

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**UTJECAJ PRIMJENE EMULZIJSKIH SUSTAVA NA
UČINAK FENOLNIH EKSTRAKATA BOROVNICE U
PRODULJENJU OKSIDACIJSKE STABILNOSTI ULJA**

DIPLOMSKI RAD

ANA MARIJA DROPULIĆ

Matični broj :169

Split, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA
SMJER: MEDITERANSKE KULTURE

**UTJECAJ PRIMJENE EMULZIJSKIH SUSTAVA NA
UČINAK FENOLNIH EKSTRAKATA BOROVNICE U
PRODULJENJU OKSIDACIJSKE STABILNOSTI ULJA**

DIPLOMSKI RAD

ANA MARIJA DROPULIĆ

Matični broj :169

Split, rujan 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
ORIENTATION: MEDITERANEAN CULTURES

DIPLOMA THESIS

**THE EFFECT OF EMULSION SYSTEMS ON THE
ENHANCEMENT OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF
PHENOLIC EXTRACTS FROM CULTIVATED BLUEBERRY**

ANA MARIJA DROPULIĆ

Parent number: 169

Split, September 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet Split

Diplomski studij kemijskog inženjerstva

Smjer: Mediteranske kulture

Znanstveno područje: biotehničke zanosti

Znanstveno polje: prehrambena tehnologija

Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko- tehnološkog fakulteta

UTJECAJ PRIMJENE EMULZIJSKIH SUSTAVA NA UČINAK FENOLNIH EKSTRAKATA BOROVNICE U PRODULJENJU OKSIDACIJSKE STABILNOSTI ULJA

Ana Marija Dropulić

Sažetak: Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) predstavlja jedan od najbogatijih prirodnih izvora polifenola u prehrani čovjeka. Raznolikost biološkog potencijala polifenolnih spojeva potvrđena je rezultatima brojnih znanstvenih studija. U ovom je istraživanju ispitan utjecaj fenolnih ekstrakata dobivenih iz svježih plodova te nakon različitih načina obrade plodova borovnice (liofilizacija, pasterizacija, obrada ultrazvukom visokog intenziteta) na povećanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja. U cilju povećanja biološkog potencijala fenolnih ekstrakata u kombinaciji s njima korištene se dvije vrste emulzija tretirane postupkom mehaničke homogenizacije i ultrazvukom visokog intenziteta. Oksidacijska stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja mjerena Rancimat uređajem pokazala je značajan porast primjenom smjese emulzija i ekstrakata borovnice u odnosu na primjenu čistih fenolnih ekstrakata borovnice.

Ključne riječi: polifenoli, oksidacijska stabilnost, Rancimat, emulzije

Tehnička pomoć: Dr.sc. Perica Bošković

Rad sadrži: 30 stranica, 8 slika, 4 tablice, 8 literaturnih izvora

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Izv.prof.dr.sc.Vesna Sokol
2. Doc.dr.sc. Ivana Generalić Mekinić
3. Prof.dr.sc. Tea Bilušić- mentor

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of chemistry and Technology

Graduate study of Chemical Technology

Orientation: Mediteranean Cultures

Scientific area: biotechnical sciences

Scientific field: food technology

Thesis subject was approved by 21th Faculty Council of Chemistry and Technology

THE EFFECT OF EMULSION SYSTEMS ON THE ENHANCEMENT OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF PHENOLIC EXTRACTS FROM CULTIVATED BLUEBERRY

Ana Marija Dropulić

Abstract: Cultivated blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) represents one the richest natural sources of polyphenols. Numerous studies reported a huge range of biological potential of polyphenols. The aim of this study was to determine the effect of phenolic extracts from cultivated blueberry obtained from raw plant material as well as from plant material treated by different techniques (pasteurization, freeze-drying and the use of high intensity ultrasound) on the oxidative stability of extra virgin olive oil. In order to enhance the biological potential of different phenolic extracts from blueberry, the application of oil in water emulsion system was used. Prepared emulsions have been treated by mechanical homogenization and ultrasound of high intensity . Results showed that the oxidative stability of extra virgin olive oil measured by Rancimat apparatus was significantly prolonged after the use of phenolic extracts with emulsions.

Key words: polyphenols, oxidative stability, Rancimat, emulsions

Technical assistance: Perica Bošković, PhD

Thesis contains: 30 pages, 8 figures, 4 tables, 8 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Vesna Sokol, associated professor
2. Ivana Generalić Mekinić, PhD, assistant professor
3. Tea Bilušić, full professor- mentor

Rad je izrađen na Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tee Bilušić, u periodu od listopada 2016. do veljače 2017. godine.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Tei Bilušić na pomoći te na uloženom vremenu i trudu u moj Diplomski rad. Osjećam se slobodnom reći da mi je ista ta mentorica (sa svoja tri mentorstva tijekom mog studiranja) , svjesno ili nesvjesno, pomogla u izgrađivanju same sebe, u smislu mog napretka u samostalnom radu i konstantnog obogaćivanja znanjem.

Hvala dr.sc. Perici Boškoviću na sudjelovanju i pruženoj pomoći prilikom izrade ovog Diplomskog rada.

Jedno veliko hvala (sad mom zaručniku) Marku što je sa mnom pro(e)živio većinu mojih ispita, kolokvija, prolazaka, padova i svih sretnih i malo manje sretnih trenutaka studentskih dana, koji obranom ovog rada ostaju iza mene.

Ništa manje hvala i mojoj majci Grozdani , mojoj obitelji, mom cimeru i svim mojim divnim prijateljima na podršci tijekom cijelog studiranja na najdražem mi KTF-u.

Zadatak diplomskog rada

Cilj rada bio je ispitati utjecaj primjene emulzijskih sustava na učinak fenolnih ekstrakata kultivirane borovnice (*Vaccinium corybosum L.*) u cilju postizanja produljenja oksidacijske stabilnosti ulja.

Kao uzorci korišteni su svježi, liofilizirani te ultrazvukom visokog intenziteta obrađeni plodovi kultivirane borovnice iz kojih je potom ekstrahirana fenolna frakcija. Fenolne frakcije uzoraka testirane su kao potencijalni antioksidansi u cilju produljenja oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja koristeći Rancimat metodu. Nadalje, uzorci fenolnih ekstrakata iz borovnice pomiješani su u određenom omjeru s dvije vrste emulzijskih sustava i potom je ta smjesa opet testirana na učinak produljenja oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja Rancimat metodom.

Konkretni zadaci ovog diplomskog rada su bili: a) priprava uzoraka fenolnih frakcija borovnice, b) priprava emulzijskih sustava, c) određivanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja s dodatkom čistih fenolnih ekstrakata i njihovih smjesa sa emulzijama koristeći Rancimat metodu.

SAŽETAK

Kultivirana borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) predstavlja jedan od najbogatijih prirodnih izvora polifenola u prehrani čovjeka. Raznolikost biološkog potencijala polifenolnih spojeva potvrđena je rezultatima brojnih znanstvenih studija. U ovom je istraživanju ispitan utjecaj fenolnih ekstrakata dobivenih iz svježih plodova te nakon različitih načina obrade plodova borovnice (liofilizacija, pasterizacija, obrada ultrazvukom visokog intenziteta) na povećanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja. U cilju povećanja biološkog potencijala fenolnih ekstrakata u kombinaciji s njima korištene se dvije vrste emulzija tretirane postupkom mehaničke homogenizacije i ultrazvukom visokog intenziteta. Oksidacijska stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja mjerena Rancimat uređajem pokazala je značajan porast primjenom smjese emulzija i ekstrakata borovnice u odnosu na primjenu čistih fenolnih ekstrakata borovnice.

Ključne riječi: polifenoli, oksidacijska stabilnost, Rancimat, emulzije

ABSTRACT

Cultivated blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) represents one the richest natural sources of polyphenols. Numerous studies reported a huge range of biological potential of polyphenols. The aim of this study was to determine the effect of phenolic extracts from cultivated blueberry obtained from raw plant material as well as from plant material treated by different techniques (pasteurization, freeze-drying and the use of high intensity ultrasound) on the oxidative stability of extra virgin olive oil. In order to enhance the biological potential of different phenolic extracts from blueberry, the application of oil in water emulsion system was used. Prepared emulsions have been treated by mechanical and ultrasound of high intensity. Results showed that the oxidative stability of extra virgin olive oil measured by Rancimat apparatus was significantly prolonged after the use of phenolic extracts with emulsions.

Key words: polyphenols, oxidative stability, Rancimat, emulsions

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Klasifikacija fenolnih spojeva	2
2.2. Fenolni spojevi iz kultivirane borovnice (Vaccinium corymbosum L.)	8
2.3. Stabilitnost fenolnih spojeva (čimbenici okoliša, uvjeti u probavnom sustavu)	9
2.4. Tehnike inkapsulacije u cilju povećanja stabilnosti fenolnih spojeva	12
2.4.1. Primjena emulzijskih sustava	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali – uzorci borovnice	16
3.2. Postupak ekstrakcije fenolne frakcije iz plodova borovnice	19
3.3. Priprema emulzijskih sustava	20
3.4. Rancimat metoda	22
4. REZULTATI	23
5. RASPRAVA	27
6. ZAKLJUČAK	29
7. LITERATURA	30

1. UVOD

Kultivirane visokogrmne, američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) porijeklom su iz Sjeverne Amerike te se već godinama proizvode za komercijalnu upotrebu, dok je u posljednje vrijeme sve više područja u Europi na kojima se sade borovnice.

Borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) se smatraju jednim od najbogatijih izvora fenolnih spojeva, koji imaju visoku biološku aktivnost. Predominantni flavonoidi koji se nalaze u bobičastom voću su antocijani i flavoni, koji su gotovo isključivo prisutni u glikoliziranim oblicima. Antocijani mogu također postojati kao diglikozidi ili kao acilirani oblici glikozida. Bilo je mnogo pokušaja da se odredi sastav i biološka aktivnost fenolnih spojeva u borovnicama, s obzirom na jasan odnos fenolnih spojeva u biljnoj hrani s prevencijom kroničnih bolesti. Uz ostale antioksidativne komponente, fenolni spojevi kao prirodni sekundarni metaboliti su se pokazali kao komponente sa potencijalnim učinkom u smanjenju broja oboljenja od kardiovaskularnih bolesti.

Nestabilnost i biodostupnost polifenola naveliko ograničava njihove potencijalne pozitivne učinke na zdravlje. Upotreba zaštićene inkapsulacije i sustava dostavljanja mogu poboljšati stabilnost i biodostupnost polifenola. Do danas je razvijen široki raspon tehnologija za inkapsulaciju polifenola. Među njima, inkapsulacija primjenom emulzijskih sustava se smatra jednom od najobećavajućih tehnika za zaštitu i dostavljanje polifenola zbog njezine visoke učinkovitosti prilikom inkapsulacije, održavanja kemijske stabilnosti fenola i njihovog kontroliranog otpuštanja.

U ovom istraživanju, ispitan je učinak fenolnih ekstrakata plodova kultivirane borovnice tretirane različitim tehnikama obrade na produljenje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Nadalje, u ovom istraživanju ispitana je primjena različitih emulzijskih sustava u cilju povećanja učinka fenolnih ekstrakata borovnice na produljenje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja.

2. OPĆI DIO

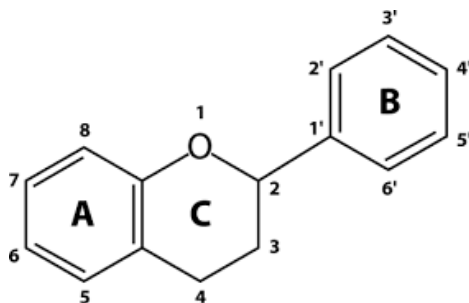
2.1. Klasifikacija fenolnih spojeva

Fenolni spojevi čine raznoliku grupu molekula klasificiranu kao sekundarni metaboliti u biljkama koje imaju širok raspon struktura i funkcija. Mogu se klasificirati u spojeve topljive u vodi (fenolne kisline, fenilpropanoidi, flavonoidi i kioni), te spojeve koji nisu topljivi u vodi (kondezirani tanini i hidroksicimetna kiselina vezana za stanične stijenke). Fenolni spojevi smatraju se jednom od najraširenijih i kemijski najraznolikijih skupina spojeva u kraljevstvu biljaka.

Voće sadržava značajnu razinu bioaktivnih spojeva koji imaju pozitivne učinke na zdravlje osim onih osnovnih nutritivnih vrijednosti. Količina fenolnih spojeva u voću znatno ovisi, između ostalog, o stupnju dozrelosti plodova, vrsti, klimatskim prilikama, sastavu tla, geografskoj lokaciji i uvjetima skladištenja. Fenoli su uglavnom klasificirani prema broju fenolnih prstenova koje sadrže (fenolne kiseline, stilbeni, flavonoidi, lignani i tanini). Svi ovi spojevi imaju jednu ili više hidroksilnih skupina direktno povezanih na aromatski prsten što karakterizira fenolnu strukturu.

U slučaju flavonoidnih skupina, koje su obično povezane na jednu ili više molekula šećera poznati su kao flavonoidni glikozidi, dok ukoliko nisu povezani sa molekulom