Nove tehnologije za stabilizaciju polifenila u dodacima prehrani

Ličanin, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:456247

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Lucija Ličanin

PRIMJENA TEHNIKA INKAPSULACIJE U STABILIZACIJI POLIFENOLA U DODACIMA PREHRANI

Diplomski rad

Akademska godina:
2015./16.

Mentor:
Tea Bilušić, prof. dr. sc.

Split, rujan 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Dijetetika
Tema rada je prihvaćena na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

Mentor: prof. dr. sc. Tea Bilušić

Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Tea Bilušić

NOVE TEHNOLOGIJE ZA STABILIZACIJU POLIFENOLA U DODACIMA PREHRANI

Lucija Ličanin, 26

Sažetak: Polifenoli su široko rasprostranjeni sekundarni biljni metaboliti. Pokazuju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje zbog kojih pobuđuju veliki interes prehrambene i farmaceutske industrije. Dodaci prehrani temeljeni na prisutnosti polifenola obuhvaćaju široko tržište. Razvoj takvih pripravaka funkcionalno je delikatan. Razlog tomu je velika osjetljivost polifenola na okolišne faktore te na uvjete probavnog sustava čovjeka. Tehnike inkapsulacije pomažu povećanju stabilnosti polifenola. Postoje brojne metode inkapsulacije koje se dijele na fizikalne, fizikalno-kemijske i kemijske. Sušenje raspršivanjem (*„spray drying")* fizikalna je metoda koja je ujedno i najviše primjenjivana. Sastoji se od nekoliko koraka od kojih atomizacija predstavlja najkritičniji. Atomizacija potpomognuta superkritičnim fluidom je još jedna fizikalna metoda. Ona koristi posebna svojstva koja karakteriziraju superkritični fluid. Liposomi predstavljaju sferične sustave koji se i endogeno sintetiziraju u organizmu, industrijski se pripremaju fizikalno-kemijskim metodama od kojih je hidratacija tankih fosfolipidnih dvosloja učestala. Evaporacija reverzne faze predstavlja drugu metodu pripreme liposoma. Kompleksna koacervacija predstavlja kemijsku metodu inkapsuliranja u kojoj dolazi do udruživanja suprotno nabijenih iona oko ciljane tvari. Polimerizacija na granici faza je još jedna kemijska metoda inkapsuliranja. Karakterizira ju nastanak polimera na granici kapljica ili čestica otopljene tvari. Premda su inkapsuliranjem nadvladani brojni problemi vezani uz primjenu polifenola, otvorena su nova područja za unaprjeđenje tehnike. Ovaj rad je narativni pregled literature.

Ključne riječi: polifenoli, dodaci prehrani, inkapsulacija

Rad sadrži: 47 stranica, 6 slika, 49 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. **Izv. prof.dr.sc. Maja Valić – predsjednik**
2. **Doc.dr.sc. Lea Kukoč Modun – član**
3. **Prof.dr.sc.Tea Bilušić**

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Nutrition

Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session and Faculty Council of School of Medicine, session no.

Mentor: PhD, Full professor Tea Bilušić
Technical assistence: PhD, Full professor Tea Bilušić

NEW TECHNOLOGIES FOR APPROVING STABILITY OF POLYPHENOLS IN FOOD SUPPLEMENTS

Lucija Ličanin, 26

Summary: Polyphenols are widespread secondary plant metabolites. They show numerous biological impacts on human health. Due to mentioned benefits, there is a huge interest for developing nutritional supplements containing polyphenols. However, the development of such kind of the pharmaceutical products has many practical problems. The reason for that is a great polyphenol instability under various environmental factors (temperature, pH, light, metal ions..). Those deficiencies can be overcomed by incapsulation technologies. There are many incapsulation methods which are grouped into physical, physico-chemical and chemical groups. *Spray drying* is mostly applied physical method of incapsulation. *Supercritical-assisted atomisation* is also physical method of incapsulation, which uses special properties characteristic to critical fluid. *Liposomes* represent spherical system endogenously synthesized in organism also, industrially prepared by physico-chemical methods such as hydration of thin phospholipid bilayer, as one of the frequently used. *Reverse phase evaporation* represents another method used for liposome preparation. *Complex coacervation* is chemical incapsulation method in which the accumulation of opposite charged macroions occurs around desired substance. Interfacial polymerisation is chemical incapsulation method, characterised by formation of polymer on line between droplets or particles of dissolved substance. Although the use of the incapsulation represents useful tool to dissolve the problems related with the polyphenol instability within food supplements products, the improvement of mentioned techniques are in the progress. This thesis is narrative review.

Keywords: polyphenols, food supplements, incapsulation
Thesis contains: 47 pages, 6 figures, 49 references
Original in: Croatian
Defense committee:

1. **Maja Valić, MD, PhD, Associate professor**
2. **Lea Kukoč-Modun, PhD, Assistant professor**
3. **Tea Bilušić, PhD, Full professor**

Defense date:

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in the Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and the Library of School of Medicine, Šoltanska1.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Polifenoli 2
1.2. Biološka aktivnost polifenola 4
1.2.1. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja polifenola 4
1.2.2. Antibakterijsko djelovanje polifenola 5
1.2.3. Antitumorsko djelovanje polifenola 6
1.3. Dodaci prehrani 7
1.4. Polifenoli kao dodaci prehrani 9
1.5. Biodostupnost polifenola 12
1.5.1. Metabolizam polifenola 14
1.5.1.1. Metabolizam polifenola u gornjem GIT-u 14
1.5.1.2. Metabolizam polifenola u tankom crijevu 15
1.5.1.3. Konjugacija i transport konjugata 16
1.5.1.4. Metabolizam polifenola u debelom crijevu pod utjecajem crijevne mikroflore 17
1.6. Stabilnost polifenola 17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 19
3. INKAPSULACIJA 21
3.1. Tehnologija inkapsuliranja 21
3.1.1. Fizikalne metode inkapsuliranja 23
3.1.2. Fizikalno-kemijske metode inkapsuliranja 26
3.1.3. Kemijske metode inkapsuliranja 28
4. RASPRAVA 30
5. ZAKLJUČCI 33
6. LITERATURA 35
7. SAŽETAK 40
8. SUMMARY 43
9. ŽIVOTOPIS 46

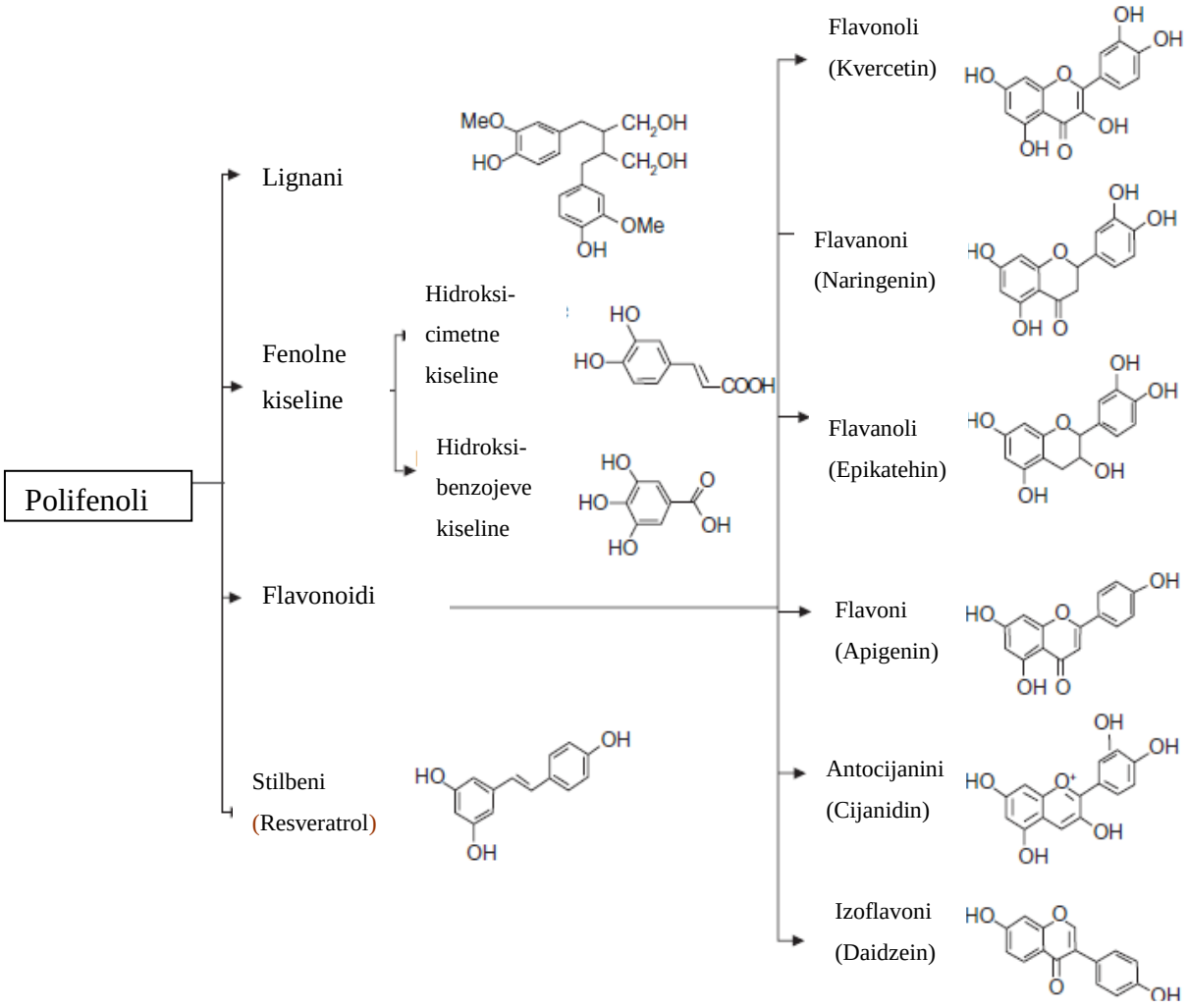
Zahvaljujem se prof. dr. sc. Tei Bilušić na pruženoj pomoći oko izrade diplomskog rada putem korisnih savjeta.

Zahvaljujem se svojoj obitelji koja mi je bila podrška tijekom studiranja, kao i prijateljima koji su bili uz mene u teškim trenucima.

1. UVOD

1.1. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji predstavljaju široku skupinu u prirodi vrlo rasprostranjenih organskih spojeva. Spadaju u jednu od najbrojnijih i najšire rasprostranjenih fitokemikalija u biljnom carstvu s više od osam tisuća lako prepoznatljivih i različitih struktura. S obzirom na kemijsku strukturu, variraju od jednostavnih molekula, kao što su fenolne kiseline, do visoko polimeriziranih struktura kao što su tanini. Svim polifenolima je zajedničko prisustvo benzenskih prstenova koji nose jednu ili više hidroksilnih (-OH) skupina. U prirodi najčešće dolaze kao glikozidi u konjugiranoj formi s jednim ili više šećernih ostataka povezanih za jednu ili više hidroksilnih grupa. Temeljem svoje bazične kemijske strukture, dijele se na različite podskupine što prikazuje Slika 1.[1,2]



Slika 1. Klasifikacija i kemijske strukture glavnih podskupina polifenola.[1]

U biljnom svijetu polifenoli imaju ulogu u pigmentaciji, rastu, reprodukciji te obrani od patogena i predatora zahvaljujući svom adstringentnom djelovanju te fitoaleksinskom učinku. Adstringentno djelovanje je posljedica reakcije polifenola s proteinima prisutnim u slini zbog čega dovode do trpkog okusa i osjećaja stezanja u ustima te time odbijaju predatore. Ukoliko je biljka napadnuta od strane patogena, najčešće gljivica, producira spektar polifenolnih spojeva koji se nazivaju fitoaleksini te oni pokazuju antivirusno, antibakterijsko, te antiinsekticidno djelovanje. Također, predstavljaju vrlo značajne komponente ljudske prehrane zahvaljujući širokom spektru bioloških aktivnosti.[1,3] Uspoređujući ih s klasičnim nutrijentima kao što su vitamini i minerali, polifenoli ne predstavljaju tvari potrebne za vitalne tjelesne funkcije te se stoga često nazivaju nenutrijentima. Polifenoli se prehranom najčešće unose putem voća, povrća, mahunarki, vina i čaja. Jednostavne fenolne kiseline čine trećinu ukupnog unosa polifenola dok flavonoidi zauzimaju preostale dvije trećine.[1]



Slika 2. Prikaz namirnica koje su izvor polifenola koji im ujedno daju vrlo privlačnu boju.[2]

1.2. Biološka aktivnost polifenola

Polifenoli pokazuju antioksidacijsko djelovanje kojim neutraliziraju slodobne radikale koji nastaju u organizmu kao posljedica metabolizma stanice, te time sprječavaju nastanak oštećenja u organizmu koja mogu dovesti do pojave patoloških stanja. U nastavku rada je prikazan pregled poznatih mehanizama djelovanja polifenola.

