# Gastrointestinalna stabilnost ekstrakata komine masline

**Antolić, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:163:077756

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**Nikolina Antolić**

# Gastrointestinalna stabilnost ekstrakata komine masline

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc Dubravki Vitali Čepo na velikoj pomoći i korisnim savjetima prilikom izrade i pisanja diplomskog rada. Također, zahvaljujem se i svim djelatnicima Zavoda za kemiju prehrane koji su mi olakšali izvođenje eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i dečku na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog studija.*

# SADRŽAJ:

1. UVOD ..... 1
1.1. Bioiskoristivost, biodostupnost i bioaktivnost ..... 1
1.2. Općenito o polifenolima ..... 2
1.2.1. Sudbina polifenola tijekom gastrointestinalne digestije ..... 3
1.2.2. Apsorpcija polifenola u enterocitima ..... 5
1.3. Bioraspoloživost polifenola masline ..... 6
1.4. Metode određivanja bioiskoristivosti i biodostupnosti ..... 7
1.4.1. *In vitro* metode određivanja biodostupnosti i bioiskoristivosti ..... 8
1.4.1.1. Metoda topljivosti ..... 9
1.4.1.2. Metoda dijalizabilnosti ..... 10
1.4.1.3. Primjena gastrointestinalnih modela ..... 10
1.4.1.4. Caco-2 stanični model ..... 12
2. OBRAZLOŽENJE TEME ..... 13
3. MATERIJALI I METODE ..... 14
3.1. Materijali ..... 14
3.1.1. Uzorci za analizu ..... 14
3.1.2. Kemikalije i pribor ..... 14
3.1.3. Instrumenti ..... 15
3.2. Metode ..... 15
3.2.1. *In vitro* gastrointestinalna digestija ..... 15
3.2.2. Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala FOLIN-CIOCALTEU metodom ..... 18
3.2.3. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom ..... 20
4. REZULTATI ..... 24
4.1. Utjecaj procesa probave na ukupni sadržaj fenola ..... 24
4.2. Utjecaj procesa probave na ABTS antioksidacijsku učinkovitost ..... 27
5. RASPRAVA ..... 30
6. ZAKLJUČCI ..... 33
7. LITERATURA ..... 34
8.SAŽETAK / SUMMARY ..... 38/39
TEMELJNA IDENTIFIKACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENATION CARD

# 1. UVOD

## 1.1. Bioiskoristivost, biodostupnost i bioaktivnost

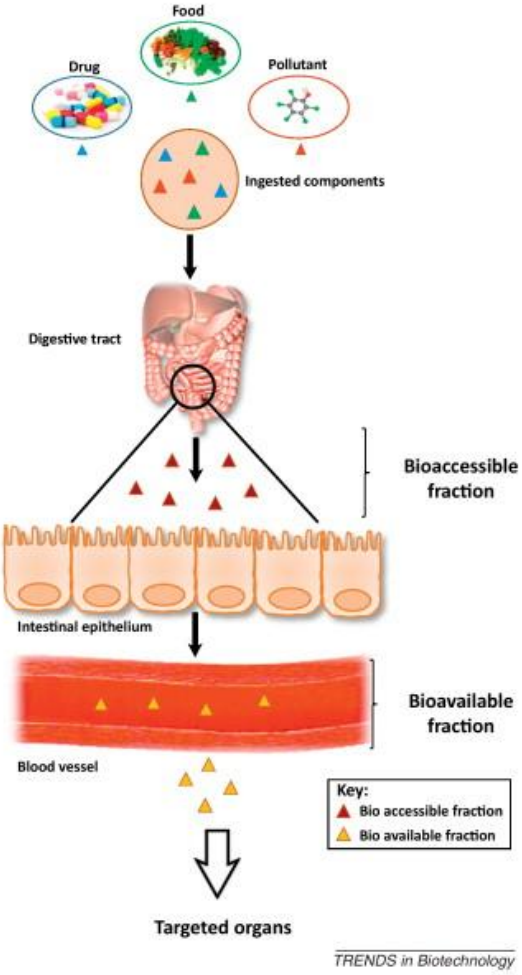
Danas su potrošači sve više svjesni važnosti pridržavanja zdravim obrascima prehrane. Tako npr. biljna prehrana bogata voćem i povrćem dokazano pokazuje brojne pozitivne učinke na zdravlje zahvaljujući visokom sadržaju vitamina i drugih bioaktivnih komponenti s antioksidativnim učinkom. Međutim, proučavanjem uloge bioaktivnih komponenti u ljudskom zdravlju, ustanovljeno je da njihova bioiskoristivost nije uvijek dobro poznata. Tijekom probave, bioaktivne komponente mogu se razgraditi, a da bi bile bioiskoristive, hranjiva komponenta se mora osloboditi iz hranjivog matriksa i apsorbirati u tankom crijevu. Stoga je važno, prije donošenja zaključka o pozitivnom učinku na zdravlje, analizirati utječe li proces probave na stabilnost bioaktivne komponente te posljedično na njezinu bioiskoristivost.

Pojam bioiskoristivosti se može definirati na više načina ovisno o istraživačkom području na koje se odnosi. S prehrambene točke gledišta, bioiskoristivost se odnosi na frakciju probavljene hranjive tvari ili bioaktivnog spoja koja je dostupna za korištenje u fiziološkim funkcijama ili pohranjivanje. Može se definirati i kao omjer hranjive tvari u određenoj hrani koje tijelo može zapravo iskoristiti (Benito i Miller, 1998). Sa farmakološke točke gledišta, FDA (američka Agencija za hranu i lijekove) definira bioiskoristivost kao brzinu i opseg u kojem se ljekovita tvar apsorbira i postaje dostupna na mjestu djelovanja lijeka. Kod definiranja bioiskoristivosti i biodostupnosti postoje mnoge nejasnoće pa se ti pojmovi često koriste kao sinonimi. Za razliku od biodostupnosti, pojam bioiskoristivosti, osim frakcije dostupne za apsorpciju, metabolizam i tkivnu distribuciju, uključuje i bioaktivnost.

Pojam biodostupnosti može se definirati kao kvantitativna frakcija koja se oslobađa iz hranjive matrice u gastrointestinalnom traktu i postaje dostupna za apsorpciju (Slika 1) (Heaney, 2001). Uključuje cijeli niz događanja koji se zbivaju tijekom probave hrane u materijal koji može biti apsorbiran u stanicama crijevnog epitela i promjene nastale tijekom presistemskog metabolizma (hepatičkog i intestinalnog).

Koncept bioaktivnosti uključuje događaje vezane uz način na koji se bioaktivni spoj transportira i dospijeva u željeno tkivo, kako ostvaruje interakciju s biomolekulama, njegov metabolizam i biotransformaciju koju pritom prolazi i fiziološki odgovor koji uzrokuje.

Bioaktivna komponenta može biti podvrgnuta raznim modifikacijama tijekom gastrične i intestinalne digestije te tijekom prvog prolaska kroz jetru. Tu činjenicu bi trebalo uzeti u obzir kod određivanja njene potencijalne koristi. Stoga studije biodostupnosti danas predstavljaju ključan faktor u razvoju funkcionalne hrane (Fernandez-Garcia i sur. 2009).




*Slika 1* Bioiskoristiva i biodostupna frakcija unijete komponente (Guerra i sur., 2012)

## 1.2. Općenito o polifenolima

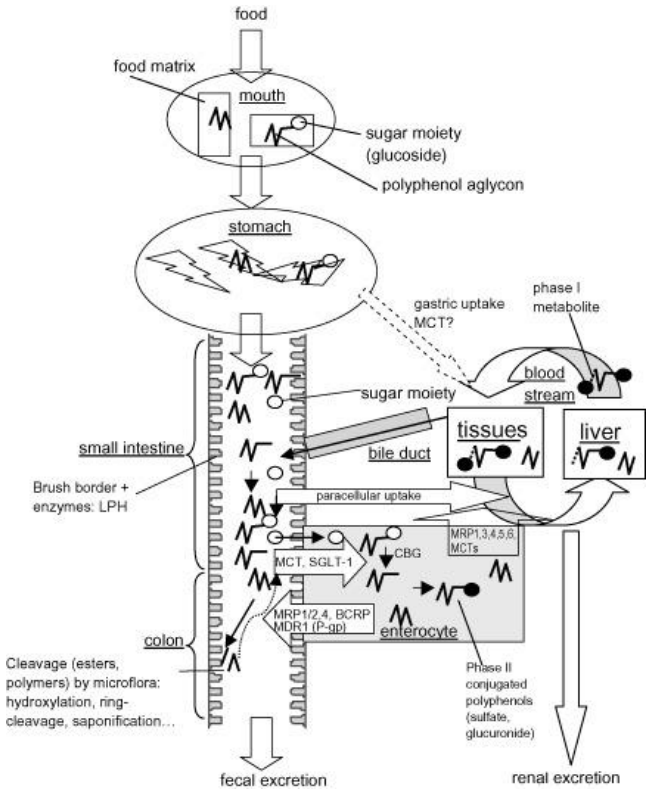
Polifenoli čine razgranatu klasu sekundarnih biljnih metabolita ili fitokemikalija koje se sintetiziraju iz zajedničkog intermedijera, šikiminske kiseline ili acetata. Primarno se dijele na flavonoide i neflavonoide. Djeluju kao antioksidansi hvatanjem reaktivnih kisikovih spojeva ili indirektno mijenjanjem genske ekspresije. Mnoga istraživanja su dokazala različite pozitivne učinke polifenola (npr. smanjuju upalne i tumorske markera te smanjuju oksidativni

stres). Smatra se da su polifenoli učinkoviti kod smanjenja incidencije nekih kroničnih bolesti npr. kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2 i nekih karcinoma (Bohn, 2014.).

### 1.2.1. Sudbina polifenola tijekom gastrointestinalne digestije

Na biodostupnost polifenola utječe nekoliko procesa koji se odvijaju tijekom probave (Slika 2):

- oslobađanje polifenola iz matriksa hrane
- promjene koje se događaju tokom probave u želucu i tankom crijevu
- apsorpcija aglikona i nekih konjugiranih polifenola u enterocitima
- mikrobiološka fermentacija neapsorbiranih polifenola ili polifenola koji se ponovno izlučuju preko žuči ili gušterače kako bi nastali dodatni metaboliti
- modifikacije koje se javljaju nakon apsorpcije u tankom i debelom crijevu djelovanjem enzima prve i druge faze metabolizma
- transport u sistemsku cirkulaciju i distribucija u tkiva
- izlučivanje putem bubrega ili ponovno izlučivanje metabolita u tanko crijevo preko žuči ili gušterače




*Slika 2* Pregled svih procesa koji utječu na bioiskoristivost polifenola (Bohn, 2014)

Polifenoli su u hrani uglavnom vezani za ugljikohidrate, organske kiseline ili jedni s drugima. Jednostavni fenoli poput benzojeve kiseline ili benzaldehida obično su kovalentno vezani za polisaharide prisutne u staničnoj stijenki biljaka te najčešće tvore estere s arabinozom iz hemiceluloze ili sa srži lignina. Antocijani i proantocijani se akumuliraju u vakuoli, dok su flavonoidi, u slobodnom obliku, prisutni u citosolu i endoplazmatskom retikulumu. Dakle, kako bi ovi polifenoli bili bioiskoristivi, potrebno je degradirati staničnu stijenku i druge stanične odjeljke te razgraditi ugljikohidrate.

Probava započinje u usnoj šupljini gdje je amilaza glavni enzim. Budući da se hrana u ustima zadržava kratko, otpuštanje polifenola iz matriksa hrane nije značajno. S druge strane, u ustima dolazi do smanjenja veličine čestica hrane i povećanja njihove površine, čime je olakšan pristup enzimima u narednim koracima probave.

Većina polifenola se otpušta tijekom gastrične faze probave. Zajedničkim djelovanjem pepsina, niskog pH i peristaltičkih pokreta nastaju fino mljevene čestice malog promjera (500 μm). Osim toga, niski pH pogoduje prisutnosti polifenola u nedisociranom obliku te oni tada, zbog smanjenja ionskih interakcija, difundiraju iz matriksa u vodenu fazu.

U tankom crijevu dolazi do postepenog povišenja pH vrijednosti s otprilike 2-4 na 7. Time se omogućuje aktivacija enzima koje izlučuje gušterača i žuč (fosfolipaze, sterol esteraze, amilaze, karboksipeptidaze, tripsinogen, kimotripsin, lipaze i žučne soli). Lipaze i žučne soli su značajne za probavu nepolarnih spojeva kao što su lipidi, nepolarni mikronutrijenti i karotenoidi, što rezultira tvorbom vodotopivih miješanih micela. Nepolarni polifenoli (npr. kurkumin) i flavonoidi s izoflavonoidnim aglikonom mogu se tako micelarizirati što smanjuje njihovu bioraspoloživost. Porast pH u tankom crijevu najviše utječe na antocijane jer dolazi do njihovog raspadanja te samo 1% frakcije prelazi u sistemsku cirkulaciju.

