

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

UPOTREBA LIPOSOMA U CILJU POVEĆANJA
ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA
BOROVNICE

ZAVRŠNI RAD

MAŠA JELAVIĆ-ŠAKO

Matični broj: 1153

Split, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
SMJER: KEMIJSKO INŽENJERSTVO

UPOTREBA LIPOSOMA U CILJU POVEĆANJA
ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI EKTRAKATA
BOROVNICE

ZAVRŠNI RAD

MAŠA JELAVIĆ-ŠAKO

Matični broj: 1153

Split, rujan 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
ORIENTATION: CHEMICAL ENGINEERING

**THE USE OF LIPOSOMES IN ORDER TO ENHANCE THE
ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BLUEBERRY EXTRACTS**

BACHELOR THESIS

MAŠA JELAVIĆ-ŠAKO

Parent number: 1153

Split, September 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Kemijske tehnologije
Smjer: Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: biotehničke znanosti
Znanstveno polje: prehrambena tehnologija
Tema rada:
Mentor: Prof.dr.sc. Tea Bilušić

UPOTREBA LIPOSOMA U CILJU POVEĆANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI EKTRAKATA BOROVNICE

Maša Jelavić-Šako, 1153

Sažetak:

Vitamini, minerali i ostale hranjive tvari imaju zaštitni učinak na zdravlje organizma. Znanstvene spoznaje upućuju na to da antioksidansi utječu na smanjenje rizika od kroničnih bolesti, karcinoma i kardiovaskularnih poremećaja. Prirodno se javljaju u voću i povrću te cjelovitim žitaricama koji predstavljaju njihov glavni izvor za ljudski organizam, pa su tako i borovnice izuzetno bogate antioksidansima. Učinkovitost antioksidansa u ljudskom organizmu je otežana slabom topljivošću, nemogućnosti prelaska staničnih membranskih barijera i brzim uklanjanjem iz stanica. Kako bi se poboljšala njihova farmakološka i farmakokinetička svojstva razvijaju se različiti sustavi, a jedan od njih je vezanje na liposome. Liposomi olakšavaju unutarstaničnu isporuku i produljuju vrijeme zadržavanja unutar stanice čime doprinose poboljšanju/očuvanju antioksidacijske aktivnosti biološki aktivnih spojeva.

Ključne riječi: liposomi, antioksidansi, borovnice

Rad sadrži: 22 stranice, 9 slika, 4 tablice, 16 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc.dr.sc. Generalić Mekinić Ivana- predsjednik
2. Doc.dr.sc. Burčul Franko- član
3. Prof.dr.sc. Tea Bilušić- član-mentor

Datum obrane: 27. rujan 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33).

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study of Chemical technology
Orientation: Chemical engineering

Scientific area: biotechnical sciences

Scientific field: food technology

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21

Mentor: Full professor Tea Bilušić

THE USE OF LIPOSOMES IN ORDER TO ENHANCE THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BLUEBERRY EXTRACTS

Maša Jelavić-Šako, 1153

Abstract:

Vitamins, minerals and other nutrients have a protective effect on the body's health. Scientific findings suggest that antioxidants affect the risk of chronic diseases, cancers and cardiovascular disorders. Naturally occurring in fruits and vegetables and whole grains, which are also the main sources for human organism, so also blueberries are extremely rich with antioxidants. The efficiency of antioxidants in human body is hampered by poor solubility, the inability to overcome cellular membrane barriers and rapid removal of cells. In order to improve their pharmacological and pharmacokinetic properties, various systems are developed, and one of them is liposome binding. Liposomes facilitate intracranial delivery and prolong the retention time within the cell and also they protect/enhance the antioxidant activity of biologically active compounds.

Keywords: liposomes, antioxidants, blueberries

Thesis contains: 22 pages, 9 figures, 4 tables, 16 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, assistant professor
2. Ph. D. Burčul Franko, assistant professor
3. Full Professor Tea Bilušić, PhD

Defence date: 27th September 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33).

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof.dr.sc. Tee Bilušić, u razdoblju od veljače do rujna 2017. godine.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Tei Bilušić na vodstvu, pomoći i strpljenju tokom izrade završnog rada, te ostalim članovima povjerenstva na pomoći. Također se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i razumijevanju.

Zadatak završnog rada

Zadatak završnog rada bio je pomoću Rancimat metode odrediti antioksidacijsko djelovanje ekstrakata borovnice sa i bez korištenja liposoma. U radu su korišteni ekstrakti borovnice koji su dobiveni ekstrakcijom iz plodova kultivirane borovnice nakon različitih tretmana (liofilizacija, pasterizacija, ultrazvuk visokog intenziteta) te u svježem, neobrađenom stanju. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata borovnice utjecala je na produljenje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja koja je izmjerena korištenjem Rancimat uređaja u uvjetima ubrzanog procesa oksidacije masti.

SAŽETAK

Vitamini, minerali i ostale hranjive tvari imaju zaštitni učinak na zdravlje organizma. Znanstvene spoznaje upućuju na to da antioksidansi utječu na smanjenje rizika od kroničnih bolesti, karcinoma i kardiovaskularnih poremećaja. Prirodno se javljaju u voću i povrću te cjelovitim žitaricama koji predstavljaju njihov glavni izvor za ljudski organizam, pa su tako i borovnice izuzetno bogate antioksidansima. Učinkovitost antioksidansa u ljudskom organizmu je otežana slabom topljivošću, nemogućnosti prelaska staničnih membranskih barijera i brzim uklanjanjem iz stanica. Kako bi se poboljšala njihova farmakološka i farmakokinetička svojstva razvijaju se različiti sustavi, a jedan od njih je vezanje na liposome. Liposomi olakšavaju unutarstaničnu isporuku i produljuju vrijeme zadržavanja unutar stanice čime doprinose poboljšanju/očuvanju antioksidacijske aktivnosti biološki aktivnih spojeva.

Ključne riječi: liposomi, antioksidansi, borovnice

SUMMARY

Vitamins, minerals and other nutrients have a protective effect on the body's health. Scientific findings suggest that antioxidants affect the risk of chronic diseases, cancers and cardiovascular disorders. Naturally occurring in fruits and vegetables and whole grains, which are also their main sources for the human organism, blueberries are also extremely rich with antioxidants. The efficiency of antioxidants in human body is hampered by poor solubility, the inability to overcome cellular membrane barriers and rapid removal of cells. In order to improve their pharmacological and pharmacokinetic properties, various systems are developed, and one of them is liposome binding. Liposomes facilitate intracellular delivery and prolong the retention time within the cell and also protect/enhance the antioxidant activity of biologically active compounds.

Keywords: liposomes, antioxidants, blueberries

Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. Oksidacijski stres i pravilna prehrana.....	2
1.2. Borovnica kao izvor prirodnih antioksidansa.....	4
1.3. Upotreba liposomskih sustava za stabilizaciju biološki aktivnih spojeva.....	8
2. MATERIJALI I METODE.....	12
2.1. Priprema uzoraka borovnice.....	12
2.2. Postupak ekstrakcije fenolnih spojeva iz borovnice.....	14
2.3. Postupak pripreme liposoma	14
2.4. Određivanje oksidacijske stabilnosti – Rancimat metoda.....	14
3. REZULTATI.....	17
4. RASPRAVA I ZAKLJUČAK.....	19
5. LITERATURA.....	21

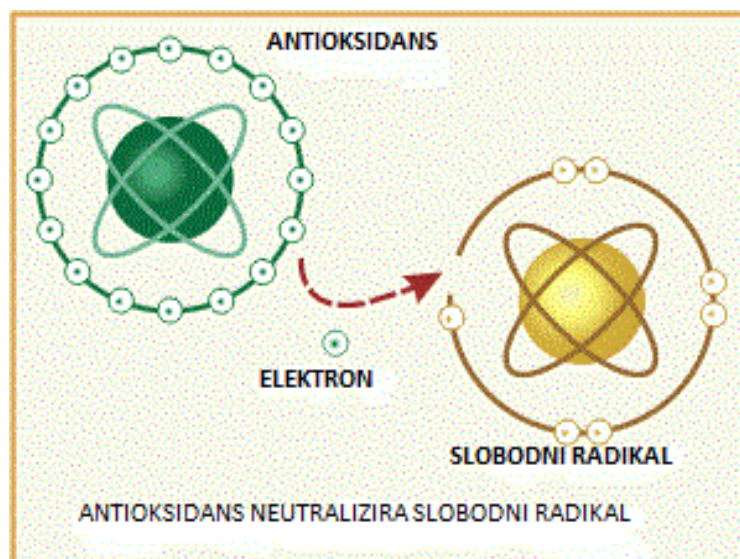
UVOD

Reaktivni kisikovi spojevi, uključujući superoksidni anion, vodikov peroksid i hidroksilni radikal, formiraju se kao normalni produkti aerobnog metabolizma, ali se proizvode pod patofiziološkim uvjetima. Prekomjerna proizvodnja i/ili nedovoljno uklanjanje reaktivnih kisikovih spojeva iz ljudskog organizma dovodi do značajnog oštećenja stanica, njihovih struktura, ali i funkcija. Oksidacijski stres definira se kao neravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva i antioksidacijske obrane stanice, odnosno stanja koje dovodi do prekomjernog nakupljanja slobodnih radikala u stanicama što dovodi do oštećenja staničnog tkiva. Potencijalna farmakološka strategija u sprječavanju ili liječenju oksidacijskog inducirano oštećenja staničnog tkiva uključuje uporabu odgovarajućih antioksidansa. Antioksidansi su tvari koje mogu spriječiti, odgoditi ili ublažiti oksidativna oštećenja. Ipak, njihova učinkovitost je otežana slabom topljivošću ovih spojeva, njihovom nemogućnošću prelaska staničnih membranskih barijera i brzim uklanjanjem iz stanica. Kako bi se poboljšala farmakološka i farmakokinetička svojstva antioksidansa, razvijaju se različiti sustavi kao što su antioksidacijske kemijske modifikacije te vezanje na micelle i liposome. Liposomi su umjetni mjehurići koji se sastoje od vodene jezgre zatvorene u jedan ili više fosfolipidnih slojeva. Spojevi topljivi u vodi mogu biti kapsulirani u vodenoj jezgri, dok spojevi topljivi u lipidima mogu biti ugrađeni u lipidni dvoslojni liposom. Kapsuliranjem enzimskih (superoksid dismutaza i katalaza) ili neenzimskih antioksidansa (glutation, N-acetilcistein, CoQ10, kurkumin, resveratrol, α -tokoferol i γ -tokoferol) u liposomima poboljšava se njihov terapijski potencijal jer liposomi olakšavaju unutarstaničnu isporuku antioksidansa i produljuju njihovo vrijeme zadržavanja unutar stanica [1].

1. OPĆI DIO

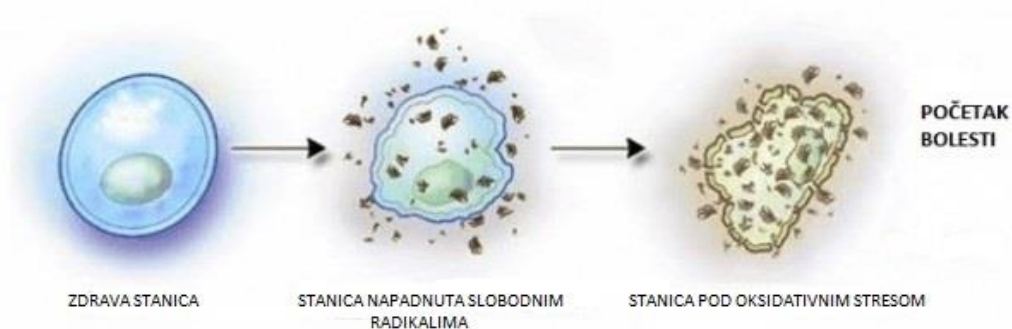
1.1. Oksidacijski stres i pravilna prehrana

Antioksidansi su kemijski spojevi koji sprječavaju ili usporavaju oštećenja stanice. Smatra se da bilo koji spoj koji može donirati elektrone i na taj način neutralizirati slobodne radikale ima antioksidativna svojstva. Antioksidansi djeluju na način da snižavaju energiju slobodnih radikala, sprječavaju njihovo nastajanje ili prekidaju lančane reakcije oksidacije. Stoga se na antioksidanse gleda kao molekule sa sposobnošću inhibicije reakcija oksidacije drugih molekula. Oksidacija je kemijska reakcija u kojoj dolazi do prijenosa elektrona ili vodika sa supstrata na oksidativni agens, pri čemu mogu nastati slobodni radikali. Na taj način mogu započeti lančane reakcije, a ako do njih dođe u stanici, nastaje šteta koja obično dovodi do staničnog uništenja. Prirodni antioksidansi se nalaze u voću i povrću, morskim biljkama te plodovima mora. Količina spojeva koji posjeduju antioksidacijska svojstva je zaista velika, a najučestaliji su vitamini A, C i E, te β -karoten i likopen. Suvremeni način života, koji podrazumijeva velika mentalna opterećenja, neispavanost, jednoličnu prehranu i prekomjerni unos alkohola, kave te konzumiranje cigareta, uvelike doprinosi povećanju oksidativnog stresa u našem organizmu i generiranju slobodnih radikala [2]. Slobodni radikal je molekula kojoj nedostaje jedan elektron, te je stoga vrlo nestabilna pa u lančanim reakcijama oduzima elektrone susjednim molekulama, pri čemu i one postaju slobodni radikali. Najreaktivniji su superoksid radikal i hidroksil radikal (reaktivni kisikovi spojevi) koji razara građevne elemente poput DNA, lipida i proteina. Uzima se da je najopasnije oštećenje bioloških struktura DNA koje uzrokuju mutacije, što dovodi do nepovratne promjene genetičke upute za sintezu proteina, te na taj način i do mnogih degenerativnih oboljenja. Usprkos svemu, slobodni radikali istovremeno pomažu u metabolizmu oksidirajući ugljikohidrate, masti i bjelančevine, te na taj način stvaraju toplinu i energiju. Zbog toga antioksidansi nemaju za svrhu potpuno uklanjanje oksidansa, nego održavanje njihove razine na optimalnoj. Da bi održali homeostazu potrebno je kontinuirano regenerirati antioksidativne kapacitete, inače dolazi do pojave oksidativnog stresa.



Slika 1. Antioksidans i slobodni radikal [3].

Oksidativni stres je stanje organizma gdje dolazi do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala, odnosno gubi se ravnoteža između stvaranja i razgradnje slobodnih radikala. Ipak, još uvijek nije otkriveno da li je oksidativni stres uzrok ili posljedica bolesti [4]. Povezuje se sa rakom, bolestima srca, moždanim udarom, starenjem, dijabetesom, artritismom, fibromijalgijom, Parkinsonovom bolesti, Alzheimerovom bolesti, autoimunom bolesti, opadanju kognitivnih funkcija te bolestima očiju kao što je makularna degeneracija [2].



Slika 2. Djelovanje slobodnih radikala na stanicu [5].

Ako se unese dovoljno antioksidativnih nutrijenata hranom u naš organizam, većina stanica bi bila sposobna tolerirati blagi oblik neravnoteže prooksidansa/antioksidansa. To bi bio razlog za uvrštavanje voća i povrća u svakodnevnu prehranu [4]. Prehrana siromašna mastima onemogućava apsorpciju β -karotena i vitamina E te drugih hranjivih tvari topljivih u mastima. Glavni izvor vitamina E su cjelovite žitarice, orašasti plodovi te biljna ulja visoke kvalitete, dok su voće i povrće glavni izvori vitamina C i karotenoida.

"Fitonutrijenti," ili "fitokemikalije" su tvari koje se nalaze u biljkama te one također posjeduju antioksidativna svojstva. Posjeduju ih i fenolni spojevi, poput flavonoida koje također nalazimo u voću i povrću.

Ljudski organizam posjeduje nekoliko antioksidanskih mehanizama koji se mogu zaštititi od posrednog oštećenja slobodnih radikala. Antioksidativni enzimi u organizmu su glutathion peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza. Za obavljanje svojih funkcija potrebni su im mikronutrijenti poput selen, željeza, bakra, cinka i mangana. Dakle, dolazimo do zaključka da i manjak nekog od ovih mikronutrijenata, kao i masti, može dovesti do slabog djelovanja antioksidanasa [2].

1.2. Borovnica kao izvor prirodnih antioksidansa

Borovnica je grmolika biljka iz porodice vriješovki, koja daje tamnoplave plodove u obliku bobica te ponekad doseže starost i do 15 godina. Ljekoviti dijelovi biljke, uz plodove, su listovi i korijen, koji se sabiru prije sazrijevanja plodova i suše se na tamnom i prozračnom mjestu. Plodovi se beru ljeti nakon sazrijevanja. Imaju ljekoviti učinak; snižavaju razinu kolesterola, pomažu kod dijabetesa tipa 2, smanjuju visoki krvni tlak, poboljšavaju pamćenje i ostale kognitivne funkcije, sprječavaju infekcije urinarnog trakta, smiruju menstrualne tegobe, poboljšavaju rast kose te štite zdravlje oka [6].



Slika 3. Borovnice [7].

Borovnice sadrže uglavnom vodu (85%), ugljikohidrate i vlakna. Od vitamina se ističu vitamini C, E i B6, dok je od minerala najviše zastupljeno željezo. Od ostalih minerala i elemenata u tragovima sadrže fosfor, kalcij, kalij, magnezij, mangan i cink. Pored antioksidanata u obliku vitamina sadrži i vrlo vrijedne spojeve, poput antocijana, jabučne i limunske kiseline, pektina, bioflavonoida, te tanina, koji pojačavaju ukupno antioksidativno djelovanje [8].

Vitamin C ili askorbinska kiselina je najjači antioksidans među vitaminima topljivim u vodi koji ima vrlo važnu ulogu u oksido-redukcijskim procesima i staničnom disanju. Sudjeluje u procesu stvaranja kolagena značajnog za razvoj i regeneraciju tkiva, krvnih žila, kostiju i zubi, a značajan je jer povećava otpornost organizma prema virusnim i bakterijskim infekcijama uključujući i alergije, učinkovit je kod bolesti dišnih putova i cijelog niza drugih bolesti [9].

Vitamini E skupine predstavljaju tokoferole topljive u mastima koji u organizmu također djeluju kao odlični antioksidansi sprječavajući oksidaciju nezasićenih masnih kiselina, membranskih lipida [10].

Vitamin B6 ili piridoksin je vitamin B-kompleksa topljiv u vodi koji sudjeluje u procesima metabolizma aminokiselina, lipida i glukoze, ali i u sintezi nekih važnih molekula (neuroprijenosnika, hemoglobina i nukleinskih kiselina). Također ima veliku ulogu u imunološkom, kardiovaskularnom i neurološkom sustavu [11].

Željezo se nalazi na hemoglobinu, krvnom pigmentu, te ima ulogu prijenosa kisika u krvi. Osobe koje pate od pomanjkanja željeza uslijed manjka kisika stalno imaju osjećaj umora [12].

Fosfor je drugi mineral po zastupljenosti u tijelu. On sudjeluje u izgradnji i formiranju koštanog tkiva, te je vrlo bitan sastojak kostiju. Fosfor potiče probavu, sudjeluje u sintezi proteina, održavanju hormonalne ravnoteže, potiče sposobnost tijela da iskoristi energiju iz hrane, omogućava regeneraciju stanica i optimizira kemijske reakcije tijela. [13].

Kalcij je najvažniji element za izgradnju kostiju, te se oko 99 % ukupne količine kalcija se nalazi u kostima i zubima. Osim toga kalcij ima važnu ulogu u raznim biokemijskim procesima, kao što su kontrakcija mišića, zgrušavanje krvi i stanična signalizacija. Kalij se može smatrati najzastupljenijim unutarstaničnim kationom, važnim za provođenje živčanih impulsa, a time i normalnu funkciju skeletnih mišića i srca. Nadalje, važan je pri održavanju normalnog pH organizma i osmotskog tlaka.

Magnezij ima ulogu kao kofaktor u više od 300 enzimski kataliziranih reakcija, sudjeluje u transportu iona, stabilizira stanične strukture i molekule, a bitan je i za zdravlje kostiju, te mu je dokazano i antioksidativno djelovanje [11].

Mangan je važan za održavanje zdravlja kostiju, stvaranje važnih enzima za izgradnju kostiju, jak je antioksidans, te kao koenzim sudjeluje u različitim metaboličkim procesima, u formaciji vezivnog tkiva, apsorpciji kalcija, pravilnom radu štitnjače, regulaciji spolnih hormona, regulaciji razine šećera u krvi, razgradnji masti i ugljikohidrata [14].

Cink je nužan za stvaranje tjelesnih stanica, pa je osobito važan za rast i razvoj djeteta u trudnoći. Osim toga, cink je vrlo važan za tek, te osjetila okusa, mirisa i vida (očna mrežnica sadrži mnogo cinka). Dokazano je da cink potiče zacjeljivanje kože, jača kosti, mišiće, kosu i nokte. [15].

Antocijani, plavi pigment u borovnici, povećavaju elastičnost i pospješuje protočnost krvnih žila i kapilara što dovodi do snižavanja krvnog tlaka, a time i rasterećenja srca. Antocijani također razrjeđuju krv i sprječavaju stvaranje ugrušaka.

Jabučna i limunska kiselina djeluju kao antiseptici.

Pektini su čvrst sastavni dio svih biljnih stanica i nalaze se u velikoj skupini balastnih tvari važnih za neometano funkcioniranje prehrane [16].

Bioflavonoidi pozitivno utječu na oštećenu funkciju kapilara i vena, imaju antitrombotička svojstva, moćni su antioksidanti, održavaju funkciju imunološkog sustava, te imaju pozitivan učinak u prevenciji srčanih bolesti, raka, pa i na antiinfektivna svojstva nekih bioflavonoida. Tanini su biljni polifenoli koji imaju antioksidativno djelovanje [17].

100 g borovnice sadrži [18]:

- Vitamin C: 9,7 mg (16% dnevnih potreba)
- Vitamin E: 0,6 mg (3%)
- Vitamin K: 19,3 mg (24%)
- Vitamin B6: 0,1 mg (3%)
- Željezo: 0,3 mg (2%)
- Kalij: 77,0 mg (2%)
- Bakar: 0,1 mg (3%)
- Mangan: 0,3 mg (17%)

Ostale vitamine i minerale u količini od 2% i manje.

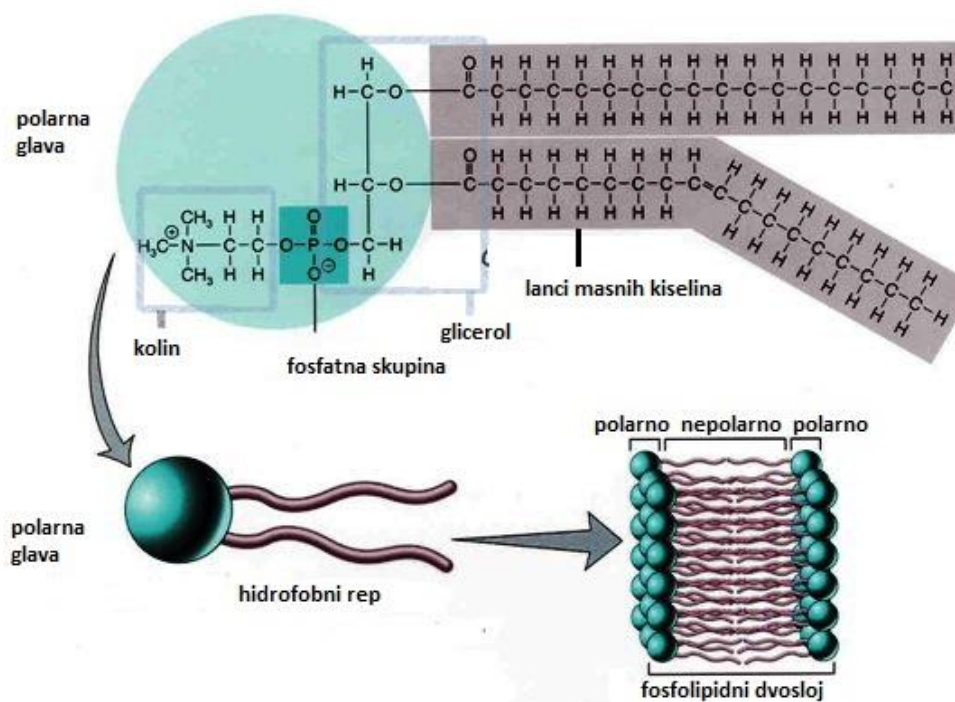
U Tablici 1. prikazan je kemijski sastav ploda borovnice.

Tablica 1. Kemijski sastav borovnice [18].

100 g svježe borovnice	57 kalorija
Sastojak	Količina
Masti	0 g (0%)
Zasićene masti	0 g (0%)
Trans masti	0 g
Kolesterol	0 g
Sol	1 mg (0%)
Ugljikohidrati	14 g (5% preporučene dnevne vrijednosti)
Vlakna	2 g (10%)
Šećeri	10 g
Proteini	1 g

1.3. Upotreba liposomskih sustava za stabilizaciju bioloških aktivnih spojeva

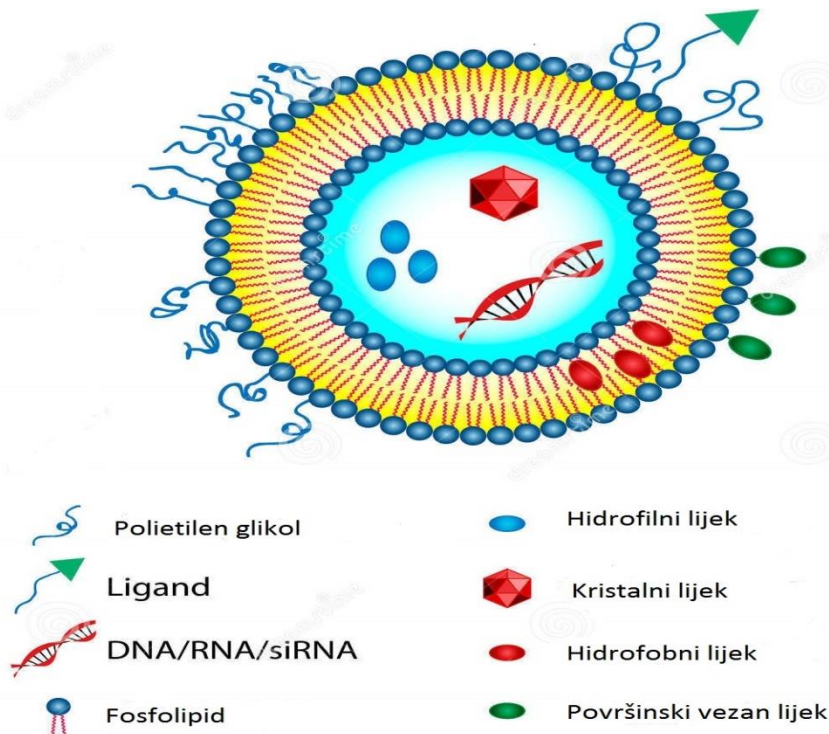
Liposomi su umjetne vezikule sfernog oblika koje se mogu proizvesti iz prirodnih ili sintetičkih fosfolipida, te im je vodena unutarnja faza obavijena sa jednim ili više slojeva koncentrično posloženih fosfolipidnih membrana. Promjer im je između 10-20 μm . Glavne gradivne jedinice liposoma su fosfolipidi, a zajednička karakteristika svih fosfolipida je da u prisutnosti vode tvore dvosloj koji ima najniže energetske stanje. Liposomi su amfipatske molekule, koje sadrže diglicerid, fosfatnu skupinu i jednostavne organske molekule kao što je kolin.



Slika 4. Građa fosfolipida (fosfatidilkolina) [19].

U ovojnici liposoma fosfolipidi su složeni u obliku dvosloja, pri čemu su polarne, hidrofilne "glave" orijentirane prema vanjskoj i unutarnjoj vodenoj fazi, te se tako nalaze na površini membrana, zaklanjajući pritom nepolarne, hidrofobne "repove" (lanci masnih kiselina) jedan prema drugome. Polarne molekule mogu biti inkapsulirane

u vodenu jezgru, lipofilne molekule u ovojnicu, te amfipatske između lipidnog i vodenog dijela.



Slika 5. Liposom [20].

Najčešće korišteni fosfolipid za izgradnju liposoma je lecitin, kojeg ima u jajima i soji. Lipidni polimorfizam odnosno pojava fosfolipida da u vodenom okruženju poprimaju različite strukture i faze je od velike važnosti u biološkim procesima i dizajniranju terapijskih sustava u kojima se kontrolira otpuštanje uklopljenog lijeka. U molekuli fosfolipida lanci masnih kiselina mogu biti u čvrstom (gel) stanju ili tekućem (kristaliničnom) stanju. Kolesterol se ponekad ugrađuje u fosfolipidni dvosloj kako bi povećao čvrstoću molekula što znatno ima utjecaja na prijelaz iz jedne u drugu fazu. Temperatura na kojoj se odvija prijelaz iz gel faze u fazu tekućih kristala naziva se temperatura faznog prijelaza (T_c) i ona ovisi o duljini i stupnju zasićenosti lanaca masnih kiselina. T_c je značajna u proizvodnji liposoma jer utječe na permeabilnost, agregaciju, fuziju, povezivanje na proteine plazme. Fluidnost i permeabilnost membrane će biti veća što je temperatura faznog prijelaza veća, pa će u tom slučaju stabilnost liposoma biti smanjena.



Slika 6. Priprava liposomal-N-acetilcisteina [21].

Na slici 6. je kao primjer prikazana priprava liposomal-N-acetilcisteina.

Fizikalno kemijske karakteristike poput veličine liposoma, fosfolipidnog sastava, stabilnosti, uspješnost inkorporiranja lijeka, biološka interakcija sa stanicama omogućuju primjenu liposoma kao nosača lijekova te njihovo otpuštanje. Interakcija između liposoma i stanice može biti npr. lipidna izmjena gdje se izmjenjuje lipid iz liposoma sa lipidom stanične membrane, što dovodi do gubitka vodenog sadržaja liposoma. Može doći i do adsorpcije na površinu stanica kada su privlačne sile (elektrostatske, elektrodinamičke, van der Waalsove sile) jače od odbojnih uz pojavu fuzije ili endocitoze. Endocitozom se cijeli liposom može unijeti u citoplazmu, dok se fuzijom cijeli sadržaj liposoma oslobađa direktno u citoplazmi. Liposomi mogu biti u obliku suspenzija, aerosoli, krema, gelova ili suhih prašaka. Poput bioloških membrana. Na zadržavanje liposoma utječe njegoa veličina, koncentracija lipida, naboj na površini te fluidnost i čvrstoća membrane. Liposomi većeg promjera se u usporedbi s onima onih manjeg promjera brže uklanjaju iz cirkulacije kao i oni u kojima je manja koncentracija lipida. Također lipidi neutralnog ili pozitivnog naboja se duže zadržavaju u cirkulaciji.

Gotovo pa sve metode priprave liposoma uključuju sušenje lipidnog sloja uklanjanjem organskog otapala, disperziju fosfolipida u vodi, uklanjanje neuklopljenog sadržaja i analizu konačnog produkta. Konačni produkt trebao bi imati visoku

uspješnost uklapanja lijeka, prilikom njegove proizvodnje ne bi se smjelo koristiti štetno organsko otapalo, te bi cijeli postupak trebao biti jednostavan i ponovljiv. Lipofilni lijekovi se dodaju zajedno sa fosfolipidima otopljenima u organskom otapalu, a hidrofilni otopljeni u vodenoj fazi. Postoje tri velike skupine metode pripreme liposoma obzirom na način dispergiranja fosfolipida. Prva skupina uključuje postupke fizičkog dispergiranja fosfolipida, to su metode hidratacije suhog fosfolipidnog sloja, metoda dehidracije-rehidracije, metoda smrzavanja-taljenja, soniciranje i visokotlačna homogenizacija. U drugu spadaju postupci dvofaznog dispergiranja fosfolipida koji uključuju metodu etanolnog injiciranja, metodu eternog injiciranja, metodu pripreme liposoma uparavanjem V/U emulzija i metodu pripreme višestrukih emulzija. Zadnju skupinu predstavljaju postupci pripreme liposoma solubilizacijom pomoću detergensa. Razlikujemo i metode pripreme liposoma s obzirom na morfološka svojstva.

Hidroliza i oksidacija liposoma i njegovih fosfolipida je uzrok nestabilnosti liposoma raspršenih u vodenoj fazi. Zbog toga bi fosfolipidi u svojoj strukturi trebali sadržavati zasićene masne kiseline ili bi im se trebao dodati antioksidans (vitamin E). Za stabilizaciju liposoma razvijene su metode poput zamrzavanja, liofilizacije te metoda sušenja raspršivanjem. Liofilizacija produžava rok trajanja liposomskih sustava, a prije upotrebe se rekonstruiraju pomoću vode koja se dodaje injekcijama. U procesu liofilizacije dodaju se krioprotektanti odnosno tvari koji imaju nisku točku zamrzavanja te onemogućavaju zamrzavanje i oštećenje tvari [22].

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Priprema uzoraka borovnice

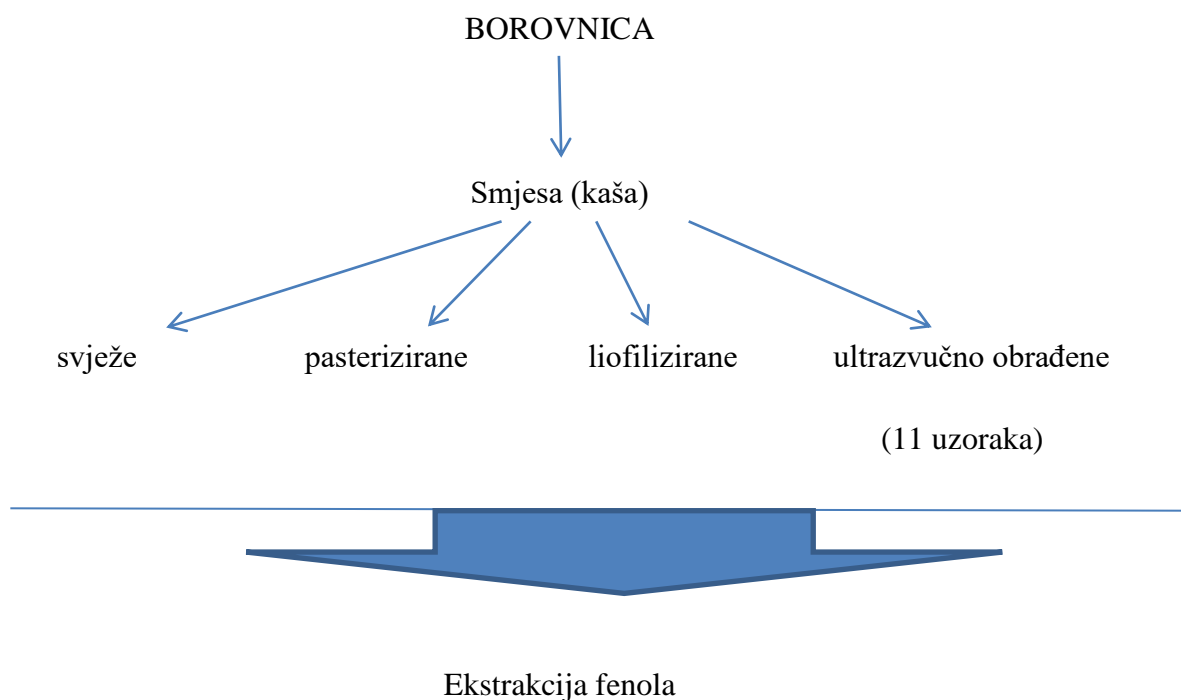
U istraživanju su korišteni uzorci plodova borovnice koji su kupljeni na tržnici u Splitu. Uzorci su raspodijeljeni u tri grupe: jedna skupina plodova koja se koristila kao uzorak borovnice u svježem stanju (korištena je odmah nakon nabavke na način da je ekstrahirana frakcija fenolnih spojeva koja je do daljnjih analiza pohranjena na temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Druga grupa plodova odmah nakon nabavke je liofilizirana u uređaju za liofilizaciju (Labconco, SAD) na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu, dok je treća grupa plodova je pohranjena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, do trenutka kada je u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu obrađena ultrazvučnim procesorom visokog intenziteta (model UP 400 S, proizvođač „dr. Hielscher“ GMBH, Tetlow, Njemačka).

Tablica 2. Eksperimentalni podaci za korištene tretmane ultrazvukom visokog intenziteta

Oznaka uzorka	Amplituda (%)	Trajanje tretmana (min)	Snaga (W)	Početna temperatura T1 ($^{\circ}\text{C}$)	Konačna temperatura T2 ($^{\circ}\text{C}$)
A1	100	6	60	7	72
A2	50	6	37	10	50
A3	50	9	30	10	66
A4	100	9	52	12	78
A5	75	6	45	12	65
A6	50	3	45	15	45
A7	75	6	48	15	68
A8	75	3	57	17	45
A9	100	3	70	16	35

A10	75	6	47	19	50
A11	75	9	42	21	70

Ukupno 11 uzoraka homogeniziranih plodova borovnice obrađeno je sondom pri čemu su korištene različite temperature tretmana, različita snaga te različito vrijeme trajanja postupka obrade.



Slika 7. Shematski prikaz postupaka eksperimentalnih postupaka.

2.2. Postupak ekstrakcije fenolne frakcije iz plodova borovnice

Prije ekstrakcije uzorci borovnice su homogenizirani u mikseru. U Erlenmayerovu tikvicu odvažuje se 2 g uzorka, doda se 8 mL 80% vodene otopine metanola (v/v) koji sadrži 1% mravlje kiseline (v/v). Smjesa se potom propuhuje inertnim plinom (dušikom) te se ekstrakcija provodi na ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi od 50 °C tijekom 15 minuta nakon čega se ekstrakt profiltrira kroz filter papir (Whatman br. 40, Whatman International Ltd., Velika Britanija). Dobiveni filtrat se u odmjernoj tikvici od 10 mL nadopuni otapalom za ekstrakciju do oznake.

2.3. Postupak pripreme liposoma

Liposomi su pripremljeni koristeći proliposomsku metodu. Proliposomska smjesa je sadržavala masti, vodu i etanol te se uz pomoć razrjeđenja dobilo liposomske čestice. Kao mast koristio se lecitin iz soje Phospholipon 90G koji se sastoji od fosfatidinkolina (min 94%). Smjesa fosfolipona 90G, etanola i vode zagrijana do temperature od 60 °C i stavljena na kontinuirano miješanje pri brzini od 800 okretaja/minuti do nastanka homogene smjese. Nakon što su se uzorci ohladili na sobnu temperaturu, dodani su ekstrakti fenola te se nastavilo s miješanjem tijekom pola sata kako bi se dobila homogena smjesa liposom-fenolni ekstrakt. Omjer između fenolnog ekstrakta i fosfolipidon 90G korišten u liposomu bio je 1:10.

2.4. Određivanje oksidacijske stabilnosti – Rancimat metoda

Oksidacijska stabilnost određena je metodom ubrzane oksidacije ulja Rancimat testom (ISO 6886:1996). Indukcijski period (IP) oksidacije ulja određuje se na osnovi količine izdvojenih kratko lančanih hlapljivih organskih kiselina koje nastaju oksidacijom ulja i koje se uvode u demineraliziranu vodu. Mjerenjem porasta vodljivosti vode u kojoj se otapaju produkti oksidacije indirektno se prati tijek

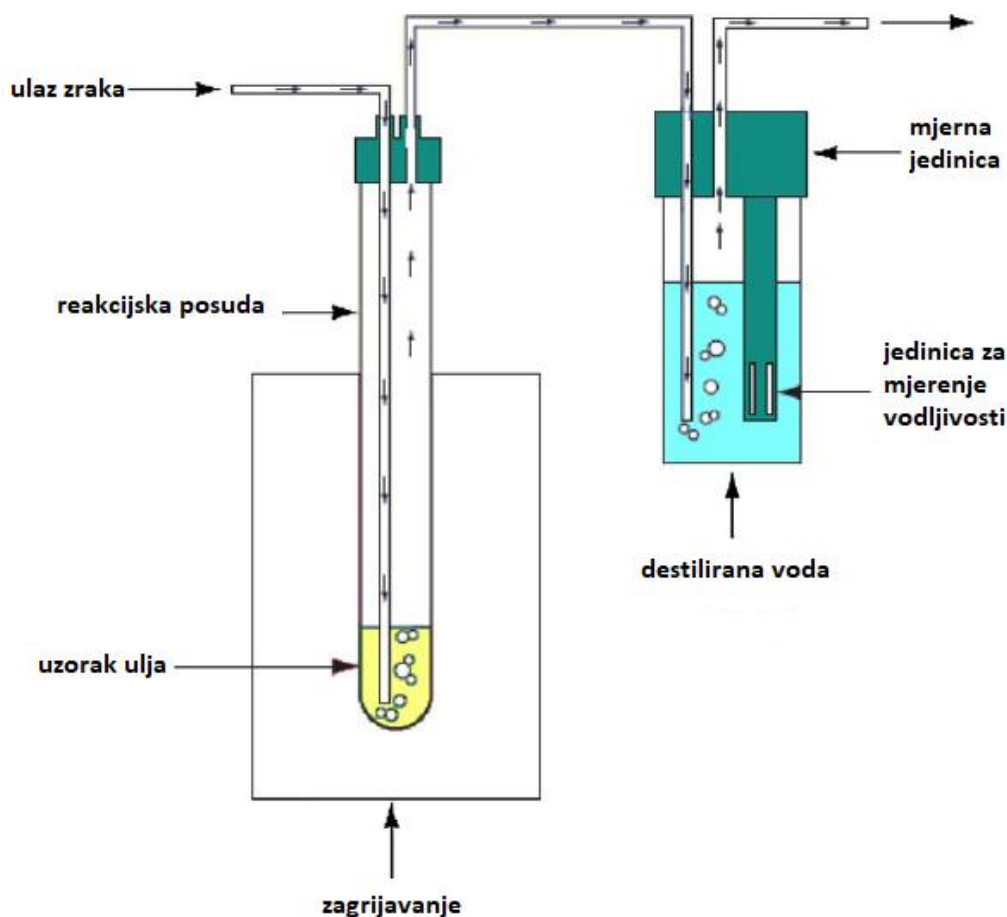
oksidacijskog kvarenja ulja. Dobivena vrijednost induksijskog perioda (vrijeme u satima) ukazuje na otpornost ispitivanog ulja prema oksidaciji. Ako je vrijednost induksijskog perioda veća tada je veća i oksidacijska stabilnost ili održivost ulja.

Za ovo određivanje korišten je automatski uređaj za određivanje oksidacijske stabilnosti ulja Rancimat model 743 (Metrohm, Švicarska), kod uvjeta rada: masa uzorka ulja 3,0 g, temperatura 120°C, protok zraka 20 L/h. Koncentracija sustava liposoma-fenolni ekstrakt iznosio je 13,3 vol/vol%.

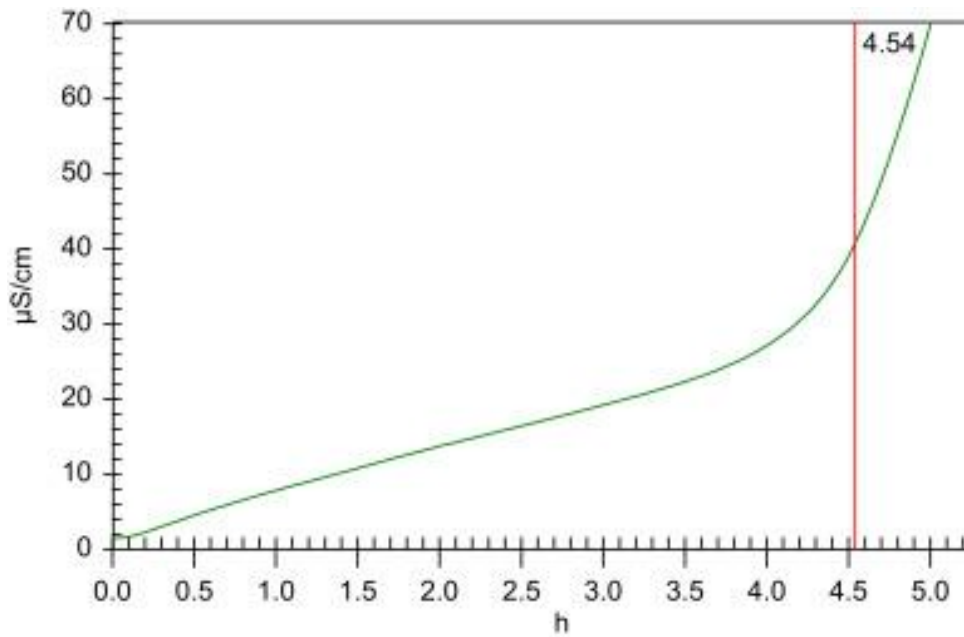
Indukcijski period (IP) predstavlja broj sati potreban da analizirano ulje dostigne vrijednost peroksidnog broja od 5 mmol O₂ /kg. Određivanje oksidacijske stabilnosti svih uzoraka ulja provedeno je s ponavljanjima, a prikazana je srednja vrijednost.

Formula po kojoj se izračunalo produljene lag faze:

$$\text{Produljenje lag faze} = ((IP_{\text{uzorak}} - IP_{\text{kontrola}}) / IP_{\text{kontrola}}) \times 100 (\%)$$



Slika 8. Shema određivanja oksidacijske stabilnosti korištenjem uređaja Rancimat [23].



Slika 8. Prikaz oksidacijske krivulje u Rancimat testu [24].

Slika 8. prikazuje oksidacijsku krivulju dobivenu ispitivanjem oksidacijske stabilnosti korištenjem uređaja Rancimat, gdje krivulja do crvene crte označava lag fazu u kojoj ne dolazi do oksidacije ulja, a dio krivulje iznad crvene crte označava ubranu oksidaciju ulja.

3. REZULTATI

Tablica 3. prikazuje utjecaj fenolnih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Tablica 3. Utjecaj fenolnih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja

Uzorci	Produljenje lag faze	
	(h)	(%)
Kontrola (ulje)	10,28 \pm 0,12	
Kontrola (ulje + EtOH)	9,82 \pm 0,14	
Fenolni ekstrakti iz svježe borovnice	0,13 \pm 0,09	1,26 \pm 0,04
Pasterizirani	0,77 \pm 0,09	7,49 \pm 0,10
Liofilizirani	0,00	0,00
UZV1	0,61 \pm 0,24	5,93 \pm 0,13
UZV2	1,09 \pm 0,18	10,60 \pm 0,07
UZV3	0,90 \pm 0,12	8,75 \pm 0,22
UZV4	1,10 \pm 0,09	10,70 \pm 0,24
UZV5	0,00	0,00
UZV6	0,00	0,00
UZV7	0,17 \pm 0,10	1,65 \pm 0,14
UZV8	0,18 \pm 0,12	1,75 \pm 0,12
UZV9	0,00	0,00
UZV10	0,00	0,00
UZV11	0,00	0,00

Tablica 4. prikazuje utjecaj sustava liposom-fenolni ekstrakt na produljenje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja.

Tablica 4. Produljenje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja djelovanjem fenolnih ekstrakta kultivirane borovnice inkorporirane u liposome

	Liposomi	
Uzorak	Produljenje lag faze (h) (%)	
A0 (svježe borovnice)	3,05 ± 0,11	43,66 ± 1,62
AP (pasterizirane)	8,87 ± 0,20	127,10 ± 2,84
AL (liofilizirane)	3,63 ± 0,14	51,97 ± 2,03
A1	2,27 ± 0,21	32,47 ± 3,04
A2	3,24 ± 0,40	46,38 ± 5,68
A3	3,40 ± 0,20	48,67 ± 2,84
A4	4,34 ± 0,13	62,15 ± 1,82
A5	3,19 ± 0,31	45,66 ± 4,46
A6	2,54 ± 0,20	36,34 ± 2,84
A7	2,67 ± 0,28	38,21 ± 4,06
A8	2,81 ± 0,24*	40,22 ± 3,45
A9	2,81 ± 0,16	40,22 ± 2,23
A10	3,14 ± 0,27	44,95 ± 3,85
A11	2,58 ± 0,14	36,92 ± 2,03

4. RASPRAVA I ZAKLJUČAK

U završnom radu smo pomoću Rancimat metode ispitivali antioksidacijsko djelovanje fenolnih ekstrakata borovnice. Prvo smo analizirali utjecaj fenolnih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Prije svega smo podvrgnuli Rancimat metodi čisto ulje koje je pokazalo da njegova oksidacija odmah započinje, te je to bio i prvi uzorak. Drugi uzorak je bilo ulje sa etanolom. Ovaj uzorak smo analizirali da provjerimo da li etanol koji se koristio u pripravi fenolnog ekstrakta kao ekstrakcijsko otapalo može imati utjecaja na rezultate. Rezultati su pokazali da etanol nema utjecaja na oksidacijsku stabilnost maslinovog ulje odnosno da je inertno pri ovom postupku. Sljedeći uzorak su bili fenolni ekstrakti svježe borovnice gdje je produljenje lag faze bilo 1,26 % (lag faza je faza u kojoj ne dolazi do oksidacije ulja) što se može smatrati zanemarivim produljenjem. Fenolni ekstrakti pasterizirane borovnice su dali pomak od 7,5 % u smjeru produljenja lag faze. Fenolni ekstrakti liofilizirane borovnice nam, iako je to bilo očekivano, nisu dali nikakve rezultate odnosno nisu rezultirali produljenjem indukcijskog perioda ulja. Ipak, 11 uzoraka fenolnih ekstrakata pripremljenih obradom ultrazvukom na različite načine, u različitom vremenskom trajanju, amplitudi, temperaturi te snazi, su nam dali rezultate. Od uzoraka se posebno ističu UZV2 i UZV4 koji su ne samo nadmašili sve rezultate dobivene korištenjem ekstrakata obrađenih ultrazvukom, nego i rezultate dobivene korištenjem ostalih fenolnih ekstrakata. Produljenje lag faze je bilo preko 10 %, što znači da ovakav način pripreme fenolnih ekstrakata borovnice ima pozitivan učinak na produljenje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja.

Nakon testiranja ekstrakata smo testirali učinak liposoma na antioksidativno djelovanje fenolnih spojeva ekstrakata borovnice. Rancimat metodom smo mjerili djelovanje fenolnih ekstrakata borovnice koji su inkorporirani u liposome na oksidacijsku stabilnost ulja.

Rezultati su pokazali značajno produljenje lag faze tj. značajno produljenje oksidacijske stabilnosti maslinovog ulja, što se povezuje sa produljenjem antioksidativnog djelovanja fenola inkorporiranih u liposome. Navedeno je bilo i očekivano.

Fenolni ekstrakti dobiveni iz svježih borovnica su produljili oksidacijsku stabilnost maslinovog ulja za 43 %, a uvjerljivo najbolji rezultat su dali ekstrakti fenola pasteriziranih borovnica koji su produljili lag fazu za čak 127 %. Primjena fenolnog ekstrakta liofilizirane borovnice je rezultirao produljenjem lag faze za 51 %. Među uzorcima ultrazvučno obrađenih ekstrakata borovnice rezultati su različiti, a opet se posebno ističe uzorak UZV4.

Zaključak je da liposomi značajno produljuju antioksidativno djelovanje fenolnih spojeva borovnice, ali i drugih biološki aktivnih spojeva, zbog čega se učestalo koriste u kozmetičkoj, farmaceutskoj i u prehrambenoj industriji.

5. LITERATURA

1. Zacharias E. Suntres. Liposomal Antioxidants for Protection against Oxidant-Induced Damage. Journal of Toxicology. 2011
2. <http://www.fitness.com.hr/prehrana/nutricionizam/Sto-su-antioksidansi.aspx> (30.8)
3. <http://prirodnilek.com/slobodni-radikali/> - (2. 9)
4. <http://www.inpharma.hr/index.php/news/33/19/Antioksidansi> (30.8)
5. <http://prirodnilek.com/slobodni-radikali/> (3. 9)
6. <http://borovnice-zelina.com/borovnice.html> (3. 9)
7. <http://kupisadnice.hr/bolesti-borovnice-i-brusnice/> (3. 9)
8. <https://zdravozdravo.blogspot.hr/2013/07/borovnica.html> (3. 9)
9. https://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C (4. 9)
10. https://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamin_E (4. 9)
11. <http://definicijahrane.hr/> (1. 9)
12. http://zena.rtl.hr/clanak/ostalo_na_temu_zdravlja/zeljezo_i_simptomi_pomanjkanja_zeljeza/603 (1. 9)
13. <http://www.centarzdravlja.hr/hrana-i-zdravlje/zdrava-prehrana/zasto-nam-je-potreban-fosfor/?refresh=true> (1. 9)
14. <http://www.centarzdravlja.hr/hrana-i-zdravlje/zdrava-prehrana/zasto-je-vazno-unositi-mangan/> (1. 9)
15. <http://www.zdravosfera.com/cink/> (1. 9)
16. <http://www.mrsavljenje-forum.com/bogatstvo-limuna-pektini-i-limunska-kiselina/> (1. 9)
17. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Bioflavonoidi> (1. 9)
18. <http://borovnice-zelina.com/borovnice.html> (1. 9)
19. <http://www.chimica-online.it/biologia/membrana-cellulare.htm> (2. 9)
20. <https://it.dreamstime.com/illustrazione-di-stock-delivery-system-scheme-della-droga-dei-liposomi-image79276746> (4. (4.9))
21. <https://www.hindawi.com/journals/jt/2011/152474/> (4.9)
22. Dasović M, Liposomi kao nosači lijekova: parenteralna primjena, Diplomski rad, Zagreb, Hrvatska, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2015.
23. https://www.google.hr/search?source=hp&q=google+prevoditelj&oq=google+pre&gs_l

≡psy-

ab.3.0.35i39k1j0l3.4656.7655.0.8844.11.10.0.0.0.0.132.961.8j2.10.0....0...1.1.64.psy-
ab..1.10.957.0..0i131k1.0.MCkpdndYF7Y (5. 9)

24. <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1364032112004170-gr2.jpg> (5. 9)