1.2.1. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja polifenola

Polifenoli svoj pozitivni učinak na zdravlje postižu putem antioksidacijskog djelovanja, kojeg postižu na nekoliko načina. Najpoznatiji i najbolje istražen način odnosi se na izravno vezivanje reaktivnih kisikovih oblika kao što su superoksid radikal, hidroksil radikal, peroksil radikal, vodikov peroksid te kisikov singletni oblik. Zbog svojih strukturnih karakteristika polifenoli su u mogućnosti donirati vodikov atom. Taj atom potom reagira sa slobodnim radikalom koji posjeduje jedan nespareni elektron. Zbog tog nesparenog elektrona, slobodni radikal je izrazito reaktivna čestica te može uzrokovati brojna oštećenja u organizmu jer može potaknuti lančanu rekaciju nastanka novih slobodnih radikala. Reakcijom radikala s vodikovim atomom, on se inaktivira. Nakon što je polifenolna komponenta donirala vodikov atom, nastao je polifenolni radikal koji je manje reaktivan od eliminiranog radikala jer posjeduje mogućnost stabilizacije. Do njegove stabilizacije dolazi putem delokalizacije nesparenog elektrona preko aromatskog prstena putem rezonancije ili hiperkonjugacijskog efekta. Za ovaj mehanizam djelovanja važna je disocijacijska energija veze kisika i vodika u hidroksilnoj skupini. Što je ta veza slabija, lakši je prijenos vodika pa je time polifenol potentniji.[1, 3]

$X^{\bullet} + ArOH \rightarrow XH + ArO^{\bullet}$

$X^{\bullet}$ predstavlja slobodni radikal

$ArO^{\bullet}$ predstavlja polifenolni stabilni slobodni radikal

Slika 3. Mehanizam prijenosa vodikovog atoma [4]

Polifenoli mogu iskazati svoj antioksidacijski učinak keliranjem potencijalnih pro-oksidativnih metalnih iona kao što su Fe^{3+}, Cu^{2+}, Al^{3+}. Polifenoli posjeduju hidroksilnu i/ili karboksilnu skupinu koje mogu vezivati metalne ione. Njihovim keliranjem se onemogućuje odvijanje Fentonove reakcije u kojoj sudjeluju, a koja rezultira nastankom slobodnih radikala. Fentonova reakcija podrazumijeva reakciju vodikovog peroksida s reduciranim željezom ili bakrom pri čemu nastaje hidroksilni radikal. Deprotoniranjem hidroksilnih i/ili karboksilnih skupina otvara se kisikov centar koji ima jak naboj, a time i mogućnost keliranja metalnih kationa. Smatra se kako i aromatska jezgra sa svojim visokim nukleofilnim karakterom ima sposobnost keliranja.[3, 4, 5, 6]

Polifenoli stupaju u interakciju s proteinima na specifičan način i posljedično moduliraju njihov učinak. Tako se polifenoli ponašaju kao potentni inhibitori enzima koji sudjeluju u nastanku reaktivnih kisikovih vrsta. Stvaranjem kompleksa sa ksantin oksidazom, ciklooksigenazom i lipooksigenazom inhibiraju njihovu aktivnost i nastanak štetnih radikala.[4, 5, 6]

1.2.2. Antibakterijsko djelovanje polifenola

Polifenoli pripadaju različitim kemijskim skupinama, a kako se u namirnicama uvijek nalazi mnoštvo polifenola, točan mehanizam interakcije teško je odrediti. Na stanici mikroorganizma nalazi se nekoliko ciljnih mjesta. Kod vegetativnih bakterijskih stanica, tri su mjesta djelovanja antimikrobnih tvari: stanična stijenka, citoplazmatska membrana te citoplazma. U konačnici, antimikrobno djelovanje polifenola rezultira oštećenjem stanice mikroorganizma. Oštećenje se može manifestirati na različite načine pa tako punikalagini djeluju na transmembranski pH gradijent i integritet stanice te uzrokuju curenje unutarstaničnog sadržaja, ometanje transporta i procesa stvaranja energije te poremećaj respiratornog lanca. Punikalagini, polifenolni spojevi prisutni u šipku (*Punica granatum L.*), predstavljaju kompleksne derivate elagitaninske kiseline i spadaju u skupinu hidroliziranih tanina tako da se nazivaju i elagitaninima. Osim opisanog oštećenja, zamijećeno je da

polifenoli mogu koagulirati unutarstanični sadržaj kao i dovesti do poremećaja replikacije mikroorganizma.[7]

1.2.3. Antitumorsko djelovanje polifenola

Posebno je dobro ispitano antitumorsko djelovanje polifenola iz zelenog čaja. Zeleni čaj sadrži polifenolnu grupu koja se naziva katehini. Katehine čine epigalokatehin-3-galat (EGCG), epigalokatehin (EGC), epikatehin-3-galat (ECG), epikatehin (EC), galokatehin i katehin. EGCG djeluje na više načina. Jedan od njih je inhibicija aktivnosti preoteasoma u tumorskim stanicama. Proteasomi su proteinski kompleksi sa ulogom razgradnje nepotrebnih ili oštećenih proteina koji se označavaju malim proteinom zvanim ubikvitin. Naime, smatra se kako je proteasomska aktivnost esencijalna za proliferaciju tumorskih stanica kao i razvoj tolerancije na antitumorske lijekove. Ubikvitin/proteasomski sustav kontrolira preobrazbu kritičnih regulatornih proteina koji su uključeni u nekoliko staničnih procesa kao što su stanični ciklus i apoptoza. Eukariotski proteasom sadrži, zasad poznate, tri katalitičke aktivnosti koje uključuju kimotripsinske, tripsinske i kaspazne mehanizme. Istraživanja su pokazala kako je inhibicija kimotripsinske proteasomske aktivnosti povezana s indukcijom apoptoze u tumorskim stanicama. Uočeno je kako EGCG potentno i specifično inhibira spomenuti sustav. Pri tom kritičnu ulogu u inhibiciji ima esterska veza unutar EGCG.[9,10]

Uz spomenuti mehanizam, EGCG štiti molekulu DNA od metilacije. U procesu karcinogeneze, karcinogen može prouzročiti promjene u genskoj funkciji i/ili genskoj konstrukciji. Epigenetsko utišavanje putem hipermetilacije gena zaduženih za popravak DNA ili tumorsku supresiju se pojavljuje učestalije tijekom ranih stadija neoplastičnog procesa te može rezultirati karcinogenezom u stanicama. Neka istraživanja su ukazala kako EGCG može inhibirati aktivnost DNA metiltransferaze što dovodi do reaktivacije gena utišanih putem metilacije u slučaju tumora jednjaka kod ljudi.[9,10]

Ljudsko tijelo producira slobodne radikale u prirodnom procesu oksidacije. Te vrlo agresivne molekule mogu prouzročiti oštećenje lipida, proteina i molekule DNA. Brojne bolesti imaju jaku povezanost s oksidativnim oštećenjima unutar tkiva pa tako ni tumor, uz dijabetes, srčane bolesti i Alzheimerovu bolest nije iznimka. Dokazano je kako brojna antiproliferativna djelovanja EGCG nastaju kao posljedica njegovih antioksidativnih svojstava.[10]

1.3.Dodaci prehrani

Dodaci prehrani su koncentrirani izvori hranjivih ili drugih sastojaka s prehrambenim ili fiziološkim funkcijama, sami ili u kombinacijama, plasirani na tržište u doziranom obliku, sa svrhom potpomaganja unosa hranjivih sastojaka u uobičajenoj prehrani i nadopunjavanja prehrane tvarima koje se, putem normalnog unosa hrane u organizam, ne dobivaju u dovoljnoj količini, a sve u svrhu povoljnog učinka na zdravlje potrošača. Na taj se način povećava otpornost organizma na stresne vanjske utjecaje te pomaže u održavanju pravilnih fizioloških funkcija organizma i njegovih dijelova.[11, 12]

Ono što dodatak prehrani čini drugačijim od uobičajene hrane jesu komponente koje u određenoj količini imaju utjecaj na zdravlje. Taj se utjecaj potvrđuje kroz razne navode, odnosno tvrdnje. Namjena ili tvrdnja je bilo koji prikaz ili poruka koja nije zakonom propisana, uključujući slikovni, grafički ili simbolički prikaz, a koji sugerira ili navodi na mišljenje da proizvod ima posebna svojstva. Ona je istaknuta na deklaraciji i upućuje da proizvod može biti prehrambeno i zdravstveno koristan u smislu ublažavanja, olakšavanja, poboljšanja, reguliranja, povećanja i/ili smanjenja određenih stanja organizma. Tvrdnje se dijele na prehrambene i zdravstvene.[11, 12] Prehrambena tvrdnja navodi ili sugerira na mišljenje da hrana ima određena prehrambena svojstva uvjetovana energijom te hranjivom ili nekom drugom tvari. U smislu energije, hrana ju može osiguravati, u smanjenoj ili povećanoj količini, ili ju ne osiguravati. U pogledu hranjive ili neke druge tvari, hrana ju može sadržavati, u smanjenoj ili povećanoj količini, ili ju ne sadržavati. Prehrambene tvrdnje se ističu samo temeljem usporedbe s referentnim proizvodom te je usporedba moguća samo između namirnica iste kategorije hrane. U Republici Hrvatskoj prehrambene tvrdnje su propisane Pravilnikom o hrani za posebne prehrambene potrebe 81/2004 koji je pisan prema prijedlozima Europske unije. U samom Pravilniku točno su utvrđene količine pojedinih nutritivnih sastojaka namirnice, prema kojima ta hrana može nositi određenu prehrambenu tvrdnju. Primjerice, ako na namirnici stoji navod "nizak sadržaj masti", to znači da masti ima manje od 3 g/100 g, dok za navod "bez masti" količina masti ne smije prijeći 0,5 g/100 g.[11]

Zdravstvene tvrdnje obuhvaćaju one tvrdnje kojima se potvrđuje, sugerira ili navodi na mišljenje da postoji veza između hrane i zdravlja. Najčešće se upotrebljava riječ *sadržava* uz koju se navodi vitalna funkcija tijela te *snižava* uz navođenje faktora rizika od određenih

bolesti. Ponekad samo ime proizvoda upućuje na funkciju tijela i samim tim se označava kao zdravstvena tvrdnja. Takvi bi bili primjerice probiotici. Ako pak navod ističe *sadržava*, tada se mora navesti i količina sastojka koja mora biti dovoljna da bi se postigao zdravstveni učinak.[7,8] S obzirom na propise u Republici Hrvatskoj, proizvođač ima mogućnost dati prijedlog svoje tvrdnje, a postupkom notifikacije Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi daje konačno odobrenje i točne navode tvrdnje koja se mora citirati i kao takva istaknuti na deklaraciji.[12]

Pravilnik o dodacima prehrani donesen je 12. prosinca 2008. kao podzakonski dokument Zakona o hrani te je time izdvojen iz Pravilnika o hrani za posebne prehrambene potrebe. Zakonom o hrani nadležnost nad provedbenim propisima o dodacima prehrani namijenjena je Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi.[12] Prije stavljanja na tržište svaki proizvod mora proći kontrolu zdravstvene ispravnosti u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo te notifikaciju, odnosno registraciju pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi. Kontrola zdravstvene ispravnosti obuhvaća osnovne analize kao što su mikrobiološka, analiza teških metala, organoleptička analiza, potom specifične analize kao što su analiza pesticida, mikotoksina, bojila, konzervansa i slično te ciljane analize za osnovnu nutritivnu vrijednost što obuhvaća udio ugljikohidrata, masti, bjelančevina te energetsku vrijednost i ciljane analize za specifičnu nutritivnu vrijednost, primjerice vitamina, minerala.[11] Nakon pozitivno ocijenjenog analitičkog izvješća proizvođač, odnosno uvoznik, skuplja opsežnu dokumentaciju, od sirovina do gotovog proizvoda. Dokumentacija uključuje certifikate kao što su genetski modificirani organizmi (engl. *Genetically Modified Organisms*) i goveđa spongioformna encefalopatija (engl. *Bovine Spongiform Encephalopathy*), specifikacije i podrijetlo sirovina, potom brojne znanstvene dokaze i mišljenja znanstveno-istraživačkih ustanova i stručnjaka da taj proizvod, vezano uz aktivne komponente i njihovu količinu, zaslužuje nositi navedenu zdravstvenu tvrdnju te prilaže molbu Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi, Povjerenstvu za dodatke prehrani i ostale proizvode. Na osnovi pregleda dokumentacije i analitičkog izvješća, članovi Povjerenstva daju mišljenje o proizvodu na temelju kojeg ministar zdravstva donosi rješenje za stavljanje u promet. Ako se molba pozitivno riješi, proizvodu se odobrava samo jedna zdravstvena tvrdnja koja se smije navesti na deklaraciji te mu se dodjeljuje broj rješenja, koji se također mora navesti na proizvodu.[11]

1.4. Polifenoli kao dodaci prehrani

Zbog povećanja učestalosti kroničnih bolesti u razvijenim zemljama, sve bržeg životnog tempa i velike uloge medija kontinuirano se povećava konzumacija dodataka prehrani. U prvom se redu to odnosi na vitaminsko-mineralne pripravke, no sve veću popularnost dobivaju i dodaci prehrani biljnog podrijetla, bogati polifenolima. Usprkos svojim potencijalno korisnim učincima na organizam, ovi pripravci imaju niz ograničenja koja predstavljaju izazov u razvoju dodataka prehrani. Bioraspoloživost i biodostupnost polifenola unesenih hranom niska je jer su većinom slabo topljivi u vodi kao posljedica velike molekulske mase, slabo se apsorbiraju te podliježu opsežnom i brzom metabolizmu koji varira ovisno o kojem spoju je riječ.[1, 2, 4, 5, 13] Posjeduju i druga svojstva koja ograničavaju njihovu primjenu, kao što su vrlo adstringentno djelovanje, gorak okus, manjak dugoročne stabilnosti, velika osjetljivost na svjetlost i toplinu. Kako bi se zaobišle ove manjkavosti polifenola, razvijene su tehnologije za njihovu inkapsulaciju.[4]

Polifenoli predstavljaju spojeve koji su učestala meta istraživanja. Neki od bolje proučenih su prikazani u nastavku.