Većina polifenola je vezana za ugljikohidrate (80%) te je za njihovu apsorpciju u tankom crijevu bitno da se odvoje od šećerne jedinice. Reakcija se odvija katalitičkim djelovanjem enzima laktaza-florizin hidrolaze (LPH) prisutnim u sluznici tankoga crijeva. Kod viših doza polifenola moguća je prisutnost glikozida u cirkulaciji zbog zasićenja LPH. Djelovanjem esteraza u enterocitima dolazi do cijepanja estera fenolnih kiselina čime se njihova bioiskoristivost povećava i do 100 puta. Međutim, kapacitet enzima je poprilično nizak pa će većinu estera polifenola cijepati enzimi mikroflore u debelom crijevu.

U debelom crijevu posredstvom bakterija metaboliziraju se polifenoli i konjugati I i II faze metabolizma izlučeni enterohepatičkom recirkulacijom. Najčešće reakcije su deglikozilacija, dehidroksilacija, demetilacija, dekonjugacija, epimerizacija, cijepanje prstena, hidroliza ili skraćivanje postranog lanca. Mikrobiološka fermentacija smanjuje bioraspoloživost nativnih polifenola, ali povećava bioraspoloživost nastalih metabolita.

Polarni polifenoli se izlučuju većinom renalno. Postotak polifenola i njihovih konjugata izlučenih u urinu jako varira. Samo se određen broj metabolita može detektirati u urinu što može značiti da je bioiskoristivnost veća nego što se procjenjuje. Za nepolarne polifenole bilijarna ekskrecija čini glavni put izlučivanja (Bohn, 2014).

### 1.2.2. Apsorpcija polifenola u enterocitima

Neki polifenoli, npr. antocijani i njihovi glikozidi, aglikoni izoflavonoida (daidzein, genistein), flavonoli (kvercetin) i fenolne kiseline (kafeinska, klorogena, galna kiselina) se primarno apsorbiraju u želucu uslijed njihove brze postprandijalne pojave u plazmi. Međutim, većina polifenola apsorbira se u tankom crijevu.

Nakon cijepanja šećera, aglikoni polifenola mogu se prenijeti u enterocite tankog (ili debelog) crijeva procesom pasivne difuzije, olakšane difuzije ili aktivnim transportom. Pasivnom difuzijom prelaze polifenoli male molekulske mase (npr epikatehin i katehin).

Pretpostavka je da se glikozidi polifenola apsorbiraju u enterocite aktivnim transportom, natrij glukoza suprijenosnikom (SGLT1). Međutim, provedene studije nisu pokazale da je SGLT1 uključen u transport glikozida (Kottra i Daniel, 2007) te se zato pretpostavlja da glikozidi mogu, u manjoj mjeri, biti transportirani natrij glukoza suprijenosnikom u enterocite, ali se tada ponovno izlučuju u crijevo ili podliježu hidrolizi citosolnim β-glukozidazama.

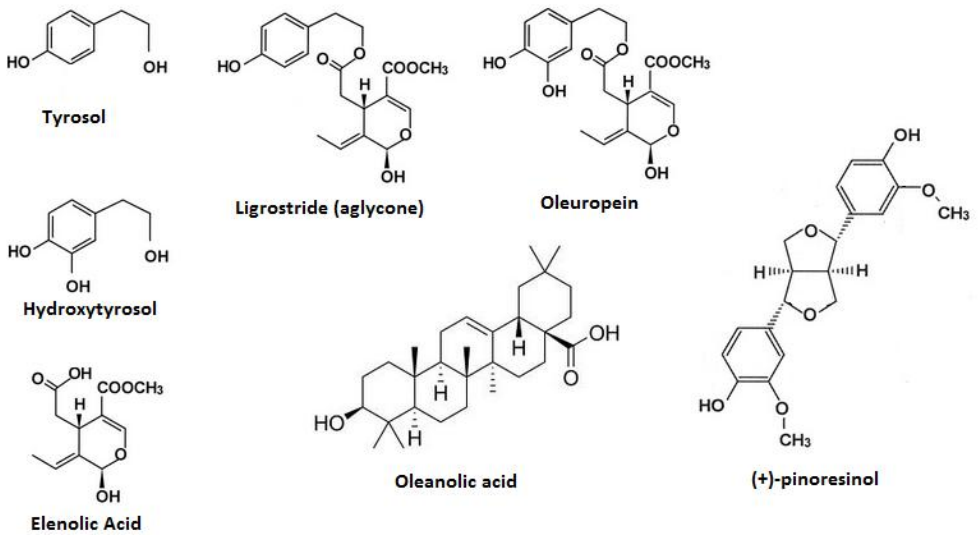
Lipofilnost također utječe na apsorpciju polifenola. Lipofilniji izoflavonoidi pokazuju veću permeabilnost (Murota i sur., 2002). Metilirani flavoni se brže apsorbiraju i sporije glukoronidiraju i sulfokonjugiraju od nemetiliranih, što je pokazatelj dobre bioraspoloživosti (Wen i Walle, 2006).

Stupanj polimerizacije utječe na unos flavonoida na taj način da se monomeri (npr. epikatehin) apsorbiraju značajno brže od dimera. Unos polimera u stanice enterocita nije moguć.

Unos polifenola je moguć i olakšanom difuzijom preko transportera monokarboksilnih kiselina (MCT). Kako bi bio prepoznat kao supstrat, polifenol mora sadržavati jednu karboksilnu kiselu skupinu i nepolarni postrani lanac ili aromatski hidrofobni dio (Bohn, 2014).

## 1.3. Bioraspoloživost polifenola masline

Maslina je bogata polifenolima od kojih su najznačajniji fenolni alkoholi (tirosol, hidroksitirosol, hidroksitirosol acetat), kompleksni fenoli (oleuropein, ligstrozid) i njihovi aglikoni (Slika 3). Aglikon oleuropeina je ester hidroksitirosola i elenoične kiseline,a aglikon ligstrozida ester tirosola i elenoične kiseline (Mosele i sur., 2014).




*Slika 3* Strukturne formule najznačajnijih polifenola masline (www.examine.com)

U uvjetima sličnim onima u želucu dolazi do neenzimatske hidrolize konjugiranih formi polifenola masline. Do raspadanja konjugata dolazi i enzimatskim djelovanjem pepsina. Kao rezutat toga dolazi do povećanja količine tirosola (3.75 puta) i hidroksitirosola (4.25 puta) u želucu tj. do povećanja njihove dostupnosti za apsorpciju u jejunumu i ileumu (Corona i sur., 2006).

Iako stabilni u kiselim uvjetima, hidroksitirosol i tirosol u velikoj se mjeri raspadaju kada bivaju izloženi uvjetima prisutnim u tankom crijevu. Neraspadnuti hidroksitirosol i tirosol procesom pasivne difuzije prelaze u enterocite i dalje u krvotok (Soler i sur., 2010)

Oleuropein se ne apsorbira u crijevu i ne raspada u kiselim uvjetima želuca. Najvjerovatnije podliježe brzoj razgradnji u debelom crijevu pod utjecajem enzima crijevne mikroflore. Jedan od tri identificirana metabolita je hidroksitirosol. Nastali hidroksitirosol se može apsorbirati u debelom crijevu čime se povećava njegova biodostupnost i omogućava postizanje većeg biološkog učinka *in vivo* (Corona i sur., 2006).

Neke studije su pokazale da polifenoli prolaze ekstenzivan metabolizam prvim prolaskom kroz jetru jer su u plazmi i urinu dominantno prisutni glukoronidi, suflokonjugati i metilirani konjugati tirosola i hidroksitirosola (De la Torre-Carbot i sur., 2007; Covas i sur., 2006).

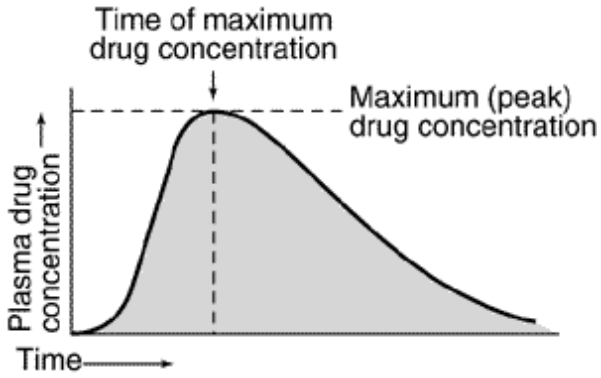
## 1.4. Metode određivanja bioiskoristivosti i biodostupnosti

Bioiskoristivost bioaktivnih komponenti hrane nije uvijek poznata. Prije nego što postane bioiskoristiva, bioaktivna komponenta mora biti oslobođena iz matriksa hrane i modificirana u gastrointestinalnom sustavu. Zato je bitno, prije donošenja zaključaka o potencijalnim učincima na zdravlje, analizirati kako proces probave utječe na stabilnost bioaktivne komponente i posljedično na njenu bioiskoristivost.

Biodostupnost se može procjeniti postupcima *in vitro* digestije; oponašanjem gastrične i intestinalne digestije nakon koje može slijediti ispitivanje permeabilnosti Caco-2 stanicama.

Bioiskoristivost, po svojoj definiciji, uključuje frakciju unijete komponente koja dostiže sistemsku cirkulaciju te se određuje *in vivo* u životinjama ili ljudima kao površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije komponente u plazmi o vremenu nakon unosa akutne ili kronične doze izolirane komponente ili komponente prisutne u hrani (Slika 4). Pokazatelj bioiskoristivosti u *in vitro* uvjetima mogu biti Caco-2 modeli (Etcheverry i sur., 2012).

Bioaktivnost predstavlja učinak koji se postiže nakon izlaganja tkiva bioaktivnoj komponenti. Nastali fiziološki odgovor može se ispitati *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro* metodama (Carbonell-Capella i sur., 2014).




*Slika 4* Ovisnost koncentracije komponente u plazmi o vremenu. Površina ispod krivulje je mjera bioiskoristivosti (www.drtedwilliams.com)

### 1.4.1. *In vitro* metode određivanja biodostupnosti i bioiskoristivosti

Za mjerenje biodostupnosti i bioiskoristivosti koriste se 4 *in vitro* metode: metoda topljivosti, metoda dijalizabilnosti, gastrointestinalni modeli (npr. TIM) i Caco-2 stanični modeli. Prednosti i nedostaci navedenih metoda prikazani su u Tablici 1.

U svakoj metodi *in vitro* digestija je provedena u dva (ponekad tri) koraka koji uključuju gastričnu i intestinalnu digestiju. Kod gastrične digestije bitno je pepsin dodati prije zakiseljavanja uzoraka na pH 2 (za oponašanje gastričnog pH odrasle osobe) ili pH 4 (za oponašanje gastrične digestije djeteta). Zakiseljavanje uzoraka na pH 2 ili 4 je nužan korak jer kod pH >5 pepsin denaturira i gubi svoju aktivnost. Prije dodatka enzima intestinalne faze digestije (pankreatin) i žučnih soli (emulgatori), uzorke je potrebno neutralizirati do pH 5.5-6 te nakon toga, podesiti pH na 6.5-7. Treći korak digestije, koji je samo ponekad uključen, prethodi gastričnoj fazi i uključuje digestiju posredstvom α-amilaze, enzima koji cijepa glikozidne veze škroba tj. amiloze i amilopektina. Jednom kad je hrana probavljena. Može se pristupiti mjerenju bioiskoristivosti metodom topljivosti, dijalizabilnosti ili gastrointestinalnim modelima (Etcheverry i sur., 2012).

*Tablica 1* Prednosti i nedostaci *in vitro* metoda mjerenja bioiskoristivosti i biodostupnosti

| ***in vitro* metoda** | **prednosti** | **nedostaci** |
|---|---|---|
| **topljivost** | ○ jednostavna<br>○ prilično jeftina<br>○ jednostavna za provođenje, svaki laboratorij posjeduje potrebnu opremu | ○ ponekad nije pouzdan indikator bioiskoristivosti<br>○ ne može procijeniti stopu unosa ili apsorpcije molekule te transportnu kinetiku<br>○ ne može izmjeriti kompetitivnost hranjivih komponenti za proces apsorpcije |
| **dijalizabilnost** | ○ jednostavna<br>○ prilično jeftina<br>○ jednostavna za provođenje, svaki laboratorij posjeduje potrebnu opremu | ○ ne može procijeniti stopu unosa ili apsorpcije molekule te transportnu kinetiku<br>○ ne može izmjeriti kompetitivnost hranjivih komponenti za proces apsorpcije |
| **GIT modeli** | ○ uključeni parametri digestije (peristaltika, vrtloženje, tjelesna temperatura...)<br>○ omogućava skupljanje uzoraka u bilo kojem koraku digestije | ○ skupi<br>○ nedovoljno studija validacije |
| **Caco-2 stanični modeli** | ○ omogućava mjerenje kompetitivnosti hranjivih komponenti za proces apsorpcije | ○ zahtjeva osoblje koje zna raditi sa staničnim modelima |

#### 1.4.1.1. Metoda topljivosti

Kod određivanja biodostupnosti metodom topljivosti potrebno je uzorak centrifugirati nakon intestinalne digestije kako bi se razdvojili precipitat i supernatant. Nutrijenti ili komponente prisutne u supernatantu predstavljaju topljivu frakciju i mogu se odrediti atomskom

apsorpcijskom spektrofotometrijom (AAS), masenom spektrometrijom, spektrofotometrijom, induktivno spregnutom plazma-atomskom emisijskom spektroskopijom (ICP-AES), tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) ili, u slučaju radioaktivne komponente, gama scintilacijskim brojačem. Postotak topljivosti se izračuna iz odnosa otopljene količine komponente i ukupne količine komponente u uzorku (Etcheverry i sur., 2012).

