

**WYBRANE STRATEGIE KAPSUŁKOWANIA
POLIFENOLI STOSOWANE W CELU POPRAWY
ICH STABILNOŚCI**

SELECTED POLYPHENOL ENCAPSULATION
STRATEGIES TO IMPROVE THEIR STABILITY

**Anna Oniszczyk*, Kamila Kasprzak-Drozd,
Monika Waksmundzka-Hajnos**

*Zakład Chemii Nieorganicznej, Katedra Chemii,
Uniwersytet Medyczny w Lublinie,
ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin
e-mail: anna.oniszczyk@umlub.pl

Abstract

Wprowadzenie


1. Aktywność biologiczna związków polifenolowych
2. Metabolizm, biodostępność i stabilność polifenoli a metody mikro-kapsułkowania
3. Fizyko-chemiczne metody stabilizacji/kapsułkowania
 - 3.1. Koacerwacja
 - 3.2. Metody emulsyjne
 - 3.3. Micele i liposomy
4. Chemiczne metody kapsułkowania – polimeryzacja
5. Fizyczne metody kapsułkowania
 - 5.1. Suszenie rozpyłowe
 - 5.2. Procesy z użyciem płynów nadkrytycznych

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane


Dr hab. n. farm. Anna Oniszczyk, profesor uczelni jest pracownikiem Medycznego w Lublinie. Po studiach na Wydziale Farmaceutycznym UM w Lublinie rozpoczęła studia doktoranckie na tym samym wydziale i w roku 2005 obroniła pracę doktorską. W latach 2007-2010 pracowała jako asystent w Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Katedra Chemii UM w Lublinie, a potem jako adiunkt (2010-2020). W 2017 r. uzyskała stopień dr hab w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku profesora uczelni w grupie badawczej w macierzystej uczelni. Od początku pracy naukowej jej zainteresowania badawcze obejmują izolację, analizę jakościową i ilościową wtórnych metabolitów roślinnych, a w szczególności ekstrakcję, analizę chromatograficzną i ocenę aktywności biologicznej ekstraktów i związków pozyskanych z roślin i żywności funkcjonalnej.



 <https://orcid.org/0000-0002-5109-3302>


Dr n. farm. Kamila Kasprzak-Drozd pracuje w Zakładzie Chemii Nieorganicznej na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Lublinie jako adiunkt naukowo-dydaktyczny. W 2019 roku uzyskała stopień doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Współautorka 20 artykułów naukowych posiadających IF. Jej zainteresowania badawcze dotyczą ilościowej i jakościowej analizy wtórnych metabolitów roślinnych oraz ich aktywności antyoksydacyjnej.



 <https://orcid.org/0000-0002-6282-6313>

Prof. dr hab. n. farm. Monika Waksmundzka-Hajnos jest profesorem na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. W 1968 r. rozpoczęła studia chemiczne na Wydziale Mat.-Fiz.-Chem. UMCS, w 1973 r. obroniła pracę magisterską, a następnie została zatrudniona na Akademii Medycznej w Lublinie. W 1980 r. obroniła pracę doktorską, a w 1999 r. otrzymała tytuł dr. hab. nauk farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Lublinie. W 2007 r. otrzymała tytuł profesora nadany przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Lecha Kaczyńskiego. Od 2003 roku pełni funkcję kierownika Zakładu Chemii Nieorganicznej Katedry Chemii UM w Lublinie.



 <https://orcid.org/0000-0003-4492-3539>

ABSTRACT

Polyphenols are one of the most numerous and ubiquitous groups of secondary plant metabolites, and constitute an integral part of both human and animal diets. These compounds possess a high spectrum of biological activities, including antioxidant, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, neuroprotective and cardioprotective. A lot of preclinical research and epidemiological data suggests that plant polyphenols reduce the risks of neurodegenerative diseases, cardiovascular disease, osteoporosis or diabetes and can slow the progression of cancers. These facts suggest that plant polyphenols might act as potential chemopreventive and anti-cancer agents.

However, the levels of polyphenols that appear effective *in vitro* are often of an order of magnitude higher than the concentrations determined *in vivo*. This is a serious problem, as only a small part of the substance remain available following oral administration, due to insufficient gastric residence time, low permeability and solubility within the gut. An important element is polyphenols instability under conditions encountered in food processing and storage (oxygen, temperature, light), or in the gastrointestinal tract (enzymes, pH, other nutrients), all of which limit the activity of polyphenolic compounds. Another unfortunate trait of polyphenols is their potential unpleasant taste. In order to overcome these drawbacks, various formulation methods have been developed.

Among them, encapsulation seems to be a promising technique to improve the effectiveness and the bioactivity of polyphenols. Moreover, it protects the core material from environmental factors. Microcapsules are small particulates that may range from submicron to several millimeters in size. Encapsulation methods can be classified in three groups: physical, physico-chemical, and chemical. The research studies reported in this paper revealed useful strategies to provide remarkable protection against harmful factors of polyphenolic compounds, avoiding the loss in activity and improving their bioavailability.