β-karoten je najpoznatiji spoj iz skupine karotenoida. Karotenoidi su komponente koje sadrže i do 15 konjugiranih dvostrukih veza te su sintetizirani od strane biljaka, određenih gljiva te bakterija. Opisano je oko 600 spojeva od kojih 50 postoji u ljudskoj prehrani, a od toga je svega njih desetak zastupljeno u značajnijoj mjeri u ljuskoj plazmi. Smatra se kako ovi spojevi djeluju kao antioksidansi i filteri plave boje spektra svjetlosti koja potencijalno oštećuje retinu oka. Najpoznatiji primjer je žuta pjega u retini oka gdje se karotenoidi, poput zeaksantina i luteina nakupljaju u velikim količinama. Nazivaju se i makularnim pigmentima jer mogu smanjiti kromatske aberacije i tako zaštititi retinu od svjetlošću potaknutog oksidativnog stresa. Karotenoidi su prirodni prekursori vitamina A.[14] β-karoten je najzastupljeniji član iz skupine karotenoida, sadrži 40 ugljikovih atoma i 9 konjugiranih dvostrukih veza te pokazuje maksimum apsorpcije u vidljivom spektru pri ~450 nm što rezultira narančastom do crvenom bojom spoja. Predstavlja najzastupljeniji karotenoid u koži te se suplementacijom povećava njegova koncentracija u tom organu. Smatra se kako je glavna funkcija β-karotena u ljudskom organizmu konverzija u vitamin A.[15] Taj vitamin je važan za brojne funkcije u ljudskom organizmu, posebice normalan rast i razvoj,

funkcioniranje imunološkog sustava te vid. Dnevni unos β-karotena široko varira, većina ljudi konzumira 1-2 mg/dan iako u rijetkim slučajevima može iznositi i 10 mg/dan. Najviši unos je postignut u prehrani vegana i vegetarijanaca.[15]

Likopen je spoj iz skupine karotenoida koji se ne konvertira u vitamin A te je zaslužan za crvenu do rozu boju kakva se vidi u rajčicama, lubenici, papaji ili grejpu.
Likopen može reducirati sintezu kolesterola i povećati degradaciju lipoproteina niske gustoće (LDL).[16] Ispitivan je utjecaj likopena na opekotine uzrokovane UV svjetlošću. Jedna grupa zdravih dobrovoljaca je konzumirala pastu od rajčice sa maslinovim uljem dok je druga grupa konzumirala čisto maslinovo ulje u periodu od 10 tjedana. Rezultati su pokazali kako je grupa koja je konzumirala pastu pokazala smanjenje u nastanku opekotina induciranih suncem.[17] Provedeno je placebom kontrolirano istraživanje o učinku likopena na gingivitis koje je pokazalo statistički značajnu redukciju pojavnosti gingivitisa kao i krvarenja povezanog sa njime.[18] Postoji istraživanje koje ukazuje na potencijalan terapijski učinak likopena na astmu, odnosno sugerira kako unos likopena može poboljšati plućnu funkciju kod astmatičara.[19]Pažnju istraživanja plijene i likopenoidi, oksidativni produkti likopena koji se mogu naći u rajčicama i proizvodima od rajčica. Vrlo su ograničeni podaci o njihovim biološkim učincima, stoga predstavljaju komponente koje će se u budućnosti više istraživati.[16]

Resveratrol je polifenol prisutan u ograničenom broju namirnica kao što su crveno grožđe, crveno vino, kikiriki te neke vrste bobičastog voća, a najpoznatiji izvori su crno vino i kožica crnog grožda. Predstavlja spoj koji je privukao pažnju diljem svijeta u proteklih dvadeset godina te su provedena brojna in vitro istraživanja kao i studije na animalnom modelu. Adekvatne studije na ljudskom modelu još uvijek ne postoje. Velik broj studija na animalnom modelu koristi uvjete koje je teško postići prilikom provođenja studija na ljudima kao što su visoke koncentracije sa potencijalno mogućim nuspojavama ili kratkotrajna izloženost resveratrolu.[20] Francuski paradoks je pojam koji je skovan kako bi se opisalo Francuze kao populaciju koja unatoč životnom stilu koji pogoduje nastanku kardiovaskularnih oboljenja predstavlja naciju koja najmanje obolijeva od istih. Naime, konzumacija crvenog vina povezana je s niskom smrtnošću Francuza od kardiovaskularnih bolesti te je resveratrol kao komponenta crvenog vina stavljena u središte pozornosti. Valja skrenutni pozornost kako je resveratrol fitoaleksin, odnosno komponenta koju biljka producira onda kada je izložena napadu patogena ili kao prilagodbu na nepovoljne uvjete. Tipične razine resveratrola su niske

i ovisne o okolišnim uvjetima što ih čini nepredvidivima. Prema tome, biološki značaj resveratrola kao komponente crvenog vina je radije precijenjen.[20]

Oleuropein je, uz hidroksitirosol koji je njegov derivat, zasigurno najpoznatija sastavnica maslinovog ulja. Oleuropein je u velikim količinama zastupljen u neprerađenom lišću i plodovima masline, dok se veće koncentracije hidroksitirosola mogu naći u plodovima i u maslinovom ulju, a razlog leži u enzimatskim reakcijama koje se odvijaju u biljci tijekom zrenja plodova.[21] Mnogi agronomski faktori kao što su sorta, stupanj zrelosti, navodnjavanje stabla i geografsko podrijetlo ploda utječu na ove sastavnice. Oleuropein i hidroksitirosol pokazuju visok stupanj biodostupnosti. Nekoliko studija je stavilo naglasak na redovitu konzumaciju maslinovog ulja u cilju postizanja pozitivnog učinka mediteranskog tipa prehrane na kardiovaskularno zdravlje. Pored antioksidativnog učinka oleuropeina i hidroksitirosola, pripisuju im se i vazodilatacijski, antiagregacijski i protuupalni učinak na animalnom modelu.[21] Studije na animalnom modelu su ukazale na njihove protektivne učinke prema razvoju ateroskleroze u vidu smanjenja njegove razine kao i smanjenja oksidacije LDL čestica.[21] Uočena je i inhibicija endotelne aktivacije na animalnom modelu koja predstavlja rani korak u aterogenezi.[21] Potvrđena je i bliska veza između antioksidacijskog i hipoglikemijskog učinka ekstrakta maslinovog lista na animalnom modelu.[21]

Katehini predstavljaju glavne polifenolne komponente u zelenom čaju. Zeleni čaj se proizvodi inaktivacijom polifenol okidaze u svježem lišću te se na taj način priječi enzimatska oksidacija katehina. Glavni katehini u zelenom čaju su epikatehin (EC), epikatehin-3-galat (ECG), epigalokatehin (EGC) i epigalokatehin-3-galat (EGCG) koji je ujedno i najzastupljeniji (48-55 %).[22] Kardioprotektivni učinak zelenog čaja je demonstriran u animalnom modelu, zeleni čaj i EGCG su pokazali učinak u smanjenju razvoja ateroskleroze. Oni su pokazali učinak u smanjenju razine kolesterola u krvi i prevenciji stvaranja depozita kolesterola u brojnim tkivima, uključujući jetru i srce na animalnom modelu.[22] Postprandijalni porast triglicerida je još jedan faktor rizika u razvoju kardiovaskularnih oboljenja, a katehini su se pokazali učinkoviti i u ovom slučaju. Naime, oni inhibiraju aktivnost lipaze i time potiskuju apsorpciju triglicerida.[22] Endotelne stanice ne služe samo kao biološka barijera koja razdvaja krv i periferna tkiva, već ima i centralnu ulogu u održavanju vaskularne homeostaze.[22] One normalno proizvode raznolike vazoaktivne supstance, primjerice NO, koje reguliraju vaskularni tonus, lokalne upalne promjene i angiogenezu. Nije poznat precizan mehanizam kojim zeleni čaj poboljšava endotelnu funkciju.[22] In vitro kao i in vivo studije su ukazale na korisne učinke katehina na agregaciju trombocita, ovisno o dozi.[22]

Kvercetin je najzastupljeniji flavonoid, široko rasprostranjen u biljnom carstvu. Može se naći u jabukama, bobičastom voću, crvenom luku, čaju, rajčicama kao i biljkama koje se koriste kao tradicionalni biljni lijekovi, primjerice *Ginkgo biloba* i *Hypericum perforatum.*[23] Dnevni unos kvercetina varira u rasponu od 50 do 800 mg/dan pri čemu glavni izvor čine jabuke. Provedene *in vitro* studije na animalnom modelu ukazuju kako kvercetin ima protuupalno i imunostimulativno djelovanje, premda studije provedene na ljudima nisu u potpunosti poduprle ove rezultate.[23] Rezultati upućuju kako je kvercetin komponenta koja ima snažno protuupalno djelovanje koje ostvaruje inhibicijom proizvodnje većeg broja citokina, među kojima i TNF-α u makrofazima. Uočeno je kako kvercetin umanjuje i upalni odgovor na prehranu bogatu zasićenim mastima na animalnom modelu.[23] Svoje imunostimulativno djelovanje ostvaruje putem učinka na T limfocite kojim dovodi do smanjene proliferacije i diferencijacije Th-1 stanica na animalnom modelu.[23]

1.5. Biodostupnost polifenola

Polifenoli koji su najobilnije prisutni u ljudskoj prehrani nisu nužno i oni koji imaju najbolji profil biodostupnosti. Valja razlikovati pojam biodostupnost od bioraspoloživosti. Biodostupnost predstavlja proces oslobađanja komponente iz matrice hrane. Bioraspoloživost je definirana kao frakcija komponente raspoloživa za aspsorpciju. Hrana sadrži kompleksnu kombinaciju polifenola te se stoga prilikom razvoja dodataka prehrani koji sadrže polifenole preferira izolacija takve mješavine polifenola pred sintetskom produkcijom određenog polifenola. Brojni su faktori koji utječu na biodostupnost polifenola. Vanjski, okolišni faktori mogu utjecati na sadržaj polifenola u biljkama i posljedičnu biodostupnost u organizmu. Tako izloženost suncu kao i količina oborina predstavljaju neke od vanjskih faktora. Nadalje, stupanj zrelosti utječe na koncentraciju polifenola. Koncentracija fenolnih kiselina smanjuje se tijekom zrenja dok se koncentracija antocijana, koji daju boju plodovima, povećava. Pokazano je kako koncentracija fenolnih komponenti u ekstra djevičanskom maslinovom ulju opada sa sazrijevanjem plodova maslina. Razina oleuropeina, glavnog polifenola u plodu maslina, značajno se smanjuje sa zrenjem dok se istovremeno uočava porast hidroksitirosola - njegovog glavnog degradacijskog produkta. Fenolne kiseline su direktno uključene u odgovor biljke na različite tipove stresa te tako doprinose cijeljenju putem lignifikacije oštećenih područja. Pokazuju i antimikrobna svojstva te se njihova koncentracija može povećati nakon infekcije. Rijetke su studije koje ispituju sadržaj polifenola u voću i povrću koji su uzgajani

organskom ili održivom poljoprivredom. One pokazuju kako je sadržaj polifenola u takvim plodovima viši od onih koji se uzgajaju konvencionalnom poljoprivredom lišenom stresa. To je nedavno dokazano na primjeru jagoda, kupina te kukuruza. Pohrana odnosno skladištenje također može utjecati na sadržaj polifenola budući su vrlo podložni oksidaciji. Reakcije oksidacije rezultiraju formacijom manje ili više polimeriziranih supstanci koje rezultiraju promjenama u kvaliteti hrane, posebice u organoleptičkim svojstvima. Takve promjene mogu biti korisne, primjerice u slučaju proizvodnje crnog čaja, ili pak opasne kao što je slučaj sa promjenom boje plodova voća u smeđu.[26]