#### 1.4.1.2. Metoda dijalizabilnosti

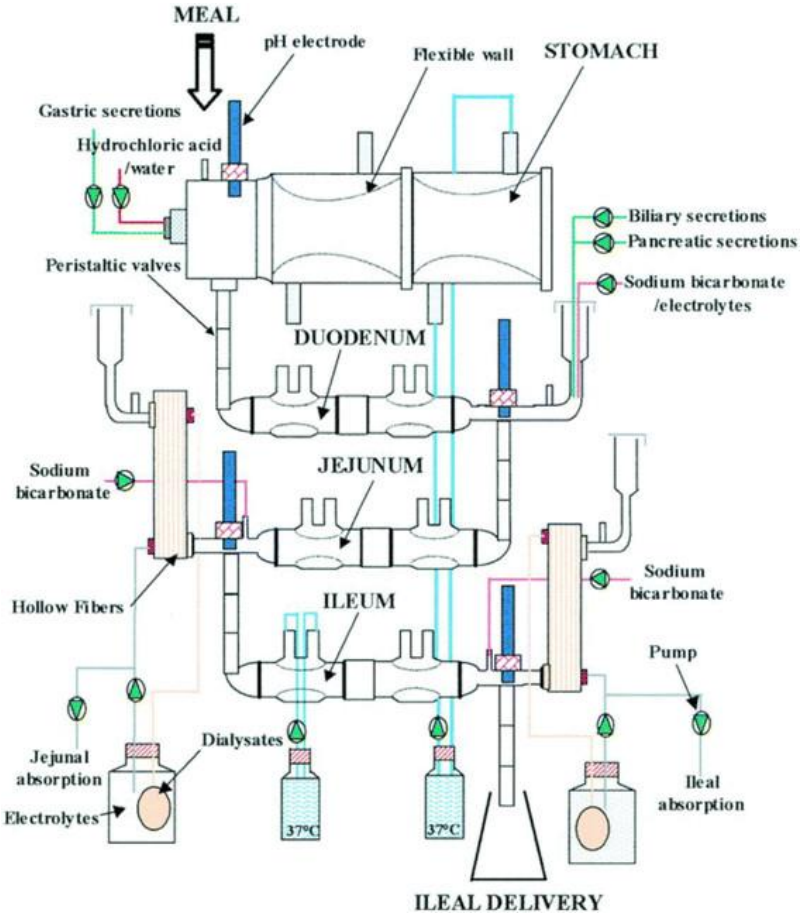
Metodu dijalizabilnosti su prvi predstavili Miller i suradnici (1981.) kako bi procijenili bioiskoristivost željeza iz hrane. Metodom se mjeri količina topljivih minerala male molekulske mase procesom dijalize do uspostave ravnoteže. Uključuje dodatak dijalizijske membrane određene molekulske mase nakon gastrične faze digestije. Membrana za dijalizu sadrži pufer, npr. natrijev hidrogenkarbonat, koji sporo difundira iz membrane i neutralizira uzorak nakon gastrične faze digestije. Nakon inkubacije dodaje se pankreatin i žučne soli te se opet inkubira. Željezo koje je difundiralo u membranu može se odrediti mjerenjem količine minerala prisutnih u dijalizatu tj. tekućini u membranama. Pretpostavka je da su sve komponente prisutne u dijalizatu bioraspoložive tj. raspoložive za apsorpciju u tankom crijevu. Ova metoda, samo ponešto modificirana, koristi se za određivanje bioraspoloživosti raznih mikronutrijenata npr. kalcija, cinka i magnezija. Kao nastavak ove metode osmišljen je dijalizijski sustav kontinuiranog tečenja pomoću sustava šupljih vlakana (Wolters i sur., 1993). Za razliku od originalne metode gdje se molekule koje prolaze membranu za dijalizu ne uklanjaju, u sustavu dijalize kontinuiranog tečenja uzima se u obzir uklanjanje komponenti koje se mogu dijalizirati što dovodi do bolje procjene bioiskoristivosti *in vivo* (Etcheverry i sur., 2012).

#### 1.4.1.3. Primjena gastrointestinalnih modela

Razvijeno je puno sofisticiranih modela koji oponašaju humani gastrointestinalni trakt. Jedan od njih je i TIM, razvijen od strane The Netherlands Organization (TNO). TIM oponaša brojne parametre ljudske probave kao što su: temperatura tijela, protok sline, želučani i gušteračini sokovi s pripadajućim enzimima, žuč, peristaltika i vrtloženje, vrijeme prolaska kroz gastrointestinalni trakt, regulacija želučanog i crijevnog pH itd. Sastoji se od dvije računalno kontrolirane komore, TIM1 i TIM2. TIM1 sadrži 4 odjeljka koji predstavljaju

želudac, duodenum, jejunum i ileum (Slika 5). Izlučivanje probavnih sokova i podešavanje pH vrijednosti u svakom odjeljku odvija se prema dostupnim fiziološkim podacima. Komponente prisutne u dijalizatu predstavljaju bioraspoloživu frakciju. Materijal koji izlazi iz modela čini neraspoloživu frakciju i koristi se za proučavanje fermentacije u debelom crijevu u TIM2 komori.

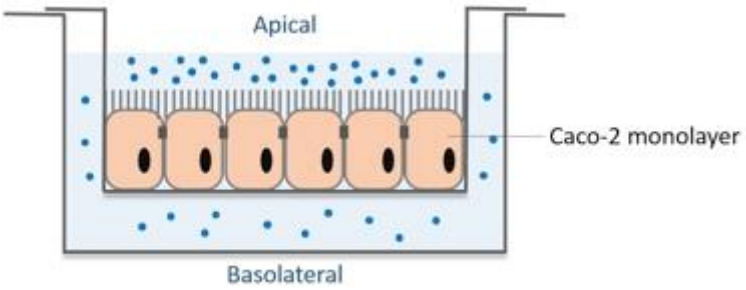
TIM2 oponaša debelo crijevo i u njemu se eksperimentalno izvodi mikrobiološka fermentacija. Frakcija iz TIM1, koja nije bioraspoloživa, inokulira se mikrobima prisutnima u debelom crijevu ljudi (Etcheverry i sur., 2012). Glavna prednost ove metode je skupljanje uzoraka na bilo kojoj razini gastrointestinalnog trakta i bilo kada tokom digestije (Etienne-Mesmin i sur., 2011).




*Slika 5* Shematski prikaz modela gastrointestinalne digestije TIM1 (Lafond i sur., 2015)

### 1.4.1.4. Caco-2 stanični model

U posljednih 20 godina Caco-2 stanični model je postao najvažniji model za istraživanje intestinalne apsorpcije i metabolizma lijekova *in vitro* u farmaceutskoj industriji i znanstvenim istraživanjima. Caco-2 stanice su stanice humanog kolorektalnog adenokarcinoma koje spontano diferenciraju tvoreći pri tom čvrsti monosloj stanica (Slika 6). 1983. Pinto i suradnici su dokazali da Caco-2 stanice diferencijacijom pokazuju neke morfološke i biokemijske karakteristike enterocita tankog crijeva (Graset i sur., 1985). Caco-2 stanice, za razliku od drugih stanica, rastu isključivo u monosloju i pokazuju cilindrično polariziranu morfologiju s mikrovilima na apikalnoj strani. Također posjeduju uske spojeve („tight junction“) između susjednih stanica i mnoge intestinalne enzime i transportere. S obzirom na prisutne enzime, sličniji su fetalnim nego odraslim enterocitima. Caco-2 stanice pokazuju bolju morfološku i funkcionalnu diferencijaciju enterocita u usporedbi s drugim staničnim linijama kolorektalnih karcinoma (Matsumoto i sur., 1990; Chantret i sur., 1988).




*Slika 6* Čvrsti monosloj Caco-2 stanica (www.creative-bioarray.com)

Ranije su Caco-2 stanične kulture pokazivale heterogenost subpopulacija čak i u stacionarnoj fazi rasta. Dokazano je da mogu mijenjati svoje funkcionalne i morfološke karakteristike ovisno o održavanju stanične kulture, klonalnom porijeklu te mnogim drugim faktorima. To dovodi do problema kod uspoređivanja rezultata između različitih laboratorija. Kako bi se osigurala homogenost i stabilnost stanične populacije, preporuča se korištenje jedne stanične linije maksimalno 10 puta.

Osim za određivanje mehanizama apsorpcije i predviđanje metabolizma lijekova, Caco-2 stanice također se mogu upotrijebiti za određivanje enzima i transportera koji su uključeni u metabolizam i prijenos ispitivanog spoja korištenjem prekomjerne ekspresije/brisanja specifičnih poznatih proteina ili adicijom/delecijom gena (Hu i Li., ured., 2011).

# 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kod prerade plodova masline nastaje velika količina komine, nusproizvoda koji se zbog ekotoksičnih učinaka posebno obrađuje prije odlaganja u okoliš. Novija istraživanja pokazuju da bi se komina, zbog visokog sadržaja polifenola, mogla iskoristiti u proizvodnji nutriceutika i prirodnih prehrambenih aditiva s antioksidativnim učinkom te kao izvor vijednih bioaktivnih spojeva.

Cilj ovog rada bio je ispitati stabilnost polifenola prisutnih u suhim ekstraktima komine masline nakon izlaganja eksperimentalnim *in vitro* uvjetima gastrične i intestinalne digestije. Osim za nativni, suhi ekstrakt, stabilnost polifenola se ispituje i za uzorke kojima su dodani ciklodekstrini kao ekscipijensi. Naime, tijekom formulacije suhog produkta formiranjem inkluzijskih kompleksa s ciklodekstrinima poboljšavaju se loša oganoleptička svojstva nativnog ekstrakta te je njihovo korištenje u izradi funkcionalnog pripravka nužno. Određivanjem antioksidativnog potencijala nakon svake faze digestije ispitano je koji je od analiziranih uzoraka najpovoljniji za dobivanje funkcionalnog ekstrakta masline. Osim gastrointestinalne stabilnosti, cilj ovog rada bio je i predvidjeti bioiskoristivost antioksidansa iz svakog ekstrakta testom dijalizabilnosti tj. dokazati koji će od njih potencijalno pokazati najveću antioksidativnu učinkovitost nakon oralne primjene što predstavlja bitan korak u daljnjem razvoju i optimizaciji postupka izrade funkcionalnog ekstrakta.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Uzorci za analizu

Uzorci za analizu su liofilizirani ekstrakti komine masline (*Olea europea sativa L. Oleaceae*). Ekstrahirani su optimiziranim postupkom ultrazvučne ekstrakcije bez ciklodekstrina te uz prisutnost različitih ciklodekstrina u različitim koncentracijama kao što je prikazano u Tablici 2.

*Tablica 2* Vrste i koncentracije ciklodekstrina korištenih u analizi

| broj uzorka | uzorak | kratica |
|---|---|---|
| 1 | nativni ekstrakt komine masline (bez ekscipijensa) | NE |
| 2 | β-CD (8 mg/mL) | B (8 mg/mL) |
| 3 | nasumično metilirani β-CD (8 mg/mL) | RAMEB (8 mg/mL) |
| 4 | nasumično metilirani β-CD (16 mg/mL) | RAMEB (16 mg/mL) |
| 5 | hidroksipropil β-CD (8 mg/mL) | HPB (8 mg/mL) |
| 6 | hidroksipropil β-CD (16 mg/mL) | HPB (16 mg/mL) |
| 7 | γ-CD (8 mg/mL) | G (8 mg/mL) |
| 8 | γ-CD (16 mg/mL) | G (16 mg/mL) |

### 3.1.2. Kemikalije i pribor

- Pepsin (iz svinjske gastrične mukoze), $\geq 500$ U $mg^{-1}$ Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Pankreatin (iz svinjskog pankreasa), 4×USP, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Žučne soli, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Natrijev klorid, p.a., Almas trade, Zagreb, Hrvatska
- Kloridna kiselina, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, p.a., Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

- Natrijev hidrogenkarbonat, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka
- Membrana za dijalizu MWCO 6-8 kDa (engl. *molecular weight cut-off*, MWCO), Spectrum Laboratories, Inc.,USA
- Filteri 0,45 μm, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Natrijev karbonat, p.a., Kemika d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu fenol reagens, Fluka, Buchs, Švicarska
- Diamino-2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiaazolin-6-sulfonska kiselina), Sigma-Aldrich, St. Luis,USA
- Kalijev persulfat, p.a., Sigma, St. Luis, USA
- Ependorf kivete
- Falcon kivete
- viale
- mikropipete

### 3.1.3. Instrumenti

- Analitička vaga, AB265-S, Metler Toledo, Indija
- Vortex miješalica, tip VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan
- UV-VIS spektrometar UV 4-100, ATI Unicam, Cambridge, Velika Britanija
- Termostat, Inko, Zagreb, Hrvatska

## 3.2. Metode

### 3.2.1. *In vitro* gastrointestinalna digestija

PRIPREMA KEMIKALIJA:

1.Priprema otopine HCl (5 mol/L)

Za pripremu 10 mL 5 M HCl potrebno je otpipetirati 423 µL koncentrirane HCl (36,5%) u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopuniti destiliranom vodom do oznake

.

