

# Gastrointestinalna stabilnost polifenola iz kompleksnih biljnih ekstrakata

---

Gračanin, Karla

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:163:045482>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-19**



Repository / Repozitorij:

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



**Karla Gračanin**

**Gastrointestinalna stabilnost polifenola iz  
kompleksnih biljnih ekstrakata**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta te je izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

*Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo, na pomoći, savjetima, stručnom vodstvu i izuzetnoj susretljivosti prilikom izrade ovog rada, i dr. sc. Kristini Radić, na svom uloženom vremenu, trudu te pruženoj pomoći, savjetima i podršci tijekom izrade eksperimentalnog dijela. Hvala vam objema što ste uljepšale završetak mog studija tijekom vremena provedenog na Zavodu. Čast mi je što sam imala priliku kod vas izraditi svoj diplomski rad!*

*Hvala i svim ostalim djelatnicima Zavoda za kemiju prehrane na ugodnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju.*

*Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene. Hvala vam za svaki osmijeh, svako druženje, svaku riječ podrške i nezaboravne uspomene koje smo stvorili zajedno. Sretna sam što je svatko od vas u određenom trenutku postao dijelom mog životnog puta!*

*Posebno hvala Zrinki, uz koju su se najteži trenutci studija prestali činiti nemogućima. Hvala ti za svaki trenutak naših zajedničkih učenja i vremena provedenih u labosu, za svaku suzu i svaki smijeh koji ih je izbrisao!*

*Na kraju, najviše hvala mojoj obitelji. Mama, tata i Nika, hvala vam što ste bili uz mene u svakom trenutku mog života, prisutni u svako doba dana i noći, kad god je bilo potrebno. Hvala vam što ste mi omogućili sve i što ste vjerovali u mene u svakom trenutku, a osobito onda kad ni sama nisam vjerovala u sebe. Bez vas ne bih bila ono što jesam!*

# Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	Polifenoli.....	3
1.1.1.	Vinova loza.....	7
1.1.2.	Japanski dvornik .....	9
1.1.3.	Resveratrol.....	10
1.2.	Biodostupnost i bioraspoloživost polifenola.....	12
1.3.	Metode za istraživanje biodostupnosti i bioraspoloživosti .....	14
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	16
3.	MATERIJALI I METODE .....	17
3.1.	Materijali.....	17
3.1.1.	Uzorci za analizu .....	17
3.1.2.	Kemikalije .....	17
3.1.3.	Reagensi.....	18
3.1.4.	Pribor .....	20
3.1.5.	Instrumenti.....	20
3.2.	Metode .....	21
3.2.1.	Određivanje ukupnih fenola .....	21
3.2.2.	Određivanje antiradikalne učinkovitosti.....	23
3.2.3.	Simulacija probave <i>in vitro</i> .....	25
3.3.	Plan eksperimenta .....	27
3.4.	Statistička obrada podataka.....	27
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	28
4.1.	Antioksidativni potencijal analiziranih ekstrakata.....	28
4.1.1.	Antiradikalni potencijal .....	28
4.1.2.	Reduktivni potencijal.....	30
4.2.	Gastrointestinalna stabilnost polifenola .....	32
5.	ZAKLJUČCI.....	35
6.	POPIS KRATICA .....	36
7.	LITERATURA.....	37
8.	SAŽETAK/SUMMARY .....	41
	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	

# 1. UVOD

Slobodni radikali su molekule ili fragmenti molekula koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Ti su elektroni delokalizirani te daju značajan stupanj reaktivnosti. Općenito ih se u literaturi, kemijskim formulama te u kraticama označava superskriptnom točkom s desne strane. Dvije najzastupljenije skupine slobodnih radikala su ROS i RNS. Pod ROS spadaju superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $HO^{\cdot}$ ), peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ), hidropersil ( $HOO^{\cdot}$ ), alkoksil ( $RO^{\cdot}$ ), dok pod RNS spadaju dušikov oksid ( $NO^{\cdot}$ ) te dušikov dioksid ( $\cdot NO_2$ ). Postoje i brojne druge vrste slobodnih radikala poput vodika ( $H^{\cdot}$ ), metila ( $HC_3^{\cdot}$ ), glutatila ( $GS^{\cdot}$ ), halogenih radikala ( $X^{\cdot}$ ), ugljikova triklorida ( $CCl_3^{\cdot}$ ) i feril iona ( $FeOO_2^{\cdot 2+}$ ) (Sharma i sur., 2018; Valko i sur., 2007).

Njihova je uloga u organizmu dvojna. Ovisno o koncentraciji mogu biti korisni ili štetni. S obzirom da su produkti su normalnog metabolizma stanice u niskim, ali mjerljivim koncentracijama, određenim ravnotežom između stupnja njihove proizvodnje i stupnja uklanjanja antioksidansima, ispoljavaju svoje korisne učinke. Njihova proizvodnja strogo je regulirana hormonima, citokinima i drugim mehanizmima. Djeluju kao sekundarni glasnici, sudjeluju u staničnom odgovoru na štetne i infektivne agense te sudjeluju u nizu staničnih signalnih puteva. Primjerice u pokretanju i održavanju puteva prijenosa signala uključenih u stanični rast i diferencijaciju (Valko i sur., 2007).

Svaka stanica okarakterizirana je redoks stanjem, odnosno koncentracijom elektrona pohranjenih u staničnim odjeljcima. Redoks stanje stanice određuje njezino funkcioniranje te se pri normalnim uvjetima održava unutar uskog raspona. Reakcije oksidacije bitne su za život budući da pomažu u održavanju složene strukture našeg tijela, međutim mogu biti i štetne. Općenito govoreći, oksidacija je proces kemijske transformacije koji rezultira ekstremno reaktivnim slobodnim radikalima. Za pravilno odvijanje fizioloških funkcija neophodna je ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidansa (Neha i sur., 2019; Sharma i sur., 2018; Valko i sur., 2007).

Ukoliko dođe do prekomjerne proizvodnje ROS i RNS te manjka enzimskih i neenzimskih antioksidansa, počinju štetno djelovati na organizam. Te se procese naziva oksidativnim i nitrozativnim stresom. Oksidativni je stres štetan proces, koji nastaje kao posljedica metaboličkih procesa u kojima se koristi kisik pri čemu dolazi do poremećaja ravnoteže između prooksidativnih i antioksidativnih reakcija u organizmu. Ravnoteža između korisnih i štetnih učinaka slobodnih radikala vrlo je osjetljiva i važno ju je očuvati, a to se postiže mehanizmima redoks regulacije, koji organizam štite od oksidativnog stresa te se na taj način održava redoks homeostaza. U visokim koncentracijama ROS može uzrokovati oštećenje staničnih struktura,

proteina, lipida i nukleinskih kiselina, pri čemu se inhibira njihova funkcija. S obzirom na to, oksidativni stres povezan je s različitim patološkim stanjima organizma i uključen u niz bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, raka, neurodegenerativnih bolesti kao i u proces starenja (Neha i sur., 2019; Sharma i sur., 2018; Valko i sur., 2007).

Uslijed izloženosti slobodnim radikalima organizmi su razvili niz obrambenih mehanizama. Ti zaštitni putevi protiv oksidativnog stresa izazvanog slobodnim radikalima iz raznih izvora uključuju preventivne mehanizme, mehanizme popravka, fizičku obranu te antioksidativnu obranu (Valko i sur., 2007).

Antioksidansi se dijele na endogene i egzogene. Endogeni se dalje dijele na enzimske i neenzimske. Pod enzimske antioksidanse spadaju glutaciona peroksidaza, superoksid dismutaza i katalaza, dok se u neenzimske antioksidanse ubrajaju mokraćna kiselina, lipoična kiselina, bilirubin, glutation i melanin. Egzogeni antioksidansi su oni koje unosimo u organizam, a neki od njih su vitamini A, C i E, karotenoidi te polifenoli. Ravnoteža aktivnosti antioksidansa i njihovih vrijednosti u stanicama nužna je za opstanak i zdravlje organizma (Neha i sur., 2019; Valko i sur., 2007).

Adekvatan unos antioksidansa najdjelotvorniji je način kontrole oksidativnog stresa i izbjegavanja nastanka oksidativnog oštećenja. Stručnjaci smatraju da bi terapije temeljene na antioksidansima mogla imati ključnu ulogu u prevenciji ranije navedenih stanja (Sharma i sur., 2018; Georgiev, i sur., 2014).

## 1.1. Polifenoli

Polifenoli čine najveću skupinu fitokemikalija. Većinom ih se pronalazi u hrani biljnog podrijetla (Tsao, 2010). Istraživanja pokazuju kako su mnogi pozitivni učinci konzumacije biljaka i funkcionalne hrane posljedica prisutnosti polifenola. Iako se radi o najzastupljenijim antioksidansima u prehrani, polifenoli su tek nedavno zaokupili pozornost stručnjaka. Jedan od glavnih razloga koji je otežavao proučavanje njihovih učinaka je njihova značajna raznolikost i velik broj složenih kemijskih struktura s različitim biološkim aktivnostima (Scalbert i sur., 2005).

Široko su zastupljeni u biljkama, a njihovi glavni izvori su voće te pića biljnog podrijetla poput čaja, kave, voćnih sokova i crnog vina. Ukupnom unosu doprinose i povrće, mahunarke, žitarice i čokolada. Prema procjenama, njihov ukupni unos hranom mogao bi biti i do 1 g/dan, što je 10 puta više od unosa vitamina C i čak 100 puta više od unosa vitamina E ili karotenoida (Scalbert i sur., 2005).

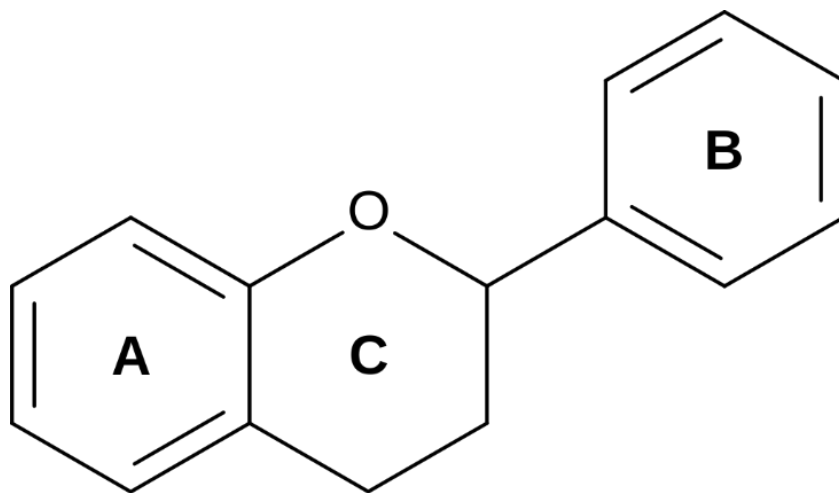
U većini slučajeva, u hrani se nalaze složene mješavine polifenola. Na njihov sadržaj u biljci, osim sorte, mogu utjecati i zrelost u vrijeme berbe, okolišni čimbenici te način prerade i skladištenja (Manach i sur., 2004).

Mnogi polifenoli, izravno su uključeni u odgovor biljke na različite stresore. Nastaju kao sekundarni metaboliti u biljkama, koje ih stvaraju s ciljem obrane od ultraljubičastog zračenja ili od napada patogena. Pomažu zacjeljivanju oštećenih dijelova ili posjeduju antimikrobna svojstva, a njihova koncentracija u tim slučajevima može dodatno porasti (Manach i sur., 2004). Kemijski gledano, polifenoli čine skupinu spojeva s fenolnim strukturnim značajkama. To je zapravo skupni naziv za nekoliko podskupina fenolnih spojeva. Brojne su studije pokazale kako se te podskupine mogu značajno razlikovati u stabilnosti, bioraspoloživosti te fiziološkim funkcijama (Tsao, 2010). Mogu se klasificirati ovisno o broju fenolnih prstenova ili strukturnih elemenata koji te prstenove međusobno povezuju (Manach i sur., 2004).