Čimbenici povezani sa preradom hrane također utječu na biodostupnost. Jednostavno guljenje voća i povrća može eliminirati značajnu količinu polifenola budući da su oni često zastupljeni u većoj koncentraciji u vanjskim nego u unutarnjim dijelovima. Termička obrada graha i mahunarki rezultira značajnom redukcijom ukupnog sadržaja polifenola kao i njihove antioksidacijske aktivnosti. Luk i rajčica izgube između 75% i 80% inicijalnog sadržaja kvercetina nakon kuhanja u trajanju od petnaest minuta, 65% nakon pripreme u mikrovalnoj pećnici te 30% nakon prženja na ulju.[23] Za neke polifenole pak vrijedi da im se sadržaj povećava nakon termičke obrade. Tako je uočeno značajno povećanje sadržaja polifenola nakon kuhanja brokule na pari kao i njihove antioksidacijske aktivnosti. Prema tome metoda kulinarske pripreme ima značajan utjecaj na sadržaj polifenola u hrani. Preferira se priprema povrća na pari uz izbjegavanje njegovog namakanja.[26]

Interakcija polifenola s drugim komponentama predstavlja još jedan faktor koji utječe na njihovu biodostupnost. Prilikom određivanja cjelokupne biodostupnosti polifenola, potrebno je razmotriti i kapacitet polifenola i njihovih metabolita za vezanjem na proteine. Zapaženo je kako postoje intramolekularne veze između serumskog albumina i metabolita kvercetina što doprinosi njihovoj sporoj eliminaciji iz organizma. Epigalokatehin-3-galat također posjeduje visok afinitet za proteine plazme što može produljiti njegov poluživot u organizmu. Tanini koji sadrže preko 12 hidroksilnih grupa se vrlo snažno vežu za proteine pa tako tvore kompleks sa proteinima prisutnim u slini što rezultira njihovom smanjenom apsorpcijom te bioraspoloživosti. Tanini se vežu i za proteinske transportere prisutne u stijenci tankog crijeva, kao što je SGLT1 zadužen za transport glukoze, te time smanjuje i apsorpciju nekih drugih makronutrijenata, u prvom redu ugljikohidrata. Stoga se u prošlosti nazivao antinutrijentom jer je zapaženo da je kod životinja koje su ga u prehrani imale u velikom obimu rezultirao kržljavim rastom. Polifenoli mogu smanjiti apsorpciju nekih minerala. Dobro je istražen negativan učinak nekih polifenola kao što je EGCG na apsorpciju željeza i cinka. Poznato je kako potencijal polifenola za keliranjem minerala ovisi o tipu

samog minerala. Jedna studija je pokazala utjecaj antocijanina iz crnog ribizla na apsorpciju minerala ukoliko se konzumira sa i bez fitinske kiseline. Fitinska kiselina predstavlja normalni sastojak hrane s vrlo velikim potencijalom keliranja dvovalentnih metala koji opada u nizu Cu>Zn>Mn>Fe>Ca. Dodatkom fitinske kiseline zapažene su veće koncentracije polifenola u urinu i plazmi. Fitinska kiselina je u ovom slučaju kao jaki kelator onemogućila nastanak kompleksa polifenol-mineral.[26]

Jedan od glavnih čimbenka koji utječe na biodostupnost je kemijska struktura polifenolne komponente. U hrani većina polifenola postoji u glikolizidnoj formi, povezani sa šećernom grupom. U ovakvoj prirodnoj formi oni se, u pravilu, ne mogu apsorbirati te moraju podleći hidrolizi putem intestinalnih enzima ili crijevne mikroflore. Antocijani predstavljaju iznimku jer se intaktni glikozidi mogu apsorbirati i detektirati u cirkulaciji.[21,22]

1.5.1. Metabolizam polifenola

Budući da se veoma mali dio polifenola izlučuje nepromijenjen iz organizma, za očekivati je da na djelovanje polifenola u organizmu ne utječu samo ishodišne molekule, već i njihovi metaboliti. Zbog toga se sve veće značenje pridaje istraživanju metaboličkih procesa polifenola u organizmu kao i bioloških značajki nastalih metabolita. Dobro je istražen metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina, kao najzastupljenijih polifenolnih skupina u ljudskoj prehrani.[24]

1.5.1.1. Metabolizam polifenola u gornjem GIT-u

U gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta (GIT), promjene nisu intenzivne te polifenoli u tanko crijevo uglavnom dospijevaju u nepromijenjenom obliku. U usnoj šupljini dolazi do hidrolize nekih glikozida kao što su kvercetin-4-glukozid i genistein-7-glukozid. Nastankom farmakološki aktivnih aglikona omogućen je njihov lokalni učinak na inhibiciju proliferacije raka usne šupljine. Hidroliza se uglavnom događa utjecajem enzima epitelnih stanica, ali je moguća i uz pomoć bakterija. Razlika u mikroflori usne šupljine značajno pridonosi varijabilnosti hidrolize glikozidnih flavonoida među pojedincima tako da ona kod

nekih može pokazati značenje u metabolizmu i djelovanju flavonoida. U kiselim uvjetima želuca nema značajnijih promjena. Flavonoidni glikozidi stabilni su na hidrolizu u kiselim uvjetima želuca te nepromijenjeni dospijevaju u tanko crijevo.[24]

1.5.1.2. Metabolizam polifenola u tankom crijevu

Brojni čimbenici utječu na apsorpciju probavljenih komponenti u tankom crijevu. Možemo ih podijeliti u dvije osnovne skupine: fitokemijski poput strukture molekula, lipofilnosti, p*K*a i topljivosti te biološki u koje ubrajamo pH tankog crijeva, permeabilnost membrane i učinak prvog prolaska kroz jetru. Pri tome najveći utjecaj na intestinalnu apsorpciju pokazuju strukturalni parametri poput molekulske mase, glikozilacije i esterifikacije. Povećanjem molekulske mase, smanjuje se mogućnost apsorpcije u tankom crijevu. Iz tog razloga visokomolekularni proantocijanidini, građeni od podjedinica flavanola, gotovo uopće nisu apsorbirani u tankom crijevu. Međutim, slaba apsorpcija proantocijanidina bi mogla biti značajna za postizanje lokalnog učinka na sluznicu crijeva ili pri djelovanju fenolnih kiselina koje nastaju razgradnjom enzimima crijevne mikroflore.[24]

Većina flavonoida se u hrani nalazi u obliku glikozida, a tip šećerne jedinice znatno utječe na apsorpciju pojedinih flavonida u tankom crijevu. Tako se kvercetin-3-*O*-β-glukozid mnogo bolje apsorbira od rutina, ramnoglukozida kvercetina, pa čak i od pripadajućeg aglikona. Dva su mehanizma koji objašnjavaju bolju apsorpciju kvercetin-3-*O*-β-glukozida u odnosu na aglikon. Prvi uključuje membranski transporter SGLT1, glukozni transporter, kojim se glukozidi transportiraju u lumen enterocita gdje su supstrati za citosolnu β-glukozidazu. U drugi mehanizam je uključena laktaza-florizin hidrolaza smještena na membrani enterocita s aktivnim mjestom okrenutim prema lumenu crijeva. Ona svojom aktivnošću otpušta aglikone koji potom mogu pasivno difundirati preko membrane.[24]

Intestinalnu apsorpciju također smanjuje esterifikacija. Katehini koji su esterificirani s galnom kiselinom, kava kiselina s kina kiselinom (klorogenska kiselina) i ferulična kiselina vezana za arabinoksilate iz stanične stijenke biljaka pokazuju znatno manju bioraspoloživost od pripadajućih slobodnih oblika.[24]

1.5.1.3. Konjugacija i transport konjugata

Flavonoidi se gotovo u potpunosti konjugiraju tako da su u nepromijenjenom obliku u krvi općenito odsutni ili prisutni u vrlo niskim koncentracijama. Najčešće su podložni rekacijama glukuronidacije, sulfatacije i metilacije. Glavna mjesta konjugacije su tanko crijevo (osobito ileum) i jetra. Konjugati nastali u tankom crijevu apsorbiraju se ili transportiraju nazad u lumen putem MRP1, MRP2, BCRP1 ili OAT transportera s tim da se efluks, odnosno transport glukuronida odvija dominantno prema bazolateralnom, a sulfata prema luminalnom odjeljku. Ukupna produkcija konjugata ovisna je o koncentraciji aglikona na apikalnoj strani te njegovom prelasku u lumen koji je obrnuto proporcionalan broju hidroksilnih grupa. Najveće povećanje produkcije konjugata je kod galangina koji posjeduje 3 hidroksilne skupine, a slijede kempferol s 4 te kvercetin s 5 hidroksilnih skupina.[24]

Najdominantniji metabolički proces kojem flavonoidi podliježu je glukuronidacija. Glukuronidaciju kataliziraju mikrosomalni enzimi UDP-glukuronozil transferaze. Na primjeru baikaleina (bioaktivnog flavonoida iz korijena vrste *Scutellaria baicalensis*, biljke koja se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini) je vidljivo zašto je glukuronidacija dominantniji metabolički put od sulfatacije. Iako se sulfatacija odvija uz veći afinitet enzima prema supstratu, kinetika sulfatacije već je pri manjem povećanju koncentracije supstrata inhibitorna. Glukuronidacija se odvija uz veću učinkovitost i kapacitet te je dominantan metabolički put u širokom rasponu koncentracije supstrata i u jetri i u crijevima.[24]

Flavanoli su u usporedbi s drugim flavonidima podložniji metilaciji u jejunumu, što je posljedica specifičnosti katehol-*O*-metiltransferaze prema ovim spojevima. Metilacija može utjecati na smanjenje toksičnosti flavonoida i općenito polifenola. Većina polifenola sadrži kateholne grupe koje *in vivo* mogu biti oksidirane u toksične kinone. Slični kinoni nastali iz endogenih estrogena i kateholamina dovode do nastajanja superoksidnih radikala kroz reakciju s nukleofilnim molekulama u stanicama. Tako reakcija metilacije kvercetina objašnjava izostanak karcinogenog djelovanja *in vivo* unatoč dobro definirane mutagenosti *in vitro*.[24]

Oksidacija citokrom P-450 enzima se odvija u manjoj mjeri u odnosu na reakcije konjugacije ali može utjecati na biološku aktivnost flavonoida. I najmanje promjene u strukturi flavonoida mogu značajno utjecati na njihovo djelovanje u organizmu. Najčešće se smanjuje biološka aktivnost i ubrzava izlučivanje, ali postoje dokazi i o nastanku biološki aktivnijih spojeva. Važna osobina ovog metaboličkog puta je varijabilnost među pojedincima zbog različite ekspresije CYP izoenzima, polimorfizma, kao što je CYP1A2 koji predstavlja

jedan od najvažnijih enzima u metabolizmu flavonoida. Ta činjenica navodi na mogućnost velike razlike u uspješnosti liječenja raka među pojedincima kao i na razlike u sklonosti obolijevanja od istog. Hidroksilacijom i demetilacijom, reakcijama kataliziranim CYP enzimima, mogu nastati polihidroksilirani spojevi s jačim antioksidacijskim djelovanjem od ishodišnih molekula. Tako hidroksilacijom kempferola i O-demetilacijom tamariksetina nastaje kvercetin, koji sadrži prsten koji je pogodniji za delokalizaciju elektrona.[24]

