

# Bioraspoloživost fenolnih spojeva

---

**Budisavljević, Mateja**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:670137>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij – Prehrambena tehnologija**

**Mateja Budisavljević**  
**0058215430/PT**

**BIORASPOLOŽIVOST FENOLNIH SPOJEVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog projekta:** Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi (KK.01.1.1.04.0093), koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj- Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. -2020.

**Mentor:** prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac

**Zagreb, 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva  
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Bioraspoloživost fenolnih spojeva**  
**Mateja Budisavljević, 0058215430**

### **Sažetak:**

Cilj ovog preglednog rada bio je istaknuti važnost fenolnih spojeva, njihove potencijalne zdravstvene benefite, ulogu u prevenciji brojnih oboljenja te definirati faktore koji utječu na njihovu bioraspoloživost. U radu je prikazana klasifikacija fenolnih spojeva s obzirom na kemijsku strukturu prema kojoj se dijele na dvije osnovne skupine flavonoide i neflavonoide među kojima se najviše ističu fenolne kiseline. Također definirani su najznačajniji izvori fenolnih spojeva te su istaknuta njihova antioksidativna, protuupalna, antimikrobna, imunostimulirajuća, antikancerogena i brojna druga djelovanja. Definirana je bioraspoloživost fenolnih spojeva te faktori koji na nju utječu, kao i sam metabolizam fenolnih spojeva. Glavni čimbenici koji ograničavaju oralnu bioraspoloživost jesu biodostupnost, apsorpcija i transformacija polifenolnih spojeva. Kemijska struktura te molekulska težina fenolnih spojeva značajno utječu na bioraspoloživost fenolnih spojeva. Također, navedene su i potencijalne tehnike poput mikrokapsulacije, koje mogu utjecati na povećanje bioraspoloživosti fenolnih spojeva te su prikazane i najčešće metode koje se koriste za određivanje bioraspoloživosti fenolnih spojeva. Poznavanje kemizma fenolnih spojeva i bioraspoloživosti, mehanizama djelovanja i metoda njihovog praćenja imaju veliku važnost u proizvodnji funkcionalne hrane, dodataka prehrani i nutraceutika.

**Ključne riječi: bioraspoloživost, fenolne kiseline, flavonoidi, metabolizam fenolnih spojeva**

**Rad sadrži: 26 stranica, 3 slike, 3 tablice, 32 literaturnih navoda, 0 priloga**

**Jezik izvornika: hrvatski**

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambenobiotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor: prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac**

**Pomoć pri izradi:**

**Datum obrane: 08.07.2022.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Food engineering

Laboratory for drying processes and monitoring the stability of biologically active compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

**Bioavailability of phenolic compounds**

**Mateja Budisavljević, 0058215430**

### **Abstract:**

The aim of this review was to highlight the importance of phenolic compounds, their potential health benefits, their role in the prevention of many diseases and to define the factors that affect their bioavailability. The paper presents the classification of phenolic compounds with regard to the chemical structure according to which they are divided into two basic groups of flavonoids and non-flavonoids, among which phenolic acids stand out the most. The most important sources of phenolic compounds are also defined, and their antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, immunostimulatory, anticancer and many other effects are highlighted. The bioavailability of phenolic compounds and the factors that affect it are defined, as well as the metabolism of phenolic compounds. The main factors limiting oral bioavailability are bioavailability, absorption, and transformation of polyphenolic compounds. The chemical structure and molecular weight of phenolic compounds significantly affect the bioavailability of phenolic compounds. Also, potential techniques such as microencapsulation, which can increase the bioavailability of phenolic compounds, are listed, and the most common methods used to determine the bioavailability of phenolic compounds are presented. Knowledge of the chemistry of phenolic compounds and bioavailability, mechanisms of action and methods of their monitoring are of great importance in the production of functional foods, dietary supplements and nutraceuticals.

**Keywords: bioavailability, flavonoids, metabolism of phenolic compounds, phenolic acid**

**Thesis contains: 26 pages, 3 figures, 3 tables, 32 references, 0 supplements**

**Original in: Croatian**

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor: PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor**

**Technical support and assistance:**

**Defence date: 08.07.2022.**

## Sadržaj

<b>1.UVOD</b> .....	1
<b>2.TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. KLASIFIKACIJA FENOLNIH SPOJEVA.....	3
2.1.1. FENOLNE KISELINE.....	3
2.1.2. FLAVONOIDI .....	5
2.2. BIORASPOLOŽIVOST FENOLNIH SPOJEVA.....	11
2.2.1.MIKROENKAPSULACIJA KAO STRATEGIJA ZA POVEĆANJE BIORASPOLOŽIVOSTI POLIFENOLA .....	13
2.2.2. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM FENOLNIH KISELINA.....	14
2.2.3. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM FLAVONOLA .....	15
2.2.4. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM FLAVANOLA (FLAVAN-3-OLA) .....	16
2.2.5. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM ATNOCIJANA .....	18
2.2.6. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM IZOFLAVONA.....	19
2.3. <i>IN VITRO</i> METODE ODREĐIVANJA BIORASPOLOŽIVOSTI FENOLNIH SPOJEVA....	20
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	24
<b>4. LITERATURA</b> .....	24

## 1.UVOD

Fenolne spojeve danas pronalazimo u različitim prirodnim izvorima, prehrambenim proizvodima poput različitih vrsta voća i povrća, zelenog čaja, kave, vina, orašastih plodova te nutraceuticima i sl. Značajne skupine polifenolnih spojeva su fenolne kiseline i flavonoidi. Flavonoidi se dijele na flavonole, flavanole, flavone, flavanonone, izoflavone i antocijanine, a fenolne kiseline na hidroksibenzojeve i hidroksicimne kiseline. Veliki broj radova dokazao je da polifenoli imaju pozitivan utjecaj na zdravlje ljudskog organizma zbog njihovih antioksidacijskih i protuupalnih svojstava. Najvažnije svojstvo polifenola je njihova bioraspoloživost koja uvelike ovisi o njihovoj strukturi. Bioraspoloživost je ključna za bioefikasnost bioaktivnih sastojaka hrane tj. ona predstavlja odnos između namirnica i njihovih zdravstvenih dobiti, a glavni čimbenici koji utječu na nju su biodostupnost, apsorpcija i transformacija. Također, na bioraspoloživost utječe i matriks namirnica i prisutnost hrane u gastrointestinalnom traktu. Zbog toga je uspostavljen sustav klasifikacije za lijekove i nutraceutike kako bi se lakše odredila bioraspoloživost određenih spojeva. Spomenuta je i mikroenkapsulacija kao jedna od tehnika koja može značajno pridonijeti povećanju bioraspoloživosti i biodostupnosti fenolnih spojeva.

Cilj ovog rada je kratki pregled dosadašnjih spoznaja o bioraspoloživosti i faktora koji utječu na nju. U radu je ukratko prikazan i pregled metoda koje služe za ispitivanje bioraspoloživosti kao što su *in vivo* i *in vitro* metode. Oralna bioraspoloživost istraživana *in vitro* studijama daje potrebne informacije proizvođačima hrane i lijekova kako bi oni mogli učinkovitije formulirati sustav dostave same hrane ili lijeka te pomaže u određivanju doze biokomponenti kako bi se povećala zdravstvena korist i izbjeglo ili smanjilo rizik od toksičnosti. Procjena oralne bioraspoloživosti provedena *in vitro* metodama manje je točna od one provedene *in vivo* metodama, zbog razlike između uvjeta simulacije bioloških procesa i stvarnih bioloških procesa koji se odvijaju u ljudskom tijelu. Veliki broj *in vitro* studija dao je rezultate o blagotvorim učincima polifenola.

## 2. TEORIJSKI DIO

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti kojih je u prirodi identificirano preko 8000. Pripadaju fenilpropanoidima te sadržavaju barem jednu aromatsku jezgru i jednu ili više hidroksilnu skupinu (Di Lorenzo i sur., 2021). Zbog svoje kemijske strukture polifenoli su poznati kao jaki antioksidansi te imaju važnu ulogu u sprječavanju negativnih posljedica oksidativnog stresa. Imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje tako da preventivno djeluju pri nastajanju brojnih oboljenja ili da ublažavaju simptome brojnih bolesti uključujući dijabetes, kardiovaskularna oboljenja pa čak i neke vrste karcinoma u ranijim stadijima (Annunziata i sur., 2020).

Glavni izvori polifenola su različite vrste voća i povrća, zeleni i crni čaj, voćnih sokova, kave, crveno vino, sjemenke, žitarice i orašasti plodovi. Različiti začini i začinsko bilje poput kurkume, celera, peršina, mente, ružmarina, timijana, kadulje i đumbira također sadrže visoke udjele polifenola (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Jedna od vrlo važnih karakteristika fenolnih spojeva je njihova bioraspodivnost koja uvelike ovisi o kemijskoj strukturi. Kako bi se što bolje razjasnili mehanizmi djelovanja fenolnih spojeva kao i njihova bioraspodivnost važno ih je razmatrati u užem smislu u okviru skupina kojima pripadaju. U Tablici 1 prikazana je podjela fenolnih spojeva kao i izvori u kojima su najzastupljeniji.