Svi polifenolni spojevi imaju zajedničku osnovnu kemijsku strukturu, a to je aromatski prsten na koji su supstituirane jedna ili više hidroksilnih skupina i funkcionalni bočni lanac. Dijele se u 10 glavnih skupina, od kojih su najznačajnije skupine flavonoidi i izoflavonoidi, stilbeni, lignani te neflavonoidni spojevi (Harborne, 1989).

Jedna od najbrojnijih skupina polifenola su flavonoidi. Uz njih, skupine koje se smatra važnima za ljudsko zdravlje su fenolne kiseline, fenolni amidi te neflavonoidni polifenoli, među kojima se ističe resveratrol (Tsao, 2010).

Strukturu flavonoida čine dva aromatska prstena (A i B) povezana preko tri ugljikova atoma koji tvore oksigenirani heterociklički prsten (C). Uz to, mogu se vezati i međusobno te s ugljikohidratima i organskim kiselinama što dodatno doprinosi njihovoj strukturnoj raznolikosti. Ovisno o vrsti heterocikličkog prstena, se dijele na 6 podskupina: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i flavanoli u koje spadaju katehini i proantocijanidini (Manach i sur., 2004).



Slika 1. Osnovna struktura flavonoida  
(preuzeto s <https://commons.wikimedia.org/>)

Polifenoli su snažni antioksidansi koji nadopunjuju antioksidativna djelovanja vitamina i enzima (Tsao, 2010). Antioksidativna aktivnost određena je njihovim redukcijskim potencijalom, sposobnošću stabilizacije i delokalizacije nesparenih elektrona, reaktivnošću s drugim antioksidansima te potencijalom keliranja metalnih kationa. Zahvaljujući kemijskoj strukturi koja im omogućuje bolju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, u *in vitro* ispitivanjima pokazali su se kao učinkovitiji antioksidansi od vitamina C i E (Rice-Evans i sur., 1997).

Stupaju u izravne reakcije s receptorima ili enzimima uključenim u prijenos signala. Na taj način štite stanice od oksidativnog stresa, a rezultat tih interakcija može biti modifikacija redoks stanja stanice ili poticanje reakcija ovisnih o redoks potencijalu (Scalbert i sur., 2005).

Jedan od načina njihovog antioksidativnog djelovanja je indukcija ili inhibicija određenih enzima. Mogu inducirati aktivnost glutation peroksidaze, katalaze ili superoksid dismutaze,



enzima koji razgrađuju hiperoksid, vodikov peroksid te superoksidne anione. Uz to, imaju i mogućnost inhibicije enzima poput ksantin oksidaze (Tsao, 2010).

Na stanice mogu djelovati kao antioksidansi i kao prooksidansi. Kao antioksidansi povećavaju im šansu preživljavanja, dok kao prooksidansi sprječavaju proliferaciju tumorskih stanica, a mogu uzrokovati i njihovu apoptozu (Scalbert i sur., 2005). Kemijski gledano, molekule polifenola, nakon što predaju elektron ili atom vodika, same postaju slobodni radikali. Stoga potencijalno mogu izazvati prooksidativne učinke. Međutim, pitanje je hoće li ti učinci pojaviti *in vivo* i uzrokovati štetu. Iz tog su razloga potrebna daljnja istraživanja (Tsao, 2010).

Utvrđeno je da mogu neutralizirati slobodne radikale doniranjem elektrona ili atoma vodika. Suzbijaju stvaranje slobodnih radikala te time smanjuju brzinu oksidacije inhibicijom ili deaktivacijom aktivnih vrsta ili prekursora slobodnih radikala. Mogu djelovati i kao hvatači slobodnih radikala u lančanim reakcijama peroksidacije. Razbijači lanca slobodnom radikalom doniraju elektron, pri tom neutralizirajući radikal sami postaju stabilni radikali, ali manje reaktivni, čime zaustavljaju lančane reakcije (Tsao, 2010).

Također, mogu djelovati i kao kelatori metala. Kelacijom prijelaznim metala poput  $Fe^{2+}$  izravno smanjuju brzinu Fentonove reakcije. Time se sprječava oksidacija uzrokovana visoko reaktivnim hidroksilnim radikalima (Tsao, 2010).

Važno je naglasiti da nemaju svi polifenoli jednak stupanj apsorpcije, stoga se i njihova biodostupnost značajno razlikuje. Metaboliziraju se jetrenim i crijevnim enzimima te crijevnom mikroflorom. Metaboliti se brzo eliminiraju iz plazme pa je nužna svakodnevna konzumacija biljnih proizvoda, kako bi se održale visoke koncentracije. Uz to, postoji mogućnost da sami polifenoli, koje unosimo hranom i koje se istražuje, zapravo nisu aktivne komponente, već da su aktivni neki njihovi metaboliti, zbog čega su potrebna daljnja istraživanja (Scalbert i sur., 2005; Manach i sur., 2004).

Učinci polifenola na zdravlje ovise o unesenoj količini i njihovoj bioraspoloživosti, što uvelike može varirati (Manach i sur., 2004). Istraživanja provedena posljednjih godina podupiru preventivnu ulogu polifenola po pitanju degenerativnih bolesti, posebice kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti te karcinoma (Tsao, 2010).

Epidemiološkim studijama potvrđen je preventivni učinak kod kardiovaskularnih bolesti, dok se uvelike provode studije po pitanju neurodegenerativnih bolesti, karcinoma, osteoporoze i šećerne bolesti. Većina dokaza o preventivnim učincima dobivena je pokusima pri kojima su korištene puno veće doze od onih koje su prisutne u prehrani. Iz tog razloga i dalje nema dovoljno podataka za formiranje smjernica koje bi vrijedile za opću populaciju ili pojedine rizične skupine. (Scalbert i sur., 2005). Međutim, iako se većina dokaza temelji na podacima

dobivenim *in vitro* studijama, sve je više dokaza koji ukazuju na njihovo *in vivo* antioksidativno djelovanje (Tsao, 2010).

Vodeći uzrok smrtnosti u 21. stoljeću, uz karcinom, su kardiovaskularne bolesti. Iz tog razloga nalaženje načina njihove prevencije jedan je od glavnih predmeta istraživanja (Ramaa i sur., 2006). Polifenoli se ističu kao jedni od najučinkovitijih. Djelujući kao antioksidansi, sprječavaju oksidaciju LDL kolesterola, a uz to moduliraju i staničnu signalizaciju te smanjuju agregaciju trombocita (Arranz i sur., 2012).

Resveratrol, neflavonoidni polifenol, ima antiproliferativne učinke djelujući na način da inducira apoptozu u staničnim linijama leukemije te karcinoma dojke, prostate, debelog crijeva i gušterače (Aggarwal i sur., 2004).

### 1.1.1. Vinova loza

Vinova loza (*Vitis spp.*) jedna je od najstarijih i ekonomski najvažnijih biljnih kultura. Razlog tome je njezina široka upotreba u proizvodnji vina, soka od grožđa i raznih prehrambenih proizvoda. Uzgaja se u umjerenim područjima s dovoljnom količinom kiše, gdje su ljeta topla i suha, a zime relativno blage (Georgiev i sur., 2014).



Slika 2. Grozd vinove loze

(preuzeto s <https://www.canva.com> )

Jedinstvenu kombinaciju fitokemikalija u grožđu čini niz bioaktivnih spojeva uključujući jednostavne fenole, flavonoide, antocijanine, stilbene, proantocijanidine i vitamin E. Jednostavni fenoli prisutni u grožđu su derivati hidroksicimetne kiseline i hidroksibenzojeve kiseline, uključujući i galnu kiselinu. Postoje dokazi o raznim terapijskim učincima galne kiseline poput antioksidativnih, protuupalnih, antikancerogenih, antifungalnih i antivirusnih (Georgiev i sur., 2014).

Grožđe je jedan od najbogatijih izvora polifenola. Polifenoli uključujući flavonoide, stilbene i proantocijanidine najvažnija su skupina biološki aktivnih spojeva u grožđu. Studije koje su ispitivale učinke konzumacije grožđa i proizvoda grožđa na zdravlje, te učinke pripisuju upravo prisutnosti polifenola (Georgiev i sur., 2014).

Najzastupljeniji među polifenolima grožđa su flavonoidi. Raznolikost njihovih kemijskih struktura doprinosi širokom rasponu njihovih fizioloških i bioloških aktivnosti. Najčešći flavonoidi prisutni u grožđu su antocijanini, flavanoli, flavonoli, dihidroflavonoli i proantocijanidini. Antocijanini su prisutni samo u crvenim sortama (Georgiev i sur., 2014).

Flavonoidi štite biljku od ultraljubičastog zračenja, određuju boju cvijeta, privlače oprašivače te štite tkiva u slučaju prisutnosti patogena ili oksidativnog oštećenja. U grožđu se prvenstveno nalaze u epidermalnom sloju kože i sjemenki bobica. Pokazalo se da imaju kardioprotektivna, neuroprotektivna, antioksidativna, protuupalna, antikancerogena i antimikrobna svojstva i svojstva protiv starenja (Georgiev i sur., 2014).

Kardioprotektivno djeluju pojačanjem funkcije endotela, smanjenjem oksidacije LDL-a, poboljšanjem vaskularne funkcije, mijenjanjem lipida u krvi te moduliranjem upalnog procesa. Jednom je studijom dokazano da konzumacija soka crnog grožđa bogatog flavonoidima ublažava kardiovaskularne bolesti i inhibira trombozu. Neuroprotektivni učinak posljedica je sprječavanja neurodegenerativnih procesa inhibicijom neuro-upale i smanjenjem oksidativnog stresa. Smatra se da poboljšavaju funkciju pamćenja kod starijih osoba s blagim poteškoćama pamćenja. Zbog protuupalnih i antioksidativnih svojstava imaju sposobnost zaštite jetre djeluju i hepatoprotektivno. Protuupalni učinak događa se uslijed modulacije upalnih puteva ili smanjenja razine ROS-a prilikom čega smanjuju kroničnu upalu. Moduliranjem metaboličke endotoksemije te poboljšanjem integriteta crijevne barijere smanjuju pojavnost metaboličkog sindroma te razvoja pretilosti i DM tipa 2. Stoga, iako je već vrlo zastupljeno, grožđe i njegove proizvode treba i dalje promicati u svakodnevnoj prehrani, ne samo kao hranjivu, već i kao zdravu hranu (Georgiev i sur., 2014).

Blagotvorno djelovanje flavonoida grožđa na zdravlje povezuje se s pojmom "francuski paradoks". Pojam se odnosi na epidemiološku opservaciju relativno niske pojavnosti koronarne bolesti srca u mediteranskoj populaciji, unatoč lokalnoj prehrani bogatoj zasićenim mastima. Kao glavni čimbenik koji je tome pridonio navodi se redovita konzumacija crnog vina koje smanjuje rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti. Flavonoidi u crnom vinu smatra se odgovornima za ovaj fenomen (Georgiev i sur., 2014).

Pokazalo se da i nusproizvodi, dobiveni kao rezultat prerade grožđa imaju visoke nutritivne vrijednosti te se proizvode u raznim oblicima poput praškova, granulata ili koncentriranih ekstrakata (Georgiev i sur., 2014).

### 1.1.2. Japanski dvornik

Japanski dvornik (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) je višegodišnja zeljasta trajnica, podrijetlom iz istočne Azije. Osušeni korijen japanskog dvornika koristi se kao tradicionalni biljni lijek u Kini i Japanu. Kineskoj narodnoj medicini koristi se za liječenje gonoreje, dermatitisa i hiperlipidemije (Xiao i sur., 2002).