1.5.1.4. Metabolizam polifenola u debelom crijevu pod utjecajem crijevne mikroflore

U debelo crijevo dospijeva najveći dio unesenih polifenola, kako onih neapsorbiranih tako i onih koji su u enterocitima i/ili jetri metabolizirani i potom transportirani natrag u lumen crijeva izravno pomoću membranskih transportera ili putem žuči. Debelo crijevo naseljava oko 10^{12} mikroorganizama/cm^3 s velikim katalitičkim i hidrolitičkim potencijalom, tako da enzimatskom razgradnjom polifenola nastaje velik broj novih metabolita. Debelo crijevo tako ne predstavlja samo mjesto izlučivanja polifenola nego i aktivno mjesto njihovog metabolizma. Na taj način nastaje enterohepatičko kruženje, dekonjugacija metabolita polifenola te reapsorpcija, kojim se produžuje vrijeme zadržavanja polifenola u organizmu. Najčešće metaboličke reakcije u debelom crijevu su hidroliza, dehidroksilacija, demetilacija, cijepanje prstena i brza dekonjugacija. Velika varijabilnost u opsegu metabolizma u kolonu je odraz intra- i inter-individulanih razlika u mikroflori na koju utječu dob, stres, bolesti i prehrana. Tako u metabolizmu daidzeina, izoflavonske komponente, crijevnom mikroflorom, razlike među pojedincima mogu biti drastične. Jedni su ekvol-producenti dok kod drugih nastaje *O*-demetilan-golensin.[27]

Farmakokinetičke studije apsorpcije i eliminacije polifenola indiciraju kako oni dostižu maksimalnu koncentraciju u krvi otprilike dva sata nakon unosa, a vrijeme poluživota kreće se u rasponu 4,8 – 6,9 sati. Ove vrijednosti mogu značajno varirati što ovisi o kemijskoj strukturi, veličini i složenosti samog polifenola.[1]

1.6. Stabilnost polifenola

Polifenole se smatra vrlo nestabilnim spojevima i visoko podložnima degradaciji. Stabilnost polifenola pod različitim uvjetima je vrlo važan aspekt budući da je težnja očuvati njihova željena svojstva, strukturu i djelotvornost. Tako na stabilnost polifenola utječe svjetlost, visoka temperatura, kisik te prijelazni metali.[25]

Jedna studija je pokazala kako djelovanjem UV svjetlosti dolazi do foto-degradacije katehina, galne kiseline i vanilinske kiseline. Katehin se pokazao kao najnestabilniji te je njegova potpuna degradacija nastupila nakon osmosatne izloženosti djelovanju UV zraka. U istom periodu izloženosti, zapažen je gubitak od 85% galne kiseline. Vanilinska kiselina se pokazala kao najstabilnija sa gubitkom od 50% u istom periodu izloženosti. Galna i vanilinska kiselina pokazuju i veću antioksidativnu aktivnost u sporedbi s katehinom.[25]

Studija je proučavala i termičku stabilnost istih polifenola. Podaci pokazuju korelaciju sa UV stabilnosti. Katehin se tako pokazao kao najnestabilniji sa stopom degradacije od 20% na temperaturi od 60^{o} C te se ona penje na 32% pri temperaturi od 100 ^{o}C. Galna i vanilinska kiselina pokazuju gotovo istu stopu degradacije pri temperaturi od 60 ^{o}C i 80 ^{o}C i one iznose redom 15% i 25%. Odnosno, ovi polifenoli pokazuju izraženiju stopu degradacije pri višim temperaturama kao što je 100 ^{O}C te se one tada kreću u rasponu 32-37%.[25] Polifenoli su podložni oksidaciji. Reakcija oksidacije predstavlja dehidrogenaciju fenolnih spojeva što rezultira nastankom kinona koji su vrlo reaktivni. Oni mogu polimerizirati ili reagirati sa drugim spojevima. Rezultat je nastanak obojenih spojeva zvanih fitomelanini i gubitak antioksidacijskog učinka.[26]

Razlikuju se autooksidacija polifenola - bez katalizatora koje se odvijaju dosta sporo te je za uočavanje promjena ponekad potrebno nekoliko dana ili čak tjedana, oksidacija katalizirana prijelaznim metalima kao što su Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+} te oksidacija katalizirana enzimima pri čemu je najznačajnija polifenoloksidaza ili fenolaza. Taj enzim se prirodno nalazi u voću te je nakon mehaničkog oštećenja narušena stanična stuktura čime je omogućen kontakt polifenoloksidaze, polifenola i kisika. Taj proces je poznat kao enzimsko posmeđivanje i nije uvijek nepoželjan. On doprinosi poželjnoj boji i okusu grožđica, suhih šljiva, kakaa, kave i čaja.[26]

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istaživanja bio je proučiti dostupnu znanstvenu literaturu o polifenolnim učincima, utjecaju okolišnih faktora i faktora procesa probave na stabilnost i stupanj biodostupnosti u

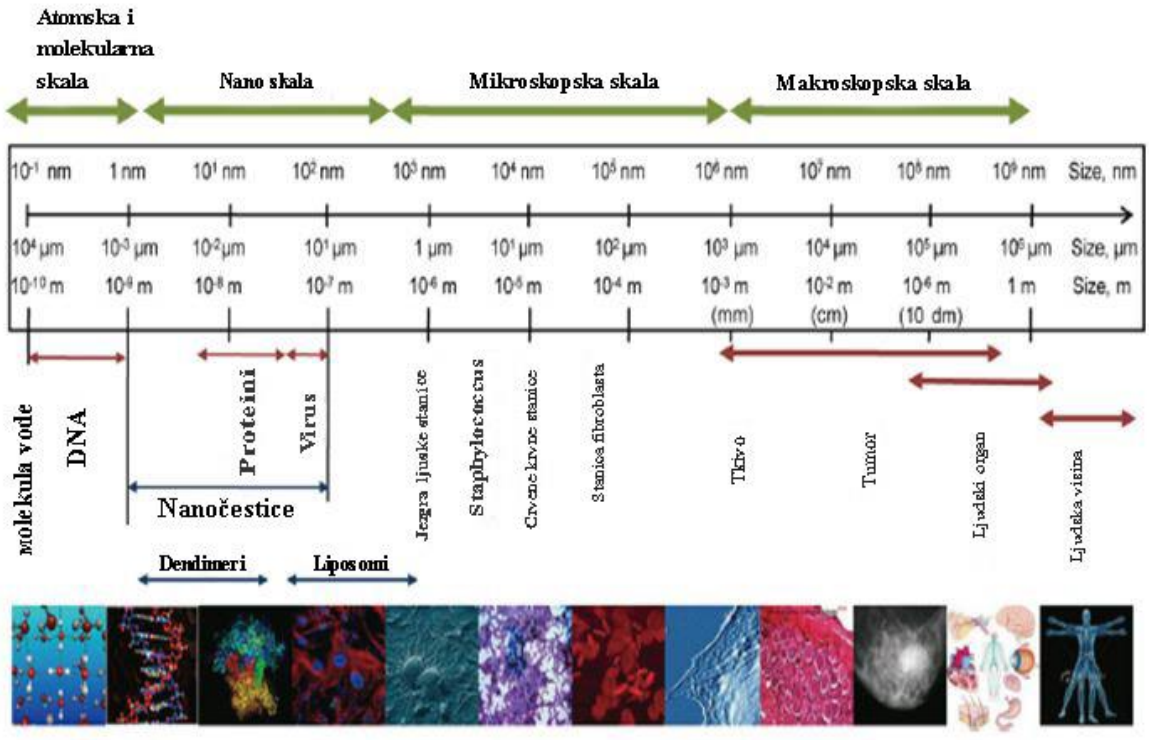
organizmu pretraživanjem baze podataka PubMed obuhvaćajući pregledne radove, kliničke studije te studije na animalnom modelu. U kontekstu problematike stabilnosti polifenola poseban osvrt je dan na primjenu tehnika inkapsulacije u cilju očuvanja i povećanja stabilnosti polifenola u dodacima prehrani.

3. INKAPSULACIJA

3.1. Tehnologija inkapsuliranja

Inkapsulacija se može definirati kao proces u kojem se jedna tvar, aktivna komponenta, zatvara unutar druge, oblagajuće tvari. Inkapsulirana tvar se može nazivati središtem, punjenjem ili unutarnjom fazom. Tvar, koja inkapsulira, često se naziva membranom, ljuskom, kapsulom, vanjskom fazom ili matriksom. Tvari, koje se upotrebljavaju za inkapsuliranje, moraju biti prehrambene kvalitete, biodegradabilne i u mogućnosti tvoriti barijeru između unutarnje faze i vanjskog okruženja. Tako se za proces inkapsuliranja najčešće upotrebljavaju polisaharidi kao što su škrob i njegovi derivati: amiloza, amilopektin, dekstran, maltodekstran i drugi. Proteini i lipidi također su primjereni za uporabu u procesu inkapsuliranja. Unutar lipidnih komponenata, primjerenih za uporabu, su masne kiseline i masni alkoholi, voskovi, gliceridi i fosfolipidi.[29]

Procesom inkapsulacije mogu se dobiti mikročestice koje se kreću u rasponu veličina od jednog mikrometra do jednog milimetra, kao i nanočestice s rasponom veličina od jednog nanometra do jednog mikrometra.[4]



Slika 4. Prikaz veličina bioloških materijala i sustava.[27]

Postoji veliki broj inkapsulacijskih metoda koje se mogu klasificirati na temelju reakcija koje se odvijaju prilikom procesa. Tako razlikujemo fizikalne, fizikalno-kemijske te

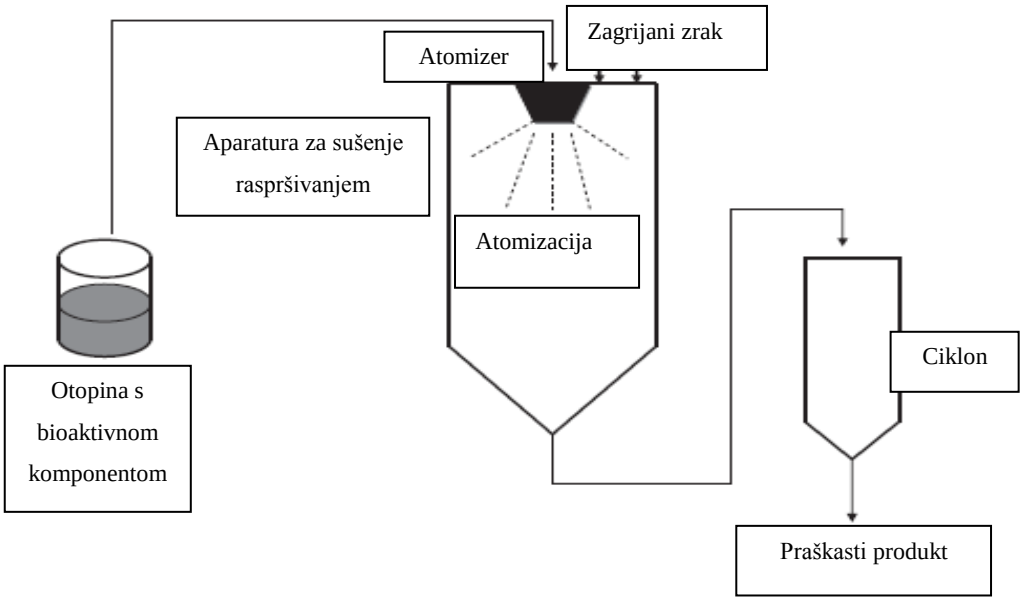
kemijske metode inkapsuliranja.[4] U nastavku se navode tipični predstavnici svake skupine metoda.