**Tablica 1. Podjela fenolnih spojeva i najznačajniji izvori (prema Brglez Mojzer i sur., 2016)**

Vrsta fenolnih spojeva	Najznačajniji predstavnici	Prirodni izvori
<b>Fenolne kiseline</b>		
Hidroksibenzojeve	Galna kiselina	Bobičasto voće, ananas, banane, limuni, vino
Hidroksicimetne	Ružmarinska kiselina	Biljke iz porodice Lamiaceae
<b>Flavonoidi</b>		
Flavonoli	Kvercetin	Povrće (luk, brokula), voće (jabuka, marelica, bobičasto voće), orašasti plodovi, sjemenke, vino, kakao
Flavan-3-oli	<i>Epigallocatehin 3-O-galat</i>	Čaj, voće (jabuke, grožđe, bobice), crveno vino, čokolada
Antocijani	Pelargonidin	Bobice (maline, jagode, borovnice, kupine), šljive, šipak
Flavoni	Apigenin	Ljekovito i aromatično bilje (kamilica, peršin, origano, timijan) Grejp, naranče, luk
Flavanoni	Naringin	Citrusi, rajčica, aromatične biljke

Izoflavoni	Genistin	Mahunarke, najviše u soji
<b>Polifenolni spojevi</b>		
Stilbeni	Reservatrol	Crveno vino, grožđe, bobice, kikiriki

## 2.1. KLASIFIKACIJA FENOLNIH SPOJEVA

Polifenoli obuhvaćaju širok spektar kemijskih spojeva čiju strukturu čini jedan ili više fenolnih prstenova s nekoliko hidroksilnih skupina u njihovoj strukturi. Polifenolni spojevi se klasificiraju uzimajući u obzir različite aspekte (podrijetlo, biološku funkciju ili kemijsku strukturu) (Annunziata i sur., 2020), a prema najjednostavnijoj podjeli dijele se na neflavonoide i flavonoide.

Biosinteza fenolnih spojeva odvija se u putu šikiminske kiseline, a glavni prekursor u biosintezi većine fenolnih spojeva je fenilalanin. Konjugacijom hidroksilnih skupina osnovne strukture s jednim ili više ostataka šećera, karboksilnih ili organskih kiselina, amina, lipida ili fenolnih skupina nastaju različite strukture polifenola (Kondratyuk i Pezzuto, 2004). Prema broju fenolnih prstenova i skupina vezanih na njih fenoli se dijele na: flavonoide (flavonoli, flavanoli, flavoni, flavanoni, izoflavoni i antocijanini) i neflavonoidne molekule (fenolne kiseline, hidroksicimetne kiseline, lignane, stilbene i tanine), te polifenolne amide (Di Lorenzo i sur., 2021). Većina flavonoida u prirodi prisutna je u stabilnijoj formi glikozida, dok im je bioraspoloživost znatno veća kada se nalaze u formi aglikona (Singla i sur., 2019).

Osnovnu strukturu neflavonoida čini jedan aromatski prsten, a najznačajniji predstavnici su fenolne kiseline koje se dijele na hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne te njihove derivate. U polifenolne amide svrstavamo avenantramide i kapsaicinoide koji sadrže amidne skupine u svojim kemijskim strukturama. Zastupljeni su u različitim proizvodima kao npr. čili papričicama i proizvodima od zobi, a istraživanja upućuju na pretpostavku da imaju protuupalna i antioksidativna svojstva (Singla i sur., 2019).

### 2.1.1. FENOLNE KISELINE

Fenolne kiseline su neflavonoidni polifenoli, aromatski sekundarni biljni metaboliti koji imaju jedan fenolni prsten vezan na lanac od 1-3 ugljikova atoma. Čine važnu skupinu polifenola, a podijeljene su u dvije velike skupine: hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline s odgovarajućim derivatima (Stojevski, 2014). Pripadnici ovih podskupina fenolnih kiselina u prirodi se često nalaze u konjugaciji s drugim komponentama kao što su glukoza, kininska kiselina ili su povezane sa strukturnim komponentama izvorne biljke (Singla i sur., 2019). Najvažniji predstavnici



hidroksibenzojevih kiselina su galna (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) i elaginska (dilakton heksahidroksidifenske kiseline) kiselina (Brglez Mojzer i sur., 2016). Hidroksicimetne kiseline su u prirodnim izvorima zastupljenije od hidroksibenzojevih kiselina a, najpoznatije su kafeinska i ferulinska kiselina (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Fenolne kiseline u prirodnim izvorima prisutne u obliku estera, topljivih i akumuliranih u vakuolama ili netopivi kao komponente stanične stijenke, a zastupljene su u različitim udjelima u svim vrstama, voća i povrća, žitaricama, ali i prerađevinama poput čaja, kave, čaja, sokovima, vinima, maslinovom ulju (Stojevski, 2014). Udio hidroksibenzojeve kiseline je u jestivim biljkama relativno nizak (osim u određenom crvenom voću, crnim rotkvicama i luku, koji imaju značajno veći udio) (Pandey i Rizvi, 2009). Galnu kiselinu možemo pronaći u najvećem udjelu u jagodama, ananasu, bananama, limunu, crvenom i bijelom vinu, kori hrasta, te u različitim orašastim plodovima i čaju u slobodnom obliku, esterificirana s molekulama glukoze ili estera s katehinima ili proantocijanidinima (Brglez Mojzer i sur., 2016). Elaginska kiselina u biljkama je uglavnom prisutna u obliku glukozida ili kao dio hidroliziranih tanina, a najbogatiji izvori su različite vrste bobičastog i jagodastog voća, šipak, orasi (Brglez Mojzer i sur., 2016). Hidroksicimetne kiseline rijetko se nalaze u slobodnom obliku (osim u procesiranoj hrani), a u vezanom su obliku kao glikozilirani oblici ili esteri šikiminske i vinske kiseline.

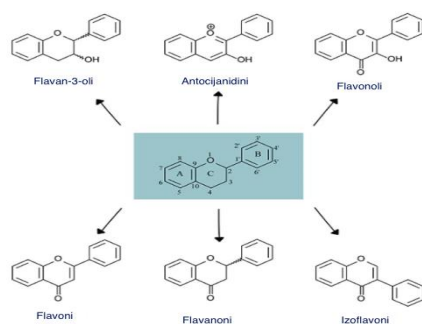
Najviše ih sadrži voće poput borovnica, kivija, šljiva, višnje i jabuke (Manach i sur., 2004). Kafeinska kiselina je najčešće esterificirana s kininskom kiselinom kao u klorogenskoj kiselini, što značajno smanjuje njenu apsorpciju. Nalazi se u raznim vrstama voća i povrća te je ključni supstrat za enzimsku oksidaciju koja dovodi do posmeđivanja, osobito u jabukama i kruškama (Brglez Mojzer i sur., 2016). Ferulinsku kiselinu možemo pronaći u rajčicama i pivu u slobodnom obliku i kao takva se učinkovito apsorbira u odnosu na onu u esterificiranom obliku koja se nalazi u stijenkama stanica zrna (u žitaricama) (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Važno svojstvo fenolnih kiselina je da imaju antioksidativno djelovanje tako da hvataju slobodne radikale (posebno hidroksilne i peroksidne radikale, superoksidne anione i peroksinitrite). Osim antioksidativnog djelovanja fenolne kiseline pokazuju i druga biološka djelovanja kao što su protuupalno, antibakterijsko, antivirusno, antimelanogeno, antimutageno i antikancerogeno djelovanje. Svoje biološke učinke ostvaruju kroz različite farmakološke i biokemijske puteve. Primjerice za galnu kiselinu se pretpostavlja da utječe na različite tipove tumora na više molekularnih razina pa je stoga jedna od bitnih biomolekula u terapijskoj upotrebi. Većina polifenola, pa tako i galna kiselina ima selektivnu citotoksičnost prema kancerogenim stanicama i malu ili skoro nikakvu toksičnost prema normalnim stanicama, što je poželjno svojstvo (Brglez Mojzer i sur., 2016). Pozitivni učinci elaginske kiselina na organizam očituju se antikancerogenim, antioksidativnim (prirodni je antioksidans), protuupalnim, antibakterijskim, antiateroskleroznim,

antihyperglikemijskim, antihipertenzivnim, antifibroznim i kardioprotektivnim djelovanjem. Uključena je u brojne procese koji sudjeluju u angiogenezi i metastazama nekoliko tipova raka. Također uzrokuje stanično specifične odgovore, što znači da je reaktivnija prema tumorskim stanicama od zdravih (normalnih) stanica. Mehanizam kojim inhibira inicijaciju tumora odvija se vezanjem na aktivno mjesto molekule DNA te na taj način sprječava progresiju stanica tumora. (Brglez Mojzer i sur., 2016). Hidroksicimetne kiseline također imaju slične učinke kao antioksidansi te inhibitori raka s antitumorskim i metastatskim svojstvima (Brglez Mojzer i sur., 2016).

## 2.1.2. FLAVONOIDI

Flavonoidi sačinjavaju najproučavaniju skupinu polifenola, a otkriveno ih je više od 6000. Svi flavonoidi dijele i osnovnu strukturu difenilpropana (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), tj. benzenski prstenovi A i B povezani su heterocikličkim prstenom C u čijoj strukturi se nalazi kisik. Strukturna raznolikost molekula flavonoida proizlazi iz varijacija u hidroksilaciji i stupnju oksidacije središnjeg heterocikličkog prstena, što rezultira širokim rasponom spojeva: flavanola, antocijanidina, antocijana, izoflavona, flavona, flavonola, flavanona. (Slika 1) (Manach i sur., 2004; Pandey i Rizvi, 2009). Varijacije u hidroksilaciji i stupnju oksidacije temelje se na prisutnosti ili odsutnosti dvostruke veze između drugog i trećeg ugljikovog atoma, te formiranju karbonilne skupine na četvrtom ugljikovom atomu (Stojevski, 2014). Najznačajnije grupe fenolnih spojeva zastupljene u prirodnim izvorima pripadaju flavonima, flavonolima, flavanonima i flavanonolima (Singla i sur., 2019).



**Slika 1.** Podjela flavonoida prema strukturi (Izvor: nepoznato)

Najviše proučavana skupina među flavonoidima su flavonoli, a najznačajniji spojevi ove skupine su kvercetin, kamferol i miricetin. U okviru ove skupine determinirana je značajna je varijabilnost te je do danas određeno i opisano oko 380 flavonol glikozida i 200 različitih kvercetin i kamferol

glikozida (Brglez Mojzer i sur., 2016). Flavonoli (dihidroflavonoli) su 3-hidroksi derivati flavanona, od kojeg se razlikuju po prisutnosti hidroksilne skupine na trećem ugljikovom atomu u prstenu (Singla i sur., 2019).

Flavanonoli (tzv. 3-hidroksiflavanon ili 2,3-dihidroflavonol) su u biljnim izvorima manje zastupljeni, a najznačajniji predstavnici ove skupine su: taksifolin (ili dihidrokvercetin), aromadrin (ili dihidrokamferol) i engeletin (ili dihidrokamferol-3-ramnozid).

Strukturu flavanola (flavan-3-oli) čini zasićeni heterociklički prsten, bez dvostruke veze između drugog i trećeg ugljikovog atoma, i hidroksilnu skupinu na trećem ugljikovom atomu. U hrani se nalaze isključivo kao aglikoni. Dodatno, mogu se naći i kao monomerne jedinice, koje se nazivaju katehini i epikatehini (Slika 2) te kao polimerni oblici, koji se nazivaju tanini. Tanine koji se nalaze u kompleksima s alkaloidima, polisaharidima i proteinima dijelimo na hidrolizirane i kondenzirane tanine (poznate kao proantocijanidine) (Singla i sur., 2019)

Kemijsku strukturu flavona čini karbonilna skupina na četvrtom ugljikovom atomu i heterociklički prsten koji ima zasićeni lanac s tri ugljikova atoma bez hidroksilne skupine na trećem ugljikovom atomu. Specifično za flavone je da postoji veliki broj supstituiranih derivata zbog jedinstvenih obrazaca supstitucije. Neki od najčešće prisutnih flavona su apigenin (4',5,7-trihidroksiflavan) i luteolin.

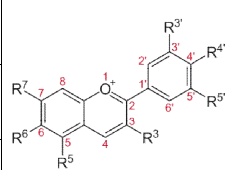
Flavanoni su skupina spojeva manje zastupljena u prirodnim izvorima a, najvažniji među aglikonskim oblicima flavanona su naringenin, hesperetin, izosakuranetin i eriodiktiol dok su glikozidni oblici flavanona klasificirani u dvije skupine: neohesperidozide i rutinozide (Brglez Mojzer i sur., 2016). Kemijsku strukturu flavanona karakterizira odsutnost dvostruke veze između drugog i trećeg ugljikovog atoma u prstenu i prisutnost kiralnog centra na drugom ugljikovom atomu. U biljkama se javljaju u raznim oblicima kao derivati *O*- ili *C*-glikozil, hidroksi, metoksi, metilendioksi, *C*-metil, *C*-benzil, *C*-hidroksi metil, *C*-formil i *C*-izoprenil. Najčešći flavanon glikozid je *hesperetin-7-O-rutinozid* (hesperidin), a neki od ostalih glikoziliranih flavanona koji postoje su didimin, eriocitrin, narirutin, naringin, neoeriocitrin i neohesperidin (Teng i Chen, 2019).

Izoflavoni su prirodni fitonutrijenti iz skupine flavonoida i nazvani su "fitoestrogeni" zbog učinka u ljudskom organizmu sličnog estrogenu. Najznačajniji prirodni izvori spojeva s fitoestrogenim djelovanjem su biljke iz porodice graha, *Fabaceae* (*Leguminosae*), posebno soje (*Glycine max L. Merr.*) (Brglez Mojzer i sur., 2016). Imaju heterociklički prsten pričvršćen na trećem ugljikovom atomu, a ne na drugom ugljikovom atomu.

Antocijanidini i antocijanini razlikuju se od ostalih flavonoida jer su prisutni u formi kationa zbog čega su jedna od najnestabilnijih struktura flavonoida. Antocijanini su glikozilirani oblik antocijanidina i za njih su karakteristične reakcije hidroksilacije i metoksilacije na prstenu središnjem heterocikličkom prstenu, a u Tablici 2 prikazano je 6 najzastupljenijih antocijana u prirodnim izvorima. Antocijani mogu biti prisutni u formi aglikona ili češće u obliku glikozida, a najčešći šećeri koji čine glikozidne forme su monosaharidi (npr. glukoza, galaktoza i arabinoza). Tako glikozilirani antocijanini su pigmenti koji su topljivi u vodi i prisutni su u šarenim cvjetovima i plodovima. U prirodi su antocijani najčešće prisutni u formi glikozida (Singla i sur., 2019). Do danas je identificirano preko 600 molekulskih struktura antocijana, a osim bioloških djelovanja spadaju i u kategoriju biljnih pigmentata koji su nosioci različitih nijansi od svjetlo crvenih preko ljubičastih pa gotovo do tamno plavih nijansi boja različitog voća, povrća, žitarica i cvijeća. Njihova boja ovisi o pH vrijednosti sredine u kojoj se nalaze (Brglez Mojzer i sur., 2016). Pri niskom pH, antocijani su prisutni u obliku kationa tj. imaju pozitivan naboj na atomu kisika u C prstenu, koji se naziva flavijev ion i pojavljuje se kao crveni pigment. Antocijanidini se klasificiraju na temelju broja i položaja hidroksilnih skupina na samoj molekuli flavonoida (Di Lorenzo i sur., 2021).

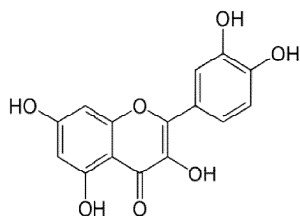
Najzastupljeniji antocijanini su glikozilirani oblici cijanidina, delfinidina, malvidina, peonidina, petunidina i pelargonidina. Šećerne komponente mogu se acilirati na položaju trećeg ugljikovog atoma piranskog prstena vezanjem npr. hidroksicimetnih kiselina (ferulinska, kafeinska i kumarinska) (Di Lorenzo i sur., 2021). Glavni izvori antocijana su sve vrste crvenog voća, poput aronije, malina, kupina, borovnica, višnje itd. (Brglez Mojzer i sur., 2016).

**Tablica 2. Odabrani antocijanidini i njihove zamjene (prema nepoznato)**

Antocijanidin	Osnovna struktura (R <sup>3</sup> & R <sup>4</sup> = -OH)	R <sup>3'</sup>	R <sup>5'</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>
Cijanidin		-OH	-H	-OH	-H	-OH
Delfinidin		-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidin		-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH
Peonidin		-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-H	-OH
Petunidin		-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH

Pelargonidin	-H	-H	-OH	-H	-OH
--------------	----	----	-----	----	-----

Flavonoide su u prirodnim izvorima najčešće zastupljeni u obliku glikozida (D'Archivio i sur., 2010; Tsao, 2010), a neki od značajnijih izvora su gotovo sve vrste voća i povrća poput, aronije, borovnica, kupina, malina, luka, kelja, poriluka, brokule, ljekovitog bilja, čaja, maslinovog ulja te crnog vina (Annunziata i sur., 2020). **Kvercetin** (Slika 2) se smatra glavnim antioksidansom u skupini flavonola u ljudskoj prehrani jer ga sadrži različito voće, povrće, pića, orašasti plodovi, sjemenke, cvijeće i kora a, najveći udio kvercetina imaju brusnica i luk (0,3 mg/g svježe težine), dok je njegov udio u zelenom čaju i crnom vinu nešto manji (10-25 mg/L). Ostale značajne flavonole poput **miricetina**, **kamferola** (3,4',5,7-tetrahidroksiflavon), **fisetina** i drugih također možemo pronaći u brojnim vrstama voća i povrća te gore navedenim prehrambenim izvorima (Calderon-Montano i sur.,2011; Brglez Mojzer i sur., 2016; Semwal i sur., 2016).



**Slika 2.** Kemijska struktura kvercetina  
(Izvor: nepoznato)

Flavoni poput **krizina**, **akacetina**, **hispidulina** i **tricina**, pronađeni su u celeru, peršinu i drugom bilju (Teng i Chen, 2019). Ipak najvažniji predstavnici ove skupine su **luteolin** i **apigenin** (4',5,7-trihidroksiflavon) (Singla i sur., 2019), koje pronalazimo u uobičajenom voću i povrću kao što su grejp, napitcima biljnog porijekla, peršin, luk, kamilica, naranče, čaj i pšenične klice. Najčešći izvor konzumiranog apigenina je u čaju pripremljenom od kamilice (Brglez Mojzer i sur., 2016). Luteolin se dobiva iz biljke *Reseda luteola*, a najčešće se može pronaći u lišću, kori, cvijetu djeteline i peludi ambrozije. Prehrambeni izvori luteolina su celer, brokula, artičoka, zelena paprika, peršin, timijan, maslačak, čaj od kamilice, mrkva, maslinovo ulje, paprena metvica, ružmarin i origano (Lin i sur., 2008).

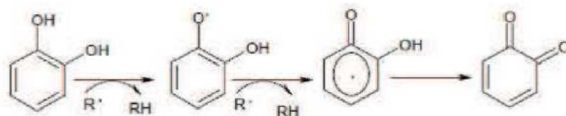
Flavanoni su skupina fenolnih spojeva koji nisu široko rasprostranjeni u brojnim vrstama voća i povrća te se uglavnom nalaze u agrumima i suhim šljivama. Glavni među aglikonskim oblicima flavanona su naringenin i hesperetin. Ipak, značajne količine flavanona u obliku aglikona rijetko su prisutne u prirodnoj hrani. Glikozidni oblici flavanona podijeljeni su u dvije skupine:

neohesperidozidi i rutinozidi (Brglez Mojzer i sur., 2016). U neohesperidozidi spadaju naringin, neohesperidin i neoeriocitrin te su oni odgovorni za gorak okus sokova od nekih agruma. Naringenin je flavanon s prevladavajućim udjelom u grejpu i pored toga se nalazi u raznom voću i bilju. Naringenin ima svoj glikozidni oblik, naringin (*naringenin-7-O-glikozid*), koji ima dodatak disaharida neohesperidoze vezan glikozidnom vezom na sedmom ugljikovom atomu (Salehi i sur., 2019). U ljudi se naringin unosom u organizam metabolizira u aglikon naringenin (koji nije gorak) pomoću enzima naringinaze prisutnog u crijevima. Sterička prepreka u strukturi naringina koju čine dvije šećerne jedinice čini ga manje učinkovitim od njegovog aglikonskog oblika, naringenina (National Center for Biotechnology Information, 2022). Predstavnici rutinozida su hesperidin, narirutin i didimin koji su prisutni u sokovima naranče, mandarine i limuna (Brglez Mojzer i sur., 2016). Hesperidin (*hesperetin 7-O-glikozid*) je glikolizirani oblik hesperetina, a značajniji izvori ovog spoja su limunu i slatka naranča. Nakon unosa hesperidina u organizam putem hrane on oslobađa svoj aglikonski oblik, hesperetin (Roohbakhsh i sur., 2015; Brglez Mojzer i sur., 2016).

Izoflavoni daidzein i genistein, su sa svojom strukturom 7-hidroksi-3-(4-hidroksi-fenil)-4H-1-benzopiran-4-on, 4H-1-benzopiran-4-on i 5,7-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on isključivo zastupljeni u mahunarkama, dok su u fermentiranim sojinim proizvodim izoflavoni prisutni u obliku aglikona zbog hidrolize glikozida.

Glavni izvori flavanola su kakao i tamna čokolada (1590 mg /100 g), također je i bobičasto voće kao što su jagode, jabuka, lješnjaci, pistacija i bademi, te crni čaj, zeleni čaj i crno vino (Di Lorenzo i sur., 2021).

Za fenolne spojeve, naročito flavonoide poznato je da imaju izraženo antioksidativno djelovanje, te su učinkoviti u uklanjanju slobodnih radikala, reguliranju aktivnosti enzima posredovane oksidativnim stresom i kelacijom prijelaznih metala koji su uključeni u procese formiranja radikala (Brglez Mojzer i sur., 2016). Različiti su mehanizmi antioksidativnog djelovanja slobodnih radikala, a zajedničko im je da neutraliziraju i djeluju kao hvatači slobodnih radikala i tako sprječavaju oštećenja staničnih molekula. Ulazeći u oksidativne reakcije sa slobodnim radikalima ( $R\bullet$ ), nastaju stabilniji i manje reaktivni oblici radikala, prema sljedećem mehanizmu: flavonoid-OH +  $R\bullet \rightarrow$  flavonoid (O $\bullet$ ) + RH. Noviformirani flavonoksi radikal (O $\bullet$ ) stabilizira se rezonancijom jer nespareni elektron može biti i postaje delokaliziran po cijelom aromatskom prstenu (Slika 3) (Irina i Mohamed, 2012). Do danas je proučavano i pokazano da flavonoidi mogu djelovati antibakterijski, protuupalno, antialergijsko i antitrombotično (Brglez Mojzer i sur., 2016).



**Slika 3.** Formiranje kvinona regiranjem flavonoksi radikala s nekim drugim slobodnim radikalom.

(Izvor: .Irina& Mohamed, 2012)

Kvercetin je građen od dva aromatična prstena povezana heterociklom koji sadrži kisik i zahvaljujući molekulskim svojstvima kvercetin ima ključnu ulogu u njegovim biološkim aktivnostima (Lee i sur., 2020). Sam po sebi djeluje kao snažan antioksidans budući da posjeduje sve strukturne funkcije koje omogućavaju maksimalan potencijal uklanjanja slobodnih radikala (Brglez Mojzer i sur., 2016), ali također ima i protuupalna, antibakterijska i antikancerogena svojstva. Kvercetin iz luka i njegovi derivati dodatno povećavaju enzimsku aktivnost crijevne mikrobiote, antioksidativno djelovanje krvi i aktivnost antitrombocita (Lee i sur., 2020). Za fisetin je dokazano antiproliferativne učinke na ljudske stanice raka prostate i selektivno smanjuje održivost kancerogenih stanica uz minimalne učinke na normalne epitelne stanice (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Apigenin je prirodni biljni flavon, koji ima snažan antioksidativni, antimutagen, protuupalni, antivirusni i purgativni učinak. Svoje protuupalno djelovanje pokazuje tako što blokira proizvodnju prostaglandina, hormona koji se luči tijekom upalnih procesa i djeluje kao vazodilatator (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Izoflavoni zbog svoje strukture vrlo slične sa ženskim hormonom, estrogenom, su posebno klasificirani kao receptori  $\beta$ -estrogena, koji onda mogu djelovati kao estrogenski agonisti i antagonisti koji se natječu za estradiol na kompleksu receptora (Teng i Chen, 2019). Od svih polifenola oni se najbolje apsorbiraju kod ljudi. Imaju brojne povoljne učinke npr. antioksidativno, antitumorsko i antilipogeno djelovanje. Fitoestrogeni soje zbog sastava i visokog udjela izoflavona pokazuju pozitivna djelovanja na osteoporozu, kardiovaskularne bolesti (arterioskleroza) i umjerene učinke na snižavanje krvnog tlaka (Brglez Mojzer i sur., 2016). Genistein je opisan kao inhibitor angiogeneze i kao fitoestrogen. Učinkovito djeluje i kao čistač superoksidnih i peroksinitritnih radikala nastalih iz enzimskih i neenzimskih sustava (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Antocijanini zbog svojih višestrukih bioloških učinaka imaju ulogu u poboljšanju kvalitete hrane koja promiče zdravlje, te su stoga od velikog interesa za prehrambenu industriju (u proizvodnji dodataka prehrani, prirodnih boja, itd.). Pridonose poboljšanju (noćnog) vida, inhibiraju tjelesnu

težinu i povećanje masnog tkiva; mogu pomoći kod pretilosti i dijabetesa a, pripisuje im se i sposobnost modulacije kognitivnih i motoričkih funkcija, za poboljšanje pamćenja (Brglez Mojzer i sur., 2016).

## 2.2. BIORASPOLOŽIVOST FENOLNIH SPOJEVA

Oralna bioraspoloživost (kada se lijek ili određena supstanca primjenjuje oralnim putem) ključna je za bio efikasnost bioaktivnih sastojaka hrane tj. ona predstavlja odnos između namirnica i njihovih zdravstvenih dobiti. Glavni čimbenici koji ograničavaju oralnu bioraspoloživost jesu biodostupnost (topljivost, interakcija s drugim komponentama), apsorpcija i transformacija, te je zbog toga uspostavljen sustav klasifikacije za lijekove i nutraceutike (Sustav klasifikacije biofarmaceutika i klasifikacijska shema nutraceutske bioraspoloživosti) (Dima i sur., 2020). Istraživanja su pokazala da je terapijski učinak biomolekule povezan s njezinim fizikalno-kemijskim i strukturnim karakteristikama, kao što su molekularna težina, lipofilnost, sposobnost interakcije s receptorima i transporterima itd. Također je utvrđeno da visoka molekularna težina utječe na njihovu bioraspoloživost (BA). Lipofilnost ima utjecaj na dva ključna parametra BA, a to su topljivost i propusnost. Visoka lipofilnost (sposobnost spoja da se otapa u nepolarom okruženju) smanjuje topljivost molekula u vodi i povećava njihovu propusnost (Dima i sur., 2020).

Oralna BA se izražava sljedećom jednadžbom [1] (Joye i sur., 2014.):

$$BA = F_C \cdot F_{B^*} \cdot F_{A^*} \cdot F_{T^*} (\%) \quad [1]$$

gdje je

$F_C$  —udio biokomponente od hrane do uzimanja

$F_{B^*}$  —djelić biokomponente kojemu je dostupna crijevna apsorpcija

$F_{A^*}$  — dio biokomponente apsorbiran kroz crijevni zid

$F_{T^*}$  —udio bioaktivnog spoja koji ostaje nakon kemijske i enzimske transformacije koje ulaze u sustavnu cirkulaciju i distribuiraju se u organe i tkiva (Dima i sur., 2020).

S obzirom na klasifikacijsku shemu nutraceutske BA, polifenoli imaju tri različite karakteristike, (i) nisku topljivost i slabu propusnost pri prolasku kroz staničnu membranu, (ii) visoku topljivost i lošu propusnost pri prolasku kroz staničnu membranu i (iii) nisku topljivost i visoku razinu propusnosti pri prolasku kroz staničnu membranu. Polifenoli su u hrani vezani glikozidnim vezama s različitim komponentama, uglavnom je to s vlaknima, a za učinkovitu apsorpciju potrebno je da prijeđe u aglikonski oblik. Polifenoli su zbog svoje kemijske strukture općenito stabilni u kiselom području i



razgrađuju se pod neutralno-baznim pH koji se javlja u želučanim i crijevnim uvjetima (Annunziata i sur., 2020).

Prema sustavu klasifikacije biofarmaceutike (BCS) smatra se da bioaktivni spoj ima visoku topljivost ako je oblik doziranja s trenutnim otpuštanjem koji sadrži najveću dozu topiv u volumenu od 250 mL (ili manje) vodenog medija na temperaturi od  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , unutar određenih pH raspona koji odgovaraju gastro intestinalim (GIT) segmentima. Smatra se da su tvari koje su topljive u volumenu većem od 250 mL slabo topljive. Smatra se da bioaktivni spoj ima visoku propusnost ako je brzina crijevne apsorpcije najmanje 90 % brzine apsorpcije istog spoja primijenjenog intravenozno u istoj dozi. Oblik doziranja s trenutnim otpuštanjem smatra se brzim otapanjem, ako se najmanje 85 % bioaktivne tvari otopi za najviše 30 min, korištenjem uređaja za otapanje USP-I pri 100 o/min, ili USP-II pri 50 o/min, u volumenu od pri najviše 900 mL HCl 0,1N ili simulirane želučane tekućine (SGF) (bez enzima), puferske otopine pri pH = 4,0 - 5,0 i pH = 6,0 - 8,0 ili simulirane crijevne tekućine (SIF) (bez enzima) (Dima i sur., 2020).

Klasa I: Visoka topljivost i visoka propusnost

Ova klasa uključuje bioaktivne spojeve koji imaju i visoku topljivost i propusnost. U tim spojevima, otapanje i apsorpcija su brzi procesi koji ne ograničavaju BA.

Klasa II: Niska topljivost i visoka propusnost

Ova klasa uključuje lipofilne spojeve niske topljivosti u GI tekućini i visoke propusnosti u sloju epitelnih stanica. Ograničavajući faktor BA je topljivost spoja u GI tekućinama.

Klasa III: Visoka topljivost i niska propusnost

Ova klasa uključuje hidrofilne spojeve, visoke topljivosti u crijevnim tekućinama, ali niskog kapaciteta za prolazak kroz GI membranu. U ovom slučaju, ograničavajući faktor BA je propusnost tvari kroz GI membranu. Zbog toga je za formulaciju ovih bioaktivnih spojeva potrebno koristiti pojačivače propusnosti, kao što su: sintetski tenzidi, žučne soli, masne kiseline, kelirajuća sredstva, natrijev salicilat, inkluzijski agensi i mukoadhezivni polimeri.

Klasa IV: Niska topljivost i niska propusnost

Spojevi koji čine ovu klasu imaju nisku topljivost i propusnost. BA ovih spojeva je vrlo niska te je važno primijeniti nove tehnike poboljšanja BA, kao što su samoemulgirajući sustavi za isporuku lijekova (SEDDS) ili samo mikroemulgirajući sustavi za isporuku lijekova (SMEDDS) (Dima i sur., 2020).

Ukoliko se preparati na bazi polifenola kategoriziraju kao nutraceutici prema nutraceutičkoj bioraspodjelivosti klasificiraju se prema tri glavna čimbenika koji ograničavaju BA: biodostupnost

(B\*), apsorpcija (A\*) i transformacija (T\*), kao i njihovi mehanizmi. Svaki glavni čimbenik uključuje druge čimbenike simbolizirane slovima koji označavaju mehanizme kojima utječu na BA (Slika 5). Nutraceutik čija je biodostupnost >75 % smatra se visoko biodostupnim nutraceutikom i označuje se s B\*(+), dok se nutraceutik čija je biodostupnost <75 % smatra relativno niskim biodostupnim nutraceutikom i označava se s B\*(-). Mehanizmi kojima djeluju tri faktora označeni su odgovarajućim slovima: oslobađanje (L), solubilizacija (S), interakcija (I), sloj sluzi (ML), čvrsti spojevi (TJ), dvoslojna propusnost (BP), aktivni transporter (AT), efluksni transporter (ET), kemijska razgradnja (C) i metabolizam (M). Prema istom algoritmu, visoko apsorpcijski nutraceutik označen sa A\*(+) može se razlikovati od one s niskom apsorpcijom A\*(-). Nutraceutik se smatra relativno stabilnim pri molekularnim transformacijama u GIT-u ako >75 % unesene količine ostane u bioaktivnom obliku, označenom s T\*(+), dok je nutraceutik koji se transformira u GIT-u > 25 % nestabilan spoj označen s T\*(-) (Dima i sur., 2020).

### 2.2.1. MIKROENKAPSULACIJA KAO STRATEGIJA ZA POVEĆANJE BIORASPOLOŽIVOSTI POLIFENOLA

Mikroenkapsulacija je tehnološki proces poznat od 70-ih godina koji je od značajne važnosti u farmaceutskoj industriji kako bi se poboljšala isporuka različitih spojeva do ciljanog tkiva. Definira se kao proces pakiranja kojim se tekućine, krute ili plinovite tvari ugrađuju u mikroskopske kapsule koje mogu biti veličine od milimetra do mikrometra, i koje se sastoje od kontinuiranih filmova, materijala za oblaganje (Annunziata i sur., 2020).

Mikroenkapsulacija je učinkovita tehnika koja uz primjenu optimalnih uvjeta može značajno povećati nisku biodostupnost fenolnih spojeva. Polifenoli su posebno osjetljivi na različite čimbenike, uključujući svjetlost, temperaturu i pH, što rezultira razgradnjom i posljedično smanjenjem njihove bioaktivnosti. Zbog posebne kemijske strukture imaju nisku topljivost u vodi, zajedno s aktivnošću enzima i fizikalno-kemijskim procesima u GIT-u, bioraspoloživost ovih spojeva je vrlo niska. Mikroenkapsulacija u ovom slučaju povećava njihovu topljivost u vodenoj sredini i štiti ih tijekom prolaska kroz GIT. Nadalje, može produljiti zadržavanje bioaktivnih tvari u crijevima mukoadhezijom i potaknuti endocitozu čestica što će posljedično rezultirati povećanjem apsorpcije i bioraspoloživosti inkapsuliranih polifenola (Annunziata i sur., 2020).

**Tablica 3.** Glavni čimbenici koji utječu na bioraspoloživost prehrambenih polifenola u ljudskom organizmu (prema D\*Archivio i sur., 2010)

<b>Vanjski faktori</b>	Čimbenici okoliša (tj. izlaganje suncu, stupanj zrelosti); dostupnost hrane
<b>Čimbenici povezani s preradom hrane</b>	Termički tretmani; homogenizacija; liofilizacija; kuhanje i metode kulinarske pripreme; skladištenje
<b>Čimbenici povezani s hranom</b>	Prehrambena matrica; prisutnost pozitivnih ili negativnih učinaka apsorpcije (tj. masti, vlakna)
<b>Interakcija s drugim spojevima</b>	Veže se s proteinima (tj. albuminom) ili s polifenolima sa sličnim mehanizmom apsorpcije
<b>Čimbenici povezani s polifenolima</b>	Kemijska struktura; koncentracija u hrani; uveden iznos
<b>Čimbenici povezani s domaćinom</b>	Crijevni čimbenici (tj. aktivnost enzima; vrijeme prolaska kroz crijeva; mikroflora debelog crijeva). Sistemske čimbenici (tj. spol i dob; poremećaji i/ili patologije; genetika; fiziološko stanje)

#### 2.2.2. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM FENOLNIH KISELINA

Na bioraspoloživost fenolnih kiselina utječu brojni faktori poput kemijske strukture te oblika u kojem se unosi u organizam. Apsorpcija im ovisi o oslobađanju iz matrice hrane, a neka istraživanja su dokazala da se apsorpcija povećava s dozom. Ferulinska kiselina je često kovalentno vezana na staničnu stijenku žitarica, te se tako oslobađa u debelom crijevu, mikroflorom i apsorbira u debelom crijevu. Najviše se putem hrane u ljudski organizam unosi kafeinska kiselina u obliku klorogenske kiseline. Fenolne kiseline ne mogu se ekstrahirati organskim otapalima jer se pojavljuju kao netopivi kovalentni kompleksi, povezani s polimerima stanične stijenke putem esterskih i glikozidnih veza. Vezane fenolne kiseline mogu se osloboditi prije ekstrakcije pomoću bazične hidrolize, kisele hidrolize ili oboje (Scholz, 2007).

Zbog ograničene distribucije hidroksibenzojevih kiselina u hrani, vrlo se malo zna o njihovoj apsorpciji i metabolizmu. Neke studije pokazuju da se galna kiselina iznimno dobro apsorbira u usporedbi s drugim polifenolima. Međutim, galna kiselina postoji u malim količinama i različitim oblicima u voću, orašastim plodovima, čaju i crnom vinu u slobodnom obliku, esterificirana u

glukoza (kao kod hidroliziranih tanina) ili esterificirana u katehine ili proantocijanidine (kao kod kondenziranih tanina) (Brglez Mojzer i sur., 2016). Elaginska kiselina je uglavnom prisutna u obliku glukozida ili kao dio hidroliziranih tanina (estera glukoze) zvanih elagitanini (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Najčešće hidroksicimnetne kiseline su kafeinska i ferulinska kiselina. Ferulinska kiselina u rajčicama i pivu pojavljuje se u slobodnom obliku i kao takva se učinkovito apsorbira za razliku od one u esterificiranom obliku koji se nalazi u stijenkama stanica zrna (npr. u žitaricama). Esterifikacija kafeinske kiseline, kao kod klorogenske kiseline, značajno smanjuje njezinu apsorpciju (Brglez Mojzer i sur., 2016).

### 2.2.3. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM FLAVONOLA

Za polifenole koji su u hrani prisutni kao glikozidi, dio šećera vezanog za njih ima značajno najveći učinak na apsorpciju u usporedbi s bilo kojim drugim čimbenikom jer se u takvom obliku aktivno apsorbiraju u tankom crijevu. Ovisno o uvjetima i matrica hrane također utječe na bioraspoloživost, iako u odnosu na vezani šećer u puno manjoj mjeri. Posebice se taj utjecaj vidi kod jednog od glavnih flavonola, kvercetin i njegovih metabolita te je kod njih bitna i topljivost koja je modificirana etanolom, mastima i emulgatorima. Topljivost je ključna jer se njome određuje biodostupnost spoja enterocitu. Molekula koja je lipofilna bit će više topljiva u mastima te će za njenu apsorpciju biti potrebna ugradnja u miješane micelle, dok molekula koja je hidrofilna će s time biti dobro topljiva u vodi i za njenu apsorpciju ona će se solubilizirati u vodenom matriksu. Raspon flavonola je široki kreće se od onih dobro topivih u vodi do onih koji su manje hidrofilni. S obzirom, da se flavonoli u hrani nalaze većinom u glikoliziranom obliku vrlo su dobro topljivi u vodi (Scholz, 2007).

Kvercetin je prisutan u luku kao glikozid, ali u čaju kao rutinozid (glukoza i ramnoza) te se iz ova dva izvora apsorbira vrlo različitim farmakokinetikom. Znatno se bolje apsorbira kada je vezan na glukoza. Razlog je u zbog hidrolize kvercetin glikozida koja se odvija u tankom crijevu, a katalizirana je glukozidaza enzimima koji se nalaze na granici četkice tankoga crijeva (osobito laktaza-florizin hidrolaza), nakon čega se učinkovitije apsorbira. U odnosu na to, hidroliza rutinozida odvija se u debelom crijevu katalizirana enzimima mikroflora. Iako vezani šećera ima veliki učinak na apsorpciju, kvercetin se zapravo apsorbira kao aglikon nakon što se ukloni šećera, a zatim se konjugira u enterocitu. Kvercetin kada se daje kao glikozid ima dugi poluvijek u plazmi, a kratak  $t_{max}$  [vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije u plazmi ( $C_{max}$ )] (Scholz, 2007).

U istraživanju Wolfram i sur. (2003; 2004) ispitali su utjecaj prisutnosti mesnog matriksa ili sadržaja masti na apsorpciju kvercetina u svinja. Uspostavljena je preferencijalna apsorpcija *kvercetin-3-O-glukoze* iz mesne matrice u odnosu na standardnu prehranu. Niži udio glukoze i veći udio masti u mesu, kao i veća koncentracija *kvercetin-3-O-glukoze* u samom mesu mogu poslužiti kao moguće objašnjenje za bolju apsorpciju. Najveća apsorpcija kvercetina bila je kod prehrane koja je sadržavala 17 % masti u usporedbi s kontrolnom prehranom s 3 % masti. Daljnje povećavanje udjela masti u prehrani nije dovelo do povećanja bioraspoloživosti. Prisutnost masti poboljšala je ugrađivanje kvercetina u miješane micelle, a time i dovela do olakšane apsorpcije kroz membranu ruba čestice. Međutim, istraživanjima nije dokazano da kvercetin zahtijeva miješane micelle za svoju apsorpciju, ili da prisutnost miješanih micela pogoduje apsorpciji kvercetina.

Veit i sur. (2001) proveli su istraživanje koje se temelji na konceptu kako matrica hrane utječe na apsorpciju rutina, i to u ljudi, davan kao čisti spoj ili kao prirodno prisutan u čaju od heljde. Ovdje je uočen samo mali učinak na apsorpciju rutina, najvjerojatnije zbog iznimne hidrofilnosti rutina i njegovog dobrog otapanja u GIT-u kada se daje kao krutina.

#### 2.2.4. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM FLAVANOLA (FLAVAN-3-OLA)

U odnosu na druge skupine flavonoida, flavanoli se u hrani nalaze samo kao aglikoni ali, mogu postojati i kao monomerne jedinice, te kao polimerni oblici. U odnosu na polimerne flavanole, monomerne jedinice pokazuju dobru topljivost u vodi i relativno visoku molekularnu težinu (Singla i sur., 2019).

Provedeno je istraživanje utjecaja reakcija epimerizacije izazvanih toplinskom obradom s usporedbom bioraspoloživosti nastalih epimera s njihovim odgovarajućim prekursorima na štakorima. Tijekom uvjeta visoke temperature, pH, te određenih procesa, (-) -epikatehin se konvertira u (-) -katehin, a (+) -katehin u (+) -epikatehin. Na isti način, (-) -EGCG (epigalokatehin galat) se konvertira u (-) -galokatehin galat. Provedeno je istraživanje gdje je jedna doza smjese koja je sadržavala katehine i njihove epimere davana je oralno ili intravenozno. Zaključno, (-) -katehin, (-) -katehin galat i (-) -galokatehin galat slabije su se apsorbirali u usporedbi sa svojim prethodnicima (-) -epikatehin, (-) -epikatehin galat i (-) -EGCG. Također je potvrđeno u izravnom pokusu perfuzije tankog crijeva na štakorima, da se (-) oblik katehina apsorbira u puno manjoj mjeri od prirodnog (+) oblika, što se djelomično objašnjava činjenicom da je (-) oblik manje metiliran (Scholz, 2007). Flavanoli se slabije apsorbiraju od kvercetina (falovonol) i pojavljuju se u krvi uz vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije u plazmi ( $C_{max}$ ) od oko 2 h.

Na apsorpciju flavanola, posebice katehina iz zelenog čaja, utječu reakcije epimerizacije koje se javljaju tijekom obrade, prisutnost lipida i ugljikohidrata, a apsorpcija se dodatno poboljšava s prisutnošću piperina i vinske kiseline. Piperin, sastojak papra, povećao je apsorpciju EGCG kod miševa. Za to povećanje može biti odgovorna i inhibicija glukuronidacije EGCG u tankom crijevu (iako je već niska) i kašnjenje u gastrointestinalnom tranzitnom vremenu piperina (Scholz, 2007). Dodavanje fosfolipida u pripravak zelenog čaja povećalo je koncentraciju EGCG u plazmi, što ukazuje da bi lipidi mogli biti važni za apsorpciju flavanola (Scholz, 2007).

Provedeno je ispitivanje gdje su se pojedinačne doze ekstrakta zelenog čaja konzumirale natašte ili uz lagani doručak. Chow i sur. (2005) proveli su istraživanje u kojem su primjenjivane tri razine doze čaja u rasponu od 400-1200 mg. Uočeno je značajno povećanje EGCG-a, u plazmi u kojoj nije bilo EGCG, kada je primjenjivan u odsutnosti hrane u usporedbi s primjenom uz doručak. Maksimalna koncentracija slobodnih oblika EGCG, epigalokatehina i epikatehin galata bila je značajno veća kod primjene natašte. Iz toga možemo zaključiti da konzumacija katehina zelenog čaja s hranom pod određenim uvjetima može negativno utjecati na apsorpciju (smanjena apsorpcija).

Međutim, Schantz i sur. (1998) proveli su još jedno istraživanje na dobrovoljcima koji su primili tri doze zelenog čaja bez kofeina, koji sadrži do 330 mg EGCG. Ovo istraživanje nije pokazalo linearno povećanje koncentracije EGCG-a u plazmi s danom dozom.

U trećoj studiji Kimure i sur. (2002), dobrovoljci su dobili dozu katehina zelenog čaja (164 mg) u usporedbi s 2 doze istog katehina zelenog čaja (svaka od 164 mg) u razmaku od 2 h. Koncentracije EGCG u plazmi nakon ovog dvostrukog uzimanja bile su neznatno, ali ne i značajno veće nego nakon pojedinačne doze (u vremenskom periodu 180 min nakon uzimanja). U dodatnom eksperimentu istražen je učinak ponovljenih uzimanja katehina zelenog čaja 3 puta dnevno u periodu od jednog tjedna. Dokazano je da su se koncentracije EGCG-a značajno povećale nakon tjedan dana u usporedbi s koncentracijom prije prvog uzimanja. Zaključak je da je kontinuirani dnevni unos važan za održavanje visoke koncentracije EGCG-a u plazmi.

Također, potvrđeno je da alkohol ima samo minimalan učinak na apsorpciju flavanola, nakon što je provedeno istraživanje u kojem se uspoređivala konzumacija katehina u vinu s konzumacijom katehina u dealkoholiziranom vinu kod zdravih dobrovoljaca u dvije studije. Rezultati nisu pokazali značajne razlike u koncentraciji katehina u plazmi (Scholz, 2007).

Schramm i sur. (2003) istraživali su utjecaj druge hrane na apsorpciju katehina i epikatehina iz kakaa i pokazali da istodobna konzumacija kruha, šećera ili soka od grejpa utječe na bioraspoloživost flavanola kod ljudi. Konzumiranje hrane bogate ugljikohidratima rezultiralo je značajnim povećanjem koncentracije flavanola u plazmi u odnosu na uzimanje samog kakaa, dok su interakcije protein-flavanol ili lipid-flavanol imale minimalne učinke na njihovu bioraspoloživost.

Silberberg i sur. (2005) uspoređivali su bioraspoloživost i metabolizam kvercetina i katehina kada se daju odvojeno ili zajedno u prehrani štakora. Istodobna primjena ovih flavonoida otkrila je da se koncentracija metabolita u plazmi značajno smanjila za 35 % za kvercetin i 28 % za katehin. Zaključujemo da na smanjenu bioraspoloživost utječe kompetitivna interakcija između ova dva spoja tijekom probave.

Što se tiče procijanidina, ti spojevi imaju smanjenu bioraspoloživost, koja je oko 100 puta niža od bioraspoloživosti monomernih jedinica flavanola. Biološki učinci općenito su posljedica monomernih jedinica nastalih nakon želučane razgradnje, koje se mogu brzo apsorbirati u crijevima. Crijevna mikrobiota je također odgovorna za stvaranje metabolita (*m-hidroksifenilpropionska kiselina*, *m-hidroksifeniloctena kiselina*, fenilpropionska kiselina, feniloctena kiselina, hidroksifenilvalerinska kiselina i benzojeva kiselina između ostalih), koji bi mogli biti odgovorni za različite biološke učinke (Di Lorenzo i sur., 2021). Unatoč činjenici da im je bioraspoloživost niska, bioraspoloživost flavanola veća je u usporedbi s ostalim skupinama flavonoida (Teng i Chen, 2019).

#### 2.2.5. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM ANTOCIJANA

Antocijani su u prirodi prisutni kao glikozidi kojima se pripisuju biološka svojstva (Brglez Mojzer i sur., 2016). U prirodnim oblicima polifenoli se ne mogu apsorbirati, a da bi se apsorbirali moraju se hidrolizirati uz pomoć crijevnih enzima ili mikroflora debelog crijeva. Antocijanini predstavljaju iznimku, jer se kao intaktni glikozidi mogu apsorbirati i detektirati u cirkulaciji. (D'Archivio i sur., 2010).

Bioraspoloživost antocijana je iznimno niska: samo oko 1-2 % zadržava svoju izvornu strukturu nakon konzumiranja. Glavni kemijski oblici antocijanina u želucu, pri pH 1,5-3 nalaze se u obliku flavijskih kationa, dok u crijevnom okolišu prevladavaju karbonilni oblici koji, imaju manju apsorpciju. Osim toga, tijekom prolaska kroz GIT dolazi do biotransformacije tj. metaboličkih procesa faze II (glukuronidacija, sulfatizacija i metilacija) te enzimskog i mikrobiotskog katabolizma. Oni dovode do nekoliko kemijskih spojeva, a to su antocijanin glukuronid, fenolne

kiseline (ferulinska kiselina, kafeinska kiselina, vanilinska kiselina, galna kiselina, protokatehinska kiselina, siringinska kiselina i 4-hidroksibenzojeva kiselina) i aldehidi (floroglucinaldehid) (Di Lorenzo i sur., 2021). Glavni razlog za nedovoljno razjašnjen mehanizam biorasploživosti antocijana je nemogućnost jasnog definiranja metaboličkih procesa nakon uzimanja te zbog velikog broja produkata razgradnje koji se brzo proizvode *in situ* (Brglez Mojzer i sur., 2016). Stupanj bioaktivnih svojstava antocijana uvelike ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi (položaju, broju i vrsti supstituenata) te o njihovoj unutarstaničnoj lokalizaciji.

Procijenjeni dnevni unos antocijanidina varira između 500 mg i 1 g, međutim, lako može doseći nekoliko g kada pojedinac konzumira flavonoidne dodatke kao što su ekstrakti sjemenki grožđa, ginkgo biloba ili piknogenol. Sinergijsko djelovanje flavonoida (uglavnom antocijana) također je odgovorno za antitrombotičnu aktivnost crnog vina i soka od grožđa, što bez jakih interakcija između komponenti kožice grožđa i sjemenki grožđa ne bi bilo moguće (Brglez Mojzer i sur., 2016).

#### 2.2.6. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM IZOFLAVONA

Jedini izvor izoflavona su proizvodi dobiveni od soje, pa tako ovisno o vrsti pripravka od soje, izoflavoni mogu biti prisutni kao aglikoni ili glikozidi (Di Lorenzo i sur., 2021). Od svih polifenola, oni se najbolje apsorbiraju u ljudskom organizmu.

Njihova biorasploživost pretežno ovisi o aktivnosti crijevne mikroflore. Stoga se apsorpcija izoflavona i korisni učinci koji im se pripisuju mogu uvelike razlikovati među pojedincima. Biorasploživost i apsorpcija izoflavonskih aglikona i glikozida još uvijek su nejasne jer studije pokazuju kontradiktorne rezultate. Stoga je još uvijek nepoznato koji se od ovih dvaju oblika bolje apsorbira, jer neke od provedenih studija nisu pronašle značajne razlike u učinkovitosti apsorpcije između aglikona i glikozida. Međutim, u jednom ispitivanju su dobiveni rezultati da je proizvodnja equola (derivat daidzeina koji proizvode anaerobne bakterije s velikim estrogenskim potencijalom (Di Lorenzo i sur., 2021) značajno veća nakon uzimanja daidzina (glikozidni oblik), nego nakon uzimanja daidzeina (aglikonski oblik) (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Biorasploživost soje bi se mogla značajno povećati korištenjem  $\beta$ -glukozidaza za pretvorbu izoflavonskih glikozida i aglikona, poboljšavajući njihove prednosti za primjenu putem hrani. Daidzein se brzo izlučuje urinom, dok genistein ulazi u enterohepatičnu reciklažu. Prijavljeno je da je apsorpcija daidzeina u GIT-u bila vrlo loša, a apsolutna apsorpcija je bila samo 6,1 % u štakora nakon oralne primjene (Teng i Chen, 2019). Farmakokinetičke studije pokazale su da genistein



također ima <15 % apsorpcije kod ljudi kroz oralnu primjenu (Teng i Chen, 2019). Na primjer, pokazano je da je ubrizgani genistein učinkovitiji u inhibiciji transplantiranih tumora nego ako se konzumira oralno. Iako je sistemska bioraspoloživost značajno viša za genistein nego za daidzein.

U studiji Lamberta i sur. (2017), postignuti su pozitivni učinci, objašnjeni primjenom probiotičkih bakterija mliječne kiseline (BMK) u liječenoj skupini u kombinaciji s izoflavonima, koji su onda posredovali u proizvodnji equola. Budući da nijedan od ispitanika nije mogao proizvesti equol na početku studije, a nakon šest mjeseci liječenja, 55 % osoba u skupini koja je uzimala ekstrakt crvene djeteline (bogat izoflavonima) proizvodilo je equol. Razlog je vjerojatno da su probiotici BMK pozitivno utjecali na crijevno-bakterijski uzorak sudionika, promičući pozitivnije uvjete za proizvodnju equola. Ova hipoteza potvrđena je činjenicom da su u obje studije pronađene visoke razine equola u plazmi (Di Lorenzo i sur., 2021).

Zaključno je da na doze izoflavona u plazmi mogu utjecati izvor varijacija, kompleks hrane, razlika u prehrani, učestalost unosa, razlika između spola i dobi (Teng i Chen, 2019).

### 2.3. *IN VITRO* METODE ODREĐIVANJA BIORASPOLOŽIVOSTI FENOLNIH SPOJEVA

*In vivo* testovi se smatraju "zlatnim standardom" za procjenu procesa adsorpcije, distribucije, metabolizma, izlučivanja i toksičnosti (ADMET) zbog prednosti proučavanja bioloških mehanizama u identičnim ili sličnim uvjetima kao u ljudskom tijelu. Nedostaci ovih testova su: potrebno dugo vrijeme za istraživanje, mali kapacitet istraživanja, utjecaj čimbenika koje je teško kontrolirati, niska ponovljivost rezultata, visoka cijena, smanjena mogućnost istraživanja fizikalno-kemijskih tvari i bioloških procesa u svakom segmentu GIT-a te određena etička ograničenja. Kako bi se uklonili ili smanjili neki od nedostataka *in vivo* metoda, razvijen je veliki izbor *in vitro* metoda za istraživanje svakog od glavnih čimbenika koji ograničavaju bioraspoloživost biokomponenti. Prednosti metode istraživanja *in vitro* su da: zahtijevaju kraće razdoblje istraživanja i omogućuju uzorkovanje i analizu više uzoraka, kompletan proces probave može se proučavati za cijeli GIT ili samo za pojedini segment GIT-a, može se proučavati interakcija nutraceutika s različitim komponentama (lipidima, proteinima, polisaharidima, itd.), može se kontrolirati više faktora (pH, temperatura, koncentracija, prisutnost enzima itd.), rezultati su ponovljivi, relativno su jeftini i tehnološki jednostavni te bez ikakvih etičkih ograničenja. Pomoću *in vivo* metoda moguće je procijeniti ponašanje nutraceutika u simuliranim GI tekućinama, te analizirati svaki od tri glavna čimbenika koji utječu na BA, a to su biodostupnost, apsorpcija i transformacija (Dima i sur., 2020).

Oralna bioraspoloživost istraživana *in vitro* studijama daje potrebne informacije proizvođačima hrane i lijekova kako bi oni mogli učinkovitije formulirati sustav dostave same hrane ili lijeka, te pomaže u određivanju doze biokomponenti kako bi se povećala zdravstvena korist i izbjeglo ili smanjilo rizik od toksičnosti. Procjena oralne bioraspoloživosti provedena *in vitro* metodama manje je točna od one provedene *in vivo* metodama, zbog razlike između uvjeta simulacije bioloških procesa i stvarnih bioloških procesa koji se odvijaju u ljudskom tijelu. Pokusima *in vitro* metodom ne mogu se osigurati uvjeti za potpuno istraživanje apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja bioaktivnih tvari specifičnih za žive sustave (Dima i sur., 2020).

### **In vitro modeli simulacije probave**

Procese u GIT-u svrstavamo u dvije kategorije, iako se oni odvijaju istodobno: mehanička razgradnja, tijekom koje se komadi hrane degradiraju na manje komadiće, te enzimska razgradnja, kojom se složeniji spojevi, odnosno makromolekule, razgrađuju na manje molekule koje se zatim lakše mogu apsorbirati u sistemsku cirkulaciju. Da bi se odredila bioraspoloživost spojeva, najtočniji model bi bilo *in vivo* ispitivanje ljudske probave, ali zbog navedenih nedostataka u tu svrhu se koriste *in vitro* metode. One moraju strogo oponašati fiziološke procese te biti fleksibilne i točne, a rezultati reproducibilni. *In vitro* simulacije probave se na temelju svoje kompleksnosti, dijele na statične i dinamične modele (Horvat, 2020).

Statični model simulacije probave je najčešće korištena metoda kod ispitivanja biodostupnosti spojeva. Simulacija probave je u ovom modelu podijeljena u dvije faze, gastričnu i intestinalnu fazu, a odvijaju se u istom odjeljku. Tijekom gastrične faze pomiješa se homogenizirana hrana, enzim želuca pepsin, pH se namjesti na 1–2 i temperatura na 37 °C, a reakcija se ovisno o uzorku provodi u vremenskom periodu od 1 do 3 h. Zatim slijedi intestinalna faza u istom odjeljku. Kako bi je učinili što sličnijom ljudskoj probavi, tijekom intestinalne faze u smjesu je potrebno dodati enzime gušterače s ili bez žučnih soli te namjestiti pH na 6-7. Postupak je jeftin, praktičan te je moguće brzo i lako obraditi više uzoraka istovremeno. Unatoč svim prednostima, ovim modelom se ipak ne može predočiti dinamički fiziološki odgovor tijela na bolus hrane. Također, tijekom procesa statičkog modela simulacije probave, koristi se mehanička miješalica, koja ne oponaša vjerodostojno stvarnu peristaltiku GIT-a (Horvat, 2020).

Dinamični model simulacije probave je razvijen jer statični modeli ne mogu adekvatno simulirati dinamiku probavnog sustava. Iako ovaj model najbliže reproducira uvjete u GIT-u, nedostatak je što je vrlo skup, zbog same opreme i skupih materijala, enzima i probavnih tekućina koje je potrebno

nabaviti te je potrebno uložiti znatno više rada i vremena. Razvijeno je nekoliko modela za različite potrebe eksperimenata, a neki od osnovnih su navedeni niže u odjeljku.

Takvi modeli, na temelju *in vivo* podataka, točnije reproduciraju ljudski probavni sustav. Aparatura se sastoji od dva povezana dijela. Prvi dio koji predstavlja tijelo želuca i drugi dio koji predstavlja antrum. Aparatura završava s ventilom kroz koji prolaze manji komadi bolusa dok se veći vraćaju natrag u prvi dio aparature na dodatnu razgradnju. Zbog svoje kompleksnosti, takav model se koristi kako bi se potvrdili rezultati statičnih modela. Dinamični gastrični model međutim, ne predstavlja ispravno peristaltiku želuca, pa je stoga osmišljen ljudski gastrični simulator, koji se sastoji od fleksibilnih komora napravljenih od lateksa.

Navedenim modelima ispituje se utjecaj želuca na bolus hrane što nam daje samo djelomični uvid u probavu. Da bi u potpunosti istražili biodostupnost i razgradnju spojeva koji nas zanimaju, potrebno je uvrstiti sve dijelove probavnog sustava zajedno sa stvarnim trajanjem tog procesa. U tu svrhu, razvijeni su dinamični modeli s dva ili više odjeljaka (Horvat, 2020).

Jedan od najtočnijih *in vitro* modela *in vivo* probave je TIM-1 (*eng. TNO Gastro-Intestinal Model 1*) koji sadrži 4 različita odjeljaka, koji predstavljaju želudac, dvanaesnik, jejunum i ileum. U svim odjeljcima se regulira temperatura, promjena pH, pražnjenje želuca, tranzitno vrijeme, peristaltika, lučenje probavnih sokova i pasivna apsorpcija malih molekula pomoću dijalize. Probava u debelom crijevu nije zanemariva i beznačajna, te je prilikom ispitivanja biodostupnosti potrebno uključiti i taj korak u modele. Iz tog se razloga razvio TIM-2 model, koji uz gastrični i duodenalni dio sadrži i odjeljak koji oponaša debelo crijevo i u njemu se odvija fermentacija koja je često vrlo značajna za polifenole (Horvat, 2020).

U posljednje su vrijeme *in vitro* eksperimentalne tehnike uvelike unaprijeđene primjenom metoda računalne inteligencije koje omogućuju simulaciju najsloženijih bioloških procesa u ljudskom tijelu (Dima i sur., 2020).

Veliki broj *in vitro* studija, korištenjem rezova tkiva ili kultiviranih stanica, dao je iznimno vrijedne informacije o blagotvornim učincima polifenola. Međutim, potrebna je velika pažnja pri tumačenju i ekstrapolaciji dobivenih podataka. Prije svega, često su ispitivani spojevi bili polifenol aglikoni ili njihovi konjugirani šećeri, a ne njihovi aktivni metaboliti. Stoga su mnogi istraživači testirali pogrešan spoj pokušavajući otkriti koji su fiziološki mehanizmi uključeni u zdravstvene učinke polifenola. Drugi parametar koji treba uzeti u obzir u *in vitro* studijama je li ispitivana tvar prikladna. Kada je ispitivana tvar prikladnija za tkivo, mogu se dobiti vrijedni podaci, a

ekstrapolacije koje slijede su mnogo pouzdanije. Također, vrlo važan problem koji često ugrožava *in vitro* studije je primijenjena doza. Upotrijebljena doza treba odražavati stvarni život (D'Archivio i sur., 2010).

### 3. ZAKLJUČAK

Polifenolni spojevi su zbog svoje kemijske strukture poznati kao jaki antioksidansi te zbog toga imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje u smislu doprinosa prevenciji nastajanja ili ublažavanja simptoma raznih bolesti poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i karcinoma. Bioraspoloživost je usko povezana s njihovim pozitivnim djelovanjem na zdravlje ljudskog organizma. Poznato je da je BA učinkovitija primjenom intravenozno u odnosu na druge puteve primjene poput oralne primjene. Na oralnu BA polifenolnih spojeva utječu vanjski faktori, čimbenici povezani s preradom hrane, čimbenici povezani s hranom, interakcija s drugim spojevima, čimbenici povezani s polifenolima te s domaćinom. BA je različita s obzirom na podjelu fenolnih spojeva. Iz ovog rada možemo zaključiti da najveću BA imaju izoflavoni, a najnižu antocijani na što utječe pored gore navedenih faktora i njihova kemijska struktura. Također iz ovog rada zaključujemo kako *in vitro* metode određivanja BA fenolnih spojeva imaju važnu ulogu u razvoju lijekova i funkcionalne hrane zbog sposobnosti predviđanja rezultata. Iako su najučinkovitiji testovi provedeni *in vivo* metodama, zbog nedostataka i etičkih stajališta sve više se podilazi *in vitro* metodama koje su unaprijeđene primjenom metoda računalne inteligencije koje omogućuju simulaciju najsloženijih bioloških procesa u ljudskom tijelu, što dovodi do povećanja povjerenja *in vitro* metodama

#### 4. LITERATURA

- Annunziata G, Jiménez-García M, Capó X, Moranta D, Arnone A, Tenore G.C, Sureda A. and Tejada S, 2020. Microencapsulation as a tool to counteract the typical low bioavailability of polyphenols in the management of diabetes. *Food and Chemical Toxicology*, **139**, p.111248.
- Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, & Bren U. (2016). Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, **21**(7), 901.
- Cermak R, Landgraf S. and Wolfram S. (2003) The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *J. Nutr.* **133**, 2802–2807.
- Chen R, Qi Q.L, Wang M.T, & Li Q.Y. (2016). Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharmaceutical biology*, **54**(12), 3203-3210.
- Chow H.H, Hakim I.A, Vining D.R, Crowell J.A, Ranger-Moore J, Chew W.M, Celaya C.A, Rodney S.R, Hara Y. and Albert D.S. (2005) Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4627–4633.
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Sczzocchio B, & Masella R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, **11**(4), 1321-1342.
- Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, & Restani P. (2021). Polyphenols and human health: the role of bioavailability. *Nutrients*, **13**(1), 273.
- Dima C, Assadpour E, Dima S, & Jafari S.M. (2020). Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **19**(6), 2862-2884.
- Graefe E.U, Wittig J, Mueller S, Riethling A.K, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H. and Veit M. (2001) Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J. Clin. Pharmacol.* **41**, 492–499.
- Hiary M, 2019. Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, **102**(5), pp.1397-1400.
- Horvat M. (2019). *Utjecaj ciklodekstrina na bioraspoloživost hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina iz ekstrakta komine masline* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Department of food chemistry).
- Irina I, & Mohamed G. (2012). Biological activities and effects of food processing on flavonoids as phenolic antioxidants. *Advances in applied biotechnology*, 101-124.
- Kimura M, Umegaki K, Kasuya Y, Sugisawa A. and Higuchi M. (2002) The relation between single/double or repeated tea catechin ingestions and plasma antioxidant activity in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**, 1186–1193.

- Kondratyuk T.P, & Pezzuto J.M. (2004). Natural product polyphenols of relevance to human health. *Pharmaceutical biology*, **42**(sup1), 46-63.
- Lee S.Y, Lee S.J, Yim D.G, & Hur S.J. (2020). Changes in the content and bioavailability of onion quercetin and grape resveratrol during in vitro human digestion. *Foods*, **9**(6), 694.
- Lin L.Z, Harnly J.M, Pastor-Corrales M.S, & Luthria D.L. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food chemistry*, **107**(1), 399-410.
- Lin Y, Shi R, Wang X, & Shen H.M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current cancer drug targets*, **8**(7), 634-646.
- Manach C, Scalbert A, et al., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 727-47.
- M Calderon-Montano J, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, & López-Lázaro M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini reviews in medicinal chemistry*, **11**(4), 298-344.
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5281708, Daidzein. Retrieved January 18, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Daidzein>.
- Pandey KB, Rizvi SI, 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**, 270-278.
- Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, & Iranshahi M. (2015). Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life sciences*, **124**, 64-74.
- Teng H, i Chen L. (2019). Polyphenols and bioavailability: An update. *Critical reviews in food science and nutrition*, **59**(13), 2040-2051.
- Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**(12), 1231-1246.
- Salehi B, Fokou P.V.T, Sharifi-Rad M, Zucca P, Pezzani R, Martins N, i Sharifi-Rad J. (2019). The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials. *Pharmaceuticals*, **12**(1), 11.
- Scholz. (2007). Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. *International journal for vitamin and nutrition research*, **77**(3), 224-235.
- Schramm D.D, Karim M, Schrader H.R, Holt R.R, Kirkpatrick N.J, Polagruto J.A, Ensunsa J.L, Schmitz H.H. and Keen C.L. (2003) Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sci.* **73**, 857–869.
- Semwal D.K, Semwal R.B, Combrinck S, & Viljoen A. (2016). Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*, **8**(2), 90.
- Silberberg M, Morand C, Manach C, Scalbert A. and Remesy C. (2005) Co-administration of quercetin and cat- echin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sci.* **77**, 3156–3167

Singla R.K, Dubey A.K, Garg A, Sharma R.K, Fiorino M, Ameen S.M, Haddad M.A. and Al-Stojevski D. (2014). *Najčešći polifenoli iz prehrane i njihovo protutumorsko djelovanje* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology).

Yang C.S, Chen L, Lee M.J, Balentine D, Kuo M.C. and Schantz S.P. (1998) Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 351–354.



## Izjava o izvornosti

Ja \_\_\_\_\_ (ime i prezime) \_\_\_\_\_ izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

*Mateja Budisavljević*  
Vlastoručni potpis