2.Priprema otopine NaOH (0.5 mol/L)

Za pripremu 10 mL 0.5 M NaOH potrebno je izvagati 200 mg krutog NaOH i zatim otopiti u malo destilirane vode, preliti u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopuniti do oznake.

3. Priprema otopine $NaHCO_3$ (1 mol/L)

Za pripremu 20 mL 1 M $NaHCO_3$ potrebno je izvagati 1.68 g $NaHCO_3$ i otopiti u malo destilirane vode, preliti u odmjernu tikvicu od 20 mL te zatim nadopuniti do oznake.

PRIPREMA GASTRIČNE OTOPINE:

Za pripremu 50 ml gastrične otopine potrebno je u miliQ-$H_2O$ otopiti 53.3 mg pepsina (1.066 mg/mL) i 100.6 mg NaCl (2.012 mg/mL). Zatim se doda 150 µL koncentrirane HCl te nadopuni s miliQ-$H_2O$ do konačnog volumena od 50 mL. S NaOH (0.5 mol/L) se namjesti pH na pH 2 (početni pH je oko 1,7 i treba dodati oko 20 kapi 0.5M NaOH). Za jedan uzorak potrebno je 6.67 mL gastrične otopine po pokusu.

PRIPREMA OTOPINE PANKREATIN-ŽUČNE SOLI:

Za pripremu 10 mL otopine potrebno je u miliQ-$H_2O$ otopiti 8 mg pankreatina (0.8 mg/mL) i 42 mg žučnih soli (4.2 mg/mL). Nadopuni se s miliQ-$H_2O$ do konačnog volumena od 10 mL. Za jedan uzorak potrebno je 1416 µL otopine pankreatin-žučne soli po pokusu.

POSTUPAK:

Svaki uzorak se analizira u duplikatu. Kao slijepa proba koristi se otopina bez uzorka koja prolazi kroz sve faze gastrointestinalne digestije kao i otopina s uzorkom.

1. Gastrična (želučana) faza:

U Falcon kivetu od 15 mL odvaže se oko 500 mg nativnog ekstrakta komine (za uzorke s ciklodekstrinima potrebno je izvagati toliko uzorka da sadrže otprilike 500 mg nativnog uzorka). Na uzorak je zatim potrebno otpipetirati 6.67 mL gastrične otopine. Falcon kivete potom treba zamotati parafilmom i staviti u vodenu kupelj na inkubaciju. Gastrična inkubacija se provodi 2 sata na temperaturi od 37 °C uz protresanje reakcijske smjese (100 oscilacija po minuti). Nakon inkubacije Falcon kivete treba staviti u led. Za analizu je potrebno otpipetirati 1 mL uzorka u čaše od 5 mL te profiltrirati kroz filtere od 0.45 µm u staklene viale.

2. Intestinalna faza s dijalizom

U preostalu otopinu nakon gastrične inkubacije (5.67 mL) otpipetira se 1418 µL otopine pankreatin-žučne soli. Membrane za dijalizu se napune s 631 µL $NaHCO_3$ (1 mol/L), a zatim se urone u otopine s uzorkom. Falcon kivete je potrebno zatvoriti parafilmom te staviti u vodenu kupelj na inkubaciju. Inkubacija se provodi 2 sata na temperaturi od 37 °C uz

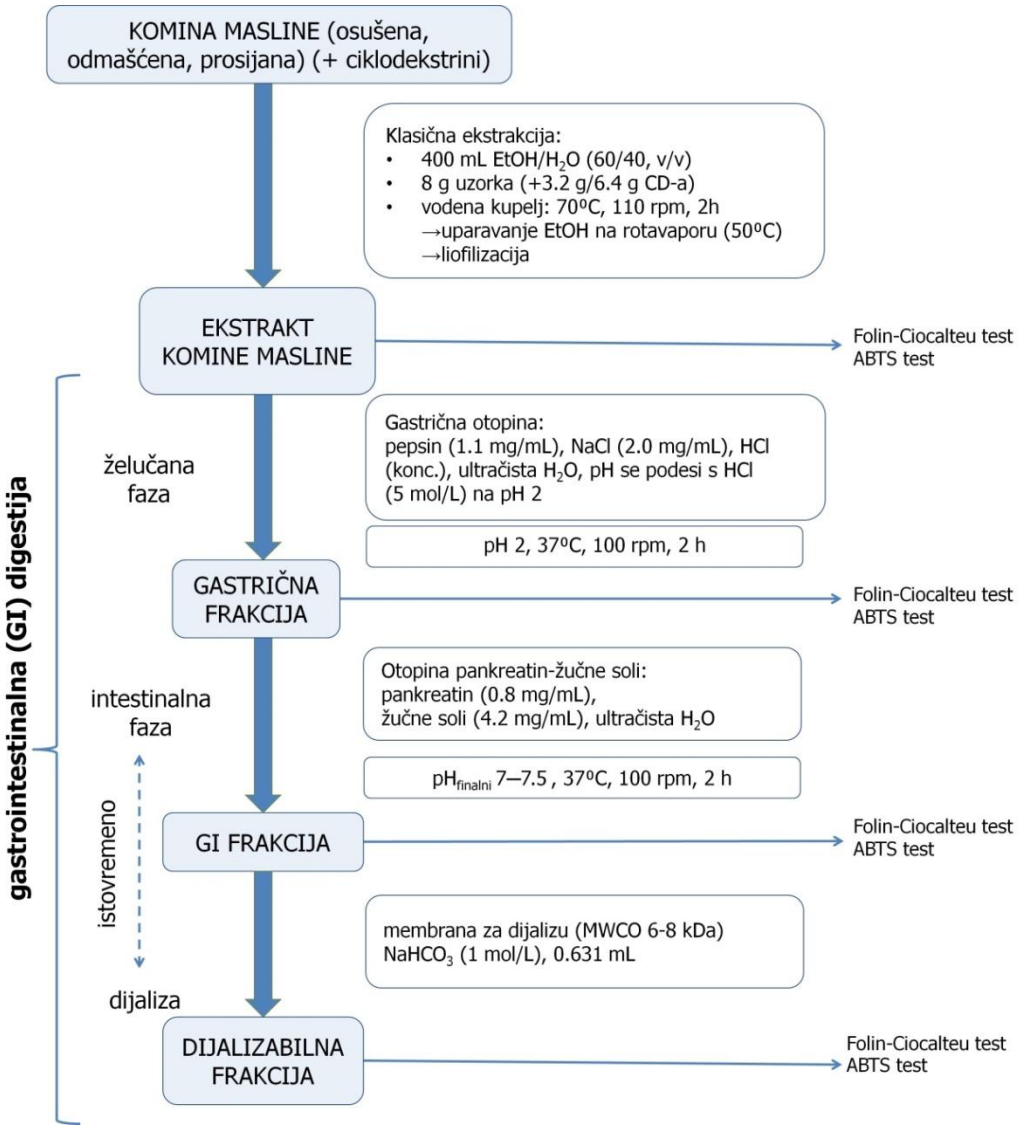
protresanje reakcijske smjese (100 oscilacija po minuti). Po završetku inkubacije Falkon kivete se stave u led.

Membrane za dijalizu se izvade iz Falkon kiveta pincetom i kratko urone u miliQ-$H_20$. Potom se vrlo kratko stave na staničevinu da se osuše te se sadržaj prelije u čaše od 5 mL (nakon što se jedan kraj membrane odreže škarama). Zatim je potrebno iz čaše špricom uzeti uzorak i profiltrirati kroz filtre pora 0.45 μm u viale.

Otopini izvan membrana se izmjeri pH, a zatim se doda 250 μL HCl (5 mol/L). Zakiseljeni uzorci se profiltriraju kroz filtre od 0.45 μm u čiste Falcon kivete od 15 mL.

Frakcije dobivene nakon gastrične i gastrointestinalne digestije te one dijalizabilne (iz membrane za dijalizu) potrebno je primjereno skladištiti u zamrzivaču. Dobivenim frakcijama određujemo antioksidativni potencijal TEAC i Folin-Ciocateu metodama.

Shema gastrointestinalnog pokusa prikazana je na slici 7.




*Slika 7* Shematski prikaz gastrointestinalnog pokusa

### 3.2.2. Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala FOLIN-CIOCALTEU metodom

Folin-Ciocalteu metoda temelji se na prijenosu elektrona s fenola i drugih redukcijskih vrsta na molibden u alkalnom mediju, stvarajući pritom plave komplekse koji se mogu detektirati spektrofotometrijski na 750-765 nm. Nastali plavi kompleksi ne ovise o strukturi fenolnih spojeva pa se odbacuje mogućnost koordinacijskih kompleksa formiranih između metala i fenolnih spojeva (Singleton i sur., 1999). Udio polifenola i ostalih reducirajućih tvari u uzorku proporcionalan je intenzitetu nastalog obojenja. Kao referentni standardni spoj, obično se koristi galna kiselina te se rezultati izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (GAE- *Gallic Acid Equivalence*).

Iako kemijska svojstva Folin-Ciocalteu reagensa nisu poznata, pretpostavlja se da sadrži smjesu fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline koja je žute boje. FC reagens nije specifičan za fenolne spojeve i može biti reduciran s mnogim ne-fenolnim spojevima (npr. aromatskim aminima, sumpornim dioksidom, askorbinskom kiselinom, bakrom, željezom) te zato nije prikladan za određivanje ukupnog sadržaja fenola, osim ako su interferirajuće vrste uzete u obzir ili uklonjene (Prior i sur., 2005; Singleton i sur., 1999). Stoga slijedi da se Folin-Ciocalteu test koristi za mjerenje ukupnog redukcijskog potencijala uzorka.

Folin-Ciocalteu metoda je ponovljiva, jednostavna za izvođenje i prikladna za procjenu antioksidacijskog kapaciteta budući da je postupak standardiziran, reagens komercijalno dostupan, a interferncije matriksa minimalne jer stvoreni kompleksi apsorbiraju na velikim valnim duljinama. Međutim, originalna metoda je dugotrajna (2h) što otežava njezinu provedbu za rutinsku analizu te nije primjenjiva za lipofilne spojeve jer se provodi u vodenoj fazi (Magalhaes i sur., 2008).

REAGENSI:

1. Standardna otopina galne kiseline

Ishodna otopina galne kiseline koncentracije 4 mg/ml ($IO_1$) izrađuje se otapanjem 400 mg galne kiseline u 10 mL etanola i nadopunjavanjem do 100 mL sa destiliranom vodom.
Ishodna otopina galne kiseline koncentracije 0.4 mg/ml ($IO_2$) izrađuje se razrjeđivanjem $IO_1$ 10 puta (10 mL razrijediti na 100 mL destiliranom vodom).

- Izrada baždarnog dijagrama

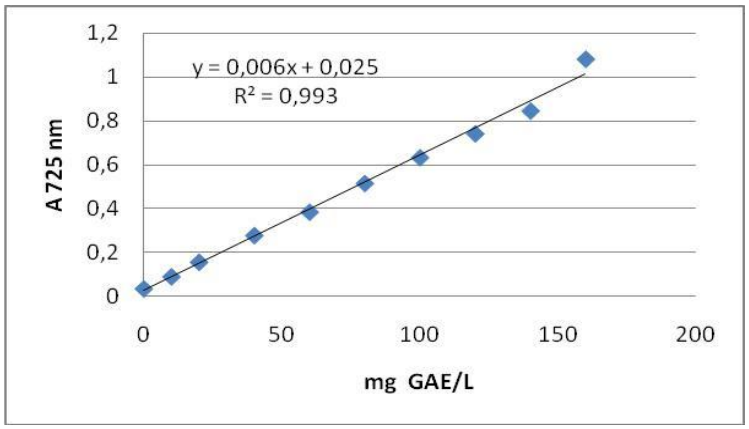
Radne otopine izrađuju se razrjeđivanjem različitih volumena ishodne otopine 2 (0.25, 0.50, 0.75, 1.25, 1.75, 2.50, 3.00, 3.75) mL destiliranom vodom na 10 mL. Od svake otopine poznate koncentracije galne kiseline pripremi se mjerna otopina (isti postupak kao i za uzorak) te se zatim mjeri apsorbancija na 725 nm. Dobivene vrijednosti koriste se za izradu baždarnog dijagrama (Slika 8).

