiju gena uključenih u metabolizam glukoze i lipida, diferencijaciju adipocita i prijenos signala potaknutog inzulinom. Povećavaju ekspresiju nosača glukoze, smanjuju razinu slobodnih masnih kiselina te otpuštanje glukoze iz jetre. Porast tjelesne mase i retencija vode su najčešće nuspojave, a postoji i određeni kardiovaskularni rizik.

Inhibitori dipeptidil peptidaze 4 (DPP-4) inhibiraju razgradnju prirodnog inkretina GLP-1, a inkretinomimetici djeluju kao agonisti receptora za GLP-1, hormon koji se otpušta u crijevima na poticaj oralne glukoze, povećava sekreciju inzulina, a smanjuje sekreciju glukagona te odgađa pražnjenje želuca i smanjuje tek.

Od novijih antidijabetika, ističu se inhibitori kotransportera natrija i glukoze 2 (SGLT2) smještenih u proksimalnim tubulima bubrega. Inhibicijom SGLT2 sprječava se reapsorpcija glukoze što za posljedicu ima povećavanje glukozurije i snižavanje razine glukoze u plazmi. Štetni učinci koji se mogu javiti jesu infekcije urinarnog i genitalnog trakta, poliurija, hipotenzija, osmotska diureza i žeđ (Nolte Kennedy i Masharani, 2020).

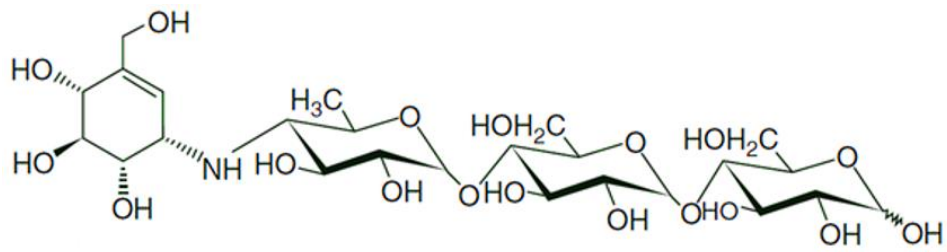
Prirodni biljni produkti sve više dobivaju na značaju zbog svojih terapijskih i preventivnih svojstava. Mnoge biljke su izvor bioaktivnih spojeva (polifenoli, karotenoidi, lignani, kumarini i dr.) koji pokazuju farmakološki značajne antidijabetičke učinke uz manje toksičnih i drugih neželjenih učinaka. Također, neki od tih biljnih produkata poslužili su kao uzor za razvoj konvencionalno dostupnih antidijabetika. Galegin, spoj izoliran iz biljke *Galega officinalis* (Fabaceae), posjeduje antidijabetička svojstva, a strukturno mu je sličan metformin (Salei i sur., 2019; Rios i sur., 2015). Brojne se biljke tako zbog svoje dostupnosti koriste u tradicionalnoj medicini za terapiju šećerne bolesti, a neke od njih sa dokazanim povoljnim antidijabetičkim i hipoglikemijskim učincima jesu *Nigella sativa*, *Curcuma longa*, *Allium sativum* i *Panax ginseng* (Alam i sur., 2022), *Trigonella foenum-graecum* (Ríos i sur., 2015.), *Cornus capitata* (Bahatia i sur., 2019) i *Vaccinium myrtillus* (Bljajić i sur. 2017).

### 1.3.1. Inhibitori $\alpha$ -glukozidaze

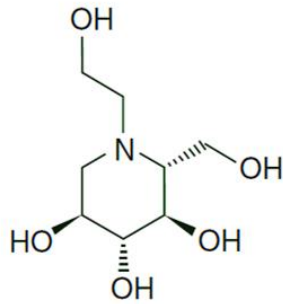
Enzim  $\alpha$ -glukozidaza, smještena u četkastoj mukoznoj membrani tankoga crijeva, katalizira hidrolizu terminalnih  $\alpha(1\rightarrow4)$  vezanih  $\alpha$ -glukočnih ostataka oligosaharida uzrokujući njihovu razgradnju do glukoze. Inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze tako usporavaju razgradnju disaharida i škroba u tankome crijevu, što za posljedicu ima smanjenu postprandijalnu apsorpciju glukoze. Neprobavljeni ugljikohidrati podliježu fermentaciji u kratkolančane masne kiseline, uz oslobađanje plina što dovodi do nadimanja, proljeva i abdominalne boli kao izraženih neželjenih učinaka koji se s trajanjem liječenja smanjuju (Nolte Kennedey i Masharani, 2020; Assefa i sur. 2019).

Akarboza, miglitol i voglibos (Slika 11) su komercijalno dostupni kompetitivni inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze. Akarboza i miglitol djeluju i kao potentni inhibitori  $\alpha$ -amilaze, gluoamilaze, i sukraze uz slabi učinak na izomaltazu. Akarboza je strukturno slična tetrasaharidima zbog čega se na apsorbira i djeluje lokalno u crijevima gdje se ne razgrađuje djelovanjem probavnih enzima. S druge strane, miglitol pokazuje strukturnu sličnost glukozi te se apsorbira u tankome crijevu. Voglibos se ne apsorbira, a reverzibilno i kompetitivno inhibira gluoamilazu, sukrazu i izomaltazu, ali ne i  $\alpha$ -amilazu. Spomenuti inhibitori uspješno smanjuju postprandijalnu hiperglikemiju bez rizika od hipoglikemije s tim da će im učinak ovisiti o vrsti ugljikohidrata prisutnih u prehrani bolesnika (Nolte Kennedey i Masharani, 2020; Bedekar i sur., 2010).

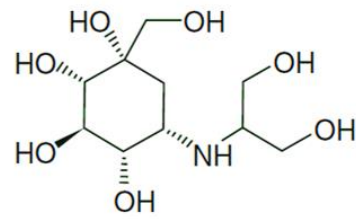
Neke od biljaka koje inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu su *Allium sativum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cornus officinalis*, *Eugenia uniflora*, *Ficus racemose*, *Juniperus communis*, *Morus alba* te *Salvia officinalis* (Salehi i sur. 2019). Sekundarni metaboliti kao što su alkaloidi, fenolne kiseline, flavonoidi, terpenoidi i antocijani imaju potencijal inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze zahvaljujući specifičnoj strukturi i funkcionalnim skupinama koje posjeduju (Assefa i sur. 2019).



akarboza



miglitol



voglibos

**Slika 11.** Strukture inhibitora  $\alpha$ -glukozidaze (preuzeto i prilagođeno prema Bedekar i sur., 2010)

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Šećerna bolest predstavlja brzorastući globalni problem sa sve većim brojem oboljelih. Prevencija i adekvatna terapija su stoga ključne za sprječavanje progresije bolesti i njezinih komplikacija kao i smrtnih ishoda. Neželjeni učinci sintetskih antidijabetika otvaraju vrata istraživanjima prirodnih spojeva kao farmakološki aktivnih tvari sa zadovoljavajućim terapijskim svojstvima, uz manje neželjenih učinaka.

Zahvaljujući svojim bioaktivnim tvarima s antidijabetičkim učinkom, pojedine su biljke pronašle svoje mjesto u tradicionalnoj medicini. Široko rasprostranjena, heterogena skupina polifenola, kao najzastupljenijih biljnih spojeva, krije veliki broj različitih i biološki aktivnih sekundarnih metabolita, od kojih se posebice ističu flavonoidi, fenolne kiseline i stilbeni. Njihova antioksidacijska svojstva čine ih prepoznatim biljnim tvarima s brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje.

Svrha ovoga rada bila je provesti usporednu procjenu sposobnosti polifenola da inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu, istaknuti one najučinkovitije te pronaći moguću poveznicu između strukturnih obilježja ispitivanih spojeva i inhibicijskog učinka.

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

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Kemikalije

- natrij hidrogenfosfat dihidrat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- natrij dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 0,1 M natrijev hidroksid
- dimetil sulfoksid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- $\alpha$ -glukozidaza iz *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

#### 3.1.2. Ispitivani polifenolni spojevi

U radu su korišteni sljedeći standardi flavonoida, fenolnih kiselina i stilbena:

- kvercetin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- kvercitrin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- izokvercitrin (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- kemferol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- rutin (Fluka, Buchs, Švicarska)
- apigenin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- luteolin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- apigenin-7-O-glukozid (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- luteolin-7-O-glukozid (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- miricetin (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ramnetin (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- hesperetin (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- hesperidin (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- naringin (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- naringenin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- (+)-katehin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- (-)-epikatehin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)



- krizin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- akacetin (Extrasynthèse, Genay, France)
- ružmarinska kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- galna kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- klorogenska kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- kavena kiselina (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ferulična kiselina (Fluka, Buchs, Švicarska)
- izoferulična kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- *o*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- *p*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- vanilinska kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- izovanilinska kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- siringinska kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- salicilna kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- resveratrol (Extrasynthèse, Genay, France)

### 3.1.3. Instrumenti i pribor

- analitička vaga AB54-S (Mettler Toledo, Švicarska)
- pH-metar Eutech Expert (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, SAD)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- labaratorijski termostat (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- čitač mikrotitarske pločice Chromate Microplate Reader (Awareness Technology, Palm City, SAD)
- TPP mikrotitarska pločica s 96 jažica (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švicarska)
- multikanalna i jednokanalne automatske pipete Research plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

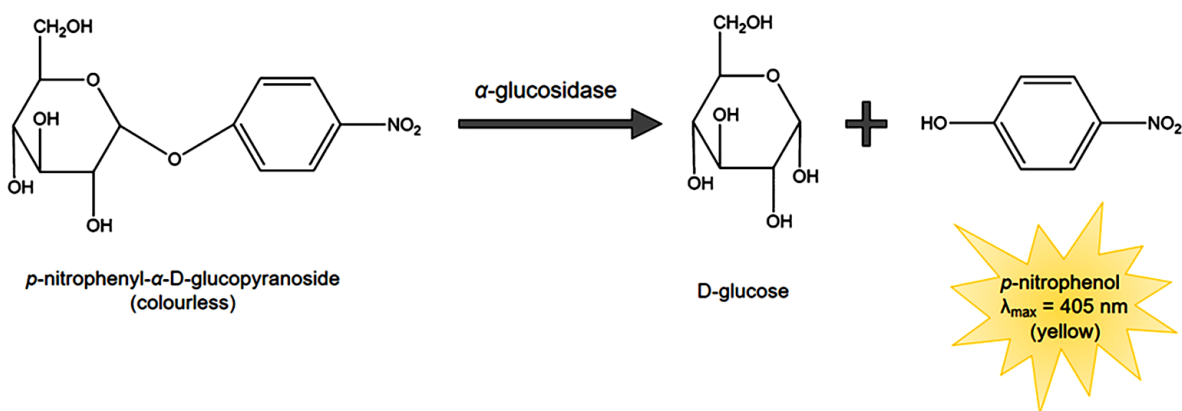
### 3.1.4. Programski paketi

- Chromate Manager (Awareness Technology, Palm City, SAD)
- Microsoft Office Excel (Microsoft, Redmond, Washington, SAD)
- ChemSketch (ADC/Labs, Toronto, Ontario, Kanada)

## 3.2. METODA

### 3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje sposobnosti inhibicije $\alpha$ -glukozidaze

Sposobnost flavonoida, fenolnih kiselina i stilbena da inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu ispitana je spektrofotometrijskom metodom. Pri pH vrijednosti 6,8 i temperaturi od 37 °C enzim  $\alpha$ -glukozidaza katalizira hidrolizu kromogenog supstrata *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozida do produkata  $\alpha$ -D-glukoze i *p*-nitrofenola. Jedna jedinica enzima (1U) potreban je za stvaranje 1  $\mu$ mol-a *p*-nitrofenola iz *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozida u minuti. Nastali *p*-nitrofenol daje žuto obojenje (Slika 12), omogućujući spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze mjerenjem apsorbancije na 405 nm (Lankatillake i sur., 2021).



**Slika 12.** Hidroliza bezbojnog *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozida u obojeni *p*-nitrofenol pomoću  $\alpha$ -glukozidaze (preuzeto iz Lankatillake i sur., 2021)

### 3.2.2. Priprema reagensa i ispitivanih otopina

- otopina fosfatnog pufera

Pripremi se 0,1M otopina fosfatnog pufera pH vrijednosti 6,8 otapanjem natrij hidrogen fosfata dihidrata i natrij dihidrogen fosfata dihidrata u destiliranoj vodi. Vrijednost pH podesi se na 6,8 dodatkom odgovarajuće količine koncentrirane kiseline odnosno lužine.

- otopina enzima

Pripremi se otopina enzima koja sadrži 1,0 U/mL  $\alpha$ -glukozidaze u fosfatnom puferu. Masena koncentracija otopine enzima iznosila je 0,0425 mg/mL.

- otopina supstrata

Pripremi se 1,25 mM otopina *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozida ( $M_r = 301,25$  g/mol) u fosfatnom puferu.

- otopina 10 %-tnog DMSO-a

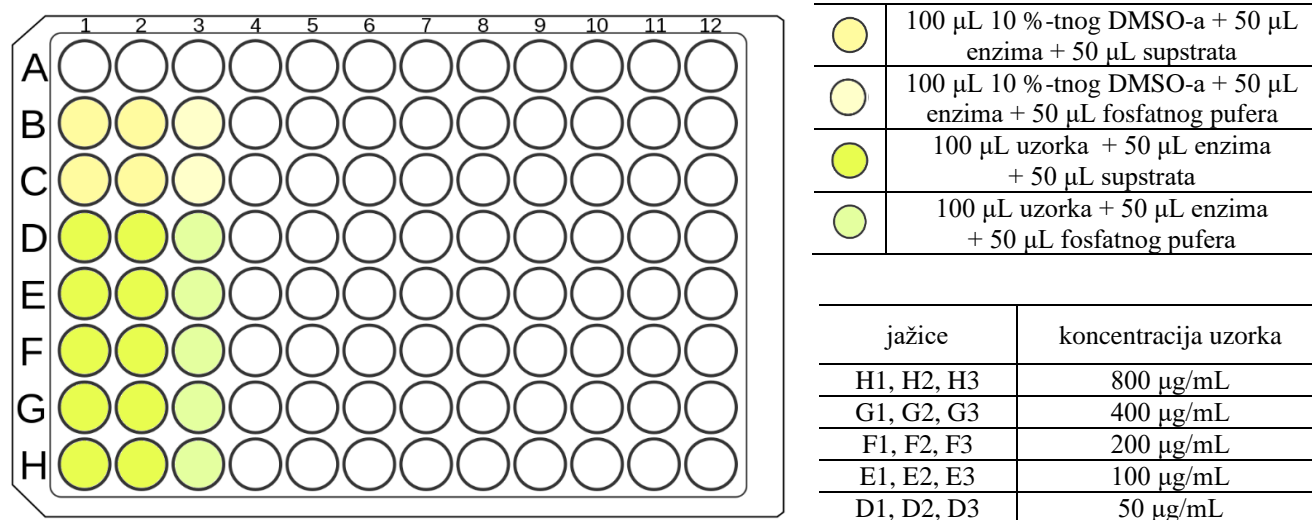
Pripremi se otopina 10 %-tnog dimetil sulfoksida u fosfatnom puferu.

- otopina ispitivanih polifenola

Niz serijskih razrjeđenja uzorka pripremi se u mikrotitarskim pločicama u 100  $\mu$ L 10 %-tnog DMSO-a u rasponu koncentracija 1600-100  $\mu$ g/mL.

### 3.2.3. Ispitivanje inhibicije $\alpha$ -glukozidaze

U mikrotitarskim pločicama (96 jažica) pripremi se niz serijskih razrjeđenja uzorka u 100  $\mu$ L 10 %-tnog DMSO-a u rasponu koncentracija 1600-100  $\mu$ g/mL. Priprema se dva puta koncentriranija početna otopina uzorka kako bi se učinak ispita u željenoj koncentraciji. U slučaju rubno dobivenih rezultata postupak je ponavljan uz povećavanje ili smanjivanje raspona koncentracija sa ciljem određivanja vrijednosti  $IC_{50}$ . Određivanje se provodi u duplikatu uz dodatan red uzorka u istom razrjeđenju radi oduzimanje pozadinske apsorbanije (zamućenje i/ili obojenost uzorka). U kontrolne jažice (po dvije u sva 3 reda) stavi se 100  $\mu$ L 10 %-tnog DMSO-a bez ispitanog uzorka. U svaku se jažicu doda 50  $\mu$ L otopine  $\alpha$ -glukozidaze (1,0 U/mL), a potom sve inkubira 10 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, u svaku jažicu se doda 50  $\mu$ L otopine *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozida (1,25 mM), s tim da se u jažice trećeg reda umjesto 50  $\mu$ L supstrata doda 50  $\mu$ L fosfatnog pufera. Sve se inkubira na sobnoj temperaturi 5 minuta, a potom mjeri apsorbancija na 405 nm u čitaču mikrotitarske pločice.



**Slika 13.** Shema mikrotitarske pločice (preuzeto i prilagođeno s [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/07/96-Well\\_plate.svg/1280px-96-Well\\_plate.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/07/96-Well_plate.svg/1280px-96-Well_plate.svg.png))

### 3.2.4. Određivanje postotka inhibicije $\alpha$ -glukozidaze

Iz eksperimentalno dobivenih vrijednosti apsorbancije računa se sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze, izražen u postocima, prema sljedećem izrazu:

$$\% \text{ inhibicije } \alpha\text{-glukozidaze} = \frac{\overline{A_0} - A_1}{\overline{A_0}} \times 100$$

Izraz  $\overline{A_0}$  označava srednju vrijednost apsorbancija dviju kontrolnih otopina koje su umjesto uzorka sadržavale jednaku količinu otapala, a  $A_1$  apsorbanciju ispitivane otopine. Vrijednosti apsorbancija umanjene su za odgovarajući iznos pozadinske apsorbancije. Interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa učinka i koncentracije dobivene su jednadžbe pravaca i pripadajući koeficijenti determinacije  $r^2$  te koncentracija uzorka koja ostvaruje 50 %-tni učinak inhibicije (IC50).

Eksperimentalno dobiveni podaci zabilježeni su pomoću programa Chromate Manager (Awareness Technology, Palm City, SAD), a potom su pohranjeni i obrađeni u računalnom programu Microsoft Office Excel (Microsoft, Redmond, Washington, SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Inhibicijski učinak flavonoida na aktivnost $\alpha$ -glukozidaze

Za sve ispitivane uzorke određivanje sposobnosti inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze se provodi u duplikatu. Izračunati su postotci inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze i određene srednje vrijednosti istih kao i pripadajuće vrijednosti standardne devijacije (SD). Grafički su obrađeni podaci odnosa postotka inhibicije i koncentracije uzorka pri čemu su uzimane vrijednosti koncentracija i pripadajući postoci inhibicije iznad, ispod i oko 50 %-tne aktivnosti. Linearnom regresijskom analizom dobivene su jednadžbe pravaca i pripadajući koeficijenti determinacije  $r^2$ . Korištenjem jednadžbi pravaca određena je koncentracija uzorka pri kojoj se postiže 50 %-tni učinak inhibicije ( $IC_{50}$ ), uz pripadajuću vrijednost standardne devijacije (SD).

U Tablici 6 prikazani su rezultati ispitivanja inhibicijske aktivnosti flavonoida u koncentracijama od 50  $\mu\text{g/mL}$  do 800 (16000)  $\mu\text{g/mL}$ . Vidljivo je da miricetin i kvercetin već u najnižoj ispitanoj koncentraciji značajno inhibiraju aktivnost enzima. U odnosu na miricetin (46,48-83,67 %), inhibicijsko djelovanje kvercetina je konstantno slabije (37,42-61,22 %). Iako je učinak kemferola konstantno zaostajao za učinkom kvercetina, ipak je u najvećoj testiranoj koncentraciji pokazao bolji učinak (67,47 %). Metilirani aglikon ramnetin djelovao je značajno slabije (0-28,55 %) u odnosu na prethodno spomenute flavonolske aglikone. Glikozidni oblici kvercetina većinom su bili manje djelotvorni od aglikona, izuzev rutina koji je u koncentraciji od 800  $\mu\text{g/mL}$  nadmašio učinak kvercetina. U usporedbi s flavonolima, flavoni su se pokazali značajno slabijim inhibitorima enzima ili uopće nisu bili djelotvorni poput krizina. Svakako je potrebno napomenuti da slaba topljivost krizina i akacetina u dimetilsulfoksidu može biti razlogom izostanka učinka ili iznimno slabe djelotvornosti. Rezultati u Tablici 6 pokazuju da luteolin i luteolin-7-O-glukozid značajno inhibiraju enzim (36,75-87,13%) tek pri najvišim koncentracijama 800-1600  $\mu\text{g/mL}$  te da je snažniji učinak glikozidnog oblika. Flavanon naringenin je u koncentraciji 800  $\mu\text{g/mL}$  ostvario 44,51 %-tnu aktivnost, dok je izostao učinak njegovog glikozidnog derivat naringina. I u slučaju hesperetina i njegovog glikozida, može se zaključiti da je glikozid slabiji inhibitor  $\alpha$ -glukozidaze. U odnosu na flavanone koji su slabije djelotvorni, flavan-3-oli katehin i epikatehin su pokazali bolji učinak (6,86-66,12 %).

**Tablica 6.** Inhibicijski učinak flavonoida na aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze ( $\bar{x} \pm SD$ )

Flavonoidi	Inhibicija enzima $\alpha$ -glukozidaze (%)					
	1600 $\mu\text{g/mL}$	800 $\mu\text{g/mL}$	400 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
<b>flavonoli</b>						
<b>miricetin</b>	/	83,67 $\pm$ 3,63	72,44 $\pm$ 1,64	66,36 $\pm$ 2,12	57,30 $\pm$ 1,57	46,48 $\pm$ 1,62
<b>kvercetin</b>	/	61,22 $\pm$ 4,92	52,76 $\pm$ 1,42	54,26 $\pm$ 0,14	44,49 $\pm$ 0,08	37,42 $\pm$ 2,55
<b>kemferol</b>	/	67,47 $\pm$ 4,23	36,27 $\pm$ 8,57	28,31 $\pm$ 3,55	16,49 $\pm$ 0,72	12,96 $\pm$ 1,96
<b>izokvercitrin</b>	57,58 $\pm$ 6,76	34,02 $\pm$ 7,71	33,70 $\pm$ 3,00	25,89 $\pm$ 4,49	19,54 $\pm$ 1,15	8,88 $\pm$ 0,95
<b>rutin</b>	95,17 $\pm$ 0,73	91,21 $\pm$ 2,78	33,44 $\pm$ 3,44	/	/	/
<b>kvercitrin</b>	/	25,65 $\pm$ 0,38	17,30 $\pm$ 3,14	12,35 $\pm$ 0,32	9,12 $\pm$ 4,26	5,63 $\pm$ 1,59
<b>ramnetin</b>	/	28,55 $\pm$ 0,28	9,93 $\pm$ 2,28	10,30 $\pm$ 1,01	4,20 $\pm$ 2,88	n.a.
<b>flavoni</b>						
<b>luteolin-7-O-glukozid</b>	87,13 $\pm$ 7,26	39,91 $\pm$ 1,54	11,14 $\pm$ 1,33	/	/	/
<b>luteolin</b>	72,02*	36,75*	9,73*	/	/	/
<b>apigenin</b>	/	19,13 $\pm$ 4,34	7,34 $\pm$ 2,12	3,06 $\pm$ 0,04	n.a.	n.a.
<b>apigenin-7-O-glukozid</b>	/	7,08 $\pm$ 2,61	4,40 $\pm$ 2,40	1,56 $\pm$ 1,21	n.a.	n.a.
<b>krizin</b>	/	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>akacetin</b>	/	4,00 $\pm$ 0,96	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>flavanoni</b>						
<b>hesperetin</b>	/	17,99 $\pm$ 1,22	10,01 $\pm$ 0,44	11,40 $\pm$ 3,59	6,52 $\pm$ 0,46	4,31 $\pm$ 1,10
<b>hesperidin</b>	/	9,55 $\pm$ 3,11	4,60 $\pm$ 1,47	n.a.	n.a.	n.a.
<b>naringenin</b>	/	44,51 $\pm$ 0,22	36,71 $\pm$ 0,23	30,03 $\pm$ 0,54	22,89 $\pm$ 0,59	19,36 $\pm$ 2,00
<b>naringin</b>	/	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>flavan-3-oli</b>						
<b>(+)-katehin</b>	/	56,96 $\pm$ 0,34	43,48 $\pm$ 1,85	26,17 $\pm$ 3,28	17,89 $\pm$ 0,48	6,86 $\pm$ 0,72
<b>(-)-epikatehin</b>	66,12 $\pm$ 2,78	47,29 $\pm$ 1,31	30,54 $\pm$ 2,00	21,26 $\pm$ 2,33	12,01 $\pm$ 1,07	8,91 $\pm$ 2,35

/ – uzorak nije ispitan u pripadajućoj koncentraciji; n.a. – nije aktivno; \* nije određeno u duplikatu zbog nedostatka supsatncije



Od ukupno 19 ispitanih flavonoida, za deset je određena vrijednost IC<sub>50</sub> koje su prikazane u Tablici 7. Među ispitanim flavonoidima, flavonol miricetin je imao najmanju vrijednost IC<sub>50</sub> (63,84 µg/mL), što je ukazalo na najbolju sposobnost inhibicije aktivnosti α-glukozidaze. Zatim slijede kvercetin i njegov glikozid rutin te kemferol koji su postigli 50 %-tni učinak pri koncentracijama 312,69-553,49 µg/mL. Vrijednosti IC<sub>50</sub> za katehin i luteolin-7-O-glukozid bile su 605,80 µg/mL i 624,79 µg/mL, dok su za epikatehin, luteolin i izokvercitrin bile 1004,93-1313,16 µg/mL.

**Tablica 7.** Vrijednosti IC<sub>50</sub> za ispitivane flavonoide

<b>Flavonoidi</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<b>flavonoli</b>	
<b>miricetin</b>	63,84 ± 12,44
<b>kvercetin</b>	312,69 ± 47,54
<b>rutin</b>	413,42 ± 25,77
<b>kemferol</b>	553,49 ± 18,88
<b>izokvercitrin</b>	1313,16 ± 96,47
<b>flavoni</b>	
<b>luteolin-7-O-glukozid</b>	605,80 ± 135,70
<b>luteolin</b>	1139,89*
<b>flavanoni</b>	
<b>naringenin</b>	1018,35 ± 19,55
<b>flavan-3-oli</b>	
<b>(+)-katehin</b>	624,79 ± 21,97
<b>(-)-epikatehin</b>	1004,93 ± 33,24

\* nije određeno u duplikatu zbog nedostatka supstancije

Dobiveni rezultati su pokazali da flavonoidi imaju sposobnost inhibicije α-glukozidaze, što je u skladu s prethodnim istraživanjima. Najčešće ispitivani flavonoidi kao inhibitori α-glukozidaze su kvercetin (Praparatan i sur., 2022; Liu i sur., 2020; Meng i sur., 2016; Flores-Blocanegra i sur., 2015), miricetin (Liu i sur., 2020; Meng i sur., 2016), epikatehin (Praparatan i sur., 2022; Flores-Blocanegra i sur., 2015) i kemferol (Liu i sur., 2020). Prema Mengu i sur. (2016) miricetin i

kvercetin izolirani iz biljne vrste *Hovenia dulcis* učinkoviti su inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze, a miricetin je inhibitorno potentniji. Liu i sur. (2020) su pokazali da flavonoidi iz biljke *Morelia rubra*, inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu prema redoslijedu: miricetin > kvercetin > kemferol. Ostvarene učinke pojedinih flavonoida iz ovog rada je teško usporediti s literaturnim podacima zbog korištenja različitih metoda ispitivanja, uključujući  $\alpha$ -glukozidazu iz različitih izvora, različite koncentracije uzoraka, enzima i supstrata, različita otapala te različita vremena inkubacije. Rezultati ovog rada su u skladu s istraživanjem kojeg su proveli Tadera i sur. (2006). Istraživali su inhibicijsku aktivnost flavonoida iz različitih skupina na  $\alpha$ -glukozidazu iz kvasca. Ukazali su na snažna inhibicijska svojstva flavonola. Unutar skupine flavonola najveća aktivnost zabilježena je za miricetin, potom kvercetin, a zatim kemferol. Katehin je bio djelotvorniji od epikatehina, a naringenin je pokazao bolji učinak od hesperetina.

#### **4.2. Inhibicijski učinak fenolnih kiselina na aktivnost $\alpha$ -glukozidaze**

U usporedbi s flavonoidima, fenolne kiseline su pokazale značajno slabiju sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze (Tablica 8). U ispitivanom rasponu koncentracija 50-800  $\mu\text{g/mL}$  niti jedna ispitivana fenolna kiselina nije postigla 50%-tnu inhibiciju aktivnosti enzima. U najvećoj ispitanoj koncentraciji hidroksibenzojeve kiseline su ostvarile 7,40-14,54 %-tni učinak, dok su hidroksicimetne kiseline inhibirale 0-40,10 % aktivnosti enzima. Izovanilinska kiselina se pokazala kao najbolji inhibitor među hidroksibenzojevim kiselinama, dok je ružmarinska kiselina bila najučinkovitija iz skupine hidroksicimetnih kiselina u koncentraciji 200  $\mu\text{g/mL}$ .

Uvidom u literaturne podatke može se zaključiti da su među hidroksibenzojevim kiselinama najviše ispitivane vanilinska, galna i siringična kiselina (Aleixandre i sur., 2022; Malunga i sur., 2018), dok su *p*-kumarinska (Aleixandre i sur., 2022; Malunga i sur., 2018; Taslimi i Gulçin, 2017), kavena, ferulična, sinapna te klorogenska kiselina (Aleixandre i sur., 2022; Malunga i sur., 2018) najviše ispitane hidroksicimetne kiseline. Ispitujući inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze štakora, Malunga i sur. (2018) su došli do zaključka da su hidroksicimetne kiseline bolji inhibitori od hidroksibenzojevih kiselina te su posebice istaknuli kavenu i klorogensku kiselinu. Suprotno tome, u ovom istraživanju klorogenska kiselina nije pokazala učinak ni pri najvećoj ispitanoj koncentraciji. S druge strane, Aleixandre i sur. (2022) su istaknuli učinak kavene kiseline na

aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze iz kvasca, dok su najmanju sposobnost inhibicije zabilježili za vanilinsku i siringičnu kiselinu, što je u skladu s rezultatima ovoga rada.

**Tablica 8. Inhibicijski učinak fenolnih kiselina na aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze ( $\bar{x} \pm SD$ )**

Fenolne kiseline	Inhibicija aktivnosti $\alpha$ -glukozidaze (%)				
	800 $\mu\text{g/mL}$	400 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
<b>hidroksibenzojeve kiseline</b>					
vanilinska kiselina	7,40 $\pm$ 1,58	5,28 $\pm$ 1,65	n.a.	n.a.	n.a.
izovanilinska kiselina	14,54 $\pm$ 1,38	6,31 $\pm$ 0,67	4,18 $\pm$ 0,01	3,40 $\pm$ 0,39	3,03 $\pm$ 0,13
salicilna kiselina	10,85 $\pm$ 3,45	2,95 $\pm$ 2,19	n.a.	n.a.	n.a.
galna kiselina	9,87 $\pm$ 0,62	5,57 $\pm$ 1,08	2,80 $\pm$ 0,52	n.a.	n.a.
siringična kiselina	9,25 $\pm$ 2,51	4,53 $\pm$ 0,86	4,15 $\pm$ 1,82	1,65 $\pm$ 0,33	n.a.
<b>hidroksicimetne kiseline</b>					
kavena kiselina	20,63 $\pm$ 5,6	11,24 $\pm$ 4,80	7,51 $\pm$ 4,47	6,57 $\pm$ 5,80	5,22 $\pm$ 3,76
ferulična kiselina	13,08 $\pm$ 0,25	8,19 $\pm$ 0,37	n.a.	n.a.	n.a.
izoferulična kiselina	9,90 $\pm$ 1,00	7,41 $\pm$ 1,70	2,80 $\pm$ 1,13	n.a.	n.a.
<i>o</i> -kumarinska kiselina	12,84 $\pm$ 0,63	3,70 $\pm$ 1,46	2,02 $\pm$ 1,10	n.a.	n.a.
<i>p</i> -kumarinska kiselina	13,73 $\pm$ 1,43	5,80 $\pm$ 1,62	2,91 $\pm$ 0,08	n.a.	n.a.
klorogenska kiselina	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
ružmarinska kiselina	/	/	40,10 $\pm$ 0,77	18,41 $\pm$ 2,23	7,63 $\pm$ 1,26

/ – uzorak nije ispitan u pripadajućoj koncentraciji; n.a. – nije aktivno

### 4.3. Inhibicijski učinak resveratrola na aktivnost $\alpha$ -glukozidaze

Stilben resveratrol je pokazao najveću sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze od svih ispitivanih polifenolnih spojeva. U koncentracijama 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$  i 50  $\mu\text{g/mL}$  inhibirao je enzim u sljedećim postocima:  $55,71 \pm 0,06 \%$ ,  $70,92 \pm 1,73 \%$  i  $80,20 \pm 0,03 \%$ . Dakle, pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji je ostvario 56%-tni učinak. Moguće je napraviti usporedbu s miricetinom koji je pokazao najsnažniji učinak među flavonoidima. Da bi taj flavonolski aglikon postigao 50 %-tni učinak bila je potrebna koncentracija veća od 50  $\mu\text{g/mL}$  (Tablica 7).

Dostupni literaturni podaci upućuju također na snažna inhibicijska svojstva resveratrola (Khalid i sur., 2022; Zhang i sur., 2017; He i Lu, 2013; Kerem i sur., 2006). U usporedbi s akarbozom, resveratrol je u nekoliko studija pokazao veći inhibicijski učinak na aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze (Zhang i sur., 2017; He i Lu, 2013).

### 4.4. Poveznica strukturnih obilježja i inhibicijskog učinka ispitivanih flavonoida

Ideja ovoga rada, između ostaloga, bila je pronaći vezu između strukturnih obilježja ispitivanih fenolnih spojeva i njihovog inhibicijskog učinka na aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze. Odnos strukture i djelovanja flavonoida moguće je promotriti na više razina. Gao i sur. (2004a; 2004b) su razmatrali važnost prstena A i B u strukturi flavonoida, točnije flavona, za sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze te ulogu hidroksilnih supstitucija na tim prstenovima. Zaključili su da je struktura 5,6,7-trihidroksiflavona ključna za snažnu aktivnost te da je hidroksilna supstitucija na B prstenu 5,6,7-trihidroksiflavona povoljna za navedenu aktivnost, dok se metoksilna supstitucija pokazala nepovoljnom. S druge strane, Tadera i sur. (2006) su također sugerirali da hidroksilna supstitucija na prstenu B povećava inhibiciju aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze, uz nezasićenost prstena C te prisutnost 3-OH i 4-CO skupine na prstenu C.

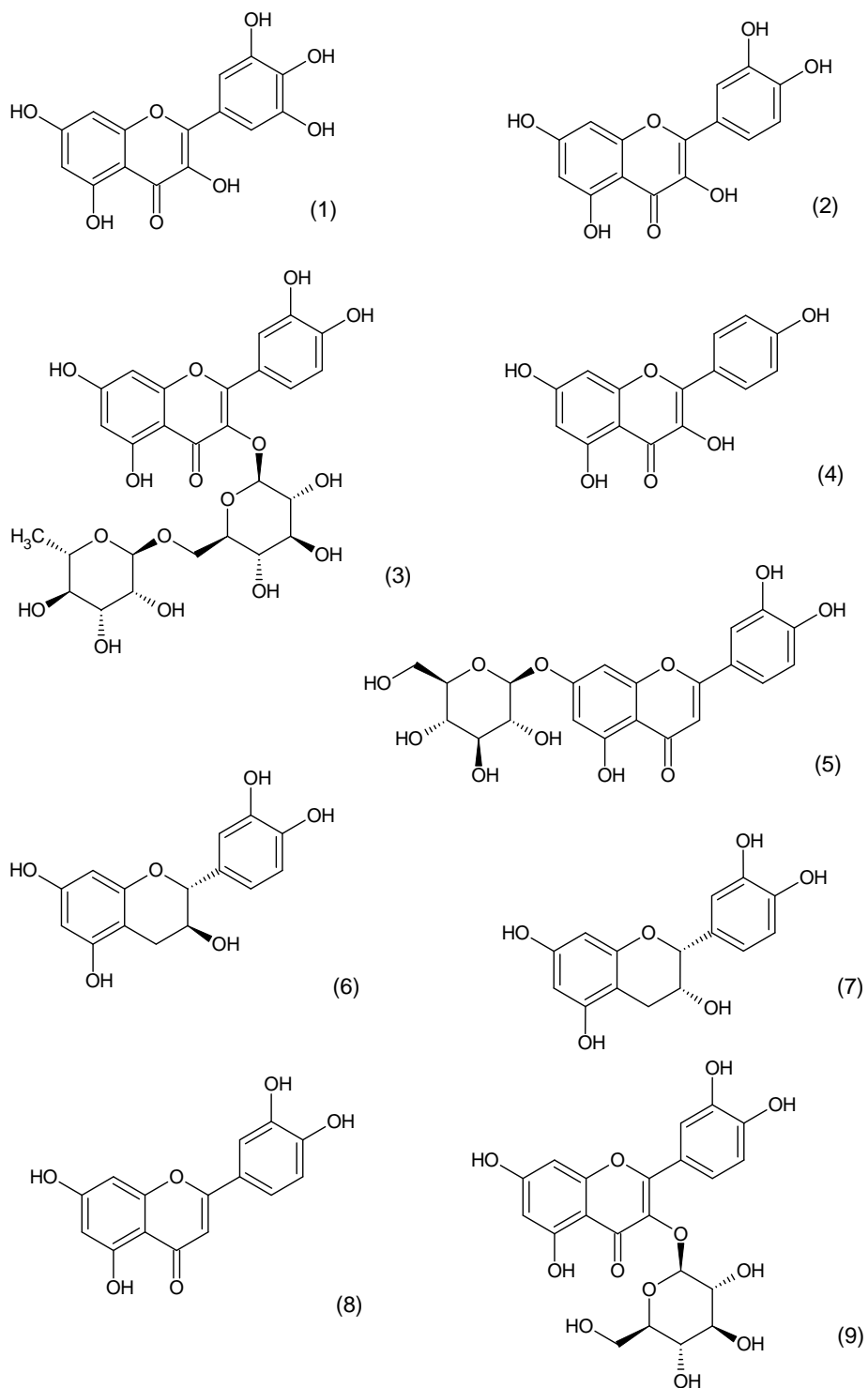
Utjecaj hidroksilne supstitucije na B prstenu na učinak ispitivanih spojeva moguće je proučiti ovisno o tome je li riječ o 4'-hidroksiliranom, 3',4'-dihidroksiliranom ili 3',4',5'-trihidroksiliranom flavonoidima. Unutar iste podskupine flavonoida inhibicijska aktivnost se povećava s porastom broja hidroksilnih skupina na prstenu B. Od ispitanih flavonola, najsnažniji

učinak pokazao je miricetin koji je ujedno bio jedini 3',4',5'-trihidroksilirani flavonoid. S obzirom na sposobnost inhibicije enzima, opadajući niz 3',4'-dihidroksiliranih flavonoida čine kako slijedi: kvercetin > rutin > kemferol > luteolin-7-O-glukozid > (+)-katehin > (-)-epikatehin > luteolin > izokvercitrin (Slika 14).

**Tablica 9.** Strukturna obilježja flavonoida za koje je određena vrijednost IC<sub>50</sub>

Flavonoidi								IC <sub>50</sub> (µg/mL)
C2=C3	C3-OH	C5-OH	C7-OH	C3'-OH	C4'-OH	C5'-OH		
<b>flavonoli</b>								
<b>miricetin</b>	+	+	+	+	+	+	63,84 ± 12,44	
<b>kvercetin</b>	+	+	+	+	+	-	312,69 ± 47,54	
<b>rutin</b>	+	Glu-Ram	+	+	+	-	413,42 ± 25,77	
<b>kemferol</b>	+	+	+	+	-	-	553,49 ± 18,88	
<b>izokvercitrin</b>	+	Glu	+	+	+	-	1313,16 ± 96,47	
<b>flavoni</b>								
<b>luteolin-7-O-glukozid</b>	+	-	+	Glu	+	-	605,80 ± 135,70	
<b>luteolin</b>	+	-	+	+	+	-	1139,89*	
<b>flavan-3-oli</b>								
<b>(+)-katehin</b>	-	+	+	+	+	-	624,79 ± 21,97	
<b>(-)-epikatehin</b>	-	+	+	+	+	-	1004,93 ± 33,24	

\* nije određeno u duplikatu zbog nedostatka supsatncije



**Slika 14.** Kemijske strukture devet flavonoida za koje je određena vrijedost  $IC_{50}$ . Navedeni su u opadajućem nizu s obzirom na inhibicijski učinak na aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze: (1) miricetin, (2) kvercetin, (3) rutin, (4) kemferol, (5) luteolin-7-O-glukozid, (6) (+)-katehin, (7) (-)-epikatehin, (8) luteolin, (9) izokvercitrin.

Unutar skupine flavona, 3',4'-dihidroksilirani spojevi luteolin i luteolin-7-O-glukozid pokazuju veću sposobnost inhibicije u odnosu na 4'-hidroksilirane spojeve poput apigenina i njegovog glikozida. U odnosu na apigenin i apigenin-7-O-glukozid, na položaju 4' prstena B akacetin posjeduje metoksi skupinu umjesto hidroksilne, čime mu je aktivnost značajno smanjena. Nadalje, krizin ne posjeduje niti jednu hidroksilnu skupinu na prstenu B, što najvjerojatnije utječe na izostanak aktivnosti u ispitivanom rasponu koncentracija. Od ispitivanih flavanona, najsnažniji učinak pokazuje naringenin. Hesperetin i njegov glikozidni oblik slabije djeluju jer su metoksilirani u položaju 4'.

Među flavonoidima, flavonoli su se pokazali najboljim inhibitorima aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze. Oni posjeduju dvostruku vezu C2=C3 te 3-OH i 4-CO skupine u heterocikličnom prstenu C, hidroksilirani su u položajima 5 i 7 na prstenu A te imaju najmanje jednu hidroksilnu skupinu na prstenu B.

**Tablica 10.** Strukturna obilježja flavonoida bez vrijednost IC<sub>50</sub> u ispitivanim koncentracijama

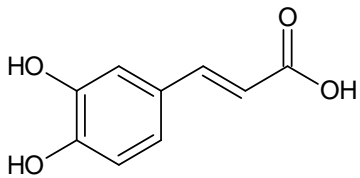
<b>Flavonoidi</b>							
	<b>C2=C3</b>	<b>C3-OH</b>	<b>C5-OH</b>	<b>C7-OH</b>	<b>C3'-OH</b>	<b>C4'-OH</b>	<b>C5'-OH</b>
<b>flavoni</b>							
<b>apigenin</b>	+	-	+	+	-	+	-
<b>apigenin-7-O-glukozid</b>	+	-	+	Glu	-	+	-
<b>krizin</b>	+	-	+	+	-	-	-
<b>akacetin</b>	+	-	+	+	-	OMe	-
<b>flavonoli</b>							
<b>kvercitrin</b>	+	Ram	+	+	+	+	-
<b>ramnetin</b>	+	+	+	OMe	+	+	-
<b>flavanoni</b>							
<b>hesperetin</b>	-	-	+	+	+	OMe	-
<b>hesperidin</b>	-	-	+	Glu-Ram	+	OMe	-
<b>naringin</b>	-	-	+	Glu-Ram	-	+	-
<b>naringenin</b>	-	-	+	+	-	+	-

#### 4.5. Poveznica strukturnih obilježja i inhibicijskog učinka ispitivanih fenolnih kiselina

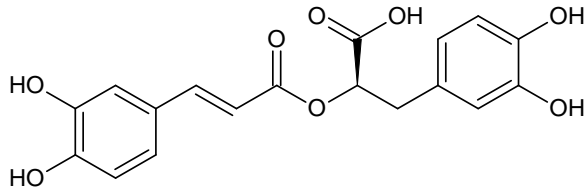
Prisutnost hidroksilnih i metoksi skupina na aromatskom prstenu u strukturi ispitivanih fenolnih kiselina može se dovesti u vezu s njihovom sposobnosti inhibicije aktivnosti enzima. Iako su općenito pokazale slab potencijal u usporedbi s flavonoidima, neke su se fenolne kiseline (Slika 15) ipak istaknule u odnosu na ostale. Ružmarinska kiselina, ester kavene i 3,4-dihidroksifeniloctene kiseline, ostvarila je najbolji učinak. U strukturi posjeduje četiri hidroksilne skupine vezane na aromatske prstenove. Kavena kiselina koja ima dvije hidroksilne skupine na aromatskoj jezgri je također pokazala nešto bolji učinak u odnosu na ostale ispitivane fenolne kiseline. No, interesantno je da klorogenska kiselina kao ester kavene i kina kiseline (Slika 7) nije pokazala sposobnost inhibicije enzima. Oboh i sur. (2015) navode kako kina kiselina u sastavu klorogenske kiseline vjerojatno stvara steričke smetnje u aktivnom mjestu enzima, što remeti afinitet vezanja te posljedično sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze. Među fenolnim kiselinama slabog učinka našle su se one kiseline koje, uz jednu hidroksilnu skupinu, posjeduju jednu ili dvije metoksi skupine na aromatskoj jezgri (vanilinska, siringična i izoferulična kiselina). Malunga i sur. (2018) su zaključili da je inhibicijska snaga fenolnih kiselina pod utjecajem hidroksilacije ili metoksilacije njihovog aromatskog prstena zbog njihove uključenosti u stvaranje interakcija s enzimom. Ustanovljeno je da hidroksilne skupine imaju veći afenitet za stvaranje vodikovih veza u odnosu na metoksi skupine te da prisutnost druge hidroksilne skupine povećava snagu inhibicije enzima mnogo više od metoksi skupine na istom položaju. Aleixandre i sur. (2022) su također opazili da fenolne kiseline s više od jedne hidroksilne skupine u svojoj strukturi pokazuju veću sposobnost inhibicije u usporedbi s kiselinama koje posjeduju samo jednu hidroksilnu skupinu ili jednu hidroksilnu skupinu s jednom ili dvije metoksi skupine.

Kako su postoci inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze u ispitivanom rasponu koncentracija fenolnih kiselina niski, usporedba odnosa strukture i učinka je slabo mjerodavna i teško je točno ustvrditi pravilan obrazac strukturnih obilježja koja su ključna za inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze. Ipak, jasno je da prisutnost hidroksilnih i metoksi skupina na aromatskim prstenovima ima važnu ulogu u vezivanju na aktivno mjesto enzima, što utječe na sposobnosti inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze. Iako su neke hidroksicimetne kiseline pokazale nešto bolji učinak u odnosu na hidroksibenzojeve, nije moguće donijeti općeniti zaključak o tome.





kavena kiselina



ružmarinska kiselina

**Slika 15.** Strukture kavene i ružmarinske kiseline

#### 4.6. Poveznica strukturnih obilježja i inhibicijskog učinka resveratrola

Resveratrol, kao jedini ispitivani stilben, istaknuo se snažnim inhibicijskim učinkom u odnosu na sve ostale ispitivane polifenolne spojeve. Osnovna 1,2-difeniletilenska struktura resveratrola s pridružene tri hidroksilne skupine na aromatskim jezgrama omogućavaju vezanje na aktivno mjesto  $\alpha$ -glukozidaze i posljedičnu inhibiciju. Vrlo je izgledno da hidroksilne skupine imaju ključnu ulogu u vezanju na enzim, slično kao kod flavonoida i fenolnih kiselina. Zhang i sur. (2017) su pokazali da resveratrol i piceatanol snažno inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu iz kvasca i sisavaca. U odnosu na resveratrol, piceatanol sadrži dodatnu hidroksilnu skupinu na položaju 3', pa stoga najvjerojatnije ima i bolji učinak. Iako resveratrol pokazuje izuzetnu sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze, trebalo bi ispitati koje promjene u njegovoj strukturi doprinose povećanju, odnosno smanjenju inhibicijskog učinka. Tako bi se moglo doći do spoznaja o skupinama koje su bitne za optimalno vezivanje na aktivno mjesto enzima. Stoga je poželjno ispitivanje navedenih stilbena i flavonoida te njihovih strukturnih analoga da bi se proširile spoznaje o inhibicijskim učincima polifenola na aktivnost enzima  $\alpha$ -glukozidaze.

## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju dobivenih rezultata o sposobnosti inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze odabranim polifenolnim spojevima moguće je donijeti sljedeće zaključke:

- Flavonoidi, fenolne kiseline i stilbeni imaju potencijal inhibicije aktivnosti enzima  $\alpha$ -glukozidaze.
- Flavonoidi su pokazali zadovoljavajuću aktivnost, pri čemu su se flavonoli istaknuli kao najpotentniji inhibitori.
- Fenolne kiseline posjeduju slabiju sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze u odnosu na flavonoide.
- Stilben resveratrol, poznat po izraženim antioksidacijskim svojstvima, pokazuje najsnažnije djelovanje od svih ispitanih polifenola.
- Unutar iste podskupine flavonoida sposobnost inhibicije enzima se povećava s porastom broja hidroksilnih skupina u prstenu B. Flavonol miricetin, kao jedini 3',4',5'-trihidroksilirani flavonoid ispitan u ovom radu, pokazao je najbolji učinak ( $IC_{50}$   $63,84 \pm 12,44$   $\mu\text{g/mL}$ ).
- Metoksilacija i hidroksilacija aromatskog prstena fenolnih kiselina utječe na sposobnost vezivanja na aktivno mjesto enzima te posljedično na inhibiciju aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze.
- Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu daljnjih ispitivanja hipoglikemijskih svojstava testiranih polifenola s najvećom sposobnosti inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze.

## **6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA**

1 U – jedinica enzimске katalitičke aktivnosti  
4CL - p-kumarat-CoA ligaza  
acetil-CoA – acetil koenzim A  
ATP – adenzin trifosfat  
C4H – cinamat 4-hidroksilaz  
CHI – kalkon izomeraza  
CHS – kalkon sintaza  
COMT - katehol-O-metiltransferaza  
DMSO – dimetil sulfoksid  
DPP-4 – dipeptidil peptidaza 4  
EPSP - 3-fosfoenolpiruvilšikimat  
F3H – flavanon 3-hidroksilaza  
FLS – flavonol sintaza  
FNS – flavon sintaza  
GDM – gestacijski diabetes mellitus  
GLP-1 – glukagonu sličan peptid-1  
HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - bikarbonat/hidrogenkarbonat  
IC<sub>50</sub> - koncentracija uzorka koja ostvaruje 50%-tni učinak inhibicije  
PAL – fenilalanin amonij liaza  
PPAR- $\gamma$  - receptor za aktivator proliferacije peroksisoma tip gama  
S3H - salicilna kiselina 3-hidroksilaza  
SD – standardna devijacija  
SGLT2 - kotransporter natrija i glukoze 2  
SS – stilben sintaza  
ŠBT2 – šećerna bolest tipa 2  
TAL - tirozin amonij liaza

## **7. LITERATURA**

Alam S, Sarker MMR, Sultana TN, et al. Antidiabetic phytochemicals from medicinal plants: Prospective candidates for new drug discovery and development. *Front Endocrinol*, 2022, 13, 800714.

Aleixandre A, Gil JV, Sineiro J, Rosell CM. Understanding phenolic acids inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase and influence of reaction conditions. *Food Chem*, 2022, 372, 131231.

Andrei V, Copolovici D, Munteanu FD, et al. Detection of biomedically relevant stilbenes from wines by mass spectrometry. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1140, 665-684.

Aron PM, Kennedy JA. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52, 79-104.

Assefa ST, Yang EY, Chae SY, et al. Alpha glucosidase inhibitory activities of plants with focus on common vegetables. *Plants*, 2019, 9, 2.

Bedekar A, Shah K, Koffas M. Natural products for type II diabetes treatment. *Adv Appl Microbiol*, 2010, 71, 21-73.

Bertelli A, Biagi M, Corsini M, Bainsi G, Cappellucci G, Miraldi E. Polyphenols: From theory to practice. *Foods*, 2021, 10, 2595.

Bhatia A, Singh B, Arora R, Arora S. In vitro evaluation of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potential of methanolic extracts of traditionally used antidiabetic plants. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19, 74.

Bljajić K, Petlevski R, Vujić L, Ačačić A, Šoštarić N, Jablan J, Saraiva de Carvalho I, Zovko Končić M. Chemical composition, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase-inhibiting activities of the aqueous and hydroethanolic extracts of *Vaccinium myrtillus* leaves. *Molecules*, 2017, 22, 703.

Božikov V. Patofiziologija žlijezda s unutarnjim izlučivanjem: Endokrina gušterača i gastrointestinalni hormoni. U: Klinička patofiziologija za studente Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Kujundžić M, urednik, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Zagreb, 2003, str. 284-291.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(8), 1001-1043.

Dewick PM. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. West Sussex, John Wiley and Sons, 2002, str. 8-9; 35; 121-129.

Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*, 2021, 13, 273.

Diabetes, <https://www.who.int>, pristupljeno 16. 06. 2022.

Donnez D, Jeandet P, Clément C, Courot E. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(12), 706-713.

Escarpa A, Gonzalez MC. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Crit Reviews in Analytical Chemistry*, 2001, 31(2), 57-139.

Flores-Bocanegra L, Pérez-Vásquez A, Torres-Piedra M, Bye R, Linares E, Mata R.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from *Vauquelinia corymbosa*. *Molecules*, 2015, 20(8), 15330-15342.

Gao H, Kawabata J. Importance of the B ring and its substitution on the alpha-glucosidase inhibitory activity of baicalein, 5,6,7-trihydroxyflavone. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(9), 1858-1864.

Gao H, Nishioka T, Kawabata J, Kasai T. Structure-activity relationships for alpha-glucosidase inhibition of baicalein, 5,6,7-trihydroxyflavone: the effect of A-ring substitution. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(2), 369-375.



Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J Med Plant Res*, 2011, 5(31), 6697-6703.

Guyton AC, Hall JE. Inzulin, glukagon i šećerna bolest. U: Medicinska fiziologija – udžbenik, 13. izdanje. Guyton AC, Hall JE (Andreis I, Kukolja Taradi S, Taradi M), urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2017, str. 994-997.

He H, Lu YH. Comparison of inhibitory activities and mechanisms of five mulberry plant bioactive components against  $\alpha$ -glucosidase. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(34), 8110-8119.

Huang DD, Shi G, Jiang Y, Yao C, Zhu C. A review on the potential of resveratrol in prevention and therapy of diabetes and diabetic complications. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125, 109767.

Kaul K, Tarr JM, Ahmad SI, Kohner EM, Chibber R. Introduction to diabetes mellitus. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 771, 1-11.

Kerem Z, Bilkis I, Flaishman MA, Sivan L. Antioxidant activity and inhibition of alpha glucosidase by trans-resveratrol, piceid, and a novel trans-stilbene from the roots of Israeli Rumex bucephalophorus L. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(4), 1243-1247.

Khalid MF, Rehman K, Irshad K, Chohan TA, Akash MSH. Biochemical investigation of inhibitory activities of plant-derived bioactive compounds against carbohydrate and glucagon-like peptide-1 metabolizing enzymes. *Dose Response*, 2022, 20(2), 15593258221093275.

Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. Flavonoids-food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2014, 65(2), 79-85.

Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep*, 2019, 24, e00370.

Lankatillake C, Luo S, Flavel M, et al. Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods*, 2021, 17(1), 3.

Liu Y, Zhan L, Xu C, et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from Chinese bayberry (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) fruit: molecular docking and interaction mechanism of flavonols with different B-ring hydroxylations. *RSC Adv*, 2020, 10, 29347.

Malunga, LN, Joseph Thandapilly, S, Ames, N. Cereal-derived phenolic acids and intestinal alpha glucosidase activity inhibition: Structural activity relationship. *J Food Biochem*, 2018, 42, e12635.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79(5), 727-747.

Meng Y, Su A, Yuan S, et al. Evaluation of total flavonoids, myricetin, and quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. as inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Plant Foods Hum Nutr*, 2016, 71(4), 444-449.

Nolte Kennedy MS, Masharani U. Hormoni gušterače i lijekovi za liječenje šećerne bolesti. U: Temeljna i klinička farmakologija. Katzung BG, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. 751-752; 757-769.

Oboh G, Agunloye OM, Adefegha SA, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (*in vitro*): a comparative study. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2015, 26(2), 165-170.

Panche AN, Diwan, AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 2016, 5, e47.

Pevalek-Kozlina B. Fiziologija bilja. Profil International, Zagreb, 2003, str. 566.

Prapatana R, Maliyam P, Barrows LR, Puttarak P. Flavonoids and phenols, the potential anti-diabetic compounds from *Bauhinia strychnifolia* Craib. Stem. *Molecules*, 2022, 27(8), 2393.

Rambaran TF. Nanopolyphenols: a review of their encapsulation and anti-diabetic effects. *SN Appl. Sci*, 2020, 2, 1335.

Ríos JL, Francini F, Schinella GR. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Planta Med*, 2015, 81(12-13), 975-994.

Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(10), 2866-2887.

Salehi B, Ata A, V Anil Kumar N, et al. Antidiabetic potential of medicinal plants and their active components. *Biomolecules*, 2019, 9(10), 551.

Shen T, Wang XN, Lou HX. Natural stilbenes: an overview. *Nat Prod Rep*, 2009, 26, 916-935.

Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2006, 52, 149-153.

Taslimi P, Gulçin İ. Antidiabetic potential: in vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on  $\alpha$ -glycosidase and  $\alpha$ -amylase enzymes. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, 31, e21956.

Škalamera Đ. Heterociklička kemija, 2019., <https://www.pmf.unizg.hr>, pristupljeno 30.05.2022.

Tian B, Liu J. Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *J Sci Food Agric*, 2020, 100, 1392-1404.

Valanciene E, Jonuskiene I, Syrpas M, et al. Advances and prospects of phenolic acids production, biorefinery and analysis. *Biomolecules*, 2020, 10, 874.

Zhang AJ, Rimando AM, Mizuno CS, Mathews ST.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of resveratrol and piceatannol. *J Nutr Biochem*, 2017, 47, 86-93.

## **8. SAŽETAK/SUMMARY**

Šećerna bolest kronični je metabolički poremećaj sa sve većim brojem oboljelih. Kao jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Prevencija, rano otkrivanje te adekvatna terapija su ključne za sprječavanje progresije bolesti i njezinih komplikacija. Bioaktivne tvari iz biljaka se sve više istražuju zbog potencijalnih antidijabetičkih svojstava, a manje neželjenih učinaka u odnosu na konvencionalno dostupne antidijabetike. Sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze jedno je od tih poželjnih svojstava budući da smanjivanjem i usporavanjem apsorpcije glukoze doprinosi kontroli postprandijalne hiperglikemije. Cilj ovog rada bio je provesti usporedno ispitivanje sposobnosti odabranih polifenola da inhibiraju aktivnost enzima  $\alpha$ -glukozidaze te pronaći poveznicu između učinka i strukturnih obilježja ispitivanih spojeva. Među flavonoidima, najučinkovitijim su se pokazali flavonoli koji imaju dvostruku C2=C3 vezu, hidroksilnu skupinu na C-3 i karbonilnu skupinu na C-4 u središnjem heterocikličnom prstenu C te hidroksilirani aromatski prsten B. Flavonol miricetin ( $IC_{50}$  63,84  $\mu$ g/mL), kao jedini ispitani 3',4',5'-trihidroksilirani spoj, pokazao se snažnijim inhibitorom enzima u odnosu na di- i monohidroksilirane flavonoide u prstenu B. Fenolne kiseline su se pokazale značajno slabijim inhibitorima enzima u usporedbi s flavonoidima, a na učinak je utjecao stupanj hidroksilacije i metoksilacije aromatskog prstena. Od svih ispitivanih polifenola, stilben resveratrol je pokazao najveću sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze.

Diabetes is a chronic metabolic disease with an increasing number of patients. As one of the leading causes of death worldwide, it is a significant public health problem. Prevention, early detection and appropriate therapy are key to prevent the progression of the disease and its complications. Therefore, bioactive plant compounds are increasingly being investigated for their potential antidiabetic properties, with fewer side effects compared to conventional antidiabetic drugs. The ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase is one of these desirable properties, as it contributes to the control of postprandial hyperglycemia by reducing and slowing the absorption of glucose uptake. The aim of this study was to comparatively investigate the ability of selected polyphenols to inhibit the activity of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme and to establish a link between the effect and the structural properties of the compounds. Among flavonoids, flavonols with a C2=C3 double bond, a hydroxyl group at C-3 and a carbonyl group at C-4 in the central heterocyclic ring C and the hydroxylated aromatic ring B were found to be the most effective inhibitors. The flavonol myricetin ( $IC_{50}$  63.84  $\mu$ g/mL), proved to be the only 3',4',5'-trihydroxylated compound tested, as a more potent inhibitor of the enzyme compared to di- and monohydroxylated flavonoids at ring B. Phenolic acids were much weaker enzyme inhibitors compared to flavonoids, and the effect was influenced by the degree of hydroxylation and methoxylation of the aromatic ring. Of all the polyphenols studied, stilbene resveratrol showed the greatest ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakognoziju  
Trg Marka Marulića 20, 10000 Zagreb

Diplomski rad

### ISPITIVANJE INHIBICIJE $\alpha$ -GLUKOZIDAZE ODABRANIM POLIFENOLIMA

Marija Pavičić

#### SAŽETAK

Šećerna bolest kronični je metabolički poremećaj sa sve većim brojem oboljelih. Kao jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Prevencija, rano otkrivanje te adekvatna terapija su ključne za sprječavanje progresije bolesti i njezinih komplikacija. Bioaktivne tvari iz biljaka se sve više istražuju zbog potencijalnih antidijabetičkih svojstava, a manje neželjenih učinaka u odnosu na konvencionalno dostupne antidijabetike. Sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze jedno je od tih poželjnih svojstava budući da smanjivanjem i usporavanjem apsorpcije glukoze doprinosi kontroli postprandijalne hiperglikemije. Cilj ovog rada bio je provesti usporedno ispitivanje sposobnosti odabranih polifenola da inhibiraju aktivnost enzima  $\alpha$ -glukozidaze te pronaći poveznicu između učinka i strukturnih obilježja ispitivanih spojeva. Među flavonoidima, najučinkovitijim su se pokazali flavonoli koji imaju dvostruku C2=C3 vezu, hidroksilnu skupinu na C-3 i karbonilnu skupinu na C-4 u središnjem heterocikličnom prstenu C te hidroksilirani aromatski prsten B. Flavonol miricetin ( $IC_{50}$  63,84  $\mu$ g/mL), kao jedini ispitani 3',4',5'-trihidroksilirani spoj, pokazao se snažnijim inhibitorom enzima u odnosu na di- i monohidroksilirane flavonoide u prstenu B. Fenolne kiseline su se pokazale značajno slabijim inhibitorima enzima u usporedbi s flavonoidima, a na učinak je utjecao stupanj hidroksilacije i metoksilacije aromatskog prstena. Od svih ispitivanih polifenola, stilben resveratrol je pokazao najveću sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze.

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

Rad sadrži: 58 stranica, 15 slika, 10 tablica i 49 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: polifenoli, flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni,  $\alpha$ -glukozidaza, šećerna bolest

Mentor: **Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, redovita profesorica u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, redovita profesorica u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Maja Bival Štefan**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb

Diploma thesis

### STUDY OF $\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITION BY SELECTED POLYPHENOLS

Marija Pavičić

#### SUMMARY

Diabetes is a chronic metabolic disease with an increasing number of patients. As one of the leading causes of death worldwide, it is a significant public health problem. Prevention, early detection and appropriate therapy are key to prevent the progression of the disease and its complications. Therefore, bioactive plant compounds are increasingly being investigated for their potential antidiabetic properties, with fewer side effects compared to conventional antidiabetic drugs. The ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase is one of these desirable properties, as it contributes to the control of postprandial hyperglycemia by reducing and slowing the absorption of glucose uptake. The aim of this study was to comparatively investigate the ability of selected polyphenols to inhibit the activity of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme and to establish a link between the effect and the structural properties of the compounds. Among flavonoids, flavonols with a C2=C3 double bond, a hydroxyl group at C-3 and a carbonyl group at C-4 in the central heterocyclic ring C and the hydroxylated aromatic ring B were found to be the most effective inhibitors. The flavonol myricetin ( $IC_{50}$  63.84  $\mu$ g/mL), proved to be the only 3',4',5'-trihydroxylated compound tested, as a more potent inhibitor of the enzyme compared to di- and monohydroxylated flavonoids at ring B. Phenolic acids were much weaker enzyme inhibitors compared to flavonoids, and the effect was influenced by the degree of hydroxylation and methoxylation of the aromatic ring. Of all the polyphenols studied, stilbene resveratrol showed the greatest ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase.

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

Thesis includes: 58 pages, 15 figures, 10 tables and 49 references. Original is in Croatian language.

Keywords: polyphenols, flavonoids, phenolic acids, stilbenes,  $\alpha$ -glucosidase, diabetes

Mentor: **Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Bival Štefan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2022.