3.1.1. Fizikalne metode inkapsuliranja

Mnoge tehnologije su temeljene na sušenju budući da se komponente, koje se inkapsuliraju, vrlo često nalaze u tekućem stanju. **Sušenje raspršivanjem** („*spray drying*“) jedna je od najstarijih i najšire korištenih inkapsulacijskih tehnologija u prehrambenoj industriji.[10] Riječ je o brzom i relativno jeftinom procesu koji je, ukoliko se izvodi na odgovarajući način, visoko reproducibilan. Relativna lakoća i niska cijena procesa glavni su razlozi za njegovu široku primjenu. Produkti su mikro i nanočestice.[4, 5, 29] Temeljna ideja sušenja raspršivanjem je produkcija visoko dispergiranih prašaka iz tekućih pripravaka isparavanjem otapala. To se postiže miješanjem zagrijanog plina, najčešće dušika, s atomiziranom tekućinom koja ima visok omjer površine naspram mase čestica. Zbog toga dolazi do ravnomjernog i brzog isparavanja otapala preko direktnog kontakta. Atomizacija predstavlja proces razbijanja tekućine na kapljice. Pri idealnim uvjetima sve bi čestice trebale imati jednak promjer. Sušenje raspršivanjem se sastoji od nekoliko faza. Pripreme otopine za prihranjivanje koja može biti homogena otopina, suspenzija ili pak pasta. Atomizacija koja predstavlja proces prevođenja otopine u kapljice, ujedno je i najkritičniji korak u procesu. Stupanj atomizacije kontrolira brzinu sušenja te time i veličinu komore za sušenje. Najčešće se koriste slijedeće atomizacijske tehnike: a) atomizacija pritiskom kroz mlaznicu („*pressure nozzle atomization*“) u kojoj se atomizacija događa potiskivanjem tekućine kroz otvor mlaznice. Predstavlja energetski učinkovitu metodu koja ujedno nudi i najužu distribuciju veličine čestica, b) atomizacija putem potiskivanja dva fluida kroz mlaznicu („*two-fluid nozzle atomization*“) predstavlja drugu tehniku u kojoj se mješavina tekućine i komprimiranog plina potiskuje kroz otvor mlaznice (energetski najmanje učinkovita metoda korisna pri produkciji izrazito finih čestica), c) atomizacija putem centrifuge („*centrifugal atomization*“) predstavlja treću najčešće primjenjivanu tehniku u kojoj se raspršivanje odvija prelaskom tekućine preko ili kroz rotirajući disk (obično se može provoditi kroz duži vremenski period). Sljedeći korak u procesu je sušenje. Otapalo vrlo brzo isparava s površine čestica u početku, a potom slijedi pad brzine sušenja jer je ono kontrolirano brzinom difuzije otapala iz središta čestice ka površini. Slijedi odvajanje praškastog proizvoda od vlažnog plina, pri tom se vodi briga o ekonomičnosti jer se nastoji reciklirati medij kojim se provodi

sušenje te izbjeći onečišćenje okoliša. Fine čestice se u pravilu odvajaju putem ciklona, vrećastih filtera, taložnika ili četki.[30]

Putem sušenja raspršivanjem su uspješno inkapsulirani, u mješavini maltodekstrina i arapske gume, procijanidi iz sjemenki grožđa kao i epigalokatehin galat sa stopom inkapulacije od 85%. Inkapsulacija ekstrakta lista masline u hitozanu se pokazala kao manje učinkovita sa stopom inkapsulacije od 27%. Uočeno je kako tvari koje se koriste kao membrana utječu na učinkovitost, odnosno postotak inkapsulacije.[4]



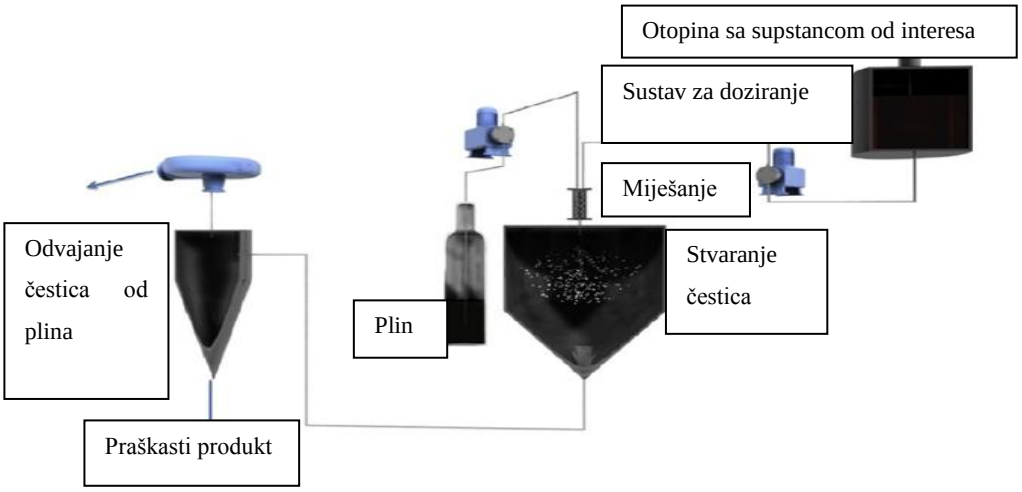
Slika 5. Shematski prikaz procesa sušenja raspršivanjem putem atomizacije pritiskom otopine kroz mlaznicu.[4]

Atomizacija potpomognuta superkritičnim fluidom („*supercritical-assisted atomization"***)** predstavlja tehniku u kojoj superkritični fluid ima ulogu otopljene tvari budući da se plinovi pod tlakom mogu otopiti u tekućini.[4] Superkritični fluid predstavlja tvar koja iznad svoje karakteristične kritične temperature i kritičnog tlaka posjeduje jedinstvena svojstva koja se razlikuju od plinova i tekućina. Tako posjeduje svojstvo plina da penetrira u svaku poru i svojstvo tekućine da otapa tvari. Najčešće se kao superkritični fluid upotrebljava ugljikov dioksid (CO_2) koji je netoksičan, nezapaljiv, jeftin te je njegove kritične parametre lako dostići. Kritična temperatura iznosi 37 ^oC te je bliska sobnoj temperaturi što je pogodno

za termolabilne supstance. Vrijednost njegovog kritičnog tlaka iznosi 73,8 bara.[31] Postoji više tehnika koje se baziraju na mikronizaciji putem superkritičnih fluida. Najčešće primjenjivana je brza ekspanzija superkritičnih otopina („*RESS- rapid expansion of supercritical solutions"*). Otopina koju se želi mikronizirati otapa se u superkritičnom fluidu. Otopina koja sadrži supstancu koja se želi inkapsulirati dovodi se u komoru koja je pod visokim tlakom i koja sadrži superkritični fluid pri čemu dolazi do otapanja superkritičnog fluida u otopini. Korak koji je najznačniji u procesu je naglo smanjenje tlaka koje se postiže prolaskom ovakve otopine kroz mlaznicu u atomizator većih dimenzija zbog čega dolazi do volumne ekspanzije superkritičnog fluida koji pri tom postaje plin što je popraćeno oslobađanjem topline. Rezultat ekspanzije je taloženje mikročestica koje se prikupljaju nakon odvajanja od plina.[4]

Ovom tehnikom je postignuto uspješno inkapsuliranje ekstrakta zelenog čaja bez degradacije njegovih aktivnih sastojaka. Dobivene čestice su sferičnog oblika i prosječne veličine oko 10 μm.[4]

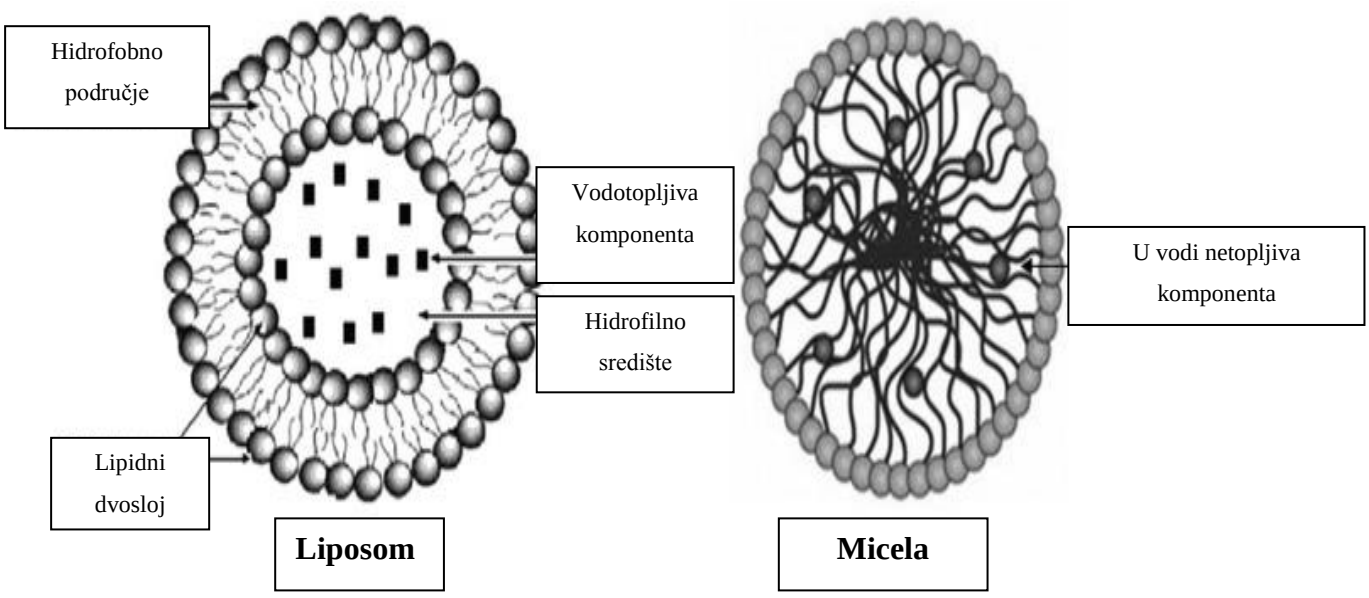
U farmaceutskom polju se često primjenjuju masne kiseline, posebice stearinska, palmitinska i miristinska kiselina te polietilenglikol kao polimerni materijali koji sačinjavaju membranu mikročestica.[32]



Slika 6. Shematski prikaz atomizacije potpomognute superkritičnim fluidom putem brze ekspanzije superkritičnih otopina.[4]

3.1.2. Fizikalno-kemijske metode inkapsuliranja

U skupini fizikalno-kemijskih metoda inkapsuliranja posebno je zanimljiva produkcija **liposoma** koje valja razlikovati od micela. Liposomi su mali sferični sustavi koji se sintetiziraju u tijelu iz kolesterola i fosfolipida. To su prirodni produkti koji se smatraju atraktivnim i neškodljivim prenosiocima tvari od interesa u organizmu.[33] Liposomi se sastoje od jednog ili više koncentričnih lipidnih dvosloja koji su razdvojeni vodenim medijem. Klasificiraju se na temelju veličine, broja lamela i naboja. Prema veličini se razlikuju mali, veliki i gigantski liposomi. S obzirom na broj lamela, definiraju se unilamelarni liposomi, sa samo jednim lipidnim dvoslojem, te oligo i mulitilamelarni liposomi. U pravilu se broj lamela kreće u rasponu od 5 do 20 te se liposomi s nižim brojem lamela smatraju oligolamelarnim. S obzirom na naboj razlikuju se neutralni i nabijeni, pozitivno ili negativno, liposomi.[4, 34]



Slika 6. Shematski prikaz liposoma i micele[34]

Konvencionalna metoda pripreme liposoma uključivala je **hidrataciju tankih fosfolipidnih filmova vodenim otopinama.** Ta metoda poznata je kao Banghamova metoda pripreme.[5,29,36] Liposomi se formiraju kada se tanki lipidni filmovi ili lipidni kolači hidratiziraju što dovodi do toga da dvosloji postaju fluidni i naduti. Dolazi do odvajanja lipidnih listova tijekom agitacije, a kasnijeg zatvaranja čime nastaju velike multilamelarne čestice. Jednom kad ove čestice nastanu moguće je reducirati njihovu veličinu i postići

homogenost što zahtijeva primjenu zvučne energije putem sonifikacije (ultrazvuk) ili mehaničke energije putem ekstruzije. Priprema liposoma uključuje nekoliko generalnih elemenata a to su priprema lipida za hidrataciju, hidratacija s agitacijom i homogenizacija distribucije veličina čestica. Priprema lipida za hidrataciju se najprije vrši otapanjem lipida u organskom otapalu. Ovaj proces se odvija primjenom čistog kloroforma ili mješavinom s etanolom. Ukoliko je primjena kloroforma upitna, alternativa je primjena tercijarnog butanola ili cikloheksana. Nakon što su lipidi otopljeni i izmiješani u organskom otapalu, uklanja se otapalo kako bi se formirao lipidni film. Mali volumeni organskog otapala se mogu ukloniti isparavanjem korištenjem struje dušika ili argona u digestoru. Za uklanjanje većih volumena otapala koriste se rotacijski uparivači. Dobiveni lipidni kolač se može pohraniti za kasniju uporabu smrzavanjem. Hidratacija lipidnog filma ili kolača se ostvaruje dodatkom vodenog medija i agitacijom. Temperatura na kojoj se vrši hidratacija bi trebala biti veća od temperature prijelaza gel-tekuće stanje lipida. To se lako može postići primjenom rotacijskog uparivača bez vakuuma. Rotacija lipida u toploj vodi s odgovarajućom temperaturom omogućava hidrataciju lipidnog filma uz odgovarajuću agitaciju. Preporuka je da vrijeme hidratacije bude 1 h uz snažno miješanje ili mućkanje. Prikladni medij za hidrataciju uključuje destiliranu vodu, puferske otopine, otopine soli i monoelektrolite kao što su šećerne otopine. Najčešću primjenu imaju fiziološka otopina (0,9%-tna otopina NaCl), 5%-tna otopina dekstroze i 10%-tna otopina saharoze. Produkti su velike mulitlamelarne čestice čija se veličina može homogenizirati sonifikacijom ili ekstruzijom. Primjenom sonifikacije dolazi do razbijanja velikih čestica djelovanjem ultrazvuka na male unilamelarne čestice sa promjerom 15-50 nm.[37] Sonifikacija se provodi na malom volumenu od 1 do 40 mL te stoga nije prikladna za produkciju velikih količina liposomskih čestica. Ekstruzijom se lipidne čestice potiskuju kroz polikarbonatni filter, najčešće s veličinom pora od 100 nm, čime se dobivaju velike unilamelarne čestice promjera 120-140 nm.[37]