2. Otopina $Na_2CO_3$

6 g bezvodnog $Na_2CO_3$ se otopi u 80 mL vode i prokuha. Nakon hlađenja doda se par kristala $Na_2CO_3$ i ostavi stajati 24 h. Otopina se nakon toga profiltrira kroz gusti filter papir i nadopuni u odmjernoj tikvici do 100 mL.

3. Folin-Ciocalteu reagens

Koristi se nerazrijeđeni originalni reagens.




*Slika 8* Baždarni dijagram za određivanje ukupnog redukcijskog potencijala uzorka (izraženog kao ekvivalenti galne kiseline)

POSTUPAK:

U Ependorf kivetu otpipetira se 10 µL uzorka, doda 1540 µL destilirane vode te 150 µL Folin-Ciocalteu reagensa i dobro promućka. Nakon pet minuta doda se 1.5 mL 6 % $Na_2CO_3$ i ponovno dobro promućka. Zatim se inkubira 30 minuta na 50 ºC pri čemu se razvija plava boja. Poslije hlađenja uzoraka mjeri se apsorbancija svake otopine i slijepe probe u duplikatu na 725 nm. Pomoću baždarnog dijagrama izračunaju se koncentracije polifenola i izraze kao ekvivalenti galne kiseline.

### 3.2.3. Određivanje sposobnosti vezanja radikala TEAC metodom

TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) test obuhvaća stvaranje dugoživućeg radikal kationa $ABTS^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) koji ima apsorpcijske maksimume na 414, 645, 734 i 815 nm. Temelji se na mjerenju sposobnosti antioksidansa da neutralizira $ABTS^{\cdot+}$ što rezultira smanjenjem apsorbancije reakcijske otopine i njenim obezbojenjem. Izvorni test kojeg su razvili Miller i sur. temeljio se na aktivaciji metmioglobina s vodikovim peroksidom pri čemu nastaje ferimioglobin radikal. Stvoreni radikal zatim reagira s ABTS-om što rezultira stvaranjem ABTS radikal kationa i pojavom karakterističnog plavo-zelenog obojenja (Miller i sur., 1993). Redoslijed dodavanja reagensa i

uzorka se pokazao kao glavna zamka jer antioksidansi (npr. kvercetin) mogu reagirati s $H_2O_2$ i/ili deriviranim oksidirajućim vrstama koje inhibiraju ABTS radikal kation, što vodi do viših vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta (Strube i sur., 1997). Stoga je razvijena poboljšana verzija ove metode gdje je stabilni ABTS radikal kation koji ima plavo-zeleni kromofor apsorpcije proizveden oksidacijom ABTS-a s kalijevim persulfatom prije dodavanja antioksidansa, što omogućava veću pouzdanost testa.

Ovisno o uvjetima analize provode se različiti postupci za stvaranje ABTS-a; bira se različito vrijeme reakcije, valna duljina za praćenje reakcije te referentni antioksidans. ABTS radikal kation može nastati kemijskom reakcijom koristeći manganov dioksid (Miller i sur., 1996), AAPH (Van den Berg i sur., 1999) ili kalijev persulfat (Re i sur., 1999), enzimskom reakcijom pomoću metmioglobina (Miller i sur., 1993) ili peroksidaze iz hrena (Cano i sur., 1998) te elektrokemijskim stvaranjem (Alonso i sur., 2002). U protokolima u literaturi usvojeno je vrijeme reakcije u rasponu od 1 do 30 minuta te poželjna valna duljina detekcije na 734 nm zbog minimalnih smetnji drugih apsorpcijskih komponenti na toj valnoj duljini. Kao referentni spojevi mogu se koristiti Trolox®, askorbinska kiselina, butilhidroksitoluol, rutin i galna kiselina. Najčešće se koristi Trolox® ekvivalenti te je prema tome ovaj antioksidativni test dobio i ime.

Ovaj spektrofotometrijski test je tehnički jednostavan, stoga se koristi za rutinska mjerenja. Hvatanje $ABTS^{\cdot+}$ može se procijeniti u širokom pH području pa se ovaj test može koristiti za proučavanje učinka pH na antioksidativne mehanizme. ABTS radikal je topljiv u vodi i organskim otapalima te je time omogućeno određivanje antioksidacijskog kapaciteta i hidrofilnih i lipofilnih spojeva. Međutim, ovo ispitivanje je kritizirano zato što ABTS radikal nije biološka molekula i ne nalazimo ga u biološkim sustavima. Termodinamički gledano, bilo koji spoj koji ima redoks potencijal niži od $ABTS^{\cdot+}$ može reagirati s radikalom (Magalhaes i sur., 2008).

REAGENSI:

1. ABTS stock otopina

Napravi se 7 mM otopina ABTS-a otapanjem 10 mg ABTS-a u 2.6 mL destilirane vode.

2. Otopina kalijevog persulfata ($K_2S_2O_8$)

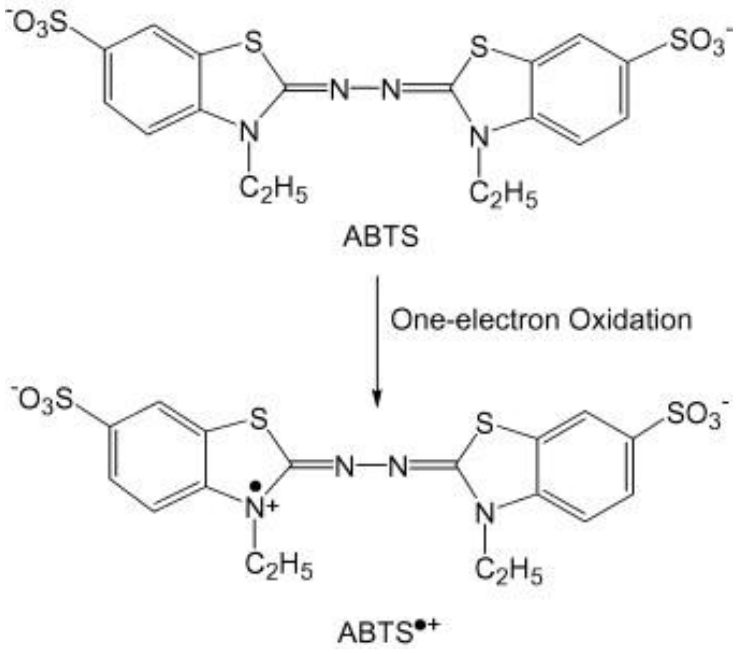
Za pripremu 2.45 mM otopine potrebno je odvagati 33.1 mg $K_2S_2O_8$ i otopiti u 50 mL destilirane vode.

3. Otopina ABTS radikala

Otopina ABTS radikala nastaje miješanjem otopine ABTS-a i kalijevog persulfata u jednakim omjerima pri čemu momentalno dolazi do stvaranja ABTS radikala što se očituje nastankom plavog-zelenog obojenja (Slika 9). Reakcija je završena tek nakon više od 6 sati. Stoga je otopinu potrebno držati 12 sati u mraku do nastanka konačnog intenziteta boje. Nakon 12 sati otopina se razrijedi tako da njena apsorbancija na 732 nm iznosi 0,700±0,02. Prema tome, 0.5 mL otopine ABTS radikala razrijedi se dodatkom 20 mL destilirane vode.

4. Trolox stock otopina

Pripremi se 20 mL stock 1 otopine koncentracije 1 mg/mL otapanjem Trolox®-a u 96% etanolu. Zatim se razrjeđivanjem pripremljene otopine 10 puta dobiva stock 2 otopina (2.5 mL razrijediti na 25 mL).




*Slika 9* Formiranje plavo-zelenog stabilnog $ABTS^{\cdot+}$ (Lee i Yoon, 2008)

POSTUPAK:

U Ependorf kivete otpipetira se 2 μL uzorka koji se potom razrijedi 50 puta destiliranom vodom (do 100 μL). Nakon toga se otpipetira 1167 μL ABTS radikala i počinje mjeriti vrijeme. Reakcijska smjesa se potom izvorteksira i prebaci u kivetu spektrofotometra pa se nakon 3 minute mjeri apsorbancija na 732 nm (A). Maksimalna apsorbancija (u vremenu t=0) određuje se tako da se u kiveti pomiješa 100 μL destilirane vode i 1167 μL ABTS radikala te se izmjeri apsorbancija nakon 2 min (A0min). Uzorci su analizirani u duplikatu. Postotak gašenja apsorbancije proporcionalan je koncentraciji antioksidansa u uzorku a računa se prema formuli:

---

**STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Postupci *in vitro* digestije provedeni su u duplikatu, a dobivene frakcije svakog digesta također su analizirane u duplikatu (n=4). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Za računanje srednje vrijednosti, standardne devijacije, relativne standardne devijacije, kao i za izradu baždarnih dijagrama korišten je programski paket Microsoft Excell.

# 4. REZULTATI

Alikvoti sakupljeni nakon gastrične (G) i gastrointestinalne (OUT) digestije te dijalizabilni sadržaj iz membrane (IN) analizirani su ABTS i Folin-Ciocalteu metodama.

Za interpretaciju rezultata potrebno je definirati ključne pojmove ( Tablica 3).

*Tablica 3.* Definiranje ključnih pojmova

| | |
|---|---|
| **frakcija prije probave (Z)** | uzorak (ekstrakt komine masline (+ ciklodekstrini)) otopljen u ultračistoj vodi; označava ukupni sadržaj polifenola/antioksidativnu aktivnost |
| **gastrična frakcija (G)** | polifenoli/antiksidansi raspoloživi nakon gastrične probave |
| **biodostupni polifenoli (OUT)** | polifenoli/antioksidansi dostupni nakon intestinalne probave; računaju se kao zbroj dijalizabilnih i nedijalizabilnih polifenola/antioksidansa (biodostupni materijal u kolonu i serumu) |
| **bioraspoloživi polifenoli (IN)** | polifenoli/antioksidansi raspoloživi za apsorpciju; polifenoli/antioksidansi koji prolaze kroz dijalizijsku membranu) |
| **neprobavljiva frakcija (OUT-IN)** | polifenoli/antioksidansi koji su prisutni u digestu nakon intestinalne probave, ali nisu raspoloživi za apsorpciju; polifenoli/antioksidansi koji ne prolaze kroz dijalizijsku membranu |
| **gastrična stabilnost** | — |
| **biodostupnost (%-tak biološki dostupnih polifenola)** | —— |
| **bioraspoloživost (%-tak dijalizabilne frakcije)** | — |
| **neprobavljiva frakcija (%-tak nedijalizabilne frakcije)** | neprobavljiva frakcija [%]= (biodostupnost [%] – dijalizabilnost [%]) |

## 4.1. Utjecaj procesa probave na ukupni sadržaj fenola

Za svaki analizirani uzorak određen je udio polifenola prema prethodno opisanoj Folin-Ciocalteu metodi u dva paralelna istraživanja. Koristeći jednadžbu pravca dobivenu iz baždarnog dijagrama s galnom kiselinom, za svaku izmjerenu apsorbanciju izračunata je koncentracija ekvivalenata galne kiseline kao mjera udjela ukupnih reducirajućih tvari (polifenola) u uzorku. Pomoću izračunatih količina polifenola u svakoj frakciji izražen je postotak biodostupnosti, bioraspoloživosti i gastrične stabilnosti polifenola te postotak neprobavljivih polifenola prema prethodno opisanom računu (Tablica 4).