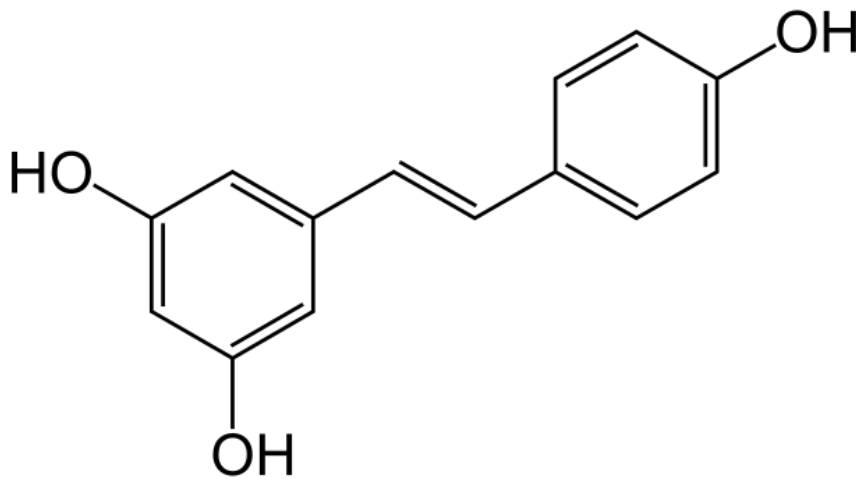
Slika 3. Japanski dvornik

(preuzeto s <https://commons.wikimedia.org/>)

Po kemijskom sastavu bogat je antrakinonima, stilbenima te flavonoidima, biološki visoko aktivnim spojevima s pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. Po svojoj biološkoj aktivnosti posebno su se istaknuli resveratrol, emodin te polidatin (Cucu i sur., 2021; Xiao i sur., 2002). Zbog svojih antioksidativnih, antimikrobnih, protuupalnih i antikancerogenih učinaka koristi se u alternativnoj medicini za prevenciju i liječenje brojnih stanja (Cucu i sur., 2021). Biljka je poznata i po svom negativnom ekološkom utjecaju. Smatra se jednom od najinvazivnijih vrsta, s obzirom da vrlo brzo raste i širi se te time ugrožava okolnu vegetaciju (Cucu i sur., 2021).

### 1.1.3. Resveratrol

Resveratrol ili trans-3,5,4'-trihidroksistilben značajan je nutraceutik, fitoaleksin, prisutan u mnogim biljnim vrstama. Prvi je put izoliran 1940. godine iz korijena bijelog kukurijeka (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), a nakon toga je pronađen i u raznim drugim biljkama, poput grožđa, borovnica, brusnica, kikirikija te japanskog dvornika. Poznato je da spojevi stilbena biljkama pružaju otpornost na mikrobnе i gljivične infekcije. U biljkama djeluje primarno protektivno, odnosno biljke ga stvaraju kao odgovorna stresne čimbenike poput fizičkih ozljeda, ultraljubičastog zračenja i gljivičnih infekcija (Aggarwal i sur., 2004; Berman i sur., 2017).



Slika 4. Struktura resveratrola

(preuzeto s <https://commons.wikimedia.org/>)

Iako su rezultati do sada provedenih znanstvenih istraživanja varijabilni, uočeno je da resveratrol smanjuje rezistenciju tkiva na inzulin te da ima pozitivno djelovanje na snižavanje krvnog tlaka i popravak endotelne funkcije. Također, može prolaziti krvno-moždanu barijeru te ispoljavati svoje učinke u središnjem živčanom sustavu što je potaklo znanstvenike na proučavanje učinaka resveratrola kod pacijenata s Alzheimerovom bolesti. Pronađeno je da smanjuje aktivnost MMP-9, čija je povećana aktivnost biomarker Alzheimerove bolesti (Berman i sur., 2017).

Uz navedene učinke, pokazalo se da ima i potencijalno antikancerogeno djelovanje. Utječe na sve tri faze kancerogeneze, inicijaciju, promociju i progresiju. Suzbija proliferaciju širokog spektra tumorskih stanica na način da inhibira angiogenezu te pojačava apoptotičke učinke citokina, lijekova te gama-zračenja Kao fitonutrijent najučinkovitiji je protiv raka kože i

gastrointestinalnog trakta (Berman i sur., 2017; Giovinazzo i Grieco, 2015; Aggarwal i sur., 2004).

Inhibira COX enzime, zadužene za pretvorbu arahidonske kiseline u prostaglandine, zbog čega se njegovo djelovanje povezuje s mogućim protuupalnim učincima (Berman i sur., 2017). Provedene su i studije koje su pokazale da inhibira agregaciju trombocita, zbog čega bi mogao biti učinkovit u sprječavanju stvaranja ugrušaka i u konačnici u prevenciji infarkta miokarda i moždanog udara (Berman i sur., 2017).

Iako pokazuje značajan terapijski potencijal, njegova je učinkovitost djelomična zbog slabe bioraspoloživosti. Farmakokinetički, resveratrol se pokazao učinkovitijim prilikom lokalne primjene, nego oralno zbog brzog metabolizma i eliminacije. Ova slaba bioraspoloživost može se pripisati brzom konjugaciji s glukuronskom kiselinom i sulfatima pri čemu nastaju glukuronidi i sulfatni konjugati koji se nakupljaju u plazmi i urinu (Berman i sur., 2017; Giovinazzo i Grieco, 2015).

U tijeku su brojna ispitivanja kako bi se odredila odgovarajuća oralna doza s obzirom na brzi metabolizam resveratrola, a postoji i potreba za dodatnim kliničkim ispitivanjima koja proučavaju različite mehanizme djelovanja resveratrola. Prilikom toga, potrebno je proučavati i metabolite resveratrola jer se pokazalo da neki od njih također imaju značajan potencijal terapijskog djelovanja (Berman i sur., 2017).

## 1.2. Biodostupnost i bioraspoloživost polifenola

Biodostupnost daje podatak o količini nutrijenta/bioaktivne sastavnice hrane koja je nakon procesa probave raspoloživa za apsorpciju. Ovisi o topljivosti nutrijenta, njegovim interakcijama s matriksom hrane te stabilnosti u uvjetima probavnog trakta. Pojam bioraspoloživost odnosi se na količinu hranjivih nutrijenata apsorbiranih iz crijeva, odnosno kvantificira količinu koja dopire u krvotok. Daje informaciju o tome koliko organizam može iskoristiti za normalne fiziološke funkcije ili skladištenje, u odnosu na ukupnu količinu unesene tvari. Vrlo je promjenjiva te varira ovisno o brojnim čimbenicima, a neki od njih su zdravstveno stanje, stanje uhranjenosti, fiziološki čimbenici poput izlučivanja želučane kiseline, sastav obroka, fizikalno-kemijska svojstva te moguće interakcije među nutrijentima (Schönfeldt i sur., 2016; Davidsson i Tanumihardjo, 2013).

Podaci o biodostupnosti, bioraspoloživosti i metabolizmu polifenola ključni su kako bi se mogla procijeniti njihova biološka aktivnost u ciljnim tkivima (Manach i sur., 2004).

Mnoge komponente hrane imaju nisku bioraspoloživost zbog niske stabilnosti u probavnim sokovima, niske biodostupnosti, slabe apsorpcije kroz intestinalni epitel ili brzog metabolizma i/ili eliminacije. Iz tog je razloga, u posljednje vrijeme, veća pažnja posvećena proučavanju mogućnosti poboljšanja oralne bioraspoloživosti raznih bioaktivnih sastavnica (Dima i sur., 2020).

Važno je za naglasiti da oni polifenoli koji su najzastupljeniji u prehrani, nisu nužno i biološki najaktivniji. Razlog tome mogu biti njihova slaba biodostupnost, slaba apsorpcija, brz metabolizam ili eliminacija. Također, njihovi metaboliti koji dopiru u krv ili ciljna tkiva mogu imati različitu biološku aktivnost od izvornih molekula (Manach i sur., 2004).

U većini studija vršne koncentracije polifenola grožđa u plazmi variraju od srednjih do vrlo niskih razina. Jedan od glavnih uzročnika niske bioraspoloživosti polifenola je njihova kemijska struktura te posljedično slaba apsorpcija. Smatra se da je uzrok slabe apsorpcije flavonoida taj što se u prirodi uglavnom nalaze u visoko hidrofilnim glikoziliranim oblicima, a samo aglikoni mogu učinkovito proći kroz stijenku crijeva. Većina polifenola nakon konzumacije ne može se odmah apsorbirati, već se moraju modificirati pomoću crijevnih enzima ili mikroflora debelog crijeva. Apsorpcija nekih događa se u tankom crijevu, prije čega dolazi do hidrolizacije glikozida. Dio polifenola koji se ne apsorbira u tankom crijevu dolazi u debelo crijevo, gdje mikroflora debelog crijeva hidrolizira glikozide u aglikone i razgrađuje ih na jednostavne fenolne kiseline. To je od velike važnosti za biološko djelovanje polifenola jer dolazi do



stvaranja niza specifičnih aktivnih metabolita, čiji se učinci mogu razlikovati od izvornih spojeva (Giovinazzo i Grieco, 2015; Georgiev i sur., 2014).

Nakon apsorpcije, zbog procesa, konjugacije prolaze kroz strukturne modifikacije koje uglavnom uključuju metilaciju, sulfataciju i glukuronidaciju, koje uvelike mogu utjecati na bioraspoloživost polifenola i, posljedično, na njihovu biološku aktivnost. Sve to uzrok je niske apsorpcije polifenola. Važno je napomenuti da polifenoli grožđa mogu ostvarivati pozitivne lokalne učinke na crijevnu sluznicu (Giovinazzo i Grieco, 2015; Georgiev i sur., 2014).

Kako bi se povećao terapijski učinak, trenutno se istražuju mogućnosti povećanja bioraspoloživosti *per os* primijenjenog resveratrola. Njegov intenzivni metabolizam u crijevima i jetri rezultira oralnom bioraspoloživošću manjom od 1%, a čini da ni povećanje doze i učestala primjena to ne mijenjaju. Trenutno se na to pokušava djelovati ispitivanjima primjene s inhibitorima metabolizma kako bi se produžila prisutnost *in vivo* ili upotrebe analoga s boljom biodostupnošću, primjerice formulacijom sustava za dostavu lijeka koji koriste nanotehnologiju te drugih formulacija koje bi se mogle učinkovitije apsorbirati (Giovinazzo i Grieco, 2015; Walle, 2011).

No, trenutno je i dalje nedovoljno konkretnih podataka o bioraspoloživosti i metabolizmu polifenola, zbog čega su potrebna daljnja istraživanja.

### 1.3. Metode za istraživanje biodostupnosti i bioraspoloživosti

Podaci o oralnoj bioraspoloživosti, dobiveni *in vitro* studijama, proizvođačima hrane i lijekova daju informacije kako bi proizveli što učinkovitije formulacije, s ciljem povećanja zdravstvenih dobiti te smanjenja rizika od toksičnosti. Iz tog je razloga, posljednjih godina, pažnja istraživača usmjerena na proučavanje procesa i mehanizama uključenih u bioraspoloživost nutraceutika (Dima i sur., 2020).

Prvi i najučinkovitiji pokusi, provedeni su na ljudima i životinjama, *in vivo*. Prilikom *in vivo* određivanja bioraspoloživosti nutrijenata, koriste se poznate količine hranjivih tvari u različitim sustavima dostave ili oblicima hrane koji se daju ili dobrovoljcima ili životinjama čiji su organi i fiziološke funkcije slične ljudskim (svinje, štakori, psi). U određenim intervalima mjeri se koncentracija hranjivih tvari u krvi ili urinu iz čega se dobivaju parametri bioraspoloživosti. *In vivo* metode smatra se zlatnim standardom za procjenu farmakokinetičkih parametara, međutim, njihovi nedostaci su dugotrajnost, teška kontrola okolišnih čimbenika, niska ponovljivost rezultata, visoka cijena te etička ograničenja (Dima i sur., 2020).