Liposomi se mogu pripremati i na druge načine. Jedan od njih je **evaporacija reverzne faze** *(„reverse-phase evaporation“*). Liposomi se otapaju u organskom otapalu koje se ne miješa s vodom, najčešće dietil-eteru ili izopropil-eteru. Ukoliko lipid ima slabu topljivost u eteru, dodatak kloroforma ili metanola će povećati njegovu topivost. Potom se dodaje vodena faza i sustav se kontinuirano nalazi u atmosferi inertnog plina dušika. Nastaje dvofazni sustav tipa emulzija ulje u vodi koji se kratkotrajno izlaže sonifikaciji (2-5 min). Emulzija se potom stavlja na rotacijski uparivač te se uklanja organsko otapalo pod smanjenim tlakom. Tijekom isparavanja organskog otapala sustav se pjeni. Kad se ukloni

većina otapala, sustav najprije formira viskozni gel, a zatim postaje vodena suspenzija. Ona se dodatno razrjeđuje kako bi se formirale liposomske čestice. Prednost ove tehnike je vrlo visoka stopa inkapsuliranja od oko 50 %.[38]

Inkapsulacijska učinkovitost polifenola ovisi o morfologiji liposoma, a ona pak ovisi o metodi primijenjenoj u njihovoj produkciji. Postoje literaturni podaci koji upućuju na to da liposomi poboljšavaju bioaktivnost i biodostupnost polifenola.[4]

3.1.3. Kemijske metode inkapsuliranja

Kompleksna koacervacija („*compleks coacervation*“**)** predstavlja razdvajanje makromolekularne otopine sastavljene od dva suprotno nabijena makroiona na dvije nemješljive tekuće faze pri čemu dolazi do udruživanja suprotno nabijenih makroiona oko aktivne komponente koja je suspendirana ili emulgirana u istom mediju. Razlikuje se od jednostavne koacervacije u kojoj sudjeluje samo jedan polimer. Suspenzija koacervata predstavlja bifazni sustav, dok jasna gusta faza predstavlja koacervat. Ta faza je viskoznija i koncentriranija od inicijalne otopine i pokazuje brojna jedinstvena svojstva.[39] Jedan od najčešće korištenih sustava u kompleksnoj kocervaciji je želatina-arapska guma zbog njihove biorazgradivosti i obilnog resursa. Naboj želatine je pH ovisan zbog čega proces pripreme mikrokapsula postaje lakše kontroliran. Bitno je fino podesiti različite faktore procesa jer vrlo male varijacije utječu drastično na tijek procesa. Vrlo važan faktor koji utječe na mikroinkapsulaciju aktivne komponente je inicijalna količina adsorbirana na kapljicama. Iz tog razloga se mogu dodavati surfaktanti. Želatina se najčešće primjenjuje kao negativno nabijena, a arapska guma kao pozitivno nabijena. U procesu kompleksne koacervacije pripremaju se 1%-tne otopine negativno nabijene želatine i pozitivno nabijene arapske gume te se pH podešava na vrijednost 6,5. U slučaju dodatka surfaktanta, on se dodaje prije podešavanja pH vrijednosti i to u otopinu arapske gume. Potom se otopine zagrijavaju na temperaturu 45^{o} C. U otopinu arapske gume se dodaje parafin te se on brzo miješa otprilike 30 min kako bi se provelo dobro emulgiranje. U ovu emulziju se dodaje otopina želatine po principu kap po kap, a pH se podešava na 4,5 kako bi se potakla koacervacija te je pri tome potrebno miješati sustav otprilike 1 h. Mješavina se potom centrifugira te se dobivaju koacervati i na površini i na dnu koji nužno ne moraju sadržavati kapsule. Produkti se potom podvrgavaju sušenju.[39]

Polimerizacija na granici faza („*interfacial polymerisation*“) je klasična tehnologija uključena u produkciju sintetičkih vlakana kao što su poliester, najlon i poliuretan. Karakterizira ju formiranje membrane putem brze polimerizacije monomera na granici kapljica ili čestica otopljenih u vodenoj fazi. Monomer se otapa u odgovarajućem otapalu, potom se dodaje u vodenu fazu koja sadrži supstancu od interesa. Potrebno je dodati odgovarajući reaktant monomeru u vodenoj fazi zbog čega dolazi do brze polimerizacije na površini željenih čestica te formiranja zida kapsule. Polimerizacija na granici faza se može primjenjivati za pripremu većih mikročestica, no u komercijalne svrhe se najčešće proizvode čestice manjeg promjera. Temelj ove metode je klasična Schotten-Baumanova reakcija između acetil klorida i komponente koja sadrži aktivni vodikov atom kao što su amin ili alkohol.[4]

4. RASPRAVA

Zbog brzog životnog tempa i činjenice da suvremeni čovjek većinu vremena tijekom dana provede izvan doma, sve je izraženija potreba za konzumiranjem dodataka prehrani koja sadrže biološki aktivne komponente, poput polifenola. Kako su polifenoli osjetljivi na utjecaj kisika iz zraka, utjecaj svjetla, te na visoku temperaturu, važno je pripraviti dodatke u kojima će primjenom određenih tehnika ovi spojevi biti dodatno stabilizirani. Nadalje, polifenoli u probavnom traktu čovjeka, prema podacima iz dostupne znanstvene literature, u pravilu imaju nizak stupanj bioraspoloživosti i podložni su utjecaju crijevne mikroflore.

Inkapsulacija je širok pojam i obuhvaća mnoge tehnike poput sušenja raspršivanjem, atomizacije potpomognute sukritičnim fluidom, pripreme liposoma hidratacijom fosfolipidnih filmova ili evaporacijom reverzne faze, kompleksna koacervacija, polimerizacija na granici faza.

Tehnika sušenja raspršivanjem se pokazala dobrom metodom pripreme mikrosfera koje sadrže ekstrakt artičoke. Analiza elektronskim mikroskopom pokazuje kako čestice bazirane na laktozi imaju sferičan oblik te pokazuju brzo oslobađanje polifenolne komponente u kiselom i neutralnom mediju zbog dobre topljivosti nosača laktoze, dok one bazirane na hipromelozi oslobađaju svega 20 % sadržaja pri pH 1,2 u periodu od 2 sata dok se ukupna preostala količina sadržanog polifenola oslobađa nakon 6 sati pri pH 6,8. Čestice pripremljene kombinacijom laktoze i hipromeloze u odnosu 1:1 pokazuju polaganu stopu oslobađanja koja traje približno 24 sata. Autori stoga predlažu da se takva formulacija primjenjuje kao oralni oblik s kontoliranim oslobađanjem.[40] Sjemenke grožđa su bogat izvor proantocijanidina no obično su tretirane kao otpad. Ekstrakt sjemenki grožđa je uspješno inkapsuliran tehnikom sušenja raspršivanjem uz stupanj učinkovitosti od 88,84%. Analiza je pokazala kako se proantocijanidini nisu promijenili tijekom procesa te da je membrana mikrokapsula sačuvala svoj integritet. Time je stabilnost produkta očito poboljšana.[41] Lišće hrasta se u sjevernom Meksiku koristi kao osvježavajuće piće bogato polifenolnim komponentama. Lišće pokazuje astringentno djelovanje te stoga zahtjeva maskiranje okusa kako bi se inkorporiralo u proizvod koji zadovoljava zahtjeve potrošača. Također, sastojci lišća ulaze u interakciju sa brojnim drugim komponentama hrane. Sušenje raspršivanjem je uspješno riješilo taj problem. Priprema kapsula sačinjenih od laktoze i kazeina omogućuje dobivanje čestica u redu submikronske veličine uz zadržavanje dobre antioksidacijske aktivnosti orginalne infuzije.[42]

Ekstrakt zelenog čaja je uspješno inkapsuliran korištenjem atomizacije potpomognute superktiričnim fluidom. Dobivene čestice su imale veličinu 44,7 nm. Dobivene čestice su iskazale antibakterijsku aktivnost, a antioksidacijska aktivnost je poboljšana. Dobivene čestice su pokazale i prebiotičku aktivnost.[43]

Ekstrakt sjemenki grejpa bogat polifenolima je inkapsuliran u liposomskim česticama. Produkti su pokazali dobru stabilnost tijekom 98 dana pohrane. Većina polifenola je inkorporirana u ljusci liposoma (85,4%), samo mali postotak (7,6%) je smješen u unutrašnjosti. Kada su liposomske čestice obložene hitozanom, poboljšana je njihova okidativna stabilnost. Neobložene liposomske čestice su vrlo sklone lipidnoj oksidaciji.[44]

Ekstrakt zelenog čaja je inkapsuliran u liposomskim česticama te je ispitana transdermalna doprema. Uočeno je kako liposomska kompozicija ima utjecaj na otuštanje spoja. Ukoliko se inkorporiraju anionski surfaktanti kao što je dicetil fosfat, transdermalno otpuštanje katehina se sedmerostruko povećava. Epigalokatehin-3-galat je pokazao najveću stopu inkapsulacije te *in vivo* nakupljanje u koži.[45]

Propolis, mješavina bogata polifenolima koju skupljaju pčele, posjeduje izraženo terapijsko djelovanje. Ipak, njegova je primjena ograničena zbog topivosti samo u alkoholu te zbog njegovog izraženog okusa. Inkapsulacija propolisa putem kompleksne koacervacije predstavlja zanimljivu alternativu. Rezultat je prašak, lako topiv u tekućinama koje nisu alkohol, koji posjeduje antioksidativna i antimikrobna svojstva te iz kojeg se otpuštanje aktivne komponente može kontrolirati.[46]

Mikročestice koje sadrže proantocijanidine iz sjemenki grožđa su dobivene polimerizacijom na granici faza. Mikročestice su imale veličinu manju od 10 μm i bile su stabilne više od 5 mjeseci na temperaturi od 45 ^{o}C u vodenom okruženju. Sporo su se degradirale u plazmi i pokazale zanimljivu antioksidativnu aktivnost, premda malo manju u odnosu na inicijalne proantocijanidine.[4]

5. ZAKLJUČCI

Prednosti tehnika inkapsulacije

1. Povećanje stabilnosti i biodostupnosti
2. Maskiraju neugodan okus polifenolnih spojeva i sprječavaju pojavnost trpkosti
3. Omogućena je ciljana doprema čestica u tanko crijevo gdje se mogu osloboditi

Mane tehnika inkapsulacije

1. Tendencija nakupljanja u vitalnim organima
2. Povećana koncentracija u organizmu i moguća toksičnost
3. Teško postizanje uniformnosti čestica

6. LITERATURA

1. Keith R Martin, Christy L Appel. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword; Nut. and Diet. Supp. 2010; 2 1-12. Review.

2. Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? Proc. Nutr. Soc. 2003; 63(3):599-603. Review.

3. Kazazić P. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arh. Hig. Toksikol. 2004;55:279-290. Review.

4. Munin A, Edwards-Lévy F. Encapulation of natural polyphenolic compounds; a review. Pharmaceutics. 2011; 3(4):793-829.

5. Menaa, et al. Dietary intake of (-)-Epigallocatechin-3-gallate against aging and cancers: Nanoencapsulation of multi-rings still requires new rounds! J. Nanomater. Mol. Nanotechnol. 2013; 2:7

6. Ian J, Gary W. Phytochemical functional foods. Woodhead Publishing. 2003: 320-325.

7. Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, Nychas G. J. E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on Escherichia coli. Ital. J. Food. Sci. 2006; 65-75.

8. Scalbert A, Manach C, Moran C, Remesy C. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. Cri. Rev. Food. Sci. Nutr. 2005;45:287-306. Review.

9. Ping Dou Q. Molecular Mechanisms of Green Tea Polyphenols. Nutr. Cancer. 2009;61(6):827-835.

10. Chen D, Ping Dou Q. Tea Polyphenols and Their Roles in Cancer Prevention and Chemoterapy. Int. J. Mol. Sci. 2008, 9, 1196-1206. Review.

11. Pollak L. Food supplements and food for particular nutritional uses. Medicus 2008: 17(1) 47-55.

12. Pollak L. Novo zakonodavstvo-Pravilnik o dodacima prehrani i Pravilnik o hrani za posebne prehrambene potrebe. Farmaceutski glasnik. 65, 7-8/2009

13. Mignet N, Seguin J, Chabot GG. Bioavailability of polyphenol liposomes: a challenge ahead. Pharmaceutics. 2013; 5(3):457-471. Review.