*Tablica 4* Ukupni, biodostupni i bioraspoloživi polifenoli u ekstraktima komine masline

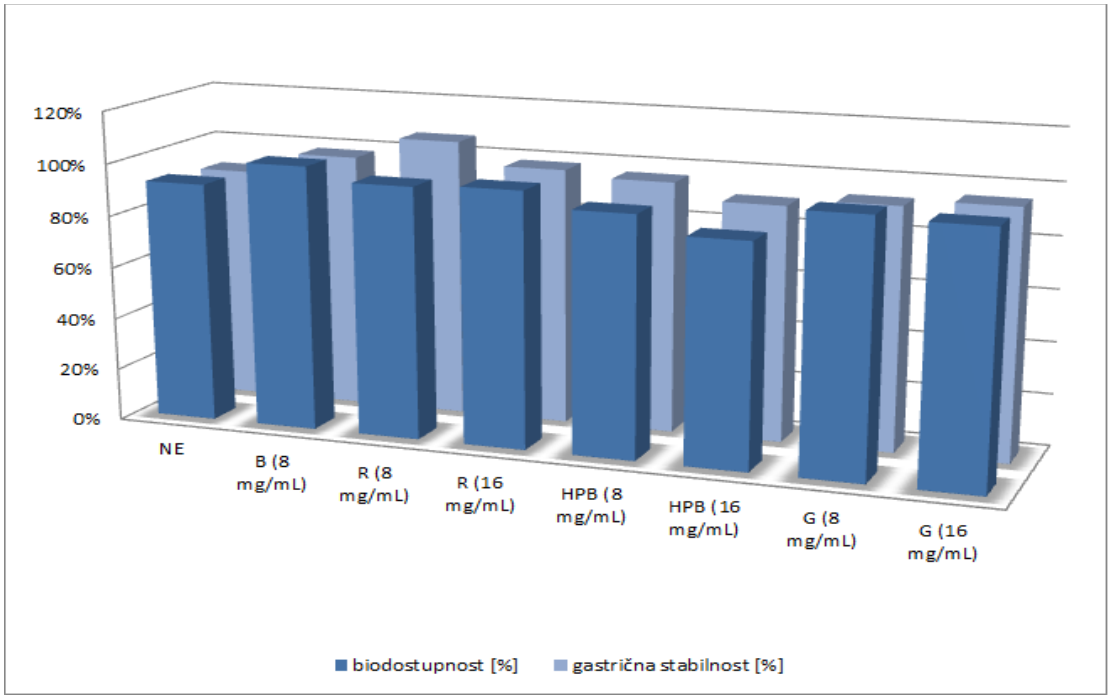
| | Z | G | OUT* | $dP_{OUT}$ | $dP_{TOT}$* | ndP | biodostupni polifenoli* | biodostupnost [%] | bioraspoloivost [%] | G [%] | ndP* [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **NE** | 40.48 | 36.42 | 35.30 | 22.40 | 24.39 | 12.97 | 37.29 | 92.10 | 60.25 | 89.96 | 32.04 |
| **B (8mg/mL)** | 42.32 | 41.55 | 41.82 | 13.18 | 14.35 | 28.62 | 42.97 | 101.54 | 33.91 | 98.18 | 67.63 |
| **RAMEB (8mg/mL)** | 43.00 | 45.85 | 38.80 | 20.17 | 21.96 | 19.54 | 41.51 | 96.52 | 51.07 | 106.63 | 45.45 |
| **RAMEB (16mg/mL)** | 45.90 | 45.15 | 43.47 | 20.15 | 21.95 | 23.56 | 44.86 | 97.73 | 47.82 | 98.35 | 51.34 |
| **HPB (8mg/mL)** | 42.07 | 40.46 | 37.62 | 11.87 | 12.93 | 25.75 | 38.68 | 91.95 | 30.74 | 96.19 | 61.21 |
| **HPB (16mg/mL)** | 44.19 | 39.83 | 36.98 | 10.56 | 11.49 | 26.13 | 37.63 | 85.15 | 26.01 | 90.14 | 59.14 |
| **G (8mg/mL)** | 39.65 | 36.80 | 37.80 | 13.92 | 15.16 | 23.42 | 38.58 | 97.31 | 38.24 | 92.83 | 59.06 |
| **G (16mg/mL)** | 47.85 | 45.58 | 44.49 | 15.50 | 16.88 | 28.47 | 45.95 | 96.02 | 35.28 | 95.25 | 59.49 |

*OUT= ndP+$dP_{OUT}$; *$dP_{TOT}$= $dP_{OUT}$+$dP_{IN}$; *biodostupni polifenoli=$dP_{TOT}$+ndP; *ndP=OUT- $dP_{OUT}$

Nakon gastrične digestije udio polifenola ili ostaje nepromjenjen ili se malo smanjuje što ukazuje na značajnu stabilnost polifenola komine masline. Prisutnost i vrsta CD u ekstraktu poboljšavaju stabilnost polifenola u uvjetima želuca obzirom da nativni ekstrakt komine masline ima najmanju gastričnu stabilnost (90%). Najveću gastričnu stabilnost pokazuje uzorak ekstrakta enkapsuliran s nasumično metiliranim β-CD (8 mg/mL), a slijede ga uzorci koji kao ekscipijens sadrže β-CD (8 mg/mL) te nasumično metilirani β-CD (16 mg/mL).

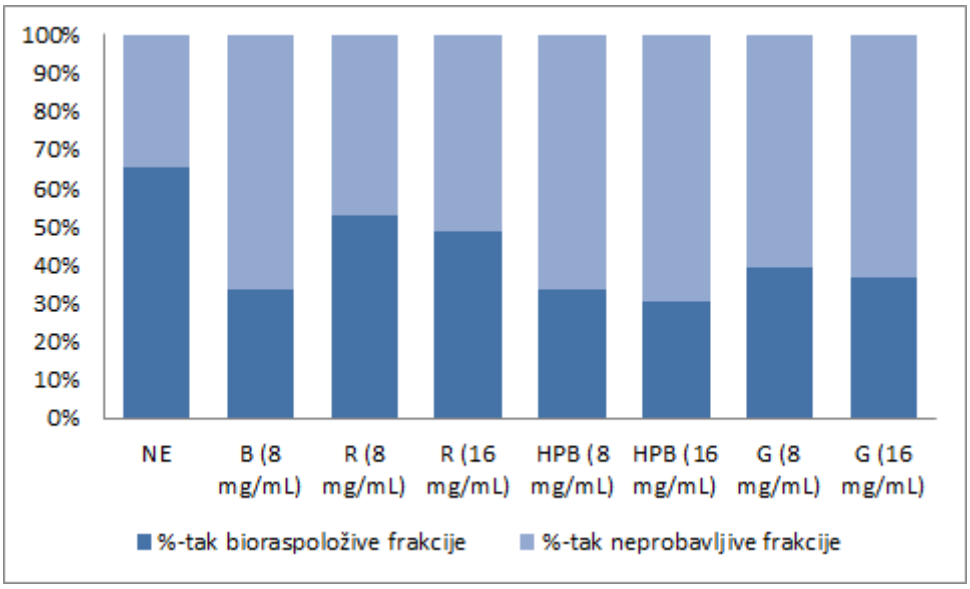
Analizom uzoraka nakon provedene gastrointestinalne digestije dobivene su vrijednosti udjela biodostupnih polifenola. Izmjereni udio polifenola je malo manji u odnosu na onaj određen nakon gastrične digestije. Iznimka su nativni uzorak i uzorak s dodanim β-CD koji pokazuju

malo više vrijednosti udjela polifenola nakon gastrointestinalne digestije. Uzorci s dodanim ciklodekstrinima (osim uzoraka s hidroksipropil β-CD) su nakon gastrointestinalne digestije pokazali veću stabilnost od nativnog uzorka. Biodostupnost polifenola u tankom crijevu je jako velika na što ukazuje najmanji izmjereni rezultat biodostupnosti od 85% što je i dalje vrlo visoka vrijednost. Najviša vrijednost izmjerena je u uzorku s β-CD (8 mg/mL), a slijede ga uzorci enkapsulirani s nasumično metiliranim β-CD (16 mg/mL) i γ-CD (8 mg/mL). Najmanju biodostupnost pokazuje uzorak s ekscipijensom hidroksipropil β-CD (16 mg/mL) (Slika 10).




*Slika 10* Grafički prikaz postotaka biodostupnosti i gastrične stabilnosti polifenola u ekstraktima komine masline

Za razliku od gastrične stabilnosti i biodostupnosti, kod određivanja bioraspoloživosti utjecaj prisutnosti ciklodekstrina u ekstraktima komine masline bio je negativan. Naime, najveća bioraspoloživost polifenola zapažena je kod nativnog ekstrakta komine masline. Od uzoraka koji koriste ciklodekstine najveća bioraspoloživost bila je u onima nasumično metiliranima β-CD-om u obje koncentracije. Najmanju bioraspoloživost polifenola pokazuje uzorak ekstrakta enkapsuliranog s hidroksipropil β-CD (Slika 11).




*Slika 11* Grafički prikaz postotaka bioraspoložive i neprobavljive frakcije polifenola u pojedinom uzorku

## 4.2. Utjecaj procesa probave na ABTS antioksidacijsku učinkovitost

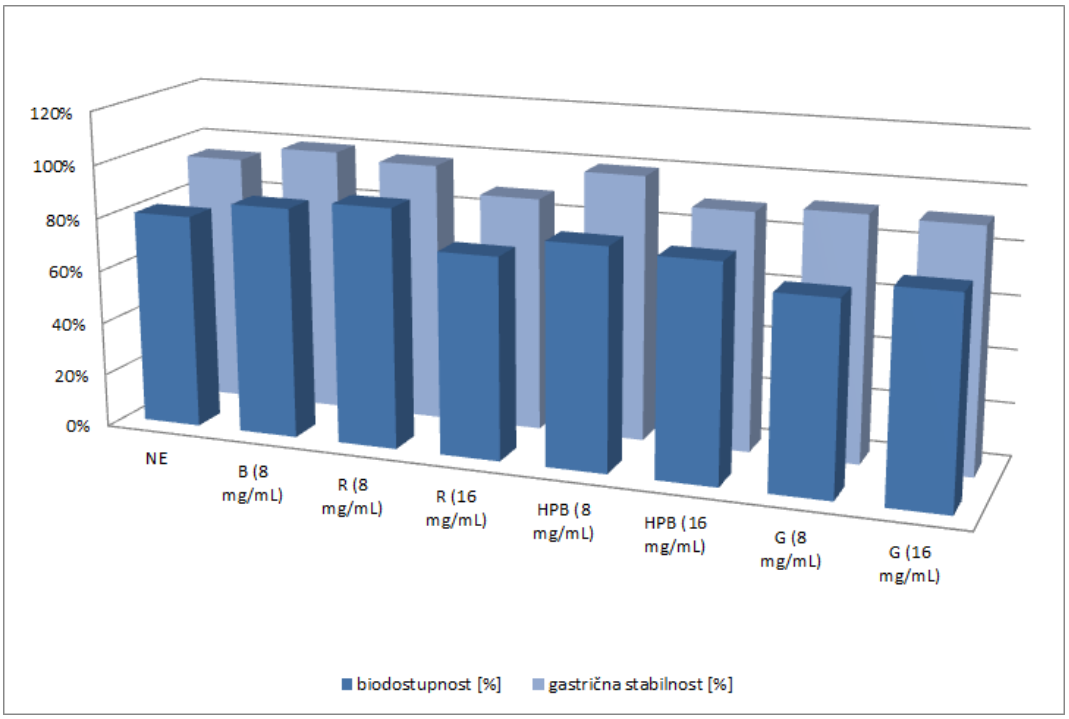
Za svaki analizirani uzorak izmjerena je apsorbancija u dva paralelna određivanja pa je, prema prethodno navedenoj formuli, izračunat postotak gašenja apsorbancije (ΔA). Iz baždarnog pravca izračunate su vrijednosti antioksidacijskog potencijala izražene kao Trolox® ekvivalenti za svaku pojedinu frakciju. Prethodno opisanim računom izrazi se postotak gastrične stabilnosti, biodostupnosti i bioraspoloživosti tvari s antioksidativnim učinkom (u ovome slučaju polifenola komine masline) te postotak neprobavljivih polifenola (Tablica 5).

*Tablica 5* Antioksidacijska aktivnost nativnog ekstrakta komine masline, gastričnog digesta te biodostupne i bioraspoložive frakcije

| | Z | G | OUT | $dP_{OUT}$ | $dP_{TOT}$ | ndP | biodostupni polifenoli | biodostupnost [%] | bioraspoloživost [%] | G [%] | ndP [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **NE** | 30.82 | 29.12 | 24.23 | 15.33 | 16.72 | 8.12 | 24.83 | 80.59 | 54.25 | 94.51 | 26.34 |
| **B (8mg/mL)** | 32.93 | 32.95 | 26.31 | 10.95 | 11.92 | 16.64 | 28.56 | 86.72 | 36.21 | 100.06 | 50.52 |
| **RAMEB (8mg/mL)** | 34.83 | 34.02 | 29.84 | 16.38 | 17.84 | 13.68 | 31.33 | 89.96 | 51.22 | 97.67 | 42.71 |
| **RAMEB (16mg/mL)** | 38.93 | 34.26 | 27.91 | 15.43 | 16.81 | 14.06 | 29.45 | 75.64 | 43.17 | 88.01 | 3611 |
| **HPB (8mg/mL)** | 31.32 | 31.17 | 24.97 | 10.06 | 10.96 | 14.31 | 25.92 | 82.76 | 34.98 | 99.51 | 45.70 |
| **HPB (16mg/mL)** | 35.12 | 31.41 | 27.79 | 9.05 | 9.86 | 18.53 | 28.39 | 80.83 | 28.07 | 89.42 | 52.76 |
| **G (8mg/mL)** | 33.52 | 30.73 | 23.45 | 11.43 | 12.45 | 11.56 | 24.01 | 71.62 | 37.14 | 91.67 | 34.48 |
| **G (16mg/mL)** | 36.47 | 33.13 | 27.56 | 12.84 | 13.98 | 14.22 | 28.21 | 77.35 | 38.34 | 90.85 | 39.00 |