Keywords: polyphenolic compounds, microencapsulation, coacervation, polymerisation, spray drying

Słowa kluczowe: związki polifenolowe, mikrokapsułkowanie, koacerwacja, polimeryzacja, suszenie rozpyłowe

WPROWADZENIE

Związki polifenolowe to zróżnicowana grupa wtórnych metabolitów roślinnych. Ich wspólną cechą jest obecność jednego lub kilku pierścieni aromatycznych oraz od jednej do kilkunastu grup hydroksylowych. Ze względu na budowę tych związków możemy wśród nich wyróżnić: proste fenole, kwasy fenolowe, kumaryny, ksantony, stilbeny, lignany, antrachinony [1]. Polifenole mogą być koniugowane z cukrami lub kwasami organicznymi, a także występować jako polimery lub tworzyć związki z białkami. W roślinach polifenole występują głównie w postaci glikozydowej [2]. Zidentyfikowano ponad 8 000 naturalnych struktur tych związków. Większość z nich wykazuje korzystną dla zdrowia aktywność biologiczną, wynikającą w dużej mierze z potencjału antyoksydacyjnego. Właściwości przeciwutleniające polifenoli warunkuje ich budowa chemiczna, a dokładniej obecność grup hydroksylowych. Siła tego działania zależy od ich liczby, położenia w pierścieniu i estryfikacji a także obecności innych podstawników [3]. Niska biodostępność oraz niestabilność polifenoli w procesie trawienia i wchłaniania ogranicza jednak w znacznym stopniu ich działanie biologiczne i korzyści zdrowotne. W rzeczywistości tylko niewielka ich część (około 10%) przyjmowana doustnie jest wchłaniana. Dzieje się tak z powodu niewystarczającego czasu przebywania związków polifenolowych w żołądku oraz słabej rozpuszczalności w wodzie. Dodatkowo, związki te są wrażliwe na warunki fizyczne i chemiczne [4]. Z tego względu opracowano szeroką gamę metod kapsułkowania polifenoli, które umożliwiają polepszenie ich rozpuszczalności w wodzie, chronią je przed niekorzystnymi warunkami panującymi w żołądku i uwalniają je w odpowiednich miejscach przewodu pokarmowego [5].

Kapsułkowanie polega na otoczeniu substancji kapsułkowanej ściankami i zamknięciu jej w ten sposób w powstałej strukturze. W przypadku, gdy rozmiary kapsułki są mniejsze od 1000 μm mamy do czynienia z mikrokapsułkami [4]. Do technik mikrokapsułkowania należą m.in. suszenie rozpyłowe, koacercwacja, emulsyfikacja, tworzenie liposomów, miceli, nanocząsteczek, liofilizacja, kokryształizacja [6]. Każda z nich ma swoją specyfikę, mocne i słabe strony związane z ochroną i dostarczeniem składników aktywnych, koszt, biodegradowalność i biokompatybilność.

Powyższa praca przeglądowa skupia się na omówieniu różnych strategii stosowanych do mikrokapsułkowania, z uwzględnieniem metod fizycznych, fizykochemicznych oraz chemicznych.

1. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH

Niejednorodna budowa polifenoli jest przyczyną ich zróżnicowanej aktywności biologicznej. Wytwarzają je jedynie rośliny, zatem przez człowieka muszą być pobierane wraz z pokarmami roślinnymi. Związki te mają zdolność zmiatania

wolnych rodników, a mechanizm ich działania antyoksydacyjnego jest zróżnicowany. Mogą hamować wytwarzanie reaktywnych form tlenu, poprzez inhibicję enzymów biorących udział w ich powstawaniu (np. oksydaza ksantynowa) lub wychwytywać i unieczynniać wolne rodniki, które zostały już wytworzone. Zapobiegają także peroksydacji lipidów, ponieważ przerywają ciąg reakcji wolnorodnikowych i mogą działać ochronnie na inne antyoksydanty (tokoferol, kwas askorbinowy). Powodują ponadto podwyższenie aktywności enzymów takich jak peroksydaza, dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza glutationowa [7].

Polifenole wykazują aktywność przeciwzapalną, która związana jest m.in. z wpływem na komórki należące do układu odpornościowego organizmu [8]. Ze względu na uciążliwe skutki uboczne i często niezadowalający efekt terapeutyczny konwencjonalnej farmakoterapii, prowadzone są badania nad możliwością włączenia związków polifenolowych do terapii chorób autoimmunologicznych. W świetle wyników badań wydają się one obiecującą alternatywną leczenia niektórych chorób, np. takich jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego, leukodermia, reumatoidalne zapalenie stawów, sarkoidoza i stwardnienie rozsiane [9]. Znane jest dobroczynne działanie polifenoli na układ trawienny, nerwowy, a także sercowo-naczyniowy. Odgrywają one ważną rolę w ochronie przed zaburzeniami patologicznymi takimi jak nadciśnienie tętnicze, miażdżycy czy zaburzenia czynności mózgu [10]. Stosowane są także do obniżania poziomu cholesterolu, prewencji osteoporozy oraz zmniejszania objawów menopauzy [11,12]. Ponadto mogą hamować procesy neurodegeneracyjne, m.in. dzięki zdolności hamowania aktywności cholinioesterazy, która jest jedną z najważniejszych strategii terapeutycznych w chorobie Alzheimera [13]. Obecnie trwają badania ich potencjału w kierunku łagodzenia objawów choroby Parkinsona [14]. Dane literaturowe wskazują, że polifenole roślinne są skuteczne w zapobieganiu i hamowaniu rozwoju różnego rodzaju nowotworów [1,2,15]. Mogą również pozytywnie wpływać na profilaktykę i łagodzenie przebiegu cukrzycy. Dzieje się tak, ponieważ mają zdolność modulowania metabolizmu węglowodanów i lipidów, obniżania hiperglikemii, dyslipidemii i insulinooporności oraz poprawiania metabolizmu tłuszczów. Ponadto związki polifenolowe mogą zapobiegać rozwojowi odległych powikłań cukrzycy, w tym neuropatii, nefropatii i retinopatii [16]. Ta grupa wtórnych metabolitów roślin zmniejsza także ryzyko otyłości. Oprócz aktywności przeciwbakteryjnej związki polifenolowe obdarzone są aktywnością przeciwwirusową [2]. Dodatkowo polifenole są skutecznym konserwantem żywności, ponieważ wykazują działanie hamujące rozwój bakterii powodujących psucie się żywności [17].