Kako bi se izbjeglo nedostatke *in vivo* metoda, razvijen je niz *in vitro* metoda za istraživanje biodostupnosti i bioraspoloživosti pri čemu se pokušava što točnije simulirati fizikalno-kemijske, biološke te mehaničke uvjete ljudskog probavnog sustava. Iako su ograničene u mogućnostima reproduciranja složenih uvjeta živog organizma, u velikom broju slučajeva daju dovoljno potrebnih informacija te mogu zamijeniti *in vivo* metode. Prednosti *in vitro* metoda su kratko vrijeme istraživanja, mogućnosti uzorkovanja i analize većeg broja uzoraka, proučavanja cijelog GIT-a li samo pojedinog segmenta, proučavanja interakcija nutraceutika s različitim komponentama, kontrole faktora poput pH, temperature, koncentracije ili prisutnosti enzima, ponovljivost rezultata, metode su relativno jeftine, tehnološki jednostavne te bez etičkih ograničenja (Dima i sur., 2020; Carbonell-Capella i sur., 2014).

*In vitro* metodama moguće je procijeniti ponašanje nutraceutika u probavnom sustavu te analizirati tri glavna čimbenika koji utječu na bioraspoloživost, a to su biodostupnost, apsorpcija i metabolizam (Dima i sur., 2020). Zbog složenog sastava probavnih sokova, većina se probave odvija u tankom crijevu. Manji dio probavlja se u debelom crijevu. Pokazalo se da su distalni segmenti probavnog sustava ključni za bioraspoloživost polifenola (van Duynhoven i sur., 2010).

*In vitro* metode za istraživanje biodostupnosti međusobno se razlikuju po broju i vrsti faza iz procesa probave (usta, želudac, crijeva), sastavu tekućina u pojedinoj fazi (elektroliti, enzimi, puferi), primjeni mehaničkih sila koje oponašaju peristaltiku i motilitet probavnog sustava te

karakteristikama probave u specifičnim dobnim skupinama (Shani-Levi i sur., 2017; Havenaar i sur., 2013; Hur i sur., 2011). *In vitro* modeli za proučavanje biodostupnosti nutraceutika klasificiraju se u statičke i dinamičke *in vitro* modele (Dima i sur., 2020).

*In vitro* modeli statičke probave vrlo su jednostavni za rukovanje i izradu. Njima se može reproducirati uvjete jednog dijela probavnog trakta neovisno o ostalima, pojedinačni stadij probave, ili sve stadije probave kroz koje uzorci prolaze postupno. Kako bi se ujednačilo provođenje *in vitro* ispitivanja biodostupnosti različitih istraživačkih skupina donesen je konsenzus o uvjetima statičke *in vitro* probave koji najtočnije oponašaju uvjete *in vivo* što je sažeto u INFOGEST metodi koja je korištena prilikom izrade ovog rada (Brodkorb i sur., 2019). Glavne prednosti statičkih *in vitro* metoda su njihova obnovljivost, robusnost, jednostavnost, relativno niska cijena te laka procjena svake pojedine faze probave. Glavni nedostatak ovih modela je nemogućnost oponašanja dinamike složenih probavnih procesa ili fizioloških interakcije s organizmom (Dima i sur., 2020; Brodkorb i sur., 2019). pH se održava konstantnim za pojedinu fazu, nema postupnog, naknadnog dodavanja želučane tekućine, kao što se to u organizmu događa prilikom dolaska hrane. Konstantna je i aktivnost enzima, ne uzima se u obzir vrsta hrane. Intestinalna faza tretira se kao jedna, ne uzimajući u obzir njezine pojedine faze, duodenalnu, jejunalnu i ilealnu, koje se međusobno razlikuju. Iz tih razloga, *in vitro* modeli statičke probave nisu prikladni za kinetičku analizu različitih faza probave. INFOGEST metoda pokazuje dobru korelaciju na krajnjim točkama svake faze probave u usporedbi rezultatima dobivenima *in vivo*. Dakle, statički modeli korisni su za procjenu krajnjih točaka probave, ali ne nužno za procjenu kinetike (Brodkorb i sur., 2019).

Kako bi se nadoknadili nedostaci *in vitro* statičkih modela, razvijeni su dinamički *in vitro* modeli probave koji bolje oponašaju uvjete u probavnom traktu (Minekus, 2015). Dinamički *in vitro* modeli koriste se za istraživanje biodostupnosti uz simulaciju dinamike transformacije hrane i lijekova tijekom probave, za što su osmišljeni različiti uređaji. Dinamičke metode omogućuju računalnu kontrolu fizioloških uvjeta za svaki odjeljak probavnog sustava. Relevantnije su jer u obzir uzimaju čimbenike poput gradijenta pH, postupnog dodavanja enzima i želučane tekućine te kontinuiranog pražnjenja želuca. Najčešće korišten model jer TNO gastrointestinalni model koji se sastoji od četiri odjeljka u kojima se oponašaju želudac, dvanaesnik, jejunum i ileum. Prijenos iz jednog u drugi odjeljak pod kontrolom je peristaltičkih pumpi (Dima i sur., 2020; Brodkorb i sur., 2019).

Iako *in vitro* metode imaju višestruke prednosti i vrlo su korisne za brojna istraživanja, najtočnije spoznaje o biološkim učincima nutraceutika dobivaju se *in vivo* metodama, a osobito tijekom kliničkih ispitivanja na skupinama dobrovoljaca (Dima i sur., 2020).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kompleksni biljni ekstrakti bogati polifenolima sve češće se koriste kao bioaktivne komponente u kreiranju nove/funkcionalne hrane i dodataka prehrani, najviše zbog širokog spektra njihovih bioloških učinaka, ponajprije antioksidativnog. Kako bi se u potpunosti sagledao njihov potencijal kao nutraceutika potrebno je istražiti utjecaj njihovog sastava na antioksidativni potencijal te ispitati gastrointestinalnu stabilnost (biodostupnost) polifenola kao glavnih nositelja biološke aktivnosti.

Cilj ovog rada je istražiti antioksidativnu aktivnost te gastrointestinalnu stabilnost (biodostupnost) polifenola iz različitih formulacija ekstrakata sjemenki grožđa (*Vitis spp.*) i ekstrakata japanskog dvornika (*Polygonum Cuspidatum*, Siebold & Zucc.), kako bi se odabrali ekstrakti pogodni za daljnju primjenu u kreiranju funkcionalne hrane obogaćene polifenolima.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Uzorci za analizu

- Ekstrakt sjemenki grožđa – smjesa polifenola
  - MegaNatural BP Grape seed extract – GSE1
  - Grape seed extract N20105877 – GSE2
- Ekstrakt japanskog dvornika – standardiziran na resveratrol
  - 90% Polygonum Cuspidatum extract 11560 – PC1
  - 98% Polygonum Cuspidatum Sibe.Et.Zucc extract 2347 – PC2

Skladištenje može značajno utjecati na sadržaj polifenola. Utvrđeno je da je hladno skladištenje najprikladniji način, s obzirom da je tada najmanji utjecaj na promjenu sadržaja polifenola (Manach i sur., 2004). Iz tog razloga, uzorci se prije korištenja čuvaju u zamrzivaču na -20 °C.

#### 3.1.2. Kemikalije

- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) - ABTS tablete (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Amonijev karbonat -  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Kalcijev klorid –  $\text{CaCl}_2$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev dihidrogen fosfat –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev klorid –  $\text{KCl}$  (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev persulfat –  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Klorovodična kiselina –  $\text{HCl}$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Magnezijev klorid heksahidrat –  $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$  (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev hidrogenkarbonat –  $\text{NaHCO}_3$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Natrijev hidroksid –  $\text{NaOH}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Natrijev karbonat –  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Ultračista voda

### 3.1.3. Reagensi

- ABTS<sup>·+</sup> radikal

7 mM otopinu ABTS pripremiti otapanjem 10 mg tablete ABTS u 2,604 mL ultračiste vode. 1,63 mM otopinu K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> pripremiti u odmjernoj tikvici od 10 mL. 6,62 mg K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> otopiti u otprilike 5 mL ultračiste vode i potom nadopuniti ultračistom vodom do oznake. ABTS<sup>·+</sup> radikal dobiti miješanjem jednakih volumena otopina ABTS i K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, iskoristiti svu otopinu ABTS te dodati istu količinu otopine K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.

Dolazi do reakcije deprotonacije sulfatnih skupina ABTS-a kalijevim persulfatom te nastaje plavo-zeleni ABTS<sup>·+</sup> kation. S obzirom da reakcija nije stehiometrijski potpuna (1:0,5) kation je u početku nestabilan, odnosno reagens nije odmah spreman za uporabu već ga je potrebno ostaviti zaštićenog od svjetlosti 12 do 16 sati kako bi se stabilizirao.

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

700 mM otopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> priprema se otapanjem 7,4192 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 100 mL ultračiste vode. Po potrebi zagrijavati na magnetskoj miješalici na 40°C dok se u potpunosti ne otopi.

- Simulirane probavne tekućine – SGF (*eng. simulated gastric fluid*) i SIF (*eng. simulated intestinal fluid*) otopine

Za pripremu otopina reagensa SGF i SIF potrebno je pripremiti stock otopine soli. Stock otopine dobiva se otapanjem soli u ultračistoj vodi (Tablica 1). Otopinu HCl 6M pripremi se razrjeđivanjem koncentrirane otopine.

Tablica 1. Priprema stock otopina soli za pripremu SGF i SIF otopina

KCl (0,5 M)	otopiti 746 mg soli u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 20 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 M)	otopiti 340 mg soli u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 5 mL
NaHCO <sub>3</sub> (1 M)	otopiti 8400 mg soli u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL
NaCl (2 M)	otopiti 2925 mg soli u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 25 mL
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> (0,15 M)	otopiti 152,5 mg soli u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 5 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,5 M)	otopiti 96 mg soli u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 2 mL
HCl (6 M)	razrijediti 9,9368 mL 37% HCl ultračistom vodom u odmjernoj tikvici od 20 mL

Za pripremu 500 mL otopina (1x razrjeđenja) koristiti staklenu čašu od 600 mL. Izračunate volumene stock otopina (Tablica 2.) pipetom prenesti u čašu te dodati ultračistu vodu do otprilike 400 mL. Dobivene otopine promiješati staklenim štapićem.

Tablica 2. Volumeni stock otopina za pripremu SGF i SIF otopina

Otopina soli	Koncentracija stock otopine (M)	SGF		SIF	
		Volumen stock otopine za pripremu 500 mL (mL)	Konačna koncentracija (mM)	Volumen stock otopine za pripremu 500 mL (mL)	Konačna koncentracija (mM)
KCl	0,50	6,9	6,9	6,8	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	0,9	0,9	0,8	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	1,00	12,5	25	42,5	85
NaCl	2,00	11,8	47,2	9,6	38,4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,15	0,4	0,12	1,1	0,33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,50	0,5	0,5	-	-
HCl	6,00	1,3	15,6	0,7	8,4

Potrebno je izmjeriti i podesiti pH na ciljne vrijednost, pH=7 za SGF te pH=3 za SIF, pomoću 1 M otopine HCl i 1 M otopine NaOH.

1 M otopinu NaOH priprema se otapanjem 4000 mg NaOH u ultračistoj vodi u odmjerne tikvici od 100 mL.

Nakon što su podešene pH vrijednosti, otopine se kvantitativno prenesu u odmjernu tikvicu od 500 mL te nadopune ultračistom vodom do oznake.

Višak pripremljenih reagensa, koji se ne iskoristi prilikom pokusa, prenese se u Falcon kivete od 50 mL te čuva u zamrzivaču na -20 °C. Pri takvim uvjetima skladištenja, osigurava se njihova stabilnost te se mogu upotrijebiti u razdoblju od godinu dana.