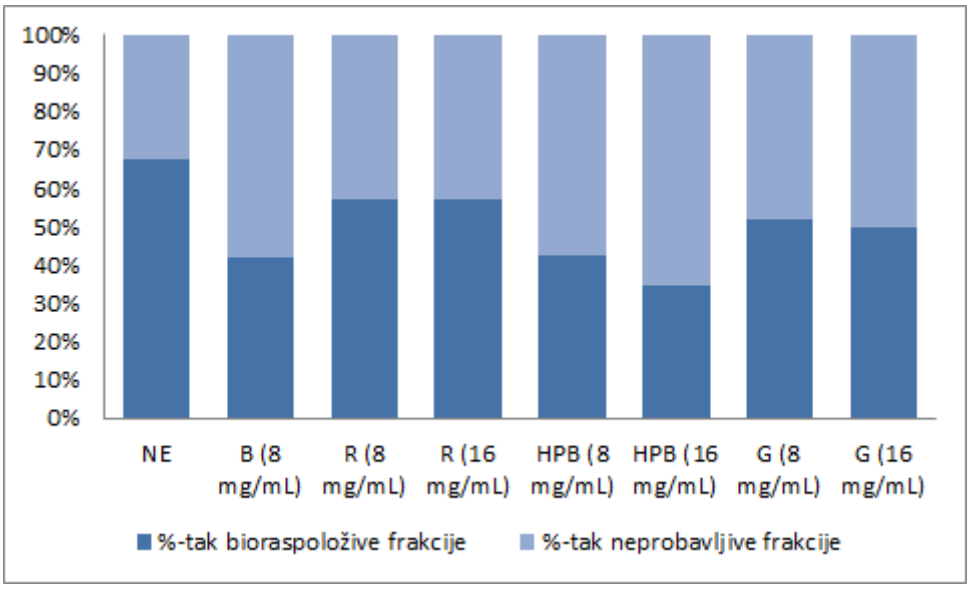
Analizom gastričnih frakcija uzoraka uvrđeno je da dodatak ciklodekstrina ne utječe ili ostvaruje pozitivan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost gastričnih digesta, ovisno o vrsti i kocentraciji pojedinog ekscipijensa. Vrijednosti za gastričnu stabilnost kretale su se od 88 do 100%. Najveća gastrična stabilnost izmjerena je u uzorku ekstrakta enkapsuliranog s β-CD (8 mg/mL), a velika je i u uzorku s dodanim hidroksipropil β-CD (8 mg/mL). Uzorak ekstrakta komine masline s dodanim nasumično metiliranim β-CD (16 mg/mL) pokazuje najmanju gastričnu stabilnost.

Sličan tome je i utjecaj ciklodekstrina na biodostupnost antioksidansa. Izmjerene vrijednosti kretale su se od 71 do 90%. Najveća biodostupnost zapažena je u uzorku ekstrakta s nasumično metiliranim β-CD (8 mg/mL), dok najmanju biodostupnost pokazuje uzorak s dodanim γ-CD (8 mg/mL) (Slika 12).




*Slika 12* Grafički prikaz postotaka biodostupnosti i gastrične stabilnosti antioksidansa iz ekstrakta komine masline

Najveću bioraspoloživost pokazuje nativni uzorak te oba uzorka enkapsulirana s nasumično metiliranim β-CD. Uzoraku s hidroksipropil β-CD kao ekscipijensom izmjerena je najmanja bioraspoloživost (Slika 13). U odnosu na nativni uzorak, udio bioraspoložive frakcije antioksidansa je u svim uzorcima s ciklodekstrinima bio manji što se podudara s rezultatima istraživanja bioraspoloživosti polifenola.




*Slika 13* Antioksidansi u bioraspoloživoj i neprobavljivoj frakciji ekstrakta komine masline

# 5. RASPRAVA

Mjerenjem količine i antioksidacijske aktivnosti oslobođenih polifenola nakon gastrične digestije dobivene su vrijednosti gastrične stabilnosti. Svi uzorci pokazuju visoke vrijednosti (od 88 do 106%). Ciklodekstrini su uglavnom pokazali pozitivan učinak na gastrointestinalnu stabilnost polifenola/antioksidansa u ekstraktima komine masline. Iz izračunatih rezultata može se uočiti da su u želucu najstabilniji uzorci s dodanim β-CD (8 mg/mL) te nasumično metiliranim β-CD (8 mg/mL). U obje primjenjene metode (Folin-Ciocalteu i ABTS) boljim su se pokazali uzorci s ciklodekstrinima dodanim u manjim koncentracijama. Može se primjetiti i da su nativnom uzorku komine masline izmjerene najniže vrijednosti ukupnih fenola tj. antioksidativne aktivnosti.

Gastrična stabilnost polifenola komine masline do danas nije istražena, barem prema našim saznanjima. Ipak, dobivene visoke vijednosti gastrične stabilnosti odgovaraju prehodno provedenim ispitivanjima stabilnosti polifenola (npr. antocijana iz crvenog zelja (McDougall i sur., 2007), polifenola iz nekoliko sorti jabuke (Bouayed i sur., 2012) ili polifenola iz kave (Campos-Vega i sur., 2015)). Kao što je ranije spomenuto, raspadanjem konjugata polifenola masline može doći do višestrukog povećanja količine hidroksitirosola i tirosola u želucu (Corona i sur., 2006). U našim istraživanjima jedino je u uzorku sa nižom koncentracijom nasumično metiliranog β-CD postotak frakcije polifenola nakon gastrične digestije bio veći od 100%. Razlog neusklađenosti rezultata je vjerojatno različita početna sirovina za istraživanje. Corona i suradnici su koristili maslinovo ulje, a u ovom slučaju koristi se komina masline koja nema isti sastav i koncentraciju polifenola kao maslinovo ulje te je i sam matriks namirnice u potpunosti drugačiji. Također, analizirani ekstrakti komine masline dobiveni su postukom ekstrakcije uz primjenu ultrazvuka i povišene temprature (t >80°C) pa se može pretpostaviti da je već i tijekom ekstrakcije dio prirodno prisutnih konjugata razgrađen pa ekstrakti sadrže veće količine aglikona od primarne sirovine (komine).

Mjerenjem ukupnog sadržaja i antioksidacijskog potencijala biološki dostupnih polifenola (bioraspoloživih i neprobavljivih) nakon gastrointestinalne digestije dobivene su vrijednosti za biodostupnost (%). Svi uzorci u obje metode pokazuju relativno visoke vrijednosti (od 71 do 101%). Kao i u slučaju gastrične stabilnosti, najniže vrijednosti su dobivene za nativni uzorak, što je barem dijelom posljedica značajnije razgradnje u uvjetima želučane probave. Protektivni učinak ciklodekstrina na želučanu razgradnju reflektira se i kroz rezultate biodostupnosti: najveće vrijednosti pokazuju uzorci s β-CD i nasumično metiliranim β-CD. U

TEAC metodi dobivene su značajno niže vrijednosti biodostupnosti u odnosu na Folin-Ciocalteu metodu. Također, dok kod određivanja ukupnog sadržaja fenola nižu vrijednost biodostupnosti pokazuju uzorci s hidroksipropil β-CD; u metodi određivanja antioksidacijskog potencijala nižu vrijednost pokazuju uzorci s γ-CD. Dakle, rezultati Folin Ciocalteu i TEAC metode pokazuju slične trendove, ali se apsolutni postoci pojedinih frakcija kao i specifični utjecaji pojedinih ciklodekstrina razlikuju. Razlog tome je vjerojatno činjenica što antiradikalnoj aktivnosti (TEAC) ekstrakata ne doprinose samo polifenoli (reducirajuće komponente uzorka) već i druge komponente (primjerice vitamini i prirodni pigmenti). Protektivni učinak ciklodekstirna se vjerojatno temelji na njihovoj sposobnosti stvaranja inkluzijskih kompleksa sa aktivnim komponentama. Različiti ciklodekstirni imaju različite karakteristike i pokazuju različite afinitete prema različitim molekulama. Stoga je i logično da se rezultati dviju metoda koje određuju dijelom različite skupove analita ne poklapaju obzirom na najučinkovitiji/najmanje učinkovit ciklodekstrin.

Jedno prijašnje istraživanje biodostupnosti polifenola u maslinovom ulju (Seiquer i sur., 2015) pokazalo je rezultate istovjetne ovom tj. visoku biodostupnost polifenola nakon gastrointestinalne digestije i veliku stabilnost na uvjete u organizmu. S obzirom da su u matriksu komine masline prisutne brojne tvari koje maslinovo ulje ne sadrži (npr. vlakna i šećeri), dobivene rezultate iz studija biodostupnosti polifenola u maslinovom ulju ne treba uspoređivati s onima u našem istraživanju.

Bioraspoloživost je određena mjerenjem ukupnog sadržaja fenola i antioksidacijske aktivnosti frakcije uzorka prisutne u dijalizijskoj membrani. Dijalizabilni polifenoli koji su, nakon gastrointestinalne digestije (OUT), procesom pasivne difuzije prošli u membranu za dijalizu (IN), predstavljaju mjeru bioraspoloživosti tj. mjereći postotak dijalizabilnosti polifenola može se predvidjeti postotak bioraspoloživosti. Ukoliko se želi proizvesti funkcionalan ekstrakt komine masline za farmaceutsku upotrebu, posebno je važno odrediti bioraspoloživost polifenola jer samo određena (bioraspoloživa) količina polifenola može biti apsorbirana u enterocitima tankog crijeva, dospijeti u krvotok i postati bioktivna tj. iskazati učinak.

Udio bioraspoložive frakcije biodostupnih polifenola u nativnom uzorku bio je 54% u TEAC metodi tj 60% u Folin-Ciocalteu metodi, dok se bioraspoloživost polifenola u uzorcima s ciklodekstrinima kretala u razmaku od 26 do 51%. Među tim uzorcima, najveći postotak bioraspoloživosti pokazuju uzorci s nasumično metiliranim β-CD u obje koncentracije, a

najmanji uzorci s hidroksipropil β-CD. Zaključuje se da je količina bioraspoloživih polifenola upola ili čak tri četvrtine manja od količine oslobođenih polifenola iz matriksa hrane u crijevima. Mogući razlog niske bioraspoloživosti je to što ciklodekstrini tvorbom inkluzijskih kompleksa s polifenolima dijelom onemogućavaju difuziju kroz dijalizijsku membranu.

U studiji ispitivanja gastrointestinalne stabilnosti polifenola prisutnim u različitim sortama jabuke (Bouayed i sur., 2011), kao i u ovom slučaju, zabilježena je bioraspoloživost od oko 50% u odnosu na biodostupan sadržaj u crijevima. Kao mogući razlozi tako niskoj vrijednosti (a isti se mogu primjeniti i na naš pokus) navode se korištenje statičkog, a ne dinamičkog probavnog sustava u pokusu i vrijeme dijalize.

Zaključno, polifenoli komine masline pokazali su veliku gastričnu i gastrointestinalnu stabilnost. Dodatkom različitih vrsta i koncentracija ciklodekstrina izmjerene vrijednosti nisu se značajnije promijenile ili su malo porasle. Unatoč visokoj biodostupnosti oslobođenih polifenola nakon gastrointestinalne digestije, vrijednosti bioraspoloživosti pokazale su se dosta niske. Uzorcima s ciklodekstrinima izmjerena je niža bioraspoloživost nego nativnom uzorku. Međutim, nativni uzorak se zbog loših organoleptičkih svojstava ne može koristiti za izradu funkcionalnog ekstrakta komine masline. Budući da su ciklodekstrini kao ekscipijensi nužni, cilj je izabrati najpogodniji tj. onaj s najmanje izraženim negativnim svojstvima. U našem slučaju najprihvatljivijim se pokazao uzorak s nasumično metiliranim β-CD (8 mg/mL). Iznimno je stabilan u uvjetima sličnim onima u želucu i tankom crijevu te je pokazao bioraspoloživost od svih prisutnih uzoraka.

Istraživanja o polifenolima komine masline kao i ispitivanja njihove *in vitro* gastrointestinalne digestije su, nažalost, rijetka. S obzirom da je komina kao sirovina lako dostupna i bogata polifenolima, trebalo bi se više pažnje posvetiti istraživanju njenog antioksidacijskog potencijala. Za početak, potrebno je potvrditi dobivene rezultate na Caco-2 staničnoj kulturi i animalom modelu.

# 6. ZAKLJUČCI

- Antioksidansi i polifenoli u komini masline pokazali su relativno visoku gastričnu stabilnost (od 88 do 106%) i biodostupnost ( od 71 do 101%).
- Prisutnost ciklodekstrina u ekstraktima uglavnom povećava gastričnu stabilnost i biodostupnost antioksidansa i polifenolnih komponenti.
- Udio dijalizabilne (bioraspoložive) frakcije polifenola/antioksidansa relativno je nizak te se kreće od 26 do 60% za polifenole i od 28 do 54% za antioksidanse.
- Prisutnost ciklodekstrina u uzorku rezultirao je smanjenjem bioraspoloživosti polifenola/antioksidansa u odnosu na nativni uzorak.
- Među uzorcima s ciklodekstrinima najveću bioraspoloživost pokazao je uzorak ekstrakta komine masline enkapsuliran s nasumično metiliranim β-CD u obje koncentracije (8 i 16 mg/mL). Najmanja bioraspoloživost izmjerena je za uzorke ekstrakta komine masline enkapsulirane s hidroksipropil β-CD (HPB u obje koncentracije: 8 i 16 mg/mL).
- Uzevši u obzir gastričnu i gastrointestinalnu stabilnost te bioraspoloživost, najbolja svojstva među istraživanim uzorcima pokazao je uzorak ekstrakta komine masline enkapsuliran s nasumično metiliranim β-CD.
- Ovo je prvo istraživanje *in vitro* gastrointestinalne stabilnosti, biodostupnosti i bioraspoloživosti polifenola iz ekstrakata komine masline te utjecaja inkapsulacije na promatrane parametre.