2. METABOLIZM, BIODOSTĘPNOŚĆ I STABILNOŚĆ POLIFENOLI A METODY MIKROKAPSULKOWANIA

Złożoność strukturalna i polimeryzacja polifenoli wpływa na ich niską absorpcję w jelicie cienkim. Ich słaba biodostępność jest głównym problemem przy zastosowaniu jako środków terapeutycznych. Niewchłonięte polifenole gromadzą się w jelicie grubym wraz z koniugatami żółci i tam są poddawane działaniu enzymów mikrobiomu jelitowego, który metabolizuje glikozyłowane polifenole do związków o niższych masach cząsteczkowych [18]. Biotransformacja polifenoli może zachodzić poprzez różne reakcje, w tym hydroksylację, utlenianie, dekarboksylację, metylację, izomeryzację, hydratację, dehydrogenację, glikozylację itp. [19]. Badania przeprowadzone przez Tao i współpracowników potwierdziły, że bakterie jelitowe przekształcają flawonoidy – linarynę i pektolinarynę w ich aglikonowe formy, a te z kolei w hydroksyloowane, metyloowane, acetylowane i uwodornione produkty uboczne [20]. Metylacja flawonoidów może skutkować wzrostem ich stabilności metabolicznej w wątrobie, ale także znaczną poprawą ich wchłaniania jelitowego, co może znacznie zwiększyć ich biodostępność po podaniu doustnym. Wykazano również, że daidzeina, główny izoflawon sojowy, jest metabolizowana przez mikroflorę jelitową do equolu, który wykazuje wyższą aktywność antyestrogenną, właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe niż daidzeina. Opisane powyżej badania sugerują, że to głównie metabolity powstałe w wyniku degradacji polifenoli są odpowiedzialne za korzystny wpływ na zdrowie człowieka [21].

Możliwość zastosowania polifenoli w terapii i profilaktyce wielu chorób ograniczają cztery główne problemy:

1. Słaba rozpuszczalność w wodzie, powodująca niską biodostępność (kurkumina, resweratrol, kwercetyna, kwas elagowy);
2. Niestabilność pod wpływem ekspozycji na światło i skrajne warunki pH (resweratrol, kwercetyna lub kwas elagowy);
3. Słabe wchłanianie z jamy ustnej i dalszych odcinków przewodu pokarmowego (z powodu degradacji lub zbyt szybkiego metabolizmu, np. galusanu epigallokatechiny (EGCG), kurkumina, resweratrol, kwercetyna, kwas elagowy);
4. Krótki okres półtrwania i szybka eliminacja z organizmu (resweratrol, kwas elagowy) [4].

W celu zniwelowania powyższych wad, ochrony i stabilizacji nietrwałych składników aktywnych przed rozkładem oraz uniknięcia niepożądanych interakcji ze składnikami żywności stosuje się różne techniki kapsułkowania. Generalnie, polegają one na otoczeniu substancji aktywnej (rdzenia, jądra) ściankami

i zamknięciu jej w ten sposób w powstałej strukturze. Rozmiary cząsteczek klasyfikowanych jako mikrokapsułki nie mają ściśle ustalonych granic. Przyjęło się, że kapsułki mniejsze niż 1 μm to nanokapsułki, w przedziale 1 μm – 1000 μm to mikrokapsułki, natomiast większe niż 1000 μm to makrokapsułki.

Wybór techniki kapsułkowania zależy od fizyko-chemicznych właściwości substancji leczniczej, właściwości polimeru (otoczki) oraz przeznaczenia końcowego produktu. Istnieje duża grupa technik mikrokapsułkowania, wśród których wyróżniamy metody fizyczne, fizyko-chemiczne oraz chemiczne [22].

3. FIZYKO-CHEMICZNE METODY KAPSULKOWANIA

3.1. KOACERWACJA

Koacerwacja, czyli rozdział fazowy polega na wydzieleniu ciekłej fazy substancji powlekającej z roztworu i zamknięciu w niej cząsteczek substancji aktywnej. W pierwszym etapie procesu ma miejsce rozdział faz z wytworzeniem kropli koacerwatu. Krople adsorbują się następnie na powierzchni cząstek substancji aktywnej, tworząc otoczkę mikrokapsulek. Do rozdzielenia faz dochodzi pod wpływem zmiany pH, temperatury, dodatku niezgodnego polimeru lub soli. Prosta koacerwacja ma miejsce w układzie zawierającym tylko jeden koloid, złożona - gdy jest ich więcej (np. żelatyna i guma arabska) [23]. W drugim przypadku, przy pH poniżej punktu izoelektrycznego żelatyna wykazuje ładunek dodatni, a guma arabska ujemny. W warunkach niskiego pH przeciwnie naładowane cząsteczki przyciągają się. Powstają wtedy nierozpuszczalne kompleksy, które wytrącają się w postaci lepkiego roztworu. Okrywa on cząsteczki substancji rdzenia zawieszony w wodzie. Otrzymane mikrokapsułki wydziela się przez odwirowywanie lub sączenie, przemywa i suszy.

Koacerwacja może zachodzić w środowisku wodnym lub bezwodnym. Podczas procesu przebiegającego w środowisku bezwodnym, substancja powlekająca jest zazwyczaj hydrofobowa, a rdzeń może być rozpuszczalny lub nierozpuszczalny w wodzie. Koacerwacja wodna stosowana jest do zamykania związków nierozpuszczalnych w wodzie i wymaga hydrofilowego koloidu powlekającego (np. żelatyna). Mikrokapsułki otrzymane przez koacerwację zawierają aż 85-90% rdzenia, który może być uwolniony dzięki działaniu czynników chemicznych, ciśnienia lub temperatury [24].