### **3.1.4. Pribor**

- Čaše
- Eppendorf epruvete
- Falcon epruvete
- Kapaljke
- Kivete
- Mikropipete
- Mikrotitarska pločica
- Multikanalna pipeta
- Odmjerne tikvice
- Staklene epruvete

### **3.1.5. Instrumenti**

- Analitička vaga, AB265-S (Meter, Toledo, Indija)
- Čitač mikrotitarskih pločica – Victor X3 (PerkinElmer, SAD)
- Lisa MultiLab centrifuga (AFI group, Château-Gontier, Francuska)
- Multi Bio RS-24 rotator (BioSan, Riga, Latvija)
- Orbital Shaker-Incubator ES-20/60 (BioSan, Riga, Latvija)
- pH-metar s kombiniranom staklenom elektrodom (Methrom, Švicarska)
- Spektrofotometar Cecil Ce7200 (Cecil Instruments, Cambridge, UK)
- Vortex mješalica, tip VTX-3000L (Mixer UZUSIO, Japan)



## 3.2. Metode

Količinu aktivnih sastavnica u uzorcima biljnih ekstrakata (GSE1, GSE2, PC1, PC2) prati se mjerenjem ukupnog redukcijskog potencijala te određivanjem koncentracija ukupnih flavonoida (GSE1, GSE2), odnosno resveratrola (PC1, PC2).

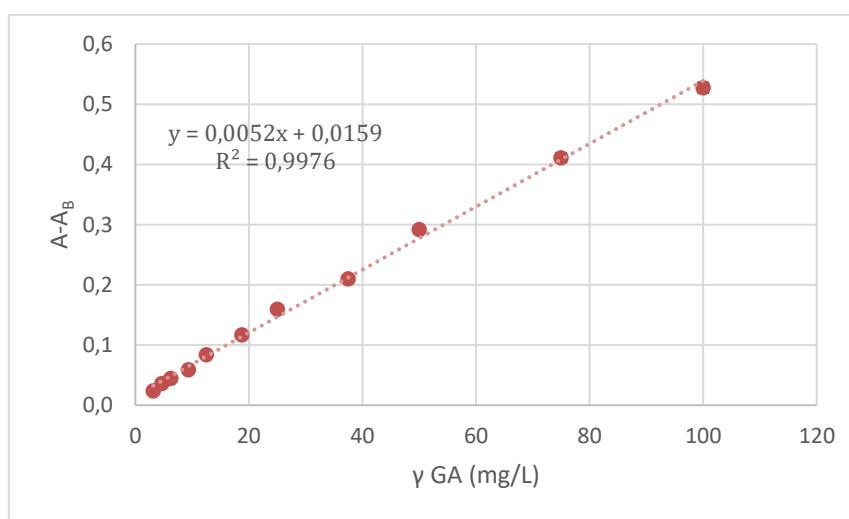
Gastrointestinalnu stabilnost prati se podvrgavanjem uzoraka *in vitro* statičkoj simulaciji probave.

### 3.2.1. Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih fenola

Folin-Ciocalteu metoda je metoda kvantifikacije sadržaja ukupnih fenola. Korištena je prema protokolu Procjena ukupnog sadržaja fenola i drugih oksidacijskih supstrata u biljnim tkivima pomoću Folin-Ciocalteu reagensa autora Ainsworth i Gillespie (2007).

Temelji se na reakciji fenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom Folin-Ciocalteu. Točna kemijska struktura reagensa nije jasno definirana, ali pretpostavka je da sadrži komplekse fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline koji u alkalnom mediju primaju elektron od fenolnih spojeva prilikom čega se oboji u plavo. Promjena boje dokaz je prisutnosti reducirajućih tvari, odnosno polifenola, u uzorku.

Mjerenje se vrši spektrofotometrijski na valnoj duljini 765 nm. Na taj način određuje se količina antioksidansa, odnosno ukupni reduktivni potencijal biljnih ekstrakata. Rezultate se izražava kao ekvivalente galne kiseline (GA), koja se koristi kao standard (Munteanu i Apetrei, 2021; Ainsworth i Gillespie, 2007).



Slika 5. Baždarni dijagram za određivanje ukupnog redukcijskog potencijala preko ekvivalenta GA

S obzirom da je metoda vrlo jednostavna, reproducibilna i robusna, predložena je kao standardizirana metoda za upotrebu u rutinskoj kontroli kvalitete prehrambenih proizvoda te u mjerenju antioksidativnog kapaciteta (Munteanu i Apetrei, 2021; Ainsworth i Gillespie, 2007). Konačni rezultati odnose se na ukupan sadržaj reducirajućih tvari u uzorku, a ne samo polifenola, što je jedan od nedostataka ove metode te prilikom provođenja to treba uzeti u obzir. Uz to, vrlo je osjetljiva na pH medija, temperaturu i vrijeme reakcije te nije prikladna za lipofilne tvari jer se vrši u hidrofilnom mediju (Munteanu i Apetrei, 2021).

#### Priprema uzoraka

Sva četiri ispitivana uzorka pripremaju se u ciljanoj koncentraciji od 400 µg/mL. U odmjerne tikvice od 20 mL odvažuje se 8 mg svakog uzorka te se nadopuni ultračistom vodom do oznake.

#### Opis postupka

Za provođenje pokusa potrebne su dvije mikrotitarske ploče. Na prvoj ploči rade se razrjeđenja uzoraka. U svakom sljedećem stupcu duplo je veće razrjeđenje, dok je u zadnjem stupcu blank (voda). Druga je ploča reakcijska ploča. Na nju se dodaje po 20 µL svakog uzorka u kvadrilikatu te 50 µL razrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa. Reagens je potrebno razrijediti 10x ultračistom vodom. Mikrotitarsku ploču inkubira se, uz istovremeno protresanje, 5 min na 37 °C. Nakon toga, u jažice se dodaje 160 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ploču se poklopi, inkubira se uz protresanje pri temperaturi od 37 °C 30 min. Važno je da se reagens doda prije lužine kako bi se izbjegla oksidacija fenola sa zrakom.

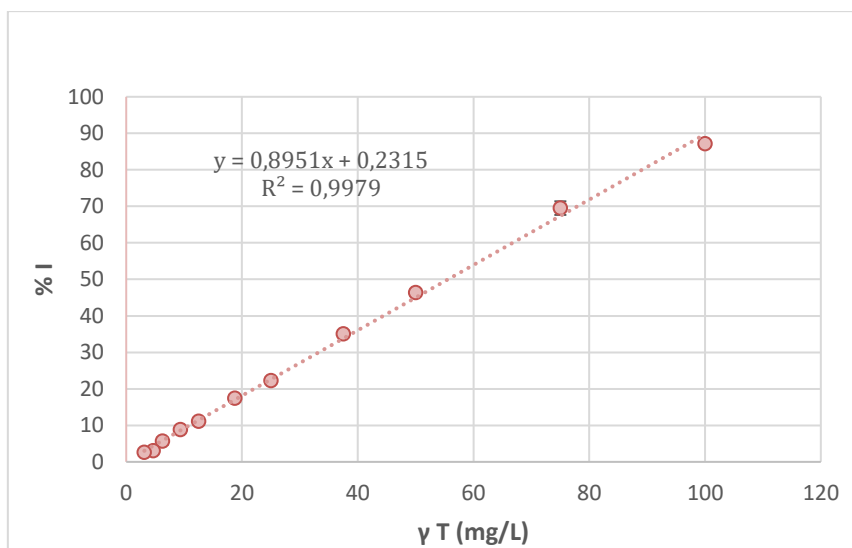
Lužina se koristi kako bi se povećalo pH na oko 10, jer u alkalnim uvjetima dolazi do deprotonacije fenolnih spojeva koji onda brže reagiraju s kiselim reagensom. Na kraju se izmjeri apsorbancija na 750 nm. Prihvatljive vrijednosti su u rasponu između 0,2 i 1,8 ± 0,02 AU. U suprotnom, uzorke je potrebno koncentrirati ili razrijediti.

### 3.2.2. Određivanje ukupnog antiradikalnog potencijala TEAC metodom

TEAC metoda ili ABTS test hvatanja radikala koristi se u svrhu mjerenja količine radikalnog kationa  $ABTS^{\cdot+}$ . Ova je metoda korištena prema protokolu za mjerenje antioksidativne aktivnosti poboljšanim ABTS testom dekolizacije radikalnih kationa autora Re i sur. (1999), kojom se mjeri smanjenje apsorpcije otopine  $ABTS^{\cdot+}$  u prisutnosti antioksidansa pri 734 nm. Iako radikal ima niz apsorpcijskih maksimuma, zbog čega se može mjeriti na valnim duljinama od 415, 645, 734 i 825 nm, preferirani apsorpcijski maksimum za mjerenje je na 734 nm, zbog vjerojatnosti interferiranja ekstrakata pri nižim valnim duljinama.  $ABTS^{\cdot+}$  radikal, nastao reakcijom  $ABTS$  i  $K_2S_2O_8$ , plavo-zelene je boje te u prisutnosti antioksidansa dolazi do obezbojenja. Na taj se način prati količinu antioksidansa, iz čega se dobiva podatke o antiradikalnoj aktivnosti.

Prednost ove metode je u tome što je  $ABTS^{\cdot+}$  kation topljiv i u hidrofilnim i u lipofilnim otapalima, stoga je metodu moguće koristiti za mjerenje i hidrofilnih i lipofilnih ekstrakata.

Kao otapala se najčešće koriste diklormetan za nepolarne ekstrakte, etanol za ekstrakte srednje polarosti te voda za polarne ekstrakte. Također, ionska jakost ne utječe na  $ABTS^{\cdot+}$  kation pa se može koristiti u širokom pH rasponu. Rezultate se izražava u ekvivalentima Trolox-a (T). Trolox se koristi kao standardni antioksidans, a to je ustvari u vodi topljiviji oblik vitamina E (Re i sur., 1999).



Slika 6. Baždarni dijagram za određivanje antiradikalnog potencijala preko Trolox ekvivalenta (T)

### Priprema uzoraka

Sva četiri ispitivana uzorka pripremaju se u ciljanoj koncentraciji od 400 µg/mL. U odmjerne tikvice od 20 mL odvažuje se 8 mg svakog uzorka te se nadopuni ultračistom vodom do oznake.

### Opis postupka

Za provođenje pokusa potrebne su dvije mikrotitarske ploče. Na prvoj ploči rade se razrjeđenja uzoraka. U svakom sljedećem stupcu duplo je veće razrjeđenje, dok je u zadnjem stupcu blank (voda). Razrjeđivanje ekstrakata je bitno kako bi se stvorio odgovarajući raspon koncentracija i potom osigurala koncentracija koja smanjuje apsorbciju radikala ispod 50%. Druga je ploča reakcijska ploča. Na nju se dodaje po 20 µL svakog uzorka u kvadrilikatu te 200 µL razrijeđene otopine ABTS<sup>•+</sup> radikala. ABTS<sup>•+</sup> radikal razrjeđuje se 20 puta, na način da se 1 mL pripremljene ABTS otopine razrijedi s 19 mL ultračiste vode. Ploču se stavlja u uređaj na 3 min pri čemu se smjesa inkubira na 30 °C i mjeri se apsorbcija na 750 nm. Prilikom reakcije ekstrakta i otopine reagensa, radikal se obezboji uslijed primanja elektrona. Odabiru se uzorci s vrijednostima apsorbcija u rasponu 0,3 - 0,5, odnosno sa smanjenjem apsorbcije od oko 50% u odnosu na kontrolu. Antioksidacijski kapacitet uzorka izračuna se kao postotak inhibicije (I%) ABTS radikala.

### 3.2.3. Statička metoda za određivanje biodostupnosti *in vitro*

Za ispitivanje gastrointestinalne stabilnosti polifenola simulacijom gastrointestinalnih uvjeta praćen je INFOGEST protokol za staničnu *in vitro* simulaciju gastrointestinalne probave autora Brodkorb i sur. (2019). Statički model digestije oponaša gastrointestinalne uvjete u dva koraka. Prvi korak je simulacija gastričnih uvjeta, dok su u drugom koraku simulirani intestinalni uvjeti, preciznije uvjeti tankog crijeva. Za to se koriste otopine reagensa SGF i SIF koje se pripremaju kao što je ranije navedeno.

Za simulaciju probave potrebno je inkubirati uzorke 4 sata na 37 °C te ih tijekom inkubacije rotirati na rotatoru. Inkubacija se provodi 2 sata nakon dodatka SGF-a, zatim se doda SIF te se inkubira još 2 sata.

#### Priprema uzoraka

Svaki uzorak priprema se u dva seta duplikata (Tablica 3). Uzorci oba seta duplikata otope se u SGF-u i inkubiraju 2 sata. Drugom setu duplikata (XI, XI'), nakon 2 sata, dodaje se SIF te se inkubiraju još 2 sata. Apsorbancija se mjeri prije inkubacije, nakon 2 sata inkubacije (prva inkubacija) te nakon 4 sata inkubacije (druga inkubacija).

Tablica 3. Oznake uzoraka s obzirom na fazu digestije

Uzorak	Otapalo	Faza digestije	Oznaka uzorka
GSE1 (MegaNatural BP Grape seed extract)	SGF	Gastrična	1G
			1G'
	SGF+SIF	Intestinalna	1I
			1I'
GSE2 (Grape seed extract N20105877)	SGF	Gastrična	2G
			2G'
	SGF+SIF	Intestinalna	2I
			2I'
PC1 (Polygonum Cuspidatum extract 11560)	SGF	Gastrična	3G
			3G'
	SGF+SIF	Intestinalna	3I
			3I'
PC2 (Polygonum Cuspidatum Sibe.Et.Zucc extract 2347)	SGF	Gastrična	4G
			4G'
	SGF+SIF	Intestinalna	4I
			4I'

## GSE1 I GSE2

### Priprema uzoraka

Falcon kivete od 10 ml označi se oznakama uzoraka (1G, 1G', 1I, 1I', 2G, 2G', 2I, 2I'). U prve četiri kivete od vagnuti 1,0 mg GSE1, a u druge četiri 1,0 mg GSE2. U sve kivete s uzorcima dodati 5 mL SGF-a te vorteksirati kako bi se uzorak u potpunosti otopio.

### Opis postupka

Nakon pripreme homogene otopine iz svakog uzorka pipetom uzeti 500 µL otopine i prebaciti u Eppendorf epruvete. Falcon kivete s otopinama su staviti na rotator, uz recipročno miješanje na 85°, i u inkubator na 37°C na 2 sata. Uzorcima uzetim u Eppendorf epruvete izmjeriti je ukupni redukcijski potencijal pomoću Folin-Ciocalteu metode. Nakon 2 sata iz otopina uzoraka u Falcon kivetama uzeti ponovno 500 µL otopine i prebaciti u Eppendorf epruvete. Zatim kivete s uzorcima 1I, 1I', 2I i 2I' dodati 4 mL SIF-a, kako bi omjer SGF i SIF bio 1:1. Uzorke vorteksirati kako bi se otopine homogenizirale, vratiti na rotator i u inkubator na 37 °C 2 sata. Uzorcima u Eppendorf epruvetama izmjeriti ukupni redukcijski potencijal pomoću Folin-Ciocalteu metode prije i nakon druge inkubacije.

## PC1 I PC2

### Priprema uzoraka

Falcon kivete od 10 ml označi se oznakama uzoraka (3G, 3G', 3I, 3I', 4G, 4G', 4I, 4I'). U prve četiri kivete od vagnuti 0,5 mg PC1, a u druge četiri 0,5 mg PC2. U sve kivete s uzorcima dodati 5 mL SGF-a te vorteksirati kako bi se uzorak u potpunosti otopio.

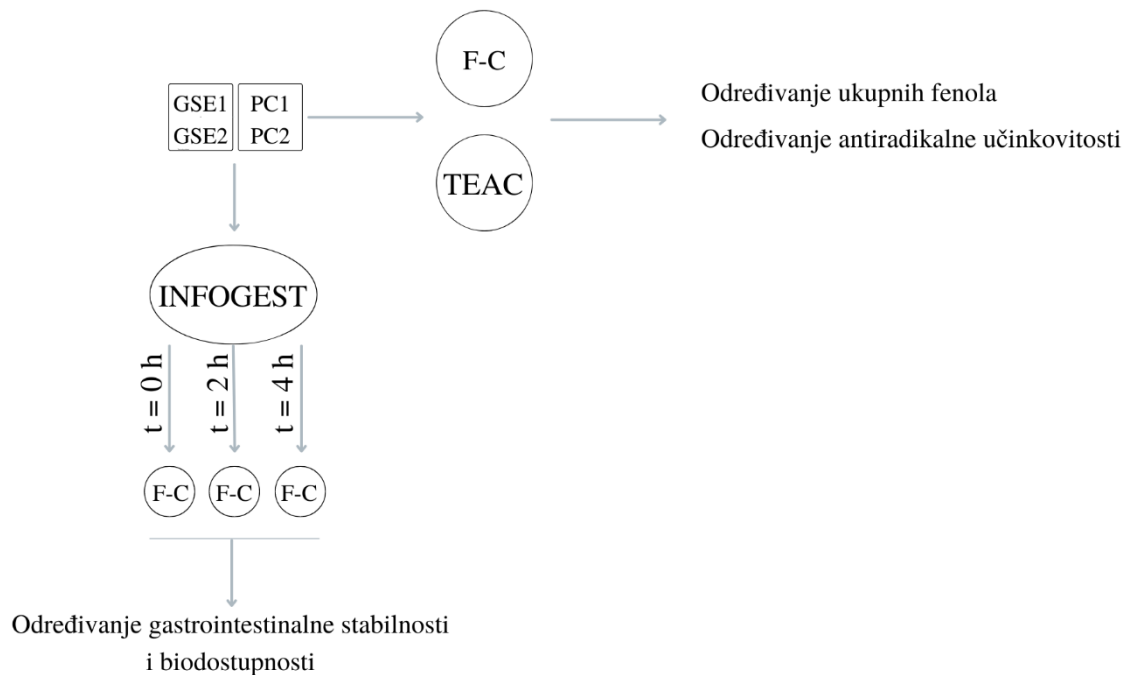
### Opis postupka

Nakon pripreme homogene otopine iz svakog uzorka pipetom uzeti 500 µL otopine i prebaciti u Eppendorf epruvete. Falcon kivete s otopinama su staviti na rotator, uz recipročno miješanje na 85°, i u inkubator na 37°C na 2 sata. Uzorcima uzetim u Eppendorf epruvete izmjeriti je ukupni redukcijski potencijal pomoću Folin-Ciocalteu metode. Nakon 2 sata iz otopina uzoraka u Falcon kivetama uzeti ponovno 500 µL otopine i prebaciti u Eppendorf epruvete. Zatim u kivete s uzorcima 3I, 3I', 4I i 4I' dodati 4 mL SIF-a, kako bi omjer SGF i SIF bio 1:1. Uzorke vorteksirati kako bi se otopine homogenizirale, vratiti na rotator i u inkubator na 37 °C 2 sata. Uzorcima u Eppendorf epruvetama izmjeriti ukupni redukcijski potencijal pomoću Folin-Ciocalteu metode prije i nakon druge inkubacije.

### 3.3. Plan eksperimenta

U prvom dijelu eksperimenta određuje se udio ukupnih fenola i antiradikalna učinkovitost analiziranih ekstrakata.

U drugom dijelu ekstrakti se podvrgavaju simulaciji probave in vitro te se udio ukupnih fenola i antiradikalna učinkovitost određuju u biodostupnim frakcijama ekstrakata kako bi se odredila njihova stabilnost tijekom probave i biodostupnost.



Slika 7. Shema provođenja eksperimenta

### 3.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka te izradu grafova i tablica korišten je programski paket Microsoft Office Excel (proizvođač Microsoft).

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije te su međusobno uspoređeni korištenjem Studentova T-testa i jednosmjerne analize varijance uz razinu značajnosti  $p \leq 0.05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Antioksidativni potencijal analiziranih ekstrakata

Antioksidativni potencijal kompleksnih biljnih ekstrakata određen je mjerenjem antiradikalnog potencijala TEAC metodom i mjerenjem ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.

#### 4.1.1. Antiradikalni potencijal analiziranih ekstrakata

Tablica 4. Antiradikalni potencijal biljnih ekstrakata.

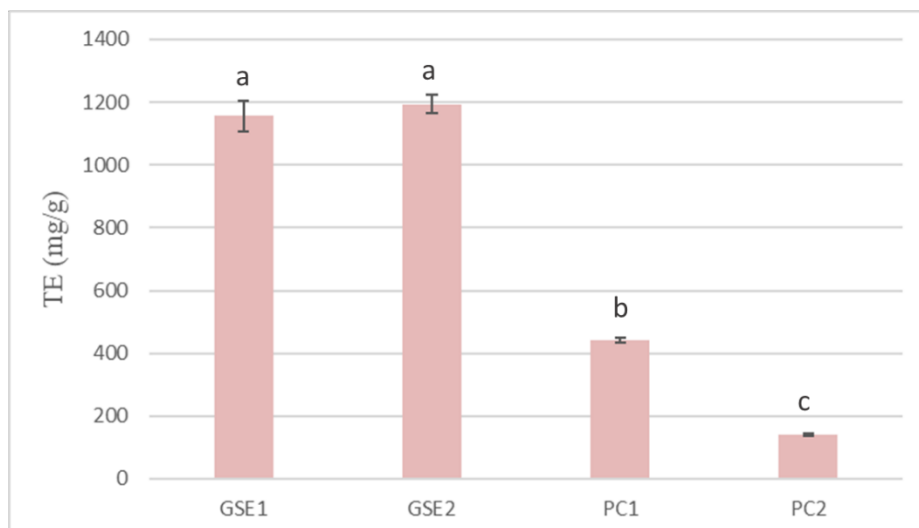
Uzorak	mg/g TE	stdev	RSD
GSE1	1156,23 <sup>a</sup>	48,89	4,23
GSE2	1193,58 <sup>a</sup>	28,23	2,37
PC1	441,39 <sup>b</sup>	6,60	1,50
PC2	141,33 <sup>c</sup>	3,39	2,40

\*Rezultati su izraženi kao ekvivalenti Trolox-a (TE). Uzorci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )

Usporedbom antiradikalnog potencijala ekstrakta sjemenki grožđa zaključeno je da nema statistički značajne razlike između dvije ispitivane sirovine, GSE1 i GSE2. Ekstrakt japanskog dvornika ima značajno niži antiradikalni potencijal u odnosu na ekstrakt sjemenki grožđa. Utvrđena je i statistički značajna razlika između dvije testirane sirovine, PC1 i PC2. Uzorak PC1 ima značajno veći antiradikalni potencijal od uzorka PC2, iako, prema deklaraciji, sadrži manje resveratrola.

Visok antiradikalni potencijal ekstrakta sjemenki grožđa, u kojem se nalazi mješavina polifenola, može se objasniti raznolikim kemijskim sastavom polifenola. Zbog kemijske složenosti polifenola te načina ekstrakcije uzoraka, analize polifenolnih uzoraka i dalje su vrlo izazovne te rezultati mogu biti vrlo raznoliki (Tsao, 2010).





Slika 8. Antiradikalni potencijal biljnih ekstrakata.

Rezultati su izraženi kao ekvivalenti Trolox-a (TE). Skupovi podataka označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ ).

#### 4.1.2. Reduktivni potencijal analiziranih ekstrakata

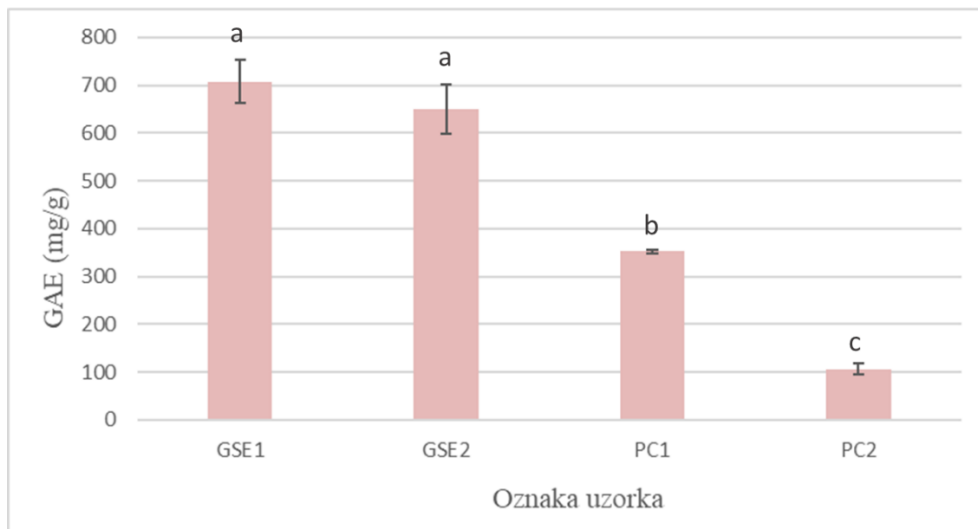
Tablica 5. Ukupni reduktivni potencijal biljnih ekstrakata.

Uzorak	mg/g GAE	stdev	RSD
GSE1	707,06 <sup>a</sup>	45,05	6,37
GSE2	649,64 <sup>a</sup>	51,17	7,88
PC1	352,43 <sup>b</sup>	4,24	1,20
PC2	105,75 <sup>c</sup>	11,53	10,91

\*Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (GAE). Uzorci označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p>0.05$ )

Usporedbom ukupnog reduktivnog potencijala ekstrakta sjemenki grožđa zaključeno je da nema statistički značajne razlike između dvije ispitivane sirovine, GSE1 i GSE2. Ekstrakt japanskog dvornika ima značajno niži ukupni reduktivni potencijal u odnosu na ekstrakt sjemenki grožđa. Utvrđena je i statistički značajna razlika između dvije testirane sirovine, PC1 i PC2. Uzorak PC1 ima značajno veći reduktivni potencijal od uzorka PC2, iako sadrži manje resveratrola.

Iako su obje sirovine bogate antioksidansima, ekstrakt sjemenki grožđa pokazao se boljim od ekstrakta japanskog dvornika. Razlozi ovakvih rezultata mogu biti razni, s obzirom da konačan antioksidativni potencijal ovisi o metodama ekstrakcije, stabilnosti polifenola u ekstraktima te uvjetima u kojima su skladišteni (Tsao, 2010). Neslaganje rezultata antioksidativnog potencijala resveratrola s deklariranim sadržajem može se objasniti mogućnošću da su uzorci bogati i drugim polifenolnim sastavnicama koje mogu biti nositelji antioksidativnog potencijala ili deklarirani udio resveratrola nije odgovarao stvarnom stanju, moguće da se dio raspao.



Slika 9. Ukupni reduktivni potencijal biljnih ekstrakata.

Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (GAE). Skupovi podataka označeni istim slovom pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ ).

## 4.2. Gastrointestinalna stabilnost polifenola

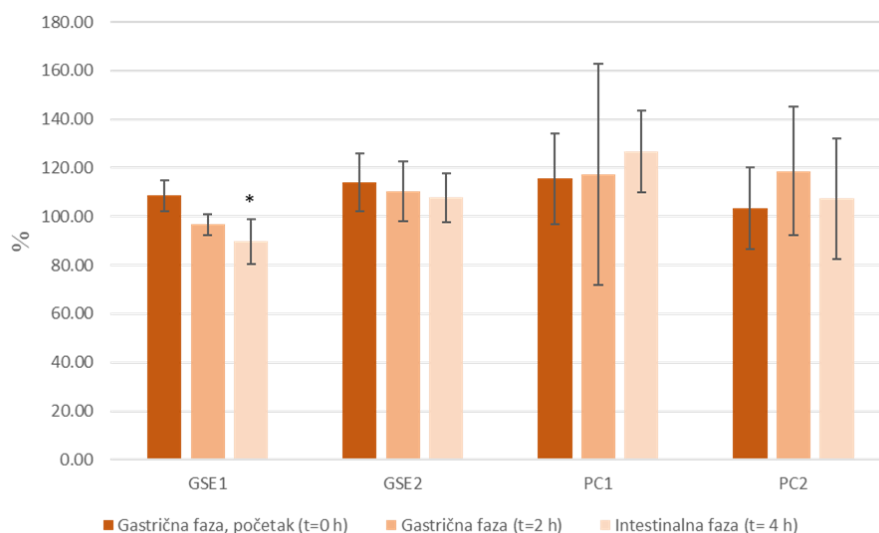
Gastrointestinalna stabilnost uzoraka prati se podvrgavanjem uzoraka *in vitro* statičkoj simulaciji probave prema standardiziranoj metodi. Stabilnost polifenolnih komponenti (glavnih aktivnih sastavnica) u analiziranim ekstraktima prati se određivanjem ukupnih polifenola i ukupnog antiradikalnog potencijala biodostupnim frakcijama ekstrakata dobivenim nakon simulacije probave.

Tablica 6. In vitro biodostupnost polifenola iz analiziranih ekstrakata

Uzorak	Biodostupnost polifenola (%)								
	Na početku gastrične digestije (t=0 h)			Nakon gastrične digestije (t=2 h)			Nakon intestinalne digestije (t=4 h)		
	%	stdev	RSD	%	stdev	RSD2	%	stdev	RSD
GSE1	108,6 <sup>a</sup>	6,32	5,82	96,67 <sup>ab</sup>	4,22	4,37	89,8 <sup>b</sup>	9,21	10,26
GSE2	113,92 <sup>a</sup>	11,85	10,4	110,36 <sup>a</sup>	12,15	11,01	107,83 <sup>a</sup>	9,99	9,27
PC1	115,61 <sup>a</sup>	18,68	16,16	117,22 <sup>a</sup>	45,48	38,8	126,85 <sup>a</sup>	16,73	13,19
PC2	103,44 <sup>a</sup>	16,73	16,18	118,64 <sup>a</sup>	26,43	22,27	107,36 <sup>a</sup>	24,73	23,04

Skupovi podataka u istom redu, označeni istim slovom, pripadaju istom statističkom skupu ( $p > 0.05$ )

Rezultati su prikazani kao postotak biodostupne frakcije u odnosu na ukupnu koncentraciju uzorka, inkubiranog u istim uvjetima u vodi. Uzorci su analizirani na početku simulacije gastrične probave (t=0 h), nakon 2 sata simulacije gastrične probave (t=2 h) te nakon završetka simulacije intestinalne probave (t=4 h). Simulacija intestinalne probave odnosi se na uvjete u tankom crijevu.



Slika 10. In vitro biodostupnost (%) ukupnih fenola u analiziranim ekstraktima

\*Uzorak u kojem je biodostupnost (%) značajno smanjena u odnosu na početnu vrijednost ( $p < 0.05$ ).

Udio biodostupnih fenola u ekstraktu sjemenku grožđa malo se smanjuje tijekom intestinalne digestije s tim da se statistički značajno smanjenje uočava samo kod uzorka GSE1. Ono je najvjerojatnije posljedica razgradnje kompleksnih polifenolnih spojeva na jednostavnije, koji imaju niži reduktivni potencijal. Reduktivna aktivnost ekstrakta japanskog dvornika i koncentracije resveratrola tijekom probave se ne mijenjaju. Na temelju dobivenih vrijednosti, zaključuje se da su polifenolni biljni ekstrakti stabilni u uvjetima probavnog trakta.

Rezultati dobiveni za GSE u skladu su dostupnim literaturnim podacima. Proučavajući *in vitro* biodostupnost i antioksidativnu aktivnost polifenola iz grožđa Tagliazucci i sur. (2010) utvrdili su da su flavonoidi stabilni tijekom gastrične i intestinalne digestije. U istom se radu pokazalo da su antocijani stabilni u gastričnoj fazi uslijed niskog pH, dok su u lužnatom mediju intestinalne faze nestabilni. S obzirom da su sjemenke grožđa bogate antocijanima, očekivano smanjenje redukcijskog potencijala u ovom radu trebalo je biti veće. Zadržavanje reduktivne aktivnosti objašnjava se konstatacijom da dolazi do raspada antocijana na produkte koji zadržavaju reduktivnu aktivnost. S obzirom da je antioksidativna aktivnost polifenola povezana s pH medija te s povišenjem pH povećava antioksidativni potencijal, moguće je da je relativno visok intestinalni pH doveo do lažnog povećanja rezultata. Istraživanjem digestije ekstrakta sjemenki grožđa Laurent i sur. (2007) zaključili su da su katehin, epikatehin i proantocijanidini stabilni tijekom probate te tijekom *in vitro* digestije u mediju bez proteina u cijelosti ostaju nepromijenjeni. S obzirom na ove informacije, može se zaključiti da je u uzorku GSE1 sadržaj antocijana bio nešto veći, nego u uzorku GSE2.

Stabilnost resveratrola tijekom *in vitro* digestije manje je proučena te je znatno manje dostupnih literaturnih podataka. Literaturni se podaci u slučaju resveratrola ne slažu s dobivenim rezultatima u ovom radu, zbog čega su potrebne dodatne studije kako bi se došlo do konačnog zaključka. Iako se u ovom radu pokazalo da reduktivni potencijal biljke *Polygonum cuspidatum* nakon provedene simulacije probave ostaje gotovo nepromijenjen, u ranije provedenim studijama rezultati su bili drugačiji. Zaključak studije koju su proveli Tagliazucci i sur. (2010) bio je da je resveratrol stabilan u gastričnoj fazi, međutim nakon intestinalne faze značajno mu se smanjuju udio i antioksidativna aktivnost. Tome vrlo slične rezultate dobili su i Ferreyra i sur. (2021) proučavajući *in vitro* biodostupnost i antioksidacijski kapacitet polifenola iz stabljika i trski.

## 5. ZAKLJUČCI

- Antiradikalni potencijal ekstrakta japanskog dvornika značajno je niži u odnosu na antiradikalni potencijal ekstrakta sjemenki grožđa.
  - Vrijednosti antiradikalnog potencijala ekstrakta sjemenki grejpa kretale su se od 1156,23 do 1193,58 mg/g TE. Između dvije ispitivane, GSE1 i GSE2, nema statistički značajne razlike u vrijednostima antiradikalnog potencijala
  - Vrijednosti antiradikalnog potencijala ekstrakta japanskog dvornika kretale su se od 141,33 do 441,39 mg/g TE. Između dvije ispitivane, PC1 i PC,2 utvrđena je statistički značajna razlika. Iako s deklarirano manjim sadržajem resveratrola, uzorak PC1 ima značajno veći antiradikalni potencijal.
- Ekstrakt japanskog dvornika ima značajno niži ukupni reduktivni potencijal u odnosu na ekstrakt sjemenki grožđa.
  - Vrijednosti ukupnog reduktivnog potencijala ekstrakta sjemenki grožđa kretale su se od 649,64 do 707,06 mg/g GAE. Između dvije ispitivane sirovine, GSE1 i GSE2, nema statistički značajne razlike.
  - Vrijednosti ukupnog reduktivnog potencijala ekstrakta japanskog dvornika kretale su se od 105,75 do 352,43 mg/g GAE.. Između dvije ispitivane sirovine, PC1 i PC2, utvrđena je statistički značajna razlika. Uzorak PC1 ima značajno veći reduktivni potencijal u odnosu na PC2
- Udio ukupnih fenola u ekstraktima sjemenki grožđa (GSE) i ekstraktima japanskog dvornika (PC) tijekom probave ostaje nepromijenjen ili se vrlo malo smanjuje. Postotne vrijednosti biodostupnih frakcija, u odnosu na ukupnu koncentraciju uzorka, kretale su se od 108,6 do 89,8 % za GSE1, od 113,92 do 107,83 % za GSE2, od 115,61 do 126,85 % za PC1 i od 103,44 do 107,36 % za PC2. Malo, ali statistički značajno, smanjenje utvrđeno je kod GSE1, dok kod ostalih uzoraka nisu utvrđene značajne promjene. Analizirani biljni ekstrakti bogati polifenolima pokazali su se stabilnima u uvjetima probavnog trakta.

## 6. POPIS KRATICA

- ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
- COX – ciklooksigenaza
- GA – galna kiselina (eng. gallic acid)
- GIT – gastrointestinalni trakt
- LDL – lipoprotein niske gustoće (eng. low-density lipoprotein)
- MMP – metaloproteinaze matriksa
- RNS – reaktivne dušikove vrste (eng. reactive nitrogen species)
- ROS – reaktivne kisikove vrste (eng. reactive oxygene species)
- SIF – simulirana intestinalna tekućina (eng. simulated intestinal fluid)
- SGF – simulirana гастриčna tekućina (eng. simulated gastric fluid)
- TEAC – antioksidativni kapacitet Trolox ekvivalenata (eng. Trolox equivalent antioxidant capacity)



## 7. LITERATURA

Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S. and Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 24(5A), 2783–2840.

Ainsworth, E.A., Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*, 2(4), 875–877.

Antioksidansi, <http://www.inpharma.hr/> , pristupljeno 8.11.2022.

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

Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., & Holz, M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ precision oncology*, 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, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*, 14(4), 991-1014.

Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J. and Frígola, Ana. (2014). Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 13(2), 155–171.

Cucu, A.-A., Baci, G.-M., Dezsi, Ş., Nap, M.-E., Beteg, F.I., Bonta, V., Bobiş, O., Caprio, E. and Dezmirean, D.S. (2021). New Approaches on Japanese Knotweed (*Fallopia japonica*) Bioactive Compounds and Their Potential of Pharmacological and Beekeeping Activities: Challenges and Future Directions. *Plants*, 10(12), 2621.

Davidsson, L., Tanumihardjo, S.A. (2013). Bioavailability, *Encyclopedia of Human Nutrition* (Third Edition), Academic Press, 149-155

Dima, C., Assadpour, E., Dima, S. and Jafari, S.M. (2020). Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 19(6), 2862–2884.

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

Georgiev, V., Ananga, A. and Tsoleva, V. (2014). Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients*, 6(1), 391–415.

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

Harborne, J.B. (1989). *Methods in plant biochemistry, Volume I: Plant phenolics. 1: General Procedures and Measurement of Total Phenolics*. London, Academic Press, 1-28.

Havenaar, R., Anneveld, B., Hanff, L.M., de Wildt, S.N., de Koning, B.A.E., Mooij, M.G., Lelieveld, J.P.A. and Minekus, M. (2013). In vitro gastrointestinal model (TIM) with predictive power, even for infants and children? *Int J Pharm*, 457(1), 327–332.

Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A. and McClements, D.J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12.

- 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*, 100(4), 1704–1712.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79(5), 727–747.
- Minekus, M. (2015). The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM), The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models, Springer, 37–46.
- Munteanu, I.G., Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(7), 3380.
- Neha, K., Haider, M.R., Pathak, A., Yar, M.S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem*, 178, 687-704.
- Ramaa, C.S., Shirode, A.R., Mundada, A.S., Kadam, V.J. (2006). Nutraceuticals—an emerging era in the treatment and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Pharm Biotechnol*, 7(1), 15-23.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231–1237.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci*, 2(4), 152-159.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 81(1), 215S-217S.
- Schönfeldt, H.C., Pretorius, B., Hall, N. (2016). Bioavailability of Nutrients, Encyclopedia of Food and Health, Academic Press, 401-406.

Shani-Levi, C., Alvito, P., Andrés, A., Assunção, R., Barberá, R., Blanquet-Diot, S., Bourlieu, C., Brodkorb, A., Cilla, A., Deglaire, A., Denis, S., Dupont, D., Heredia, A., Karakaya, S., Giosafatto, C.V.L., Mariniello, L., Martins, C., Ménard, O., El, S.N. and Vegarud, G.E. (2017). Extending in vitro digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. *Trends Food Sci Tech*, 60, 52–63.

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

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

Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.

Walle, T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*, 1215(1), 9–15.

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

van Duynhoven, J., Vaughan, E.E., Jacobs, D.M., A. Kemperman, R., van Velzen, E.J.J., Gross, G., Roger, L.C., Possemiers, S., Smilde, A.K., Dore, J., Westerhuis, J.A. and Van de Wiele, T. (2010). Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4531–4538.

Xiao, K., Xuan, L., Xu, Y., Bai, D. and Zhong, D. (2002). Constituents from *Polygonum cuspidatum*. *Chem Pharm Bull*, 50(5), 605–608.

## 8. SAŽETAK

U kreiranju funkcionalne hrane i dodataka prehrani, sve se češće koriste kompleksni biljni ekstrakti bogati polifenolima koji pokazuju širok spektar poželjnih bioloških učinaka, ponajprije antioksidativnog.

U ovom radu ispitana je antioksidativna učinkovitost i gastrointestinalna stabilnost/biodostupnost polifenola iz različitih formulacija ekstrakata sjemenki grožđa i ekstrakata japanskog dvornika. Cilj istraživanja bio je odabrati ekstrakte koji su pogodni za daljnju primjenu u kreiranju funkcionalne hrane obogaćene polifenolima. Kako bi se odredio potencijal analiziranih ekstrakata kao nutraceutika potrebno je uzeti u obzir njihovu antioksidativnu aktivnost i gastrointestinalnu stabilnost.

Antioksidativna aktivnost analiziranih uzoraka istražena je Folin-Ciocalteu (ukupni redukcijski potencijal) i TEAC metodom (antiradikalna učinkovitost). Gastrointestinalna stabilnost (biodostupnost) polifenola u analiziranim ekstraktima određena je *in vitro* statičkom simulacijom probave prema optimiranom INFOGEST protokolu.

Različite formulacije ekstrakata sjemenki grožđa bile su međusobno usporedive po vrijednostima antioksidativnog potencijala dok su se analizirani ekstrakti japanskog dvornika značajno razlikovali. Antioksidativni potencijal ekstrakta japanskog dvornika značajno je niži od antiradikalnog potencijala ekstrakta sjemenki grožđa. Polifenolni biljni ekstrakti bili su uglavnom stabilni u simuliranim uvjetima probavnog trakta te je malo smanjenje biodostupnosti polifenola primijećeno samo u jednoj formulaciji ekstrakta sjemenki grožđa.

## **SUMMARY**

Complex plant extracts rich in polyphenols are being increasingly used as bioactive ingredients in the formulation of functional food and nutritional supplements, due to the wide spectrum of their biological effects, primarily, antioxidant. .

In this paper, antioxidant activity and gastrointestinal stability of polyphenols from different formulations of grape seed extract and *Polygonum Cuspidatum* extract were investigated. The goal was to establish which extracts were suitable for the further use in designing polyphenol-enriched functional foods. To determine the potential of analysed extracts as nutraceuticals, both, their antioxidant activity and gastrointestinal stability need to be taken into account.

Antioxidant activity of analysed samples was investigated by Folin-Ciocalteu (total reduction potential) and TEAC method (antiradical efficiency). Gastrointestinal stability/bioaccessibility of polyphenols in analysed extracts was determined by in vitro static simulation of digestion according to the optimized INFOGEST protocol

Different formulations of grape seed extracts were comparable to each other in terms of antioxidant potential, while the analysed *Polygonum cuspidatum* extracts differed significantly. The antioxidant potential of the *Polygonum cuspidatum* extract was significantly lower in comparison to antiradical potential of the grape seed extract. It was determined that polyphenolic plant extracts were stable under simulated conditions of the digestive tract; the small decrease of the polyphenolic bioaccessibility was observed only in one analysed formulation of grape seed extract.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za kemiju prehrane  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## GASTROINTESTINALNA STABILNOST POLIFENOLA IZ KOMPLEKSNIH BILJNIH EKSTRAKATA

Karla Gračanin

### SAŽETAK

U kreiranju funkcionalne hrane i dodataka prehrani, sve se češće koriste kompleksni biljni ekstrakti bogati polifenolima koji pokazuju širok spektar poželjnih bioloških učinaka, ponajprije antioksidativnog.

U ovom radu ispitana je antioksidativna učinkovitost i gastrointestinalna stabilnost/biodostupnost polifenola iz različitih formulacija ekstrakata sjemenki grožđa i ekstrakata japanskog dvornika. Cilj istraživanja bio je odabrati ekstrakte koji su pogodni za daljnju primjenu u kreiranju funkcionalne hrane obogaćene polifenolima. Kako bi se odredio potencijal analiziranih ekstrakata kao nutraceutika potrebno je uzeti u obzir njihovu antioksidativnu aktivnost i gastrointestinalnu stabilnost.

Antioksidativna aktivnost analiziranih uzoraka istražena je Folin-Ciocalteu (ukupni redukcijski potencijal) i TEAC metodom (antiradikalna učinkovitost). Gastrointestinalna stabilnost (biodostupnost) polifenola u analiziranim ekstraktima određena je *in vitro* statičkom simulacijom probave prema optimiranom INFOGEST protokolu.

Različite formulacije ekstrakata sjemenki grožđa bile su međusobno usporedive po vrijednostima antioksidativnog potencijala dok su se analizirani ekstrakti japanskog dvornika značajno razlikovali. Antioksidativni potencijal ekstrakta japanskog dvornika značajno je niži od antiradikalnog potencijala ekstrakta sjemenki grožđa. Polifenolni biljni ekstrakti bili su uglavnom stabilni u simuliranim uvjetima probavnog trakta te je malo smanjenje biodostupnosti polifenola primijećeno samo u jednoj formulaciji ekstrakta sjemenki grožđa.

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

Rad sadrži: 42 stranica, 10 grafičkih prikaza, 6 tablica i 34 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Polifenoli, biodostupnost, gastrointestinalna stabilnost, kompleksni biljni ekstrakti, ekstrakt sjemenki grožđa, ekstrakt biljke *Polygonum cuspidatum*, resveratrol

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Kristina Radić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, izvanredni profesor 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 food chemistry  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

## GASTROINTESTINAL STABILITY OF POLYPHENOLS FROM COMPLEX PLANT EXTRACTS

**Karla Gračanin**

### SUMMARY

Complex plant extracts rich in polyphenols are being increasingly used as bioactive ingredients in the formulation of functional food and nutritional supplements, due to the wide spectrum of their biological effects, primarily, antioxidant.

In this paper, antioxidant activity and gastrointestinal stability of polyphenols from different formulations of grape seed extract and *Polygonum Cuspidatum* extract were investigated. The goal was to establish which extracts were suitable for the further use in designing polyphenol-enriched functional foods. To determine the potential of analysed extracts as nutraceuticals, both, their antioxidant activity and gastrointestinal stability need to be taken into account.

Antioxidant activity of analysed samples was investigated by Folin-Ciocalteu (total reduction potential) and TEAC method (antiradical efficiency). Gastrointestinal stability/bioaccessibility of polyphenols in analysed extracts was determined by in vitro static simulation of digestion according to the optimized INFOGEST protocol

Different formulations of grape seed extracts were comparable to each other in terms of antioxidant potential, while the analysed *Polygonum cuspidatum* extracts differed significantly. The antioxidant potential of the *Polygonum cuspidatum* extract was significantly lower in comparison to antiradical potential of the grape seed extract. It was determined that polyphenolic plant extracts were stable under simulated conditions of the digestive tract; the small decrease of the polyphenolic bioaccessibility was observed only in one analysed formulation of grape seed extract.

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

Thesis includes: 42 pages, 10 figures, 6 tables and 34 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Polyphenols, bioavailability, gastrointestinal stability, complex plant extracts, grape seed extract, *Polygonum cuspidatum* extract, resveratrol

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

**Kristina Radić, Ph.D.** *Postdoctoral researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2022.