# 7. LITERATURA

Alonso AM, Dominguez C, Guillen DA, Barroso CG. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem,* 2002, 35, 3112-3115.

Benito P, Miller D. Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutr Res*, 1998, 18, 581-603.

Bohn T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr Res*, 2014, 72, 429-452.

Bouayed J, Deußer H, Hoffmann L, Bohn T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chem,* 2012, 131, 1466-1472.

Caco-2 Permeabillity Assay, 2004., https://www.creative-bioarray.com/Services/caco-2-permeability-assay.htm, pristupljeno 15.02.2018.

Campos-Vega R, Vazquez-Sanchez K, Lopez-Barrera D, Loarca-Pina G, Mendoza-Diaz S, Oomah BD. Simulated gastro-intestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility nd intestinal permeabillity. *Food Res Int*, 2015, 77, 156-161.

Cano A, Hernandez-Ruiz J, Garcia-Canovas F, Acosta M, Arnao MB. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem Anal*, 1998, 9, 196-202.

Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frigola A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf,* 2014, 13, 155-171.

Chantret I, Trugnan G, Dussaulx E, Zweibaum A, Rousset M. Monensin inhibits the expression of sucrase-isomaltaze in Caco-2 cells at the mRNA level. *FEBS Lett*, 1988, 235, 125-128.

Corona G, Tzounis X, Assunta Dessi M, Deiana M, Debnam ES, Visioli F, Spencer JPE. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: Implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic Res*, 2006, 40, 647-658.

Covas MI, Ruiz-Gutierrez V, De La Torre R, Kafatos A, Lamuela-Raventos RM, Osada J. Minor components of olive oil: Evidence to date of health benefits in humans. *Nutr Res,* 2006, 64, 520-530.

De La Torre-Carbot K, Chavez-Servin JL, Jauregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, Fito M. Presense of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: Determination by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2007, 583, 402-410.

Etcheverry P, Grusak MA, Fleige LE. Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins $B_6$, $B_{12}$, D, and E. *Front Physiol,* 2012, 3, 1-22.

Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Privat M, Denis S, Cardot JM, Alric M, Blanquet-Diot S. Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157, H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77, 1127-1131.

Fernandez-Garcia E, Carvajal-Lerida I, Perez-Galvez A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr Res,* 2009, 29, 751-760.

Grasset E, Bernabeu J, Pinto M. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: effect of secretagogues. *Am J Physiol*, 1985, 248, 410-418.

Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol*, 2012, 30, 591-600.

Heaney RP. Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. *J Nutr*, 2001, 131, 1344-1348.

Hu M, Li X. Oral bioavailability: Basic Principles, Advanced Concepts, and Applications. U: Caco-2 cell culture model for oral drug absorption. Kulkarni K, Hu M, urednici, New York, John Wiley & Sons, 2011, str. 431-442.

Kottra G, Daniel H. Flavonoid glycosides are not transported by the human $Na^+$/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322, 829-835.

Lafond M, Bouza B, Eyrichine S, Rouffineau F, Saulnier L, Giardina T, Bonnin E, Preynat A. *In vitro* gastrointestinal digestion study of two wheat cultivars and evaluation of xylanase supplementation. *J Anim Sci Biotechnol*, 2015, 6, 1-14.

Lee C, Yoon J. UV direct photolysis of 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism. *J Photochem Photobil A*, 2008, 197, 232-238.

Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JFLC. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta*, 2008, 613, 1-19.

Matsumoto H, Erickson RH, Gum JR, Yoshioka M, Gum J, Kim YS. Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology*, 1990, 98, 1199-1207.

McDougall G, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red cabbage-stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 2007, 68, 1285-1294.

Miller DD, Schricker B, Rasmussen RR, Van Campen D. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr*, 1981, 34, 2248-2256.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, 1993, 84, 407-412.

Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*, 1996, 384, 240-242.

Mosele JI, Martin-Pelaez S, Macia A, Farras M, Valls RM, Catalan U, Motilva MJ. Faecal microbial metabolism of olive oil phenolic compounds: *in vitro* and *in vivo* approaches. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58, 1809-1819.

Murota K, Shimizu S, Miyamoto S, Izumi T, Obata A, Kikuchi M, Terao J. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J Nutr*, 2002, 132, 1956-1961.

Olive leaf extract, 2014., https://examine.com/supplements/olive-leaf-extract, pristupljeno 10.02.2018.

Plasma Concentration Time Curve, 2006., http://drtedwilliams.net/kb/index.php?pagename=Plasma%20Concentration%20Time%20Curve, pristupljeno 15.02.2018.

Prior RL, Wu XL, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Agric Food Chem*, 2005, 53, 4290-4302.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26, 1231-1237.

Seiqer I, Rueda A, Olalla M, Cabrera-Vique C. Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chem*, 2015, 188, 496-503.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 1999, 299, 152-178.

Soler A, Romero MP, Macia A, Saha S, Furniss CSM, Kroon PA, Motilva MJ. Digestion stability and evaluation of the metbolism and transpor of olive oil phenols in the human small-intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line. *Food Chem*, 2010, 119, 703-714.

Strube M, Haenen GRMM, Van den Berg H, Bast A. Pitfalls in a method for assessment off total antioxidant capacity. *Free Radic Res*, 1997, 26, 515-521.

Van den Berg R, Haenen GRIMM, Van den Bergh H, Bast A. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem*, 1999, 66, 511-517.

Wen X, Walle T. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34, 1786-1792.

Wolters MG, Schreuder HA, van der Heuvel G, van Lonkhuijsen HJ, Hermus RJ, Voragen AG. A continuous *in vitro* method for estimation of the bioavailability of minerals and trace elements in foods: application to breads varying in phytic acid content. *Br J Nutr*, 1993, 69, 849-861.

# 8. SAŽETAK

Komina masline je nusprodukt koji u velikim količinama zaostaje nakon proizvodnje maslinovog ulja. Bogata je polifenolima, spojevima poznatima po antioksidacijskom djelovanju. U ovom radu cilj je bio ispitati stabilnost polifenola nakon izlaganja eksperimentalnim *in vitro* uvjetima gastrične i intestinalne digestije. Osim nativnog uzorka, gastrointestinalna stabilnost je ispitana i za uzorke enkapsulirane s različitim vrstama i koncentracijama ciklodekstrina, koji se dodaju zbog loših organoleptičkih svojstava nativnog uzorka. Metodom dijalizabilnosti je zatim određena količina biorasspoložive frakcije polifenola u pojedinom uzorku. Nakon analize dobivene su vrijednosti ukupne količine biodostupnih i bioraspoloživih polifenola (Folin-Ciocalteu) te antioksidacijska aktivnost gastričnog digesta, biodostupne i bioraspoložive frakcije za svaki uzorak (TEAC). Uzorci s ciklodekstrinima pokazuju nešto više vrijednosti gastrične stabilnosti te biodostupnosti antioksidansa i fenolnih komponenti. Prisutnost ciklodekstrina rezultira smanjenjem dijalizabilnosti polifenola i antioksidansa tj. smanjenjem količine bioraspoložive frakcije i potencijalno manjem biološkom učinku *in vivo.* Uzevši u obzir sve promatrane parametre, najbolja svojstva pokazuje uzorak ekstrakta komine masline enkapsuliran s nasumično metiliranim β-CD. Za daljnje zaključivanje potrebno je ispitati antioksidacijsku učinkovitost na Caco-2 staničnoj kulturi ili *in vivo*.

# SUMMARY

Olive pomace is a by-product that remains in large amounts after olive oil production. It is rich in polyphenols, compounds known to have antioxidant activity. In this research, the aim was to examine the stability of polyphenols after exposure to experimental *in vitro* conditions simulating gastric and intestinal digestion. Apart from the native sample, stability was also tested for samples encapsulated with different types and concentrations of cyclodextrins, which were used in extract formulation due to poor organoleptic properties of the native sample. The amount of bioavailable polyphenols in a single sample was determined by the method of dialyzability. After the analysis, values of the total amount of bioavailable and bioaccessible polyphenols (Folin-Ciocalteu) and the antioxidant activity of gastric digest, bioavailable and bioaccesible fractions for each sample (TEAC) were obtained. Samples with cyclodextrins show a slightly higher gastric stability and bioavailability of antioxidants and phenolic compounds. The presence of cyclodextrin results in a reduction of the dialysability of polyphenols and antioxidants, i.e. by reducing the amount of bioaccessible fraction and potentially lower bioactivity in vivo. Taking into account all observed parameters, the best properties are seen in the sample of olive pomace extract encapsulated with randomly methylated β-CD. For making further conclusions, it is necessary to examine the antioxidant efficacy in Caco-2 cell model and *in vivo*.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

# GASTROINTESTINALNA STABILNOST EKSTRAKATA KOMINE MASLINE

**Nikolina Antolić**

## SAŽETAK

Komina masline je nusprodukt koji u velikim količinama zaostaje nakon proizvodnje maslinovog ulja. Bogata je polifenolima, spojevima poznatima po antioksidacijskom djelovanju. U ovom radu cilj je bio ispitati stabilnost polifenola nakon izlaganja eksperimentalnim in vitro uvjetima gastrične i intestinalne digestije. Osim nativnog uzorka, gastrointestinalna stabilnost je ispitana i za uzorke enkapsulirane s različitim vrstama i koncentracijama ciklodekstrina, koji se dodaju zbog loših organoleptičkih svojstava nativnog uzorka. Metodom dijalizabilnosti je zatim određena količina biorasspoložive frakcije polifenola u pojedinom uzorku. Nakon analize dobivene su vrijednosti ukupne količine biodostupnih i bioraspoloživih polifenola (Folin-Ciocalteu) te antioksidacijska aktivnost gastričnog digesta, biodostupne i bioraspoložive frakcije za svaki uzorak (TEAC). Uzorci s ciklodekstrinima pokazuju nešto više vrijednosti gastrične stabilnosti te biodostupnosti antioksidansa i fenolnih komponenti. Prisutnost ciklodekstrina rezultira smanjenjem dijalizabilnosti polifenola i antioksidansa tj. smanjenjem količine bioraspoložive frakcije i potencijalno manjem biološkom učinku in vivo. Uzevši u obzir sve promatrane parametre, najbolja svojstva pokazuje uzorak ekstrakta komine masline enkapsuliran s nasumično metiliranim β-CD. Za daljnje zaključivanje potrebno je ispitati antioksidacijsku učinkovitost na Caco-2 staničnoj kulturi ili *in vivo.*

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

Rad sadrži: 39 stranica, 13 grafičkih prikaza, 5 tablica i 41 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: komina masline, gastrointestinalna stabilnost, biodostupnost, bioraspoloživost

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
**Dr. sc. Mario Jug**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
**Dr. sc. Lovorka Vujić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of nutritional chemistry
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

# GASTROINTESTINAL STABILITY OF OLIVE POMACE EXTRACTS

**Nikolina Antolić**

## SUMMARY

Olive pomace is a by-product that remains in large amounts after olive oil production. It is rich in polyphenols, compounds known to have antioxidant activity. In this research, the aim was to examine the stability of polyphenols after exposure to experimental in vitro conditions simulating gastric and intestinal digestion. Apart from the native sample, stability was also tested for samples encapsulated with different types and concentrations of cyclodextrins, which were used in extract formulation due to poor organoleptic properties of the native sample. The amount of bioavailable polyphenols in a single sample was determined by the method of dialyzability. After the analysis, values of the total amount of bioavailable and bioaccessible polyphenols (Folin-Ciocalteu) and the antioxidant activity of gastric digest, bioavailable and bioaccesible fractions for each sample (TEAC) were obtained. Samples with cyclodextrins show a slightly higher gastric stability and bioavailability of antioxidants and phenolic compounds. The presence of cyclodextrin results in a reduction of the dialysability of polyphenols and antioxidants, i.e. by reducing the amount of bioaccessible fraction and potentially lower bioactivity in vivo. Taking into account all observed parameters, the best properties are seen in the sample of olive pomace extract encapsulated with randomly methylated β-CD. For making further conclusions, it is necessary to examine the antioxidant efficacy in Caco-2 cell model and *in vivo*.

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

Thesis includes: 39 pages, 13 figures, 5 tables and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive pomace, gastrointestinal stability, bioavailability, bioaccessibility

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

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
**Mario Jug**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
**Lovorka Vujić**, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April, 2018.