Xiong i współpracownicy wykazali [25], że kapsułkowanie antocyjanów poprzez zastosowanie naturalnych polimerów, takich jak glukan, może zwiększać stabilność tej klasy związków. Inni badacze kapsułkowali ekstrakty yerba mate (ostrokrzew paragwajski, *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), zawierające kwas galusowy, stosując dwa różne podejścia: żelowanie jonowe z alginianem wapnia

i koacerwację z alginianem wapnia oraz chitozanem [26]. Chitozan zawiera grupy polarne, takie jak $-OH$ i $-NH_2$, natomiast alginian grupy karboksylowe zlokalizowane w szkielecie polimerowym. W ten sposób mogą ulegać koacerwacji, dzięki obecności przeciwnych ładunków. Kulki alginianu wapnia, z warstwą chitozanu i bez niej, zostały przygotowane w celu oceny wpływu metody kapsułkowania na ich właściwości mechaniczne i zbadania wpływu matrycy na stabilność i uwalnianie polifenoli. Znacznie wyższą zawartość polifenoli (85%) uzyskano w mikrokapsułkach alginianowych bez warstwy chitozanu, natomiast maksymalne uwalnianie w wodzie w krótszym czasie uzyskano w przypadku kapsułek pokrytych chitozanem. Wyniki te potwierdziły znaczny wpływ materiału, z którego powstaje otoczka mikrokapsułki, na uwalnianie polifenoli. Podczas kolejnego eksperymentu ekstrakt z propolisu był kapsułkowany przez koacerwację z użyciem izolowanego białka sojowego i pektyny jako materiałów na otoczkę [27]. Technika ta zapewniła ochronę przed degradacją związków fenolowych obecnych w wolnym propolisie, gwarantując przez to zachowanie jego aktywności biologicznej.

3.2. METODY EMULSYJNE

Metody emulsyjne są najczęściej stosowanymi i najstarszymi technikami otrzymywania mikrokapsulek. Stosowane są w celu zamykania związków rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie, a także ochrony substancji wrażliwych na działanie czynników zewnętrznych. Techniki emulsyjne ukierunkowane są na wytworzenie pojedynczej lub podwójnej emulsji niemieszających się cieczy, które zawierają substancję czynną i polimer. Poprzez usuwanie rozpuszczalnika wywoływane jest zestalanie polimeru wokół substancji leczniczej i utworzenie mikrokapsułki [24].

Związki polifenolowe wyekstrahowane z wycieków winogronowych (pochodzących z winorośli właściwej, *Vitis vinifera* L.) były kapsułkowane w postaci nanoemulsji skomponowanych z oleju słonecznikowego lub palmowego oraz kombinacji hydrofilowych i hydrofobowych emulgatorów w celu zatrzymania związków słabo rozpuszczalnych w wodzie [28]. Nanokapsułki wytworzono stosując homogenizację wysokociśnieniową, a badania stabilności fizykochemicznej prowadzono w różnych temperaturach przez 14 dni. Wyniki wykazały, że nanoemulsje na bazie oleju słonecznikowego były bardzo stabilne fizycznie i chemicznie, dzięki czemu uniknięto degradacji polifenolowych składników czynnych.

Polifenole herbaty charakteryzują się niezwykle ciekawymi właściwościami przeciwutleniającymi i przeciwdrobnoustrojowymi, a ich skuteczność zależy od konkretnej odmiany herbaty. Almajano i współpracownicy kapsułkowali pięć

różnych naparów herbaty (czarnej, białej, zielonej, czerwonej i rooibos) w emulsjach oleju słonecznikowego w wodzie, niezawierających lub zawierających 0,2% albuminy z surowicy bydłowej [29]. Nie stwierdzono niekorzystnych zmian w zawartości i aktywności przeciwutleniającej polifenoli podczas długotrwałego przechowywania preparatu w stanie suchym w 37°C. Ponadto uzyskane wyniki wskazały, że emulsje zawierają ekstrakty z zielonej i białej herbaty oraz 0,2% albuminy z surowicy bydłowej były bardziej stabilne podczas przechowywania. Ze względu na właściwości przeciwutleniające i przeciwbakteryjne powstałych mikrokapsulek mogą być one rozpatrywane jako naturalny środek konserwujący żywność.

Mikrokapsułkowanie przez chłodzenie emulsji jest techniką opartą na rozpuszczaniu lub dyspersji polifenoli roślinnych w stopionym materiale, zemulgowanym poprzez ogrzewanie w wyższej temperaturze niż temperatura jego topnienia. Otrzymaną emulsję szybko schładza się, przez co następuje utworzenie się cząstek stałych. Takie podejście zostało zastosowane w celu mikrokapsułkowania flawonoidów, kwercetyny i galusanu epigallokatechiny. Zaobserwowano, że dzięki opisanemu procesowi kwercetyna była stabilna przez co najmniej 10 tygodni i nie zachodziły w niej procesy utleniania, natomiast 3-galusan epigallokatechiny charakteryzował się stabilnością przez ponad 4 tygodnie (związek ten rozpuszczony w wodzie ulega 100% degradacji w ciągu zaledwie 4 godzin) [30].

3.3. MICELE I LIPOSOMY

Makrocząsteczkowe związki powierzchniowo czynne występują w rozcieńczonych roztworach w postaci pojedynczych cząsteczek. W miarę wzrostu stężenia tych substancji wzrasta ilość ich asocjatów. Stężenie, przy którym wskutek tworzenia się asocjatów, samorzutnie tworzą się micelle i ulegają zmianie właściwości fizyczne, nazywa się krytycznym stężeniem powstawania miceli. Powyżej tego stężenia, zespół cząsteczek jest formą termodynamicznie trwałą, pozostającą w stanie równowagi z pojedynczymi cząsteczkami. Podczas rozcieńczania natomiast micelle ulegają rozpadowi, a proces ten może przebiegać dowolnie często w obydwu kierunkach. Powstawanie miceli jest charakterystyczne dla substancji organicznych, których cząsteczki są zbudowane z elementów o odmiennej polarności tzn. części hydrofobowej i hydrofilowej. Przyczyną tworzenia się miceli przez niepolarne cząsteczki w fazie wodnej jest słabe oddziaływanie między wodą a niepolarnym łańcuchem obecnym w cząsteczce. Polarne grupy miceli są skierowane ku fazie wodnej, natomiast niepolarne łańcuchy węglowodorowe tworzą jej wnętrze [31].

Liposomy, czyli pęcherzyki lipidowe zbudowane są z jednej lub kilku warstewek tłuszczowych. Substancja aktywna może być zamknięta wewnątrz wodnej fazy pęcherzyka lub może zostać włączona do struktury lipidowej [6]. Liposomy występują w organizmach żywych (np. lipoproteiny krwi) oraz są produkowane na skalę laboratoryjną i przemysłową. Liposomy sztuczne można podzielić na następujące grupy:

1. Liposomy z więcej niż jedną warstwą lipidową (wielowarstwowe) o rozmiarze w granicach 0,4 - 10 μm ;
2. Liposomy jednowarstwowe o rozmiarze w granicach 0,01 – 1 μm , a wśród nich małe liposomy jednowarstwowe o rozmiarze 0,02 - 0,03 μm oraz duże liposomy jednowarstwowe o rozmiarze 0,05 – 1 μm ;
3. Liposomy wielopęcherzykowe o rozmiarze większym od 1 μm [6,31].

Lin i współpracownicy [32] badali wpływ tworzenia miceli i liposomów na stabilność chemiczną polifenoli o różnej hydrofobowości. Autooksydację pięciu polifenoli (galusan katechiny, katechina, epikatechina, galusan epigallokatechiny i epigallokatechina) obserwowano w trzech różnych roztworach wodnych: molekularnym, micelarnym (Tween-20) i liposomalnym (fosfatydylocholina sojowa). W porównaniu z roztworem kontrolnym obecność miceli i liposomów zmniejszyła degradację polifenoli z zachowaniem ich struktury, a samoutlenianie było najwolniejsze w przypadku liposomów. Najbardziej stabilną formę uzyskały polifenole hydrofobowe, które można łatwiej rozpuszczać lub łączyć z micelami i dwuwarstwami lecytyny.

W innym badaniu, mającym na celu poprawę odporności na utlenianie i stabilność polifenoli wyekstrahowanych z herbaty, liposomy przygotowano metodą dyspersji ultradźwiękowej [33]. Przechowywano je w zamrażarce lub w temperaturze pokojowej przez 15, 30 i 60 dni. Uzyskane wyniki potwierdziły ich dużą stabilność. Zbliżone rezultaty otrzymano w eksperymencie dotyczącym resweratrolu zamkniętego w liposomach [34].

4. CHEMICZNE METODY KAPSUŁKOWANIA - POLIMERYZACJA

Polimeryzacja międzyfazowa polega na wytworzeniu otoczek, co następuje dzięki polimeryzacji monomerów na granicy fazy rozpraszającej (woda, etanol, glicerol, cykloheksan, chloroform) i rozproszonej (tłuszcze roślinne, zwierzęce i syntetyczne). Obydwie fazy wraz z rozpuszczonym lub zawieszonym związkami aktywnymi oraz monomerem otoczkującym (np. wielofunkcyjne izocyjany i chlorki kwasów organicznych, octan winylu) miesza się do momentu wytworzenia emulsji o/w. Monomery dyfundują między fazę o/w i powstaje nierozpuszczalna w oleju polimerowa membrana. Polimeryzacja *in situ* zachodzi natomiast bez

dotatku reaktywnych czynników. W pierwszej fazie powstaje prepolimer o niskiej masie cząsteczkowej, który zwiększa swój rozmiar i osadzając się na materiale rdzenia tworzy stałą otoczkę kapsułki [24].

Kwercetyna została poddana procesowi polimeryzacji z użyciem metakrylanu metylu, migliolu 812 i lecytyny jako odpowiednio monomeru, kostabilizatora i środka powierzchniowo czynnego [35]. Odnotowano, że obecność kwercetyny wykazywała większą stabilność niż analogiczny preparat zawierający nanosfery. W innych badaniach oceniono kapsułkowanie kwercetyny i ZnO przy użyciu techniki polimeryzacji. Miało to na celu opracowanie nanocząstek o wysokim współczynniku ochrony przeciwsłonecznej i działaniu przeciwutleniającym do stosowania w lotionach fotoprotekcyjnych. Do preparatów dodano także oktokrylen i olejek z zielonej kawy jako środki stabilizujące. Otrzymano kuliste nanocząstki o jednorodnej wielkości od (169 do 346 nm) i regularnych powierzchniach, które pozostawały stabilne przez co najmniej 30 dni. Kwercetyna i olejek z zielonej kawy w takiej postaci wykazywały wysoką aktywność przeciwutleniającą. Tak więc mikrokapsułkowanie kwercetyny i olejku z zielonej kawy za pomocą ZnO i oktokrylenu w preparatach przeciwsłonecznych może przyczynić się do wzrostu sun protection factor (SPF) *in vivo*, zwalczania wolnych rodników i zmniejszenie szkód spowodowanych promieniowaniem UV [36].

5. FIZYCZNE METODY KAPSULKOWANIA

5.1. SUSZENIE ROZPYŁOWE

Suszenie rozpyłowe jest to najpowszechniej stosowana technika mikrokapsułkowania w przemyśle spożywczym [31]. Polega na zdyspergowaniu substancji aktywnej w roztworze substancji powlekającej i rozpyleniu powstałej dyspersji w gorącej wodzie. Na skutek odparowania rozpuszczalnika polimeru powlekającego tworzą się mikrokapsułki. Dyspersja powstaje w wyniku mieszania materiału rdzenia z roztworem polimeru, a w razie potrzeby z dodatkiem środka powierzchniowo czynnego, który ułatwia dyspergowanie. Istotne, aby materiał rdzenia był nierozpuszczalny w materiale otoczki. Najczęściej stosowanymi materiałami powlekającymi są skrobia modyfikowana oraz guma arabska [22]. Często nośnik dla preparatów polifenoli stanowią maltodekstryny [37]. Parametrem decydującym o jakości mikrokapsulek jest temperatura - na wlocie i wylocie komory wynosi odpowiednio około 180 i 100°C. W trakcie suszenia jako pierwsza odparowuje woda z zewnętrznej powierzchni rozpylonych kropelek. W miarę postępu odwodnienia przepuszczalność matrycy polisacharydowej zwiększa się bardziej wobec polarnej wody niż niepolarnych np. składników aromatycznych

[32]. Typowy kształt cząstek suszonych rozpyłowo jest kulisty, o średnim zakresie wielkości wynoszącym 10-100 μm [31].