14. Von Linting J. Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology. Am. J.Clin. Nutr. 2012; 96(5): 1234–1244. Review.

15. Grune T, Lietz G, Palou A, Ross CA et all. B-Carotene is an important Vitamin A source for humans. J. Nutr. 2010; 140(12): 2268–2285. Review.

16. Story NE, Kopec RE, Schwartz SJ, Harris GK. An Update on the Health Effects of Tomato Lycopene. Annu. Rev. Food. Sci. Technol. 2010; 1;10.

17. Chen L,Stacewicz-Sapuntzakis M, Duncan C, Sharifi R at all. Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato-sauce based entrees as a whole food intervention. J Natl Cancer Inst 2001:93(24):1872-9.

18. Chandra RV, Prabhuji ML, Roopa DA, Ravirajan S et all. Efficacy of lycopene in the treatment of gingivitis: a randomised, placebo-controlled clinical trial. Oral Health Prev Dent.2007; 5(4): 327-36.

19. Wood LG, Garg ML, Powell H, Gibson PG. Lycopene-rich treatments modify noneosinophilic airway inflammation in astma: proof of concept. Free Radic Res.2008; 42(1): 94-102.

20. Tomé-Carneiro J, Larossa M, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA. Resveratrol and Clinical Trials: The Crossroad from in Vitro Studies to Human Evidence.Curr Pharm Des. 2013: 19(34): 6064–6093.

21. Bulotta S, Celano M, Lepore SM, Montalcini T et all. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. J Transl Med. 2014; 12: 219.

22. Velayutham P, Babu A, Liu D. Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update. Curr Med Chem. 2008; 15(18):1840-1850.

23. Li Y, Yao J, Han C, Yang J et all. Quercetin , Inflammation and Immunity. Nutrients. 2016; 8(3): 167..

24. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 2004;79:727-47.

25. D' Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzochio B, et al. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. Int. J. Mol. Sci. 2010,11,1321-1342. Review.

26. Bohn T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. Nutr. Rev. Special article.

27. Čović D, Bojić M, Medić-Šarić M. Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. Farmaceutski glasnik 65,12/2009.

28. Volf I, Ignat I, Neamtu M, Popa I.V. Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. Chem. Pap. 2014:68(1)121-129.

29. Nedovic V, Kalusevic A, Majnolovic V, et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. Proc. Food. Sci. 2011; 1: 1806-1815.

30. Kim ES, Ahn EH, Chung E, et al. Recent advances in nanobiotechnology and high-throughput molecular techniques for systems biomedicine. Mol. Cells. 2013; 36: 477-484. Minireview.

31. Vos DP, Faas MM, Spasojevic M, et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. Inter. Dair. J. 2010; 20, 292-302. Review.

32. Della Porta G, De Vittori C, Reverchon E. Supercritical Assisted Atomization: A Novel Technology for Microparticles Preparation of an Asthma-controlling Drug. AAPS Pharm. Sci. Tech. 2005;6 (3).

33. Vijayaraghavan M, Stolnik S, Howdle MS. Illum L. Suitability of polymer materials for production of pulmonary microparticles using a PGSS supercritical fluid technique:Thermodynamic behaviour of fatty acids, PEGs and PEG-fatty acids. Int. J. Phar. 2012:438:225-231.

34. Navalakhe RM, Nandedkar TD. Application of nanotechnology in biomedicine. Ind. J. Exp. Biol. 2007; 45, 160-165. Review.

35. Bonifacio BV, Silva PB, Ramos MA, et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. Int. J. Nanomedicine 2014;9:1-15.

36. Huang Z, Li X, Zhang T, et al. Progress involving new techniques for liposome preparation. Asi. J. Pharm. Sci. 2014; 9: 176-182. Review.

37. Huang Q, Yu H, Ru Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. J. Food Sci. 2010; 1(75):50-56.

38. Wagner A, Vorauer-Uhl K. Liposome Technology for Industrial Purposes. J. Drug. Del. 2011:9. Review.

39. Szoka F, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large intestinal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. 1978:75(9):4194-4198.

40. Kizilay E, Kayitmzer B, Dubin LP. Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. Adv. Col. Int. Sci. 2011;167:24-37.

41. Bhattacharyya A, Argillier J-F. Microencapsulation by Complex Coacervation: Effect of Cationic Surfactants. J. Surface Sci. Technol. 2005:3-4(21):161-168.

42. Perignon C, Ongmayeb G, Neufeld R, Frere Y et all. Microencapsulation by interfacial polymerisation: membrane formation and structure. J Microencapsul. 2015;32(1):1-15.

43. Gavini E, Alamanni MC, Cossu M, Giunchedi P. Tabletted microspheres containing Cynara scolymus (var. Spinoso sardo) extract for the preparation of controlled release. Nutraceutical matrices. J. Microencapsul. 2005, *22*, 487–499.

44. Zhang L, Mou D, Du Y. Procyanidins: Extraction and micro-encapsulation. J. Sci. Food Agric. 2007, *87*, 2192–2197.

45. Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, González-Laredo RF, Harte F et all. Effect of high-pressure homogenization on the physical and antioxidant properties of quercus resinosa infusions encapsulated by spray-drying. J. Food Sci. 2010, *75*, N57–N61.

46. Sosa MV, Rodríguez-Rojo S, Mattea F, Cismondi M et all. Green tea encapsulation by means of high pressure antisolvent coprecipitation. J. Supercrit. Fluids 2011, *56*, 304–311.
47. Nakayama T, Kajiya K, Kumazawa S. Interaction of plant polyphenols with liposomes. Adv.Planar Lipid Bilayers Liposomes 2006, *4*, 107–133.
48. Fang JY, Hwang TL, Huang YL, Fang CL. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. Int. J. Pharm. 2006,310, 131–138.
49. Nori MP, Favaro-Trindade CS, Matias de Alencar S, Thomazini, M et all. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. LWT-Food Sci. Technol. 2011, 44, 429–435.

7. SAŽETAK

Polifenoli su široko rasprostranjeni sekundarni biljni metaboliti. Pokazuju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje zbog čega vlada veliki interes za razvojem polifenolnih dodataka prehrani.

Razvoj takvih pripravaka nailazi na određene probleme. Razlog tomu je velika osjetljivost polifenola na utjecaje iz okoliša. Osjetljivi su na svjetlost, temperaturu, ione metala i kisik. Također, uneseni peroralno, pokazuju nisku biodostupnost jer su većinom slabo topivi u vodi zbog čega im je smanjena apsorpcija, a neki od njih pokazuju nepoželjna organoleptička svojstva. Navedeni nedostaci su riješeni primjenom tehnika inkapsuliranja. Postoje brojne metode inkapsulacije koje se dijele na fizikalne, fizikalno-kemijske i kemijske. *Sušenje raspršivanjem* („*spray drying"*) fizikalna je metoda koja je ujedno i najviše primjenjivana. Sastoji se od nekoliko koraka od kojih atomizacija predstavlja najkritičniji. Atomizacija potpomognuta superkritičnim fluidom je još jedna fizikalna metoda. Ona koristi posebna svojstva koja karakteriziraju superkritični fluid. Najznačajniji korak u procesu je volumna ekspanzija otopine koja sadrži superkritični fluid pri čemu dolazi do oslobađanja topline te nastanka željenih čestica. *Liposomi* predstavljaju sferične sustave koji se i endogeno sintetiziraju u organizmu, a karakterizirani su fospolipidnim dvoslojem. Industrijski se pripremaju fizikalno-kemijskim metodama od kojih je hidratacija tankih fosfolipidnih dvosloja učestala. Nastali produkti su velike multilamelarne liposomske čestice. One se dalje mogu homogenizirati primjenom sonifikacije ili ekstruzije te se time dobiju male i velike unilamelarne čestice. *Evaporacija reverzne faze* predstavlja drugu metodu pripreme liposoma. Princip ove metode je priprema emulzije tipa ulje u vodi. *Kompleksna koacervacija* predstavlja kemijsku metodu inkapsuliranja u kojoj dolazi do udruživanja suprotno nabijenih makroinona oko željene supstance što se karakterizira kao koacervat i pri čemu dolazi do razdvajanja dvije nemješljive tekuće faze. Kao makroioni se najčešće primjenjuju želatina i arapska guma. *Polimerizacija na granici faza* je još jedna kemijska metoda inkapsuliranja. Ona je inače široko primjenjivana u industriji u produkciji sintetičkih materijala i karakterizira ju nastanak polimera na granici kapljica ili čestica otopljene tvari.

Premda su inkapsuliranjem nadvladani brojni problemi vezani uz primjenu polifenola, otvorena su nova područja za unaprjeđenje tehnike. U prvom se redu to odnosi na sigurnost takvih pripravaka jer se na taj način u organizam može unijeti puno veća količina polifenola nego standardnim unosom putem hrane. Zabrinutost izaziva i veličina čestica budući da se veće nanočestice mogu se nakupljati u vitalnim organima i tako stvarati problem nanotoksičnosti.

Polifenoli predstavljaju jako vrijedne tvari s pozitivnim učinkom na ljudsko zdravlje, a inkapsulacija vrlo uspješan način rješavanja problema vezanih uz njihovu primjenu. Inkapsulacija predstavlja polje koje se još uvijek usavršava budući da postoje potencijalni problemi vezani uz njenu primjenu u industriji dodataka prehrani.

8. SUMMARY

Polyphenols are widespread secondary plant metabolites. They show numerous positive outcomes on human health. Because of mentioned benefits, there is a huge interest for developing nutritional supplements containing polyphenols.

Developing such supplements shows particular problems. The reason for that is great polyphenol instability on influences from environment. They are sensitive to light, temperature, metal ions and oxygen. Also, peroral consumation results in low bioavailability because they mostly have poor watersolubility and low apsorption rate. Some of them show unpleasant organoleptic properties. Those deficiences are overcomed by incapsulation technologies. There are plenty of incapsulation methods which are grouped into physical, physico-chemical and chemical. *Spray drying* is mostly applied physical method. It consists of several steps from which atomisation is the most critic one. *Supercritical-assisted atomisation* is another physical method. It uses special properties characteristic to critical fluid. Most important step in process is volume expansion of solution containing supercritical fluid which results in release of heat and formation of desired particles. *Liposomes* represent spherical system also endogenously synthesized in organism, characterised by phospholipid bilayer. Industrially are prepared by physico-chemical methods from which hydration of thin phospholipid bilayer is frequently used. Resulting products are big multilamellar liposome particles. They can be homogenised by sonication or extrusion resulting in small and big unilamellar particles. *Reverse phase evaporation* represents another method used for liposome preparation. Principle of this method is prepartion of oil in water type of emulsion. *Complex coacervation* is chemical incapsulation method in which joining of opposite charged macroions occurs around desired substance what is characterised as coacervate and in which two immiscible liquid phases separate. Mostly used macroinos are gelatin and gum arabic. Interfacial polymerisation is another chemical incapsulation method. It is widely used in industry for production of synthetic materials. It is characterised by formation of polymer on line between droplets or particles of dissolved substance.

Although incapsulation provides solution for problems related with use of polyphenol supplements there are some new doors opened for improvement of technique. Mostly it refers on safety aspect of using such supplementation. Consummation of that nutritional supplements results in significant higher polyphenol levels in human organism compared to usual intake by food. Particle size also represent reason for worry. Larger nanoparticles can accumulate in vital organs and cause nanotoxicity problem.

Polyphenols represent very valuable substances with positive outcome on human health and incapsulation ensures successful way in solving problems related with their application. Incapsulation represents field that is still been improved due to potencial problems related with its application in nutritional supplement industry.

9. ŽIVOTOPIS

Lucija Ličanin je rođena u Zadru 24. ožujka 1992. Nakon osnovnoškolskog obrazovanja u školi „Šimun Kožičić Benje“ upisuje u Zadru opći smjer gimnazije „Franjo Petrić“ akademske godine 2005./2006. Pokazuje interes za prirodne i društvene znanosti te

kontinuirano sudjeluje na natjecanjima iz biologije u kojima ostvaruje uspjeh u vidu ostvarenog drugog mjesta na županijskom natjecanju akademske godine 2008./2009. Sudjeluje i na županijskom natjecanju iz filozofije akademske godine 2009./2010. te osvaja šesto mjesto. Upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije u Splitu akademske godine 2010./2011. Tečno govori, piše i razumije engleski jezik, a poznaje osnovnu razinu razumijevanja, pisanja i govora talijanskog jezika. Ima ljubav prema sportu te je trenirala jiu-jitsu, tae-kwon-do i crossfit u kojem osvaja treće mjesto u klupskom natjecanju kluba Elite fitness Zadar.