

Interakcije prehrambenih vlakana s polifenolima iz biljnih ekstrakata: utjecaj na biodostupnost

Eršek, Marina

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:163:473445>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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



Marina Eršek

**Interakcije prehrambenih vlakana s polifenolima
iz biljnih ekstrakata: utjecaj na biodostupnost**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, na kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekt prehrane i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na ukazanoj pomoći, susretljivosti i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem asistentici Kristini Radić na pomoći, strpljenju i potpori tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Hvala svim mojim prijateljima i prijateljicama što ste mi ovaj period života učinili najljepšim i nezaboravnim.

Hvala Ratku koji je uvijek bio tu za mene i pružao oslonac tijekom cijelog školovanja.

Hvala Ivani na svakoj proslijeđenoj skripti i velikoj podršci tijekom studiranja.

Najveće hvala mojim roditeljima i sestri na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i razumijevanju tijekom svih lijepih i malo manje lijepih perioda studija. Hvala što ste uvijek vjerovali u mene.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Funkcionalna hrana.....	2
1.2. Vlakna.....	3
1.3. Antioksidansi	6
1.3.2. Ekstrakt sjemenki grožđa	9
1.3.3. Resveratrol	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali	15
3.1.1. Uzorci za analizu.....	15
3.1.2. Kemikalije i pribor	16
3.1.3. Instrumenti	17
3.2. Dizajn istraživanja	17
3.3. Priprema uzoraka za analizu.....	18
3.3.1. Priprema simulirane gastrične tekućine (SGF) i simulirane intestinalne tekućine (SIF)	18
3.3.2. Priprema uzoraka	19
3.4. Metode	19
3.4.1. Princip metode	20
3.4.2. Postupak.....	20
3.5. Statistička analiza	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Gastrointestinalna stabilnost polifenola iz ekstrakta japanskog dvornika i ekstrakta sjemenki grožđa.....	23
4.2. Interakcije polifenola iz ekstrakta biljke <i>Polygonum cuspidatum</i> s mješavinama prehrambenih vlakana.....	25

4.3. Interakcije polifenola iz ekstrakta sjemenki grožđa s mješavinama prehrambenih vlakana.....	27
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA.....	33
7. SAŽETAK/SUMMARY	37
7.1. Sažetak.....	38
7.2. Summary.....	39
8. PRILOZI.....	40
8.1. Kratice	41
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Funkcionalna hrana

„Neka hrane bude tvoj lijek, a lijek tvoja hrana“ govorio je još Hipokrat prije gotovo 2500 godina. U moderno doba, razvojem novih spoznaja o ulozi hrane u očuvanju zdravlja organizma, sve više shvaćamo da hrana igra važnu ulogu u prevenciji i liječenju bolesti. Naime, kronične bolesti s najvišom incidencijom smrtnosti (kardiovaskularne, šećerna bolest tipa 2, neke vrste tumora) povezane su upravo s lošim obrascem prehrane. Sve je to dovelo do razvoja koncepta optimizirane prehrane, odnosno uporabe funkcionalne hrane u svakodnevnoj prehrani opće populacije. Iako je izraz „funkcionalna hrana“ nastao u Japanu 1970-ih godina i odnosio se na namirnice obogaćene biološki aktivnim spojevima za koje je znanstveno dokazano da imaju pozitivan učinak na zdravlje, još uvijek ne postoji općeprihvaćena definicija funkcionalne hrane (Asgary i sur., 2018). FUF0SE (European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe) ju je okarakterizirala kao:

- Konvencionalnu ili svakodnevnu hranu
- Moguće ju je konzumirati kao dio uobičajene prehrane
- Prirodnog je sastava, s komponentama koje se mogu prirodno naći u toj hrani ili su dodane u tu hranu u većoj količini od koncentracije specifične za tu hranu
- Ima pozitivan utjecaj na fiziološke funkcije
- Može poboljšati opće zdravstveno stanje ili smanjiti rizik od bolesti
- Ima potvrđene i utemeljene zdravstvene tvrdnje (Čalić i sur., 2011)

Funkcionalna hrana može se praktično podijeliti u pet skupina proizvoda prikazanih u Tablici 1.

Tablica 1. Tipovi funkcionalne hrane (preuzeto iz Čalić i sur., 2011)

Nemodificirana i neprerađena hrana	Hrana u svojem prirodnom obliku, najjednostavniji oblik funkcionalne hrane
Obogaćeni proizvodi	Hrana u kojoj su povećane količine nutrijenata koje ona već sadrži (<i>fortified food</i>) ili ona u koju su dodani nutrijenti koje prirodno ne sadrži (<i>enriched food</i>)
Izmijenjeni proizvodi	Hrana u kojoj je postojeća komponenta i/ili antinutrijent zamijenjen nutrijentom koji ima pozitivan učinak (<i>altered food</i>)
Poboljšani proizvodi	Hrana kod koje je jedna ili više komponenta prirodno obogaćena kroz specijalne uvjete uzgoja biljaka, genetske manipulacije i sl. (<i>enhanced commodities</i>)

Posebne komponente funkcionalne hrane su probiotici i prebiotici. Oni sami po sebi nisu nutrijenti, međutim hrana koja ih sadrži ima dokazane pozitivne učinke na zdravlje ljudi. Probiotici su živi mikroorganizmi čija se prisutnost u probavnom traktu povezuje s mnogim pozitivnim učincima u održavanju zdravlja. Prebiotici su neprobavljive komponente koje služe kao hrana bakterijama u probavom traktu. Iako ih čovjek ne može probaviti niti se apsorbiraju u cirkulaciju, bakterije ih metaboliziraju u metabolite koji se apsorbiraju i ispoljavaju mnoge blagotvorne učinke na zdravlje organizma (Čalić i sur., 2011).

1.2. Vlakna

Prema definiciji Europske direktive iz 2011. Godine „vlakno“ označava ugljikohidratne polimere s tri ili više monomerskih jedinica, koji nisu probavljivi niti apsorbirani u ljudskom tankom crijevu i pripadaju u jednu od sljedećih kategorija:

- Jestivi ugljikohidratni polimeri prirodno prisutni u hrani
- Jestivi ugljikohidratni polimeri dobiveni fizikalnim, enzimatskim ili kemijskim metodama iz prehrambenih sirovina koji imaju dokazane blagotvorne fiziološke učinke
- Jestivi sintetički ugljikohidratni polimeri koji imaju dokazane blagotvorne fiziološke učinke (Stephen i sur., 2017)

Vlakna se najjednostavnije mogu podijeliti prema topljivosti u etanolu na topljiva i netopljiva, dok se prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane ona dijele na:

- Ne-škrobne polisaharide – celuloza, hemiceluloze, pektini, hidrokoloidi (gume, mucilagi, β -glukani)
- Rezistentne oligosaharide – fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi
- Rezistentni škrob
- Lignin (Hijová i sur., 2019)

Opće je prihvaćena činjenica da prehrana bogata vlaknima ima povoljne učinke na zdravlje čovjeka. Visok unos vlakana ima direktan utjecaj na zdravlje probavnog sustava te je povezan s održavanjem normalne tjelesne mase i manjom incidencijom kardiovaskularnih bolesti. Smatralo se da netopljiva vlakna djeluju primarno u lumenu debelog crijeva gdje imaju laksativni učinak, dok topljiva djeluju na serumske lipide. Međutim, znanstveni dokazi ne potvrđuju ovu teoriju. Na primjer, topljiva vlakna kao što su inulin i rezistentni škrob ne snizuju kolesterol, dok topljiva vlakna kao što su ona iz zobi i psilium imaju vrlo dobro laksativno djelovanje (Slavin, 2013).

Dobri izvori prehrambenih vlakana su voće, povrće i integralne žitarice. Pšenica, raž, riža i ostale žitarice sadrže puno netopljivih vlakana, dok ječam sadrži obje vrste. Zob i pektini iz voća, kao i ljuskice psiliuma te sjemenke lana su dobri izvori topljivih vlakana. Mahunarke, grah, grašak te ostalo voće i povrće sadrži i topljiva i netopljiva vlakna (Ramaa i sur., 2006). Preporučeni dnevni unos vlakana u većini europskih zemalja je 30-35 g dnevno za muškarce i 25-32 g za žene, dok je, prema studiji provedenoj na 140.000 osoba različitih životnih dobi, dnevni unos bio 18 – 24 g za muškarce i 16 – 20 g za žene (Berber i sur., 2020).

Funkcionalna vlakna sastoje se od izoliranih, neprobavljivih ugljikohidrata iz biljnih, životinjskih ili sintetskih izvora koji imaju povoljne fiziološke učinke u ljudskom organizmu prikazane u Tablici 2.

Tablica 2. Fiziološki učinci vlakana (Izvori: Berber i sur., 2020; Slavin, 2013; Ramaa i sur., 2006)

Motilitet crijeva i prevencija konstipacije	Vlakna povećavaju masu stolice, navlače vodu te povećavaju bakterijsku masu u crijevu. Sve ovo povećava i omekšava stolicu, što smanjuje vrijeme zadržavanja i bitno olakšava defekaciju. Provedene su mnoge studije koje nepobitno dokazuju učinkovitost vlakana u liječenju i prevenciji konstipacije.
Prevencija kardiovaskularnih bolesti	Viskozni polisaharidi smanjuju apsorpciju kolesterola i masnih kiselina te bilijarnog kolesterola i žučnih kiselina te tako smanjuju razinu LDL kolesterola u serumu. Također, njihovom fermentacijom nastaju kratkolančane masne kiseline koje se apsorbiraju i smanjuju endogenu sintezu kolesterola. Epidemiološke studije potvrđuju da adekvatan unos vlakana smanjuje rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti i koronarne bolesti srca.
Šećerna bolest tipa 2	Velika kohort studija (75,000 ispitanika, 14 godina) pokazala je da su ispitanici koji su unosili >15 g vlakana dnevno imali značajno manji rizik od razvoja ŠBT2. Rezultati istraživanja utjecaja vlakana na post-prandijalnu koncentraciju glukoze su nekonzistentni.
Kontrola apetita	Randomizirana, dvostruko slijepa, placebo kontrolirana klinička studija na 100 pretilih dobrovoljaca pokazala je da suplementacija pšeničnim dekstrinom (14 – 24 g/dne) povećava osjećaj sitosti i smanjuje unos kalorija.

Posebnu skupinu vlakana čine prebiotici. Prema definiciji, to su spojevi otporni na razgradnju želučanom kiselinom i probavnim enzimima sisavaca koji se ne apsorbiraju u GIT-u, već ih intestinalna mikrobiota fermentira te selektivno stimuliraju rast i/ili aktivnost dobrih bakterija u lumenu crijeva, što ima povoljan učinak na zdravlje domaćina. S kemijske strane, većina prebiotika su oligosaharidne strukture, s 3 – 9 monomernih podjedinica. Mogu se podijeliti na:

- Fruktane – fruktooligosaharidi (FOS) i inulin
- Galaktooligosaharide (GOS) – koji uključuju i trans-galaktooligosaharide (TOS)
- Rezistentni škrob – otporan je na probavu i proizvodi velike količine butirata
- Drugi oligosaharidi – podrijetlom iz pektina (POS) (Davani-Davari i sur., 2019)

Osnovni produkt bakterijske fermentacije prebiotika su kratkolančane masne kiseline, od kojih su najvažnije acetatna, propionatna i butiratna kiselina. Sama fermentacija smanjuje luminalnu pH vrijednost te tako inhibira rast patogenih mikroorganizama i raspad peptida čime se direktno smanjuje stvaranje toksičnih produkata poput amonijaka, amina i fenolnih spojeva. Nadalje, butirat je primarna hrana crijevnih epitelnih stanica te se smatra ključnim faktorom određivanja metaboličke aktivnosti i rasta kolonocita. Kratkolančane masne kiseline topljive su u vodi te se apsorbiraju u organizam gdje također ispoljavaju značajne benefite. Primjerice, propionat interferira sa sintezom kolesterola u jetri te tako smanjuje njegovu koncentraciju u krvi (Slavin, 2013).

Zbog svoje polimerne strukture, vlakna predstavljaju problem pri apsorpciji drugih sastavnica hrane. Pretpostavlja se da je u zapadnjačkoj prehrani oko 50% polifenolnih spojeva vezano na vlakna te se kao takvi ne mogu apsorbirati u organizam i ispoljiti svoj učinak. Kako vlakna najčešće grade vanjski zid stanice, a polifenoli se nalaze u vakuoli, njihova interakcija ne može se izbjeći. Na primjer, procijanidini se adsorbiraju na vlakna staničnog zida preko vodikovih veza i hidrofobnih interakcija (Ribas-Agustí i sur., 2017).

1.3. Antioksidansi

Reaktivne kisikove vrste (ROS), kao i reaktivne dušikove vrste (RNS) fiziološki su nusprodukt metaboličkih funkcija stanice. Uloga tih specija je dvojaka – u umjerenim koncentracijama su korisni, npr. u obrani organizma od patogena, dok u višim koncentracijama oštećuju DNA, stanične lipide i proteine. Štetan učinak slobodnih radikala naziva se oksidativni, odnosno nitrosativni stres. Taj pojam spominje se u patofiziologiji brojnih kroničnih bolesti, kao što su šećerna bolest, neurodegenerativne bolesti, karcinom, kronična upala te starenje (Valko i sur., 2007).

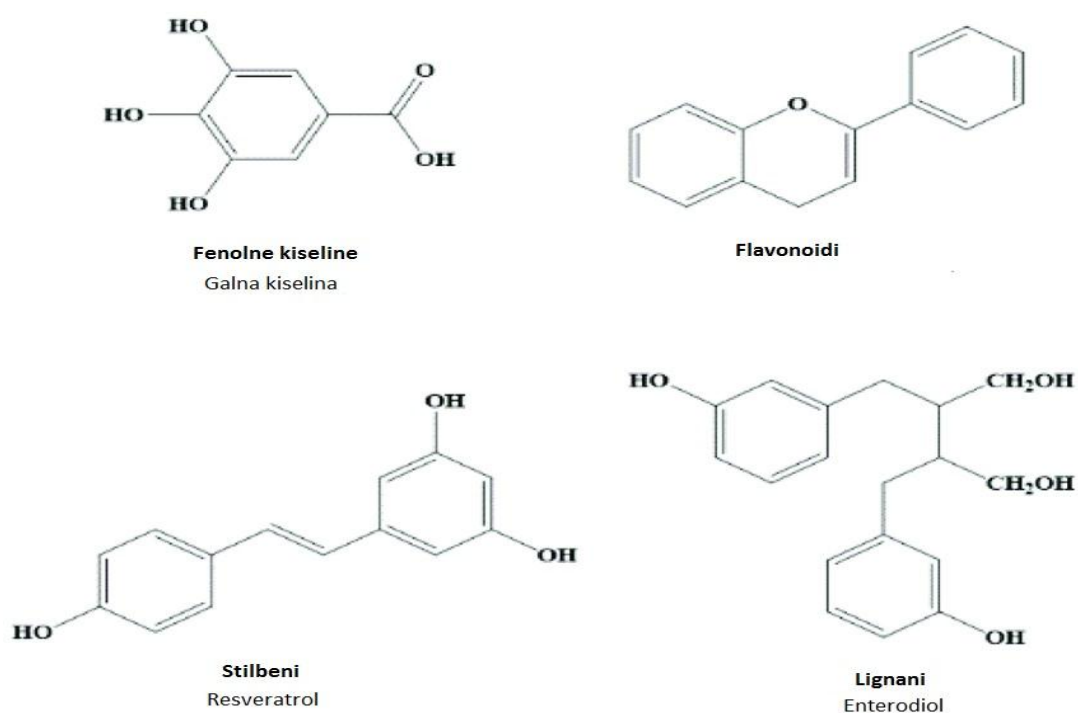
Reaktivni kisikovi spojevi su visoko reaktivne molekule dobivene metabolizmom kisika, odnosno procesom stvaranja energije oksidacijom hrane u organizmu. Takav oksidativni metabolizam odgovoran je za stvaranje slobodnih radikala kisika, koji uključuju superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (HO^{\cdot}), peroksidni radikal (HOO^{\cdot}) te molekule hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksid sam po sebi nije slobodni radikal jer u konfiguraciji nema nespareni elektron, međutim prijelazni metali, kao što su Fe^{2+} i Cu^+ mogu reducirati H_2O_2 do hidroksidnog aniona i hidroksilnog radikala koji je snažan oksidans (Sharma i sur., 2018; Valko i sur., 2004). Najčešća meta djelovanja ROS su makromolekule u stanici – lipidi, proteini i DNA. ROS oksidira masne kiseline koje tvore stanične lipide pri čemu nastaju lipidni peroksidi, aldehidi i ketoni. Te promijenjene molekule, zajedno s ostalim reaktivnim produktima raspadanja (aceton, formaldehid, malondialdehid, acetaldehid) potiču i olakšavaju unakrsno povezivanje lipida i proteina. Osim toga, ROS uzrokuje i promjene u konformaciji proteina, što za posljedicu ima gubitak ili promjenu njihove funkcije. Možda najznačajnije štetno djelovanje ROS je na molekule DNA. Naime, ROS oksidira nukleotidne baze, što kao posljedicu nosi pogrešno prepisivanje i prevođenje gena i rezultira nefunkcionalnim ili promijenjenim proteinom. Također, mogu oksidirati i deoksiribozu, što onda dovodi do delecije baza i loma molekule DNA (Sharma i sur., 2018).

Stanice ljudskog organizma razvile su specifične mehanizme kojima neutraliziraju učinak oksidansa i održavaju redoks homeostazu. Dva glavna mehanizma djelovanja antioksidansa temelje se na sprječavanju nastanka slobodnih radikala te neutralizaciji već stvorenih (Cheeseman i Slater, 1993). Ti sustavi obrane mogu biti enzimatski, kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx) ili neenzimatski: glutation, urična kiselina, lipoična kiselina, bilirubin (Neha i sur., 2019).

Egzogene antioksidanse, za razliku od ranije spomenutih endogenih antioksidansa, moramo unositi hranom u organizam. Iako ovi endogeni antioksidansi pružaju značajnu zaštitu od oksidacijskog stresa, ona nije dovoljna i u organizam se prehranom moraju unositi egzogeni antioksidansi. Posljednjih nekoliko godina objavljeni su mnogi radovi koji opisuju blagotvorno djelovanje prehrane bogate antioksidansima na zdravlje čovjeka. Neki od najvažnijih antioksidansa u namirnicama su vitamini, minerali, karotenoidi, flavonoidi i ostali polifenoli.

1.3.1. Antioksidativna svojstva polifenola

Polifenoli predstavljaju veliku skupinu raznovrsnih sekundarnih metabolita biljaka koji se nalaze u svim njihovim tkivima. Harborne ih je 1989. godine definirao kao produkte dva metabolička puta u biljkama: biosintetski put preko šikiminske kiseline te poliketidni (acetatni) put. Također, podijelio ih je u 10 glavnih skupina, od kojih su najznačajniji flavonoidi i izoflavonoidi, stilbeni i lignani te ne-flavonoidni spojevi kao što su topljive kiseline (Giovinazzo i Grieco, 2015; Harborne, 1989). Svim polifenolima je zajednička osnovna kemijska struktura – aromatski prsten koji na sebi ima jednu ili više supstituiranih hidroksilnih skupina i funkcionalni bočni lanac (Harborne, 1989). Upravo je takva struktura odgovorna za njihovo antioksidativno djelovanje. Naime, polifenoli su visoko reaktivni donori vodika ili elektrona, imaju sposobnost stabilizacije radikala i delokalizacije nesparenog elektrona te mogu kelirati metalne ione (Rice-Evans i sur., 1997).



Slika 1. Osnovne strukture odabranih polifenola (preuzeto i prilagođeno prema Bhooshan Pandey i Rizvi, 2009)

Kardiovaskularne bolesti su, uz karcinom, vodeći uzročnici smrtnosti u 21. stoljeću i upravo je zbog te činjenice njihova prevencija glavni predmet istraživanja mnogih znanstvenih radova (Ramaa i sur., 2006). U moru različitih molekula pozitivnog djelovanja na zdravlje kardiovaskularnog sustava, istaknuli su se upravo polifenoli kao jedni od najučinkovitijih.

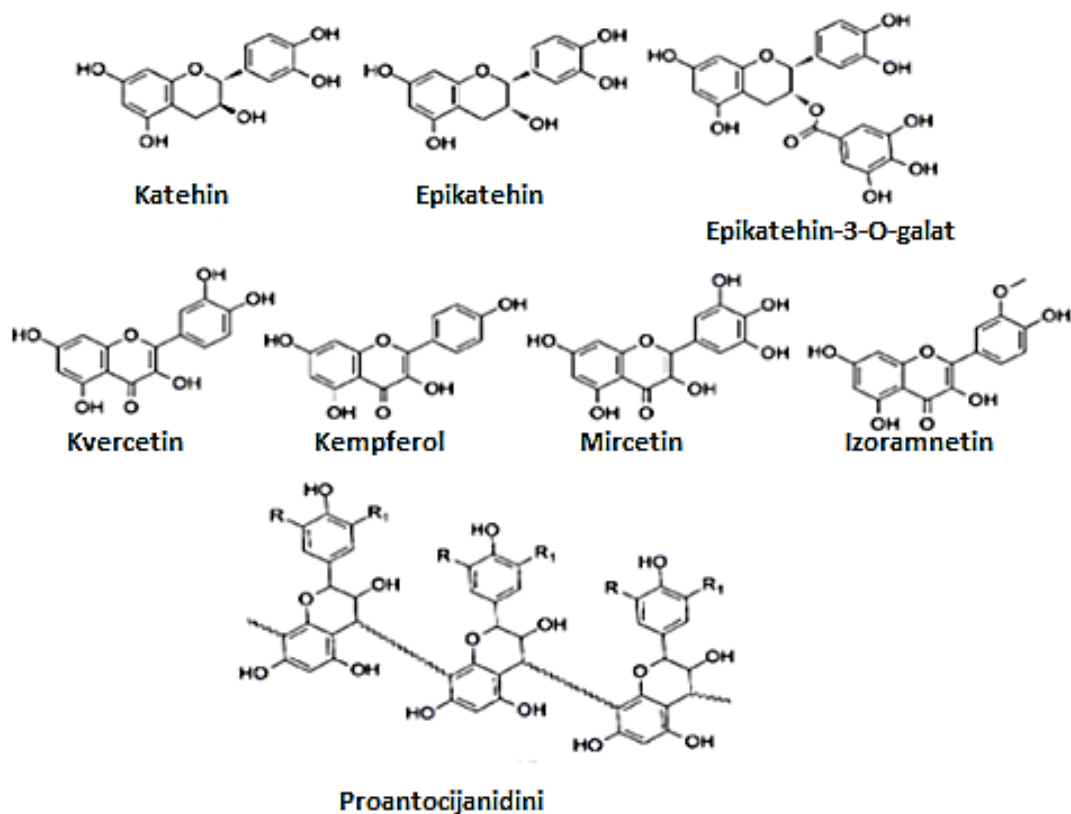
Njihov antioksidativni učinak sprječava oksidaciju LDL kolesterola, dok s druge strane, moduliraju staničnu signalizaciju i smanjuju agregaciju trombocita (Arranz i sur., 2012). Resveratrol, ne-flavonoidni polifenol pokazuje antiproliferativne učinke kroz indukciju apoptoze u staničnim linijama leukemije te karcinoma dojke, prostate, debelog crijeva i gušterače (Aggarwal i sur., 2004).

1.3.2. Ekstrakt sjemenki grožđa

Grožđe (*Vitis* spp.) je od davnina jedna od najkorištenijih vrsta biljaka u ljudskoj prehrani. Tradicionalno se upotrebljava u mnogim svjetskim kulturama za dobivanje različitih proizvoda – vina, soka, pekmeza i ostalih prehrambenih proizvoda. Upravo je zbog toga ova vrsta predmet različitih znanstvenih istraživanja. Relativno nedavno, znanstvenici su povezali flavonoide iz grožđa s pojavom nazvanom "Francuski paradoks". Naime, epidemiološke studije pokazale su nisku incidenciju koronarne bolesti srca u populacijama Mediterana, usprkos njihovoj prehrani koja obiluje zasićenim mastima. Upravo se redovita konzumacija crvenog vina smatra glavnim protektivnim čimbenikom u razvoju kardiovaskularnih bolesti (Georgiev i sur., 2014; Arranz i sur., 2012).

Plodovi grožđa, a pogotovo crvenih sorta, obiluju različitim polifenolima, najviše flavonoidima i resveratrolom. Ovi spojevi se većinom nalaze u epidermalnim stanicama kože plodova i u sjemenkama, gdje imaju primarno zaštitnu ulogu. Štite plodove od UV zračenja i različitih patogena te oksidativnog stresa.

Flavonoide koji se nalaze u grožđu možemo podijeliti u nekoliko skupina: antocijani (malvidin, cijanidin, delphinidin, pelargonidin), flavonoli (kvercetin, kempferol, mircetin, izoramnetin), flavanoli (katehin, epikatehin i proantocijanidini) te njihovi glikozidi i esteri. Biološka aktivnost flavonoida najviše ovisi upravo o njihovom stupnju glikozilacije, tipu šećernih ostataka te esterifikaciji (Georgiev i sur., 2014).



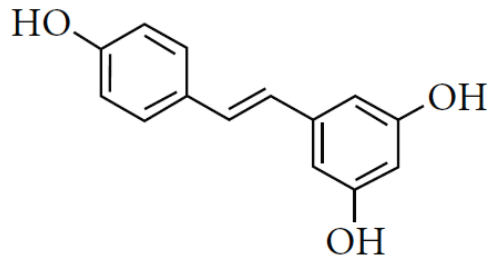
Slika 2. Strukture flavonoida iz sjemenki grožđa (preuzeto i prilagođeno prema Georgiev i sur., 2014)

Najvažnija aktivnost flavonoida u organizmu je njihova sposobnost hvatanja i neutralizacije slobodnih radikala, što proizlazi iz njihove strukture – raspored supstituenata, posebno hidroksilnih skupina, prisutnost dvostrukih veza, metilacije, glikozilacije te stupanj polimerizacije. Međutim, osim antioksidativne i protuupalne aktivnosti, flavonoidi iz sjemenki grožđa pokazuju i druge pozitivne mehanizme djelovanja u kroničnim bolestima. Naime, katehin i epikatehin povezuju se kao ometači nastajanja neuropatoloških struktura u Alzheimerovoj bolesti. Nadalje, moduliraju metaboličku endotoksemiju te tako imaju ulogu u prevenciji metaboličkog sindroma, šećerne bolesti tipa 2 te pretilosti. Također, poboljšavaju i održavaju integritet crijevne barijere te inaktiviraju pro-upalni transkripcijski faktor NF- κ B, koji ima važnu ulogu u tumorskim stanicama (Georgiev i sur., 2014).

1.3.3. Resveratrol

Resveratrol (3,4',5- trihidroksistilben) je polifenol ne – flavonoidne strukture. Prisutan je u mnogim biljnim vrstama – grožđu (*Vitis* spp.), kikirikiju (*Arachis hypogea*), japanskom dvorniku (*Polygonum cuspidatum*) te borovnicama i brusnicama (*Vaccinum* spp.). Njegova

uloga u biljkama je primarno protektivna, odnosno biljke ga sintetiziraju u odgovoru na stres, ozljede, UV zračenje i gljivične infekcije (Aggarwal i sur., 2004).



Slika 3. Struktura resveratrola (preuzeto iz Tao i sur., 2021)

Ghanim i suradnici su 2010. godine proveli studiju na 20 pojedinaca iz koje su zaključili da ekstrakt biljke *Polygonum cuspidatum* potiskuje proizvodnju ROS-a u mononuklearnim stanicama te inhibira ekspresiju ključne podjedinice enzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze koji pretvara molekularni kisik u superoksidni anion. Dodatno, inhibira i vezanje transkripcijskog faktora NF- κ B u jezgri stanica te tako djeluje protuupalno (Ghanim i sur., 2010).

Provedeno je mnogo kliničkih studija o utjecaju resveratrola na kronične bolesti poput dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti. Iako su njihovi rezultati varijabilni, uočeno je da smanjuje rezistenciju tkiva na inzulin te ima pozitivno djelovanje na snižavanje krvnog tlaka i popravak endotelne funkcije. Također, resveratrol prelazi krvno – moždanu barijeru te svoje pozitivne učinke ispoljava i u središnjem živčanom sustavu, što je navelo znanstvenike da prouče njegovo djelovanje kod pacijenata s Alzheimerovom bolesti. Pronađeno je da smanjuje aktivnost MMP-9, metaloproteinaze matriksa čija je povećana aktivnost biomarker ove bolesti. Posebno je zanimljivo i djelovanje resveratrola na stanice karcinoma, međutim rezultati kliničkih istraživanja su ovdje vrlo varijabilni te ih je potrebno provesti mnogo više kako bi se došlo do valjanog zaključka (Berman i sur., 2017).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kompleksni biljni ekstrakti bogati polifenolima i prehrambena vlakna često se koriste kao bioaktivne sastavnice nove/funkcionalne hrane. U uvjetima probavnog trakta prehrambena vlakna i polifenoli mogu stupati u međusobne interakcije čiji intenzitet ovisi o njihovim fizikalno kemijskim karakteristikama. Navedene interakcije mogu rezultirati smanjenom oralnom biodostupnošću biološki aktivnih polifenola te tako značajno utjecati na nutritivnu vrijednost konačnog proizvoda.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj različitih smjesa prehrambenih vlakana na biodostupnost polifenola u uvjetima probavnog trakta, a kako bi se utvrdila njihova kompatibilnost i istražila mogućnost korištenja u razvoju funkcionalnih formulacija enteralne hrane. Rezultati ovog rada bitno će pridonijeti saznanjima o relativno neistraženim međusobnim interakcijama polifenola s prehrambenim vlaknima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci za analizu

3.1.1.1. Uzorci antioksidansa

Korišteni su komercijalno dostupni uzorci:

1. Ekstrakt sjemenki grožđa

- MegaNatural BP Grape seed extract, (smjesa polifenola)-GSE1
- Grape seed extract N20105877, (smjesa polifenola)-GSE2

Uzorci se otope u SGF – u tako da im konačna koncentracija bude 200 µg/mL.

2. Ekstrakt japanskog dvornika

- 90% Polygonum cuspidatum extract 11560 (resveratrol)-PC1
- 96% Polygonum cuspidatum Sibe.Et.Zucc extract 2347 (resveratrol)-PC2

Uzorci se otope u SGF – u tako da im konačna koncentracija bude 100 µg/mL.

3.1.1.2. Uzorci vlakana

Korištene su različite smjese topljivih i netopljivih vlakana te fruktana inulinskog tipa. Sastav korištenih smjesa opisan je u Tablici 3.

Tablica 3. Sastav smjesa vlakana korištenih u istraživanju

Oznaka uzorka*	Sastav smjese
IN	mješavina vlakana s inulinom
IN/CEL-1	mješavina vlakana s inulinom i celulozom
IN/CEL-2	
IN/TOP/C/G-1a	mješavina topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška
IN/TOP/C/G-1b	
IN/TOP/C/G/CEL-a	mješavina topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze
IN/TOP/C/G/CEL-b	
IN/TOP/C/G-2a	mješavina topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška
IN/TOP/C/G-2b	
TOP	mješavina topljivih vlakana

*1-manji udio vlakana u smjesi; 2-veći udio vlakana u smjesi; a-tekuća formulacija; b-praškasta formulacija

3.1.2. Kemikalije i pribor

- KCl (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- NaHCO_3 (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- CaCl_2 (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Folin – Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Na_2CO_3 (Lach-Ner, neratovice, Češka)
- HCl (Panreac Quimica SLU, Barcelona, Španjolska)
- NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Falcon kivete

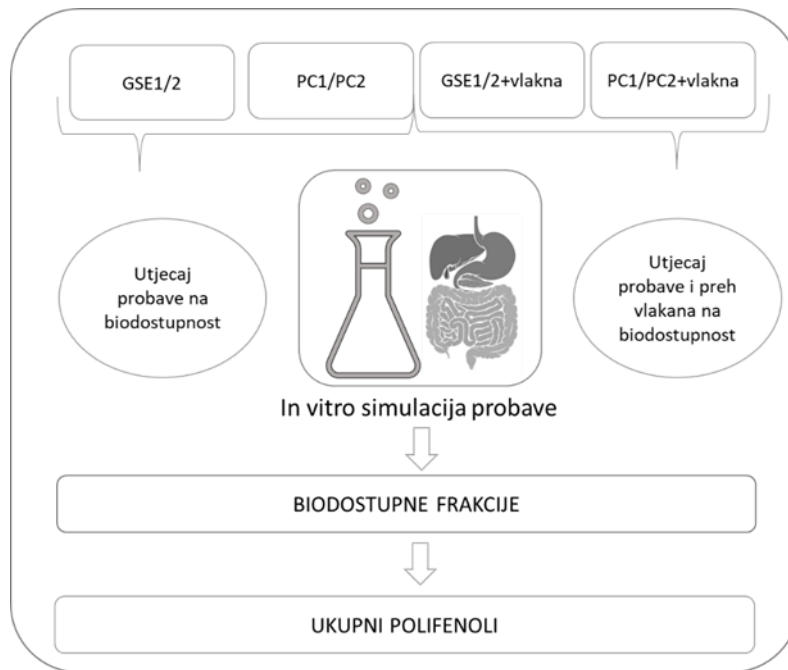
- Mikropipete
- Multikanalna pipeta
- Mikrotitarska pločica

3.1.3. Instrumenti

- Analitička vaga – AB265-S (Mettler Toledo, Švicarska)
- Vortex miješalica – tip VTY-3000L (Mixer UZUSIO, Japan)
- Čitač mikrotitarskih ploča – Victor X3 (PerkinElmer, SAD)
- Uv-Vis spektrofotometar – Aquarius CE 7200, (Cecil Instruments Ltd., UK)
- Centrifuga – Lisa (Afi, Francuska)
- Inkubator – ES-20/60 (Biosan, Latvija)
- Rotator – Multi Bio RS-24 (Biosan, Latvija)

3.2. Dizajn istraživanja

Istraživanje je podijeljeno u dva dijela i prikazano na Slici 4. U prvoj fazi cilj je bio odrediti stabilnost samih polifenola tijekom *in vitro* simulirane digestije. Uzorci polifenola se otope u simuliranoj gastričnoj tekućini i podvrgavaju *in vitro* simulaciji probave pri istim uvjetima kao i s mješavinama prehrambenih vlakana. Na samom kraju postupka određuje se ukupni redukcijski potencijal bioiskoristive (slobodne) frakcije Folin – Ciocalteu metodom. Rezultat se izražava kao postotak biodostupnih polifenola u odnosu na ukupan sadržaj polifenola prije digestije.



Slika 4. Dizajn provedenog istraživanja

GSE1/GSE2-ekstrakti sjemenki grožđa; PC1/PC2-ekstrakti biljke *Polygonum cuspidatum*

Drugi dio istraživanja odnosi se na određivanje utjecaja različitih smjesa prehrambenih vlakana na biodostupnost istraživanih polifenola tijekom *in vitro* simulirane digestije. Nakon provedene simulacije probave, ukupni reduktivni potencijal biodostupne frakcije polifenola određuje se Folin – Ciocalteu metodom.

3.3. Priprema uzoraka za analizu

3.3.1. Priprema simulirane gastrične tekućine (SGF) i simulirane intestinalne tekućine (SIF)

SGF (*Simulated gastric fluid*) i SIF (*Simulated intestinal fluid*) su otopine koje oponašaju probavne sokove čovjeka. Sadrže iste kemijske tvari, međutim razlika je u njihovoj koncentraciji u pojedinoj otopini te pH vrijednosti. Otopine su pripravljene prema standardiziranom protokolu uz male preinake (Brodkorb i sur., 2019). Sastav korištenih otopina prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Prikaz potrebnih volumena i koncentracija *stock* otopina za pripremu simuliranih probavnih tekućina

Stock otopina soli	Koncentracija <i>stock</i> otopine (g/L)	Dodani volumen za pripremu SGF-a	Konačna koncentracija u SGF-u	Dodani volumen za pripremu SIF-a	Konačna koncentracija u SIF-u
KCl	37,3	6,9	6,9	6,8	6,8
KH₂PO₄	68	0,9	0,9	0,8	0,8
NaHCO₃	84	12,5	25	42,5	85
NaCl	117	11,8	47,4	9,6	38,4
MgCl₂(H₂O)₆	30,5	0,4	0,12	1,1	0,33
(NH₄)CO₃	48	0,5	0,5	-	-
HCl		1,3	15,6	0,7	8,4
CaCl₂	44,1	0,005	0,15	0,04	0,6

3.3.2. Priprema uzoraka

Za simulaciju gastrointestinalne digestije izvagano je 600 mg svakog uzorka vlakana i dodano 5 mL SGF-a (volumen prilagođen stvarnoj masi vlakana) u kojem je prethodno otopljen uzorak antioksidansa. Koncentracija uzoraka ekstrakta sjemenki grožđa u SGF-u bila je 200 µg/mL, a resveratrola 100 µg/mL. Kivete se vorteksiraju tako da se sva vlakna resuspendiraju i miješaju na rotatoru u inkubatoru na 37°C 2 sata. Nakon toga doda se otopina SIF-a u omjeru 1:1 prema otopini SGF-a tako da je konačni udio vlakana 6%. Kivete se ponovno stavljaju na rotator i miješaju u inkubatoru na 37°C 2 sata. Uzorci se zatim centrifugiraju 15 min pri 5100 G te se analizira supernatant Folin – Ciocalteu metodom. Kao slijepa proba korištena su samo vlakna bez analita, dok se kapacitet vezanja vlakana određivao usporedbom s uzorkom koji se inkubirao u duplikatu bez vlakana u SGF-u i SIF-u (Brodkorb i sur., 2019).

3.4. Metode

Za određivanje ukupnih fenola u uzorcima korištena je Folin – Ciocalteu metoda (Ainsworth i Gillespie, 2007).

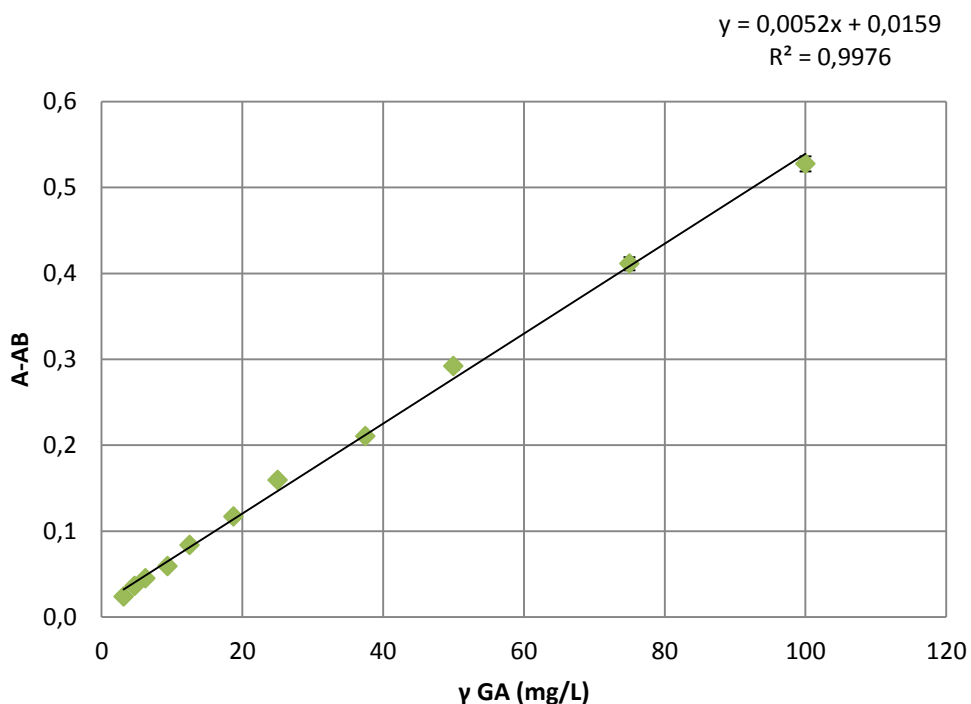
3.4.1. Princip metode

Metoda se temelji na sposobnosti fenolnih spojeva da reduciraju Folin – Ciocalteu reagens u alkalnom mediju. Točna kemijska struktura reagensa nije poznata, no zna se da sadrži komplekse fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. Reducirajuće tvari kao što su polifenoli reduciraju Mo^{6+} u kompleksu u Mo^{5+} , pri čemu se on oboji u plavo. Promjena boje proporcionalna je koncentraciji reducirajućih tvari u uzorku i može se pratiti spektrofotometrijski jer nastali kompleks ima maksimum apsorpcije na 750 – 765 nm. Kao standard najčešće se koristi galna kiselina te se rezultat izražava u ekvivalentima galne kiseline (GAE- *Gallic Acid Equivalence*).

Ova metoda je jednostavna, reproducibilna i robusna te je postala rutinska metoda za određivanje polifenola u hrani i dodacima prehrani. Međutim, jedan važan nedostatak je precjenjivanje sadržaja fenola u uzorku. Naime, dobiveni rezultati odnose se na ukupan sadržaj reducirajućih tvari u uzorku, a ne samo na polifenole. Najčešći primjer tvari koje interferiraju su reducirajući šećeri, askorbinska kiselina i neke aminokiseline. Također, metoda nije prikladna za lipofilne spojeve jer se provodi u vodenom mediju. (Munteanu i Apetrei, 2021; Ainsworth i Gillespie, 2007)

3.4.2. Postupak

Uzorci se nanose na mikrotitarsku pločicu u triplikatu u volumenu od 20 μL . Zatim se na te otopine dodaje 50 μL 10%-tnog Folin – Ciocalteu reagensa i reakcijska smjesa se miješa protresanjem na 37°C 5 minuta. Nakon toga se u svaku jažicu dodaje 160 μL 700 mM otopine natrijevog karbonata i reakcijske smjese se inkubiraju 30 min pri istoj temperaturi. Apsorbancija se očitava na valnoj duljini od 750 nm. Koncentracija antioksidansa izračuna se pomoću jednadžbe pravca dobivenog mjerenjem redukcijskog potencijala standardne otopine galne kiseline i izražava u ekvivalentima galne kiseline (Slika 5).



Slika 5. Baždarni dijagram za određivanje ukupnog reduksijskog potencijala uzorka

3.5. Statistička analiza

Simulacije gastrointestinalne digestije provedene su u duplikatu ($n=2$), a određivanje ukupnih fenola za svaki dobiveni ekstrakt provedeno je u triplikatu ($n=6$). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti paralelnih istraživanja \pm standardna devijacija. Biodostupnost je izražena u postocima tako da je količina biodostupne frakcije polifenola nakon simulacije probave bez prisustva vlakana uzeta kao 100%-tna biodostupnost. Uzorci su međusobno uspoređeni korištenjem jednosmjerne analize varijance (ANOVA) i *post hoc* Tukey testa s razinom značajnosti $p \leq 0.05$. Za statističku obradu podataka korišteni su programski paketi Microsoft Excell (Microsoft Corporation, SAD) i GraphPad Prism ver. 8.4.3 (GraphPad Software, LLC, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Gastrointestinalna stabilnost polifenola iz ekstrakta japanskog dvornika i ekstrakta sjemenki grožđa

Prije provođenja simulirane digestije uzoraka antioksidansa s prehrambenim vlaknima, određena je njihova stabilnost tijekom probave bez vlakana. Rezultati analize prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Gastrointestinalna stabilnost polifenola iz ekstrakta sjemenki grožđa (GSE) i ekstrakta japanskog dvornika (PC).

Uzorci	Ukupni polifenoli (mg/g GAE)	Gastrointestinalna stabilnost polifenola (%)		
		Gastrična digestija (t=0 h)	Gastrična digestija (t=2,5 h)	Intestinalna digestija (t=2,5 h)
GSE1	707,1 ± 45,1	108,60 ± 6,32	96,67 ± 4,22	89,80 ± 9,21
GSE2	649,6 ± 51,2	113,92 ± 11,85	110,36 ± 12,15	107,83 ± 9,99
PC1	352,4 ± 4,2	115,61 ± 18,68	117,22 ± 45,48	126,85 ± 16,73
PC2	105,7 ± 11,5	103,44 ± 16,73	118,64 ± 26,43	107,36 ± 24,73

Prije provođenja digestije, određena je ukupna količina polifenola u istraživanim biljnim ekstraktima i njihova koncentracija izražena je kao ekvivalent galne kiseline (Tablica 5.). Ekstrakti sjemenki grožđa, GSE1 i GSE2, ne razlikuju se značajno po količini polifenola. GSE2 ima nešto manji sadržaj ukupnih polifenola od GSE1, međutim ako se u obzir uzme standardna devijacija, ta razlika nije statistički značajna. S druge strane, ekstrakti biljke *Polygonum cuspidatum*, PC1 i PC2, značajno se razlikuju u količini resveratrola. PC1 je 90%-tni ekstrakt i u njemu se nalazi 352,4 ± 4,2 mg/g GAE resveratrola, dok PC2, 96%-tni ekstrakt, sadrži značajno manju količinu, samo 105,7 ± 11,5 mg/g GAE. Također, količina ukupnih polifenola viša je u ekstraktima sjemenki grožđa nego u ekstraktima biljke *Polygonum cuspidatum*.

U uzorku GSE1, reduktivni potencijal je dodatkom gastričnog soka blago porastao, ali se je nakon 2,5 h inkubacije smanjio za gotovo 12%. Također, nakon 2,5 h inkubacije u intestinalnoj tekućini, reduktivni potencijal smanjio se za gotovo 7% te njegovo ukupno smanjenje nakon probave, u odnosu na reduktivni potencijal prije probave, iznosi oko 10%. Kod uzorka GSE2 reduktivni potencijal je nakon dodatka gastrične tekućine također porastao za skoro 14% te se smanjio daljnjom probavom, ali to smanjenje nakon završetka probave iznosi 6%, što znači da se tijekom digestije ukupni reduktivni potencijal ovog uzorka povećao

za 7,83% u odnosu na potencijal prije probave. Reduktivna frakcija ekstrakta japanskog dvornika, PC1 također je porasla nakon dodatka simulirane gastične tekućine i to za 15,61% te je nakon simulirane digestije nastavila rasti do ukupne vrijednosti od 126,85% u odnosu na uzorak prije probave. Kod uzorka PC2 prisutan je samo blagi porast u reduktivnom potencijalu od 3,44% koji se nakon 2,5 h povećao na 18,64% ali se je nakon intestinalne digestije ponovno smanjio te konačan porast u reduktivnoj aktivnosti iznosi 7,36%. Međutim, ako se uzme u obzir standardna devijacija dobivenih rezultata, može se zaključiti kako se reduktivni potencijal analiziranih uzoraka nije bitno promijenio tijekom probave te je i dalje vrlo sličan reduktivnom potencijalu uzorka koji nije prošao simuliranu digestiju.

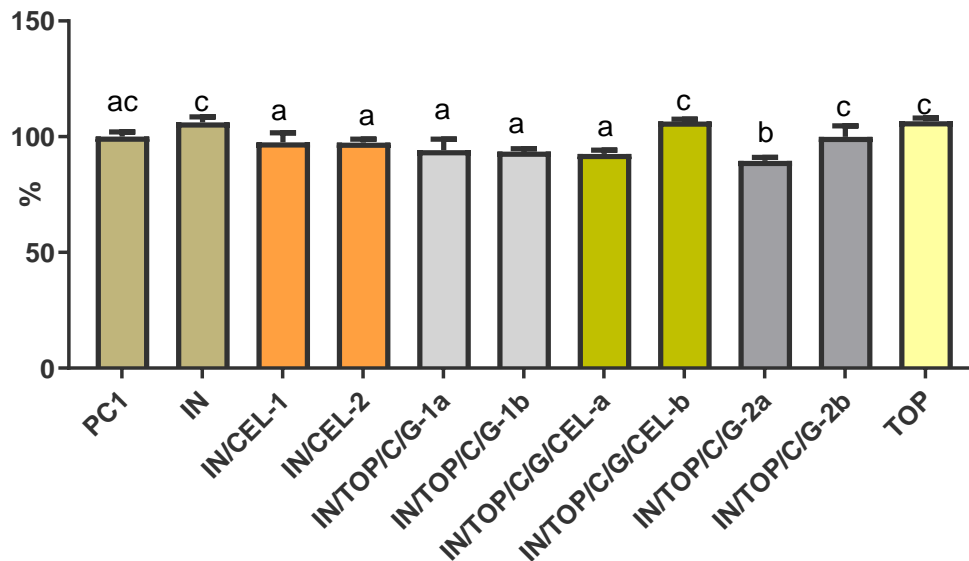
Ovakvi rezultati u skladu su s dostupnim literaturnim podacima. Laurent i sur. (2007), proučavajući digestiju ekstrakta sjemenki grožđa utvrdili su da su katehin, epikatehin te procijanidini B2 i B3 dimeri stabilni tijekom probave te u cijelosti ostaju nepromijenjeni tijekom *in vitro* digestije u mediju bez proteina. Tagliazucci i sur. (2010) istraživali su *in vitro* biodostupnost i antioksidativnu aktivnost polifenola iz grožđa te zaključili da su flavonoidi stabilni tijekom gastične i intestinalne digestije. Međutim, u istom radu pokazalo se kako su antocijani stabilni u kiselom gastičnom soku, a nestabilni u neutralnom do blago lužnatom pH mediju, odnosno u intestinalnoj tekućini. Kako su sjemenke grožđa bogate antocijanima, smanjenje redukcijaskog potencijala nakon intestinalne digestije je i u ovom eksperimentu trebalo biti veće. Zadržavanje reduktivne aktivnosti može se objasniti činjenicom da je došlo do raspada antocijana, ali su produkti raspada zadržali redukcijaski potencijal. Također, relativno visok pH intestinalnog medija mogao je doprinijeti lažnom povećanju rezultata jer je antioksidativna aktivnost polifenola povezana je s pH vrijednosti medija u kojem se nalaze te se antioksidativni kapacitet povećava povišenjem pH. To povećanje pripisano je deprotonaciji hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu fenola. Uzimajući u obzir ova saznanja, može se zaključiti kako uzorak GSE1 ima veći sadržaj antocijana nego uzorak GSE2.

Stabilnost resveratrola tijekom *in vitro* digestije mnogo je slabije proučena i dostupni literaturni podaci su ograničeni. Tagliazucci i sur. (2010) zaključili su kako je resveratrol stabilan u gastičnoj tekućini, međutim njegov udio te antioksidacijska aktivnost se značajno smanjuju nakon intestinalne digestije. Slične rezultate pokazali su Ferreyra i sur. (2021) u svojem radu o *in vitro* biodostupnosti i antioksidacijskom kapacitetu polifenola iz stabljika i trski grožđa. Literaturni podaci se u ovom slučaju ne slažu s dobivenim rezultatima koji pokazuju kako je reduktivni potencijal biljke *Polygonum cuspidatum* nakon provedene

digestije ostao gotovo nepromijenjen, međutim potrebno je provesti više studija u ovom području kako bi se došlo do zaključka.

4.2. Interakcije polifenola iz ekstrakta biljke *Polygonum cuspidatum* s mješavinama prehrambenih vlakana

Rezultati provedene analize interakcija ekstrakta PC1 i prehrambenih vlakana prikazani su na Slici 6.

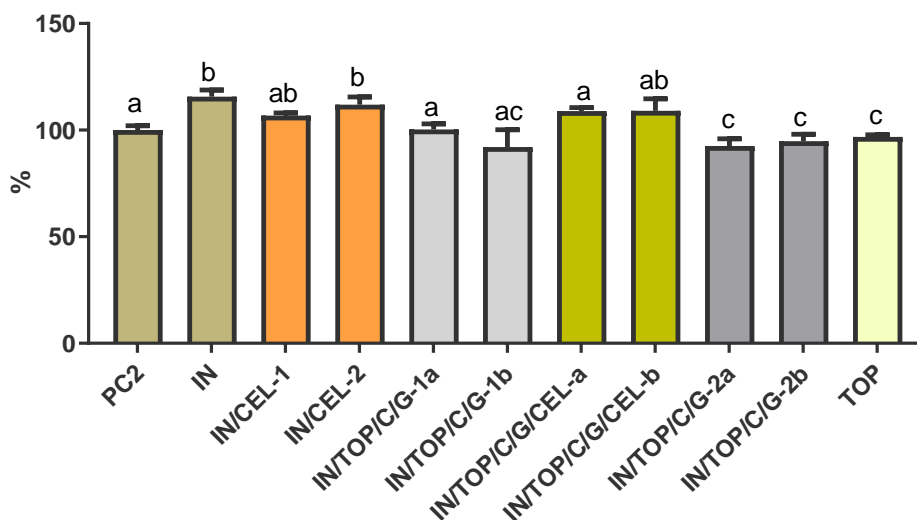


Slika 6. Biodostupnost polifenola iz ekstrakta japanskog dvornika PC1 nakon simulacije probave sa mješavinama prehrambenih vlakana

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Stupići označeni različitim slovima pripadaju različitim statističkim skupovima ($p \leq 0.05$)

Relativne vrijednosti (iskazane kao postotak u odnosu na početnu vrijednost) reduktivnog potencijala uzorka PC1 nakon digestije s vlaknima kreću se od $89,5 \pm 1,6\%$ do $106,7 \pm 1,4\%$. Najveći reduktivni potencijal pokazuju uzorci mješavine vlakana s inulinom ($106,2 \pm 2,4\%$), mješavine topljivih vlakna, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze praškaste formulacije ($106,5 \pm 1\%$) te mješavine topljivih vlakana ($106,7 \pm 1,4\%$), dok je najmanji kod mješavine topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška s većim udjelom vlakana u smjesi ($89,5 \pm 1,6\%$), mješavine topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze tekuće formulacije ($92,5 \pm 1,7\%$), mješavine topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška praškaste formulacije s manjim udjelom vlakana u smjesi ($93,6 \pm 1,2\%$), te mješavine istih vlakana tekuće formulacije ($94,2 \pm 4,7\%$).

Slika 7 prikazuje rezultate provedene analize za uzorak PC2. Rezultati se kreću od $92,0 \pm 8,2\%$ do $115,7 \pm 3,1\%$.



Slika 7. Biodostupnost polifenola iz ekstrakta sjemenki grožđa GSE2 nakon simulacije probave sa mješavinama prehrambenih vlakana

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Stupići označeni različitim slovima pripadaju različitim statističkim skupovima ($p < 0.05$)

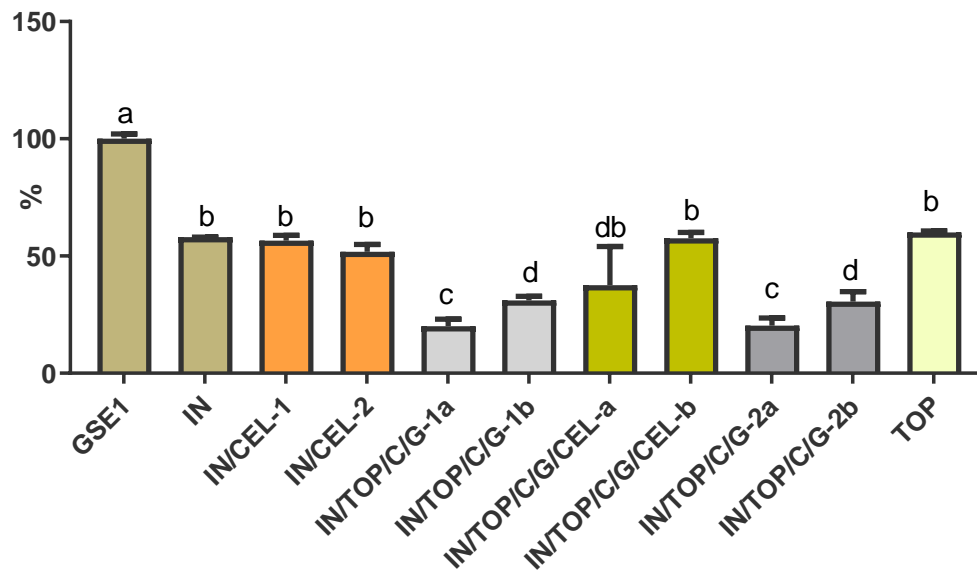
Reduktivni potencijal promatranog uzorka antioksidansa najveći je s mješavinom vlakana s inulinom ($115,7 \pm 3,1\%$), mješavinom vlakana inulina i celuloze većeg udjela vlakana u smjesi ($111,9 \pm 3,6\%$), mješavinom topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze praškaste formulacije ($109,0 \pm 5,7\%$) te mješavinom istih vlakana tekuće formulacije ($108,9 \pm 1,6\%$). Najmanji reduktivni potencijal pokazuju uzorci u mješavini topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška praškaste formulacije s manjim udjelom vlakana u smjesi ($92,0 \pm 8,2\%$), mješavini topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška tekuće formulacije s većim udjelom vlakana u smjesi ($92,6 \pm 3,3\%$) dok je kod mješavine istih vlakana praškaste formulacije rezultat malo veći i iznosi $94,8 \pm 3,3\%$.

Ukupno gledano, reduktivna aktivnost oba ekstrakta biljke *Polygonum cuspidatum* nakon digestije s različitim mješavinama prehrambenih vlakana ne razlikuje se značajno od reduktivne aktivnosti istih uzoraka nakon digestije bez vlakana. Oba ekstrakta pokazuju i sličan trend vezanja na prehrambena vlakna. Uzorak PC1 najmanji reduktivni potencijal ima nakon digestije s mješavinom topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze tekuće formulacije s većim udjelom vlakana u smjesi, a uzorak PC2 s mješavinom

topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška praškaste formulacije s manjim udjelom vlakana u smjesi, međutim njihov reduktivni potencijal i dalje je visok i iznosi oko 90%. Razlika između uzoraka, odnosno njihovih formulacija, može se vidjeti s mješavinom topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze tekuće formulacije, gdje nakon digestije, uzorak PC1 ima snižen reduktivni potencijal ($92,5 \pm 1,7\%$), a uzorak PC2 povišen ($108,9 \pm 1,6\%$). Također, u mješavini topljivih vlakana, reduktivni potencijal uzorka PC1 je povišen i iznosi $106,7 \pm 1,4\%$, dok je kod uzorka PC2 on snižen na $96,8 \pm 1,0\%$.

4.3. Interakcije polifenola iz ekstrakta sjemenki grožđa s mješavinama prehrambenih vlakana

Na Slici 8 prikazani su rezultati provedene analize za uzorak GSE1. U svim uzorcima reduktivni potencijal značajno se smanjio te se vrijednosti kreću od $20,1 \pm 3,0\%$ do $60,1 \pm 0,6\%$.



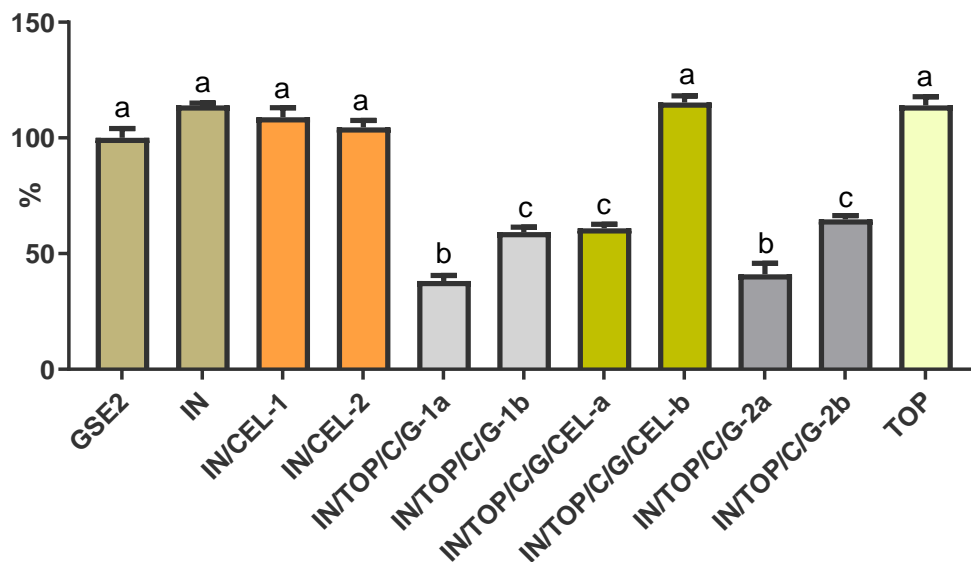
Slika 8. Biodostupnost polifenola iz ekstrakta sjemenki grožđa GSE1 nakon simulacije probave sa mješavinama prehrambenih vlakana

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Stupići označeni različitim slovima pripadaju različitim statističkim skupovima ($p \leq 0,05$)

Najveći reduktivni potencijal zadržali su uzorci s mješavinom topljivih vlakana ($60,1 \pm 0,6\%$), mješavinom vlakana s inulinom ($58,0 \pm 0,1\%$), mješavinom topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze praškaste formulacije ($57,6 \pm 2,4\%$), mješavinom

vlakana s inulinom i celulozom manjeg udjela vlakana u smjesi ($56,6 \pm 2,2\%$), dok je u istoj mješavini većeg udjela vlakana potencijal nešto niži i iznosi $51,8 \pm 3,1\%$. Slijedi mješavina topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze tekuće formulacije ($37,6 \pm 16,5\%$), mješavina topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška praškaste formulacije te nižeg udjela vlakana u smjesi ($31,0 \pm 1,8\%$) i ona višeg udjela vlakana ($30,5 \pm 4,3$), dok su navedena vlakna tekuće formulacije imala najniži reduktivni potencijal nakon digestije – $20,3 \pm 3,2\%$ za smjesu višeg udjela vlakana i $20,1 \pm 3\%$ za onu nižeg udjela.

Slika 9 prikazuje rezultate analize za uzorak GSE2. Rezultati se kreću od $38,2 \pm 2,4\%$ do $115,3 \pm 2,9\%$.



Slika 9. Biodostupnost polifenola iz ekstrakta sjemenki grožđa GSE2 nakon simulacije probave sa mješavinama prehrambenih vlakana

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Stupići označeni različitim slovima pripadaju različitim statističkim skupovima ($p \leq 0,05$)

Vrijednosti reduktivnog potencijala značajno su se povećale u mješavini topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze praškaste formulacije ($115,3 \pm 2,9\%$), mješavini vlakana s inulinom ($114,1 \pm 0,9\%$), mješavini topljivih vlakana ($114,0 \pm 3,8\%$) te mješavini vlakana s inulinom i celulozom ($108,9 \pm 4,1\%$ za manji udio vlakana i $104,6 \pm 3,0\%$ za veći udio vlakana u smjesi). Reduktivni potencijal uzorka značajno se smanjio u mješavini topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška tekuće formulacije i manjeg udjela vlakana u smjesi ($38,2 \pm 2,4\%$), mješavini topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška tekuće formulacije i većeg udjela vlakana u smjesi ($41,0 \pm 4,8\%$),

mješavini topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška praškaste formulacije i manjeg udjela vlakana u smjesi ($59,3 \pm 2,1\%$), mješavini topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze tekuće formulacije ($60,9 \pm 1,8\%$) te mješavini topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška praškaste formulacije i većeg udjela vlakana u smjesi ($64,8 \pm 1,6\%$).

Oba ekstrakta sjemenki grožđa pokazuju isti trend vezanja na prehrambena vlakna. Najmanju reduktivnu aktivnost oba uzorka imaju nakon digestije s mješavinom topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška tekuće formulacije, bez obzira radi li se o smjesi s većim ili manjim udjelom vlakana. Isto tako, najveći reduktivni potencijal vidljiv je u mješavini topljivih vlakana, mješavini topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze praškaste formulacije te mješavini vlakana s inulinom za oba uzorka ekstrakta. Pri ovim uzorcima jasno se vidi i utjecaj formulacije ekstrakta na biodostupnost. Naime, uzorak GSE2 ima značajno veći reduktivni potencijal sa svim mješavinama vlakana te posljedično, veću biodostupnost, od uzorka GSE1. Na primjer, kod mješavine topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa i vlakana graška tekuće formulacije, gdje oba ekstrakta imaju najmanji reduktivni potencijal, uzorak GSE1 ima oko 20% niži potencijal od uzorka GSE2 ($38,2 \pm 2,4\%$ i $41,0 \pm 4,8\%$ za manji i veći udio vlakana u smjesi s uzorkom GSE2 te $20,1 \pm 3,0\%$ i $20,3 \pm 3,2\%$ za ista vlakna s uzorkom GSE1). Ova razlika prisutna je sa svim mješavinama vlakana, a najveća je nakon digestije s mješavinom topljivih vlakana, inulina, vlakana citrusa, vlakana graška i celuloze praškaste formulacije, gdje iznosi $57,7\%$ ($115,3 \pm 2,9\%$ za GSE2 i $57,6 \pm 2,4\%$ za GSE1). Također, vidljivo je da formulacija mješavina vlakana može utjecati na biodostupnost polifenola. Usporedbom reduktivnog potencijala za različite formulacije istih vlakana, polifenoli će se više vezati za mješavine vlakana tekuće formulacije nego za one praškaste formulacije, dok udio vlakana u smjesi ne utječe značajno na vezanje.

Usporedbom dobivenih rezultata mjerenja redukcijskog potencijala ekstrakata sjemenki grožđa i ekstrakata biljke *Polygonum cuspidatum*, vidljivo je kako se biodostupnost polifenola iz GSE značajno smanjila u odnosu na biodostupnost uzoraka PC. Dok se za uzorke PC svi rezultati kreću oko 100%, s najnižim vrijednostima oko 90%, za uzorke GSE te su vrijednosti mnogo niže, oko 20% za GSE1 te 40% za GSE2. Dakle, polifenoli ekstrakata sjemenki grožđa imaju značajno viši afinitet vezanja za prehrambena vlakna od resveratrola. Razlog tome može biti relativno niska molekulska masa resveratrola u usporedbi s flavonoidima. Naime,

uočeno je kako se polifenoli veće molekulske mase više vežu za celulozu nego oni niže mase (Buljeta i sur., 2021). Također, Jakobek i Matić (2019) navode kako se resveratrol dobro veže na karboksimetilirani- β -D-glukan kojeg vjerojatno ima jako malo u uzorcima vlakana.

Smanjenje redukcijskih potencijala pojedinih uzoraka polifenola zapravo je očekivano te je u skladu s dostupnom literaturom. Buljeta i sur. (2021) pokazali su kako antioksidativna aktivnost polifenola soka kupine pada u prisutnosti citrusnih vlakana, što je velikim dijelom slučaj i u ovom istraživanju. Pad antioksidativne aktivnosti pripisuje se stvaranju kompleksa između polifenola i vlakana, odnosno ne-kovalentnom vezanju polifenola na prehrambena vlakna. Naime, zbog svoje strukture koja obiluje hidroksilnim skupinama, polifenoli se vrlo lako vodikovim vezama adsorbiraju na vlakna preko atoma kisika u njihovim glikozidnim vezama. Kada se stvore vodikove veze i molekule se međusobno približe, mogu nastati i Van der Waalsove interakcije između polariziranih skupina. Također, moguće su i hidrofobne interakcije s obzirom na to da nisu sva vlakna topljiva u vodi, kao ni svi polifenoli (Buljeta i sur., 2021; Jakobek i Matić, 2019). S druge strane, Vukoja i sur. (2021) proveli su studiju o utjecaju celuloze na polifenole kupine gdje je prikazano kako se antioksidativna aktivnost smanjuje povećavanjem udjela celuloze u uzorcima. U ovom radu to nije slučaj te se reduktivni potencijal nije značajno smanjio u mješavinama vlakana s celulozom, kao ni povećanjem njenog udjela u smjesi, što je u spomenutom radu imalo značajnu ulogu.

Iako je ovaj rad dao pregled interakcija polifenola s prehrambenim vlaknima u *in vitro* uvjetima probave, u obzir nije uzet utjecaj crijevne mikroflore. Bacterije fermentiraju prehrambena vlakna te uslijed tog procesa mogu otpustiti vezane polifenole. Vlakna tako štite polifenole od razgradnje u gornjim dijelovima probavnog trakta te ih dostavljaju nepromijenjene do mjesta gdje mogu ispoljiti svoje pozitivne učinke (Jakobek i Matić, 2019).

5. ZAKLJUČCI

1. Promatrani uzorci polifenola, GSE1 i GSE2 te PC1 i PC2 su tijekom *in vitro* simulirane intestinalne digestije stabilni te se njihov reduktivni potencijal ne mijenja značajno.
2. Redukcijski potencijal ekstrakta sjemenki grožđa pod nazivom MegaNatural BP (GSE1) je nakon digestije sa svim mješavinama vlakana značajno smanjen, dok kod ekstrakta pod nazivom Grape seed extract N20105877 (GSE2) to nije slučaj te se smanjenje aktivnosti vidi samo u kombinaciji s određenim tipovima vlakana.
3. Promatrani polifenoli iz ekstrakata sjemenki grožđa, GSE1 i GSE2, više će se vezati za mješavine vlakana tekuće formulacije nego za ona praškaste formulacije, dok udio vlakana u smjesi ne utječe značajno na vezanje.
4. Oba ekstrakta biljke *Polygonum cuspidatum* zadržavaju veliki reduktivni potencijal nakon digestije sa svim mješavinama vlakana te su samim time pogodniji za kombinacije u funkcionalnoj hrani od ekstrakata sjemenki grožđa.
5. Sastav smjese vlakana značajno utječe na postotak vezanja polifenola u uvjetima probavnog trakta.
6. Vezanje polifenola na vlaknastu frakciju hrane uvjetovano je njegovim fizikalno – kemijskim karakteristikama.

6. LITERATURA

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 2004, 24(5A), 2783-2840.

Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*, 2007, 2(4), 875-877.

Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martínez P, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*, 2012, 4(7), 759-781.

Asgary S, Rastqar A, Keshvari M. Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. *J Am Coll Nutr*, 2018, 37(5), 429-455.

Barber TM, Kabisch S, Pfeiffer AFH, Weickert MO. The Health Benefits of Dietary Fibre. *Nutrients*, 2020, 12(10), 3209.

Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precis Oncol*, 2017, 1, 35.

Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, Bohn T, Bourlieu-Lacanal C, Boutrou R, Carrière F, Clemente A, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Edwards C, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie AR, Martins C, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Minekus M, Portmann R, Santos CN, Souchon I, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MSJ, Weitschies W, Recio I. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*, 2019, 14(4), 991-1014.

Buljeta I, Pichler A, Šimunović J, Kopjar M. Polyphenols and Antioxidant Activity of Citrus Fiber/Blackberry Juice Complexes. *Molecules*, 2021, 26, 4400.

Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 1993, 49(3), 481-493.

Čalić S, Friganović E, Maleš V, Mustapić A. Funkcionalna hrana i potrošači. *Praktični menadžment: stručni časopis za teoriju i praksu menadžmenta*, 2011, 2, 51-57.

Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi SJ, Berenjian A, Ghasemi Y. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods*, 2019, 8(3), 92.

Ferreira S, Torres-Palazzolo C, Bottini R, Camargo A, Fontana A. Assessment of in-vitro bioaccessibility and antioxidant capacity of phenolic compounds extracts recovered from grapevine bunch stem and cane by-products. *Food Chem*, 2021, 348, 129063.

Georgiev V, Ananga A, Tsoleva V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 2014, 6(1), 391-415.

Ghanim H, Sia CL, Abuaysheh S, Korzeniewski K, Patnaik P, Marumganti A, Chaudhuri A, Dandona P. An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(9), E1-E8.

Giovinazzo G, Grieco F. Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols. *Plant Foods Hum Nutr*, 2015, 70(4), 454-462.

Harborne JB. Methods in plant biochemistry, Volume I: Plant phenolics. 1: General Procedures and Measurement of Total Phenolics. London, Academic Press, 1989, str. 1-28.

Hijová E, Bertková I, Štofilová J. Dietary fibre as prebiotics in nutrition. *Cent Eur J Public Health*, 2019, 27(3), 251-255.

Jakobek L, Matic P. Non-covalent dietary fiber - polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility, *Trends in Food Sci Technol*, 2019, 83, 235-247.

Laurent C, Besançon P, Caporiccio B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chem*. 2007, 100(4), 1704–1712.

Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, 3380.

Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem*, 2019, 178, 687-704.

Ramaa CS, Shirode AR, Mundada AS, Kadam VJ. Nutraceuticals—an emerging era in the treatment and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006, 7(1), 15-23.

Ribas-Agustí A, Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R, Elez-Martínez P. Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(15), 2531-2548.

Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci*, 1997, 2(4), 152-159.

Sharma GN, Gupta G, Sharma P. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2018, 28(2), 139-154.

Slavin J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 2013, 5(4), 1417-1435.

Stephen AM, Champ MM, Cloran SJ, Fleith M, van Lieshout L, Mejbourn H, Burley VJ. Dietary fibre in Europe: current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. *Nutr Res Rev*, 2017, 30(2), 149-190.

Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem*, 2010, 120(2), 599–606.

Tao T, Zhang Q, Liu Z, Zhang T, Wang L, Liu J, He T, Chen Y, Feng J, Chen Y. *Polygonum cuspidatum* Extract Exerts Antihyperlipidemic Effects by Regulation of PI3K/AKT/FOXO3 Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021, 3830671.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 2004, 266(1-2), 37-56.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1), 44-84.

Vukoja J, Buljeta I, Pichler A, Šimunović J, Kopjar M. Formulation and Stability of Cellulose-Based Delivery Systems of Raspberry Phenolics. *Processes*, 2021, 9, 90.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Nova saznanja o ulozi hrane u prevenciji i liječenju bolesti dovela su do razvoja nove/funkcionalne hrane koja, osim esencijalnih nutrijenata nužnih za zadovoljavanje fizioloških potreba organizma, sadrži i sastavnice za koje je dokazano da imaju važnu ulogu u prevenciji i liječenju kroničnih oboljenja. Prehrambena vlakna i biljni ekstrakti koji obiluju antioksidansima, prvenstveno polifenolima, često se kao funkcionalne sastavnice dodaju u konačni proizvod. Međutim, u uvjetima probavnog trakta polifenoli se mogu vezati za frakciju prehrambenih vlakana što na kraju može rezultirati smanjenom oralnom biodostupnosti. Navedene interakcije su vrlo specifične i njihov intenzitet značajno varira u ovisnosti o fizikalno – kemijskim svojstvima vlakana i fenolnog spoja. U ovom radu istražene su interakcije različitih mješavina probavnih vlakana i polifenola iz ekstrakata sjemenki grožđa te ekstrakata biljke *Polygonum cuspidatum* u *in vitro* simuliranim uvjetima probavnog trakta. Biodostupnost polifenola nakon provedene digestije mjerena je Folin-Ciocalteu metodom. Ekstrakti biljke *Polygonum cuspidatum*, koji obiluju resveratrolom, pogodniji su za kombiniranje s prehrambenim vlaknima od ekstrakata sjemenki grožđa. Značajna razlika u afinitetu vezanja za vlakna utvrđena je za ekstrakte sjemenki grožđa od dva različita proizvođača što ukazuje na njihov različiti kemijski sastav.

7.2. Summary

New knowledge about the role of food in the prevention and treatment of diseases has led to the development of new/functional food, which, in addition to the essential nutrients necessary to meet the physiological needs of the body, also contains components that have been proven to play an important role in the prevention and treatment of chronic illnesses. Dietary fibers and plant extracts that are rich in antioxidants, primarily polyphenols, are often added as functional components to the final product. However, under the conditions of the digestive tract, polyphenols can bind to the dietary fiber fraction, which can ultimately result in reduced oral bioavailability. Mentioned interactions are very specific and their intensity varies significantly depending on the physico-chemical properties of the fibers and the phenolic compound. In this paper, the interactions of different mixtures of digestive fibers and polyphenols from grape seed extracts and *Polygonum cuspidatum* plant extracts were investigated in *in vitro* simulated conditions of the digestive tract. Bioavailability of polyphenols after digestion was measured by the Folin-Ciocalteu method. *Polygonum cuspidatum* plant extracts, which are rich in resveratrol, are more suitable for combining with dietary fiber than grape seed extracts. A significant difference in fiber binding affinity was found for grape seed extracts from two different manufacturers, indicating their different chemical composition.

8. PRILOZI

8.1. Kratice

CAT – katalaza, engl. *Catalase*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, engl. *Deoxyribonucleic acid*

FOS – fruktooligosaharid, engl. *Fructooligosaccharide*

GAE – ekvivalent galne kiseline, engl. *Gallic Acid Equivalence*

GIT – gastrointestinalni trakt, engl. *Gastrointestinal tract*

GOS – galaktooligosaharid, engl. *Galactooligosaccharide*

GPx – glutation peroksidaza, engl. *Glutathione peroxidase*

GSE – ekstrakt sjemenki grožđa, engl. *Grape seed extract*

LDL – lipoprotein niske gustoće, engl. *Low-density lipoprotein*

MMP-9 – metaloproteinaza matriksa-9, engl. *Matrix metalloproteinase-9*

NF- κ B – nuklearni faktor kappa B, engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

PC – ekstrakt biljke *Polygonum cuspidatum*

POS – oligosaharidi iz pektina, engl. *Pectic oligosaccharides*

RNS – reaktivne dušikove vrste, engl. *Reactive nitrogen species*

ROS – reaktivne kisikove vrste, engl. *Reactive oxygen species*

SGF – simulirana гастриčna tekućina, engl. *Simulated gastric fluid*

SIF – simulirana intestinalna tekućina, engl. *Simulated intestinal fluid*

SOD – superoksid dismutaza, engl. *Superoxide dismutase*

ŠBT2 – šećerna bolest tipa 2

TOS – trans-galaktooligosaharid, engl. *Trans-galactooligosaccharide*

**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA
KARTICA/BASIC DOCUMENTATION
CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za kemiju prehrane
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

INTERAKCIJE PREHRAMBENIH VLAKANA S POLIFENOLIMA IZ BILJNIH EKSTRAKATA: UTJECAJ NA BIODOSTUPNOST

Marina Eršek

SAŽETAK

Nova saznanja o ulozi hrane u prevenciji i liječenju bolesti dovela su do razvoja nove/funkcionalne hrane koja, osim esencijalnih nutrijenata nužnih za zadovoljavanje fizioloških potreba organizma, sadrži i sastavnice za koje je dokazano da imaju važnu ulogu u prevenciji i liječenju kroničnih oboljenja. Prehrambena vlakna i biljni ekstrakti koji obiluju antioksidansima, prvenstveno polifenolima, često se kao funkcionalne sastavnice dodaju u konačni proizvod. Međutim, u uvjetima probavnog trakta polifenoli se mogu vezati za frakciju prehrambenih vlakana što na kraju može rezultirati smanjenom oralnom biodostupnosti. Navedene interakcije su vrlo specifične i njihov intenzitet značajno varira u ovisnosti o fizikalno – kemijskim svojstvima vlakana i fenolnog spoja. U ovom radu istražene su interakcije različitih mješavina probavnih vlakana i polifenola iz ekstrakata sjemenki grožđa te ekstrakata biljke *Polygonum cuspidatum* u *in vitro* simuliranim uvjetima probavnog trakta. Biodostupnost polifenola nakon provedene digestije mjerena je Folin-Ciocalteu metodom. Ekstrakti biljke *Polygonum cuspidatum*, koji obiluju resveratrolom, pogodniji su za kombiniranje s prehrambenim vlaknima od ekstrakata sjemenki grožđa. Značajna razlika u afinitetu vezanja za vlakna utvrđena je za ekstrakte sjemenki grožđa od dva različita proizvođača što ukazuje na njihov različiti kemijski sastav.

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

Rad sadrži: 41 stranicu, 9 grafičkih prikaza, 5 tablica i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Prehrambena vlakna, polifenoli, ekstrakt sjemenki grožđa, ekstrakt biljke *Polygonum cuspidatum*, resveratrol, *in vitro* gastrointestinalna digestija, biodostupnost

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Petra Turčić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Kristina Radić, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Food Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

INTERACTIONS OF DIETARY FIBER WITH POLYPHENOLS FROM PLANT EXTRACTS: INFLUENCE ON BIOAVAILABILITY

Marina Eršek

SUMMARY

New knowledge about the role of food in the prevention and treatment of diseases has led to the development of new/functional food, which, in addition to the essential nutrients necessary to meet the physiological needs of the body, also contains components that have been proven to play an important role in the prevention and treatment of chronic illnesses. Dietary fiber and plant extracts that are rich in antioxidants, primarily polyphenols, are often added as functional components to the final product. However, under the conditions of the digestive tract, polyphenols can bind to the dietary fiber fraction, which can ultimately result in reduced oral bioavailability. Mentioned interactions are very specific and their intensity varies significantly depending on the physico-chemical properties of the fiber and the phenolic compound. In this paper, the interactions of different mixtures of digestive fiber and polyphenols from grape seed extracts and *Polygonum cuspidatum* plant extracts were investigated in *in vitro* simulated conditions of the digestive tract. Bioavailability of polyphenols after digestion was measured by the Folin-Ciocalteu method. *Polygonum cuspidatum* plant extracts, which are rich in resveratrol, are more suitable for combining with dietary fiber than grape seed extracts. A significant difference in fiber binding affinity was found for grape seed extracts from two different manufacturers, indicating their different chemical composition.

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

Thesis includes: 41 pages, 9 figures, 5 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Dietary fiber, polyphenols, grape seed extract, *Polygonum cuspidatum* plant extract, resveratrol, *in vitro* gastrointestinal digestion, bioavailability

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

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Petra Turčić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina Radić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2022.