Suszenie rozpyłowe jest jednostopniową i nie generującą wysokich kosztów metodą kapsułkowania, która umożliwia ciągłą pracę, a uzyskane stabilne cząstki charakteryzujące się wysoką jakością. Pomimo tych zalet technika ta ma pewne ograniczenia, takie jak niedostateczna ilość dostępnych materiałów powłokowych rozpuszczalnych w wodzie oraz fakt relatywnie wysokich temperatur wlotu powietrza stosowanych podczas procesu, które mogą prowadzić do degradacji związków wrażliwych na wysoką temperaturę [38]. Natomiast istotne jest to, że optymalizowana stosowana temperatura może osiągać wartości niższe niż w wielu innych metodach otrzymywania mikrokapsulek [39].

Mikrokapsułkowaniu rozpyłowemu poddano polifenole obecne w pestkach winogron przy użyciu jako nośnika m.in. maltodekstryny czy gumy jadalnoszynowej pochodzącej z jodłoszynu baziowego (*Prosopis juliflora* L.) [40]. Zhang i in. [41] w celu mikrokapsułkowania procyjanidyn z tychże pestek wykorzystali mieszaninę maltodekstryny (60%) i gumy arabskiej (40%) [41]. Badania przeprowadzone przez polskich naukowców wskazują, że mikrokapsułkowane preparaty polifenoli win i soków owocowych, otrzymane techniką suszenia rozpyłowego z wykorzystaniem odpowiednich maltodekstryn jako nośników, charakteryzują się wysoką zawartością polifenoli i antocyjanin oraz znaczną aktywnością antyoksydacyjną, a także trwałością [42]. Natomiast przy użyciu suszenia rozpyłowego polifenole zawarte w ekstrakcie liści oliwki zostały zamknięte w macierzy chitozanej [43]. Chiou i Langrish [44] wprowadzili błonnik owoców cytrusowych jako środek kapsułkujący do suszenia rozpyłowego substancji bioaktywnych wyekstrahowanych z ketmii szczawiowej (*Hibiscus sabdariffa* L.). Głównymi związkami bioaktywnymi w ekstrakcie z tej rośliny są polifenole, a dokładniej kompleksy antocyjanów. Wyniki wykazały, że naturalne włókna owocowe mogą być potencjalnym nośnikiem zastępczym. Ten proces kapsułkowania połączył dwa produkty (błonnik owocowy i polifenole), tworząc nowy produkt nutraceutyczny [44]. Inna grupa badawcza analizowała wpływ środków wspomagających suszenie zawierających koloidalny dwutlenek krzemu (tixosil 333), maltodekstrynę i skrobię na suszenie rozpyłowe ekstraktu sojowego. Powstały produkt, do którego dodano tixosil 333, wykazywał większą trwałość polifenoli i aktywność przeciwutleniającą, co sugeruje, że właściwy dobór suszących substancji pomocniczych jest ważnym krokiem w zagwarantowaniu stabilności i jakości gotowego produktu. Otrzymane wyniki wskazały również, że temperatura gazu wlotowego miała istotny wpływ na całkowitą zawartość polifenoli, białka i genisteiny w suszonych ekstraktach [45].

W celu otrzymywania proszków o lepszych właściwościach rekonstrykcyjnych oraz ułatwienia bezpiecznego usunięcia wody resztkowej z materiału (mającego

wpływ na jakość produktu) można przeprowadzić proces suszenia dwustopniowego. Zastosowanie suszenia dwustopniowego pozwala na obniżenie temperatury wylotowej powietrza z suszarki rozpyłowej z około 100 do 80°C, co wpływa pozytywnie na zawartość polifenoli. Pierwszy etap suszenia rozpyłowego zakończony jest większą zawartością wody niż w tradycyjnym wariacie metody. Dalsze dosuszanie oraz chłodzenie następuje w drugim etapie procesu, prowadzonym w różnego rodzaju suszarkach fluidyzacyjnych lub wibrofluidyzacyjnych, które mogą być zintegrowane z komorą suszarki rozpyłowej lub stanowić oddzielne urządzenie. Inne możliwe modyfikacje suszenia rozpyłowego to m.in. suszenie powietrzem o obniżonej wilgotności oraz rozpyłowo-sublimacyjne [46].

5.2. PROCESY Z UŻYCIEM PŁYNÓW NADKRYTYCZNYCH

Tradycyjne metody kapsułkowania związane są z pewnymi ograniczeniami wynikającymi ze stosowania rozpuszczalników organicznych oraz środków powierzchniowo czynnych, które mogą powodować powstawanie toksycznych pozostałości w produkcie suszonym rozpyłowo. Ponadto, zastosowane parametry temperaturowe i pH mogą skutkować ryzykiem degradacji polifenoli. Istnieją fizyczne metody stabilizacji związków polifenolowych oparte na procesach z użyciem płynów nadkrytycznych [38], które charakteryzują się lepkością zbliżoną do gazów, natomiast gęstością do cieczy, a także wysoką dyfuzyjnością. Rozpuszczalność składników w płynie uzależniona jest od ciśnienia i temperatury [47]. Dwutlenek węgla jest najczęściej stosowanym płynem nadkrytycznym ze względu na niskie parametry krytyczne, które determinują pracę ze związkami termolabilnymi, ponadto charakteryzuje się wysoką dyfuzyjnością oraz dużą lotnością, która ułatwia jego usuwanie z produktu po zastosowanym procesie. Dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym jest ekonomiczny, nietoksyczny, niepalny i stabilny chemicznie [38]. Zastosowany w procesie mikronizacji nadkrytycznej rozpuszczalnik może spełniać funkcję tradycyjnego rozpuszczalnika, antyrozpuszczalnika lub współrozpuszczalnika. Metody te różnią się od siebie znacząco, od etapu przygotowania próbki aż do uzyskania zakapsułkowanego proszku [48].

W przypadku stosowania płynu nadkrytycznego jako antyrozpuszczalnika, następuje wytrącenie pożądaných związków z konwencjonalnych rozpuszczalników. Otrzymany roztwór rozpyła się do komory przez dyszę, współbieżnie z nadkrytycznym antyrozpuszczalnikiem przy umiarkowanym ciśnieniu i temperaturze. Następuje zmniejszenie rozpuszczalności określonej substancji rozpuszczonej w rozpuszczalniku pierwotnym. Następnie, na skutek procesów zachodzących pomiędzy rozpuszczalnikiem organicznym, a antyrozpu-

szczalnikiem, w wyniku krystalizacji tworzą się cząstki o niejednorodnym rozkładzie wielkości. Nadmiar rozpuszczalnika organicznego jest usuwany przy ciągłym przepływie czystego płynu nadkrytycznego.

W celu poprawy stabilności polifenoli liści rozmarynu (*Rosmarinus officinalis* L.) oraz zwiększenia rozpuszczalności w wodzie zastosowano kapsułkowanie etanolowego ekstraktu w poloksamerach, osiągając wydajność do 100% i uzyskując cząstki o wielkości w zakresie submikronowym [49]. Inna praca badawcza została skupiona na kapsułkowaniu związków polifenolowych z zielonej herbaty (*Camellia sinensis* L.) z biodegradowalnym polimerem (poli- ϵ -kaprolaktonem) w półciągłym procesie nadkrytycznym antyrozpuszczalnikiem z użyciem dwutlenku węgla. Analizowano wpływ parametrów procesu na kształt otrzymanych cząstek. W wyniku większości eksperymentów uzyskano cząstki kuliste o chropowatych powierzchniach, natomiast jedynie niskie stężenia polimeru skutkowały otrzymaniem cząstek o płaskich kształtach [38].

UWAGI KOŃCOWE

Polifenole są wtórnymi metabolitami roślinnymi charakteryzującymi się niezwykle działaniem biologicznym. Wymieniona grupa związków wykazuje właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, neuroprotektoryjne i kardioprotektoryjne. Jednak te naturalne substancje mają ograniczoną stabilność i rozpuszczalność, co skutkuje ich słabą biodostępnością. Również nieprzyjemny smak większości związków fenolowych ogranicza ich zastosowanie. W celu wyeliminowania powyższych wad, ochrony i stabilizacji nietrwałych składników aktywnych przed rozkładem oraz uniknięcia niepożądanych interakcji ze składnikami żywności stosuje się różne techniki kapsułkowania. Generalnie, polegają one na otoczeniu substancji aktywnej (rdzenia, jądra) ściankami i zamknięciu jej w ten sposób w powstałej strukturze. Wybór techniki mikrokapsułkowania zależy od fizyko-chemicznych właściwości substancji leczniczej, właściwości polimeru (otoczki) oraz przeznaczenia końcowego produktu. Istnieje duża grupa technik mikrokapsułkowania, wśród których wyróżniamy metody fizyczne (suszenie rozpyłowe, procesy z użyciem płynów nadkrytycznych), fizyko-chemiczne (koacerwacja, tworzenie miceli i liposomów, emulsyfikacja) oraz chemiczne (polimeryzacja *in situ*) [22].

Nie ma wątpliwości, że postęp w technologii kapsułkowania polifenoli przyczynia się do szybszego wzrostu zastosowania tych fitozwiązków, nie tylko jako dodatków do żywności czy suplementów diety, ale także jako aktywnych biologicznie farmaceutyków, dających nieocenione korzyści dla zdrowia człowieka.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Olszowy, *Plant Physiol. Biochem.* 2019, **144**, 135.
- [2] A. Durazzo, M. Lucarini, E.B. Souto, C. Cicala, E. Caiazzo, A.A. Izzo, E. Novellino, A. Santini, *Phytother. Res.* 2019, **33**, 2221.
- [3] M. Murkovic, *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Oxford, 2016.
- [4] W. Lu, A.L. Kelly, S. Miao, *Trends Food Sci. Tech.* 2016, **47**, 1.
- [5] Y. Shi, S. Zhou, S. Fan, Y. Ma, D. Li, Y. Tao, *Curr. Opin. Food Sci.* 2021, **38**, 102.
- [6] A. Munin, F. Edwards-Lévy, *Pharmaceutics* 2011, **3**, 793.
- [7] H. Cory, S. Passarelli, J. Szeto, M. Tamez, J. Mattei, [online] *Front. Nutr.* 2018, **5**, <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>.
- [8] S.E. Bianchi, S. Kaiser, V. Pittol, E. Doneda, K.C.B. De Souza, V.L. Bassani, *Phytochem. Anal.* 2019, **2**, 182.
- [9] H. Khan, A. Sureda, T. Belwal, S. Çetinkaya, İ.; Süntar, S. Tejada, H.P. Devkota, H. Ullah, M. Aschner, *Rev.* 2019, **18**, 647.
- [10] I. Ignat, I. Volf, V.I Popa, *Food Chem.* 2011, **4**, 1821.
- [11] T. Blicharski, A. Oniszczuk, *Open Chem.* 2017, **1**, 34.
- [12] K. Kasprzak-Drozd, T. Oniszczuk, M. Stasiak, A. Oniszczuk, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, **22**, 3715.
- [13] M.C. Morzelle, J.M. Salgado, A.P. Massarioli, P. Bachiega, A.O. Rios, S.M. Alencar, A.R. Schwember, A.C.J. Camargo, *Food Bioact.* 2019, **5**, 136.
- [14] S. Zhang, Z. Yu, J. Xia, X. Zhang, K. Liu, A. Sik, M. Jin, *Food Funct.* 2020, **11**, 1425.
- [15] T. Pejčic, T. Tosti, Z. Džamić, U. Gašić, A. Vuksanović, Z. Dolićanin, Z. Tesic, *Molecules* 2019, **24**, 3982.
- [16] Z. Bahadoran, P. Mirmiran, F. Azizi, *Diabetes Metab. Disord.* 2013, **12**, 43.
- [17] M. Sari, Y. Chung, F. Agatha, H.K. Kim, *Applied Biol. Chem.* 2019, **62**, 1.
- [18] G.M. Pasinetti, R. Singh, S. Westfall, F. Herman, J. Faith, L. Ho, *Alzheimers Dis. JAD* 2018, **63**, 409.
- [19] F. Cardona, C. Andrés-Lacueva, S. Tulipani, F.J. Tinahones, M.I. Queipo-Ortuño, *J. Nutr. Biochem.* 2013, **24**, 1415.
- [20] J.H. Tao, J.A. Duan, S. Jiang, Y.Y. Qian, D.W. Qian, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2016, **1025**, 7.
- [21] A.W.C. Man, Y. Zhou, N. Xia, H. Li, *Nutrients* 2020, **12**, 3054.
- [22] J. Korus, B. Achremowicz, M. Sikora, *ŻNTJ*, 1997, **1**, 30.
- [23] R.F.S Gonçalves, J.T. Martins, C.M.M. Duarte, A.A. Vicente, A.C. Pinheiro, *Trends Food Sci. Technol.* 2018, **78**, 270.
- [24] M. Przybyławska, K. Winnicka, *Technologia Postaci Leku* 2012, **68**, 283.
- [25] S. Xiong, L.D. Melton, A.J. Easteal, D. Siew, *J. Agric. Food Chem.* 2006, **54**, 62018.
- [26] L. Deladino, P.S. Anbinder, A.S. Navarro, M.N. Martino, *Carbohydr Polym.* 2008, **71**, 12634.
- [27] M.P. Nori, C.S. Favaro-Trindade, S. Matias de Alencar, M. Thomazini, J. de Camargo Balieiro, C.J. Contreras Castillo, *LWT - Food Sci. Technol.* 2011, **44**, 42935.
- [28] M. Sessa, A.A. Casazza, P. Perego, R. Tsao, G. Ferrari, F. Donsi, *Food Bioprocess Technol* 2012, **6**, 2609.
- [29] M.P. Almajano, R. Carbó, L.A.L. Jiménez, M.H. Gordon, *Food Chem* 2008, **108**, 55.
- [30] A. Barras, A. Mezzetti, A. Richard, S. Lazzaroni, S. Roux, P. Melnyk, D. Betbeder, N. Monfiliette-Dupont, *Int. J. Pharmaceut.* 2009, **379**, 270.
- [31] Z. Fang, B. Bhandari, *Trends Food Sci. Techn.* 2010, **21**, 510.
- [32] Q.L. Lin, J. Wang, D. Qin, B. Björn, *Sci China Ser B-Chem* 2007, **50**, 121.
- [33] Q. Lu, D.C. Li, J.G. Jiang, *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 13004.
- [34] C. Caddeo, K. Teskac, C. Sinico, J. Kristl, *Int. J. Pharmaceut.* 2008, **363**, 183.

- [35] N. Bernardy, A.P. Romio, E.I. Barcelos, C.D. Pizzol, C.L. Dora, E. Lemos-Senna, P.H.H. Araujo, C. Sayer, *J Biomed. Nano.Technol.* 2010, **6**, 181.
- [36] L.A. Fogaça, P.E. Feuser, E. Ricci-Júnior, P.H.H. de Araújo, C. Sayer, C. da Costa Mater. *Res. Expres* 2020, **7**, 015096.
- [37] E. Dłużewska, *Przem. Spoż.* 2008, **62**, 30.
- [38] R. Watson, V. Preedy, S. Zibadi. *Polyphenols in Human Health and Disease*, Academic Press, 2013.
- [39] S.S. Bansode, S.K. Banarjee, D.D. Gaikwad, S.L. Jadhav, R.M. Thorat. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2010, **1**, 38.
- [40] G. Davidov-Pardo, I Arozarena, R. Marín. *Food Bioproc Tech.* 2013, **6**, 941.
- [41] L. Zhang, D. Mou, Y. Du. *J. Agric. Food Chem.* 2007, **87**, 2192.
- [42] W. Ambroziak, A. Wilkowska, J. Adamiec. *Designed Food*, 2011, **3**, 30.
- [43] S.L. Kosaraju, L. D'ath, A. Lawrence, A. *Carbohydr. Polym.* 2006, **64**, 163.
- [44] D. Chiou, T.A.G. Langrish, T. A. G. *J. Agric. Food Chem.* 2007, **82**, 84.
- [45] S.R. Georgetti, R. Casagrande, C.R.F. Souza, W.P. Oliveira, M.J.V. Fonseca, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2008, **41**, 1521.
- [46] K. Samborska. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2008, **1**, 63.
- [47] L. Qingyong, W. Chien M. *Talanta*, 2001, **53**, 771.
- [48] E. Janiszewska, D. Witrowa-Rajchert, E. Rój, *ŻNTJ*, 2013, **91**, 5.
- [49] A. Visentin, S. Rodríguez-Rojo, A. Navarrete, D. Maestri, M.J. Cocero, *J. Food Eng.* 2012, **109**, 9.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 maja 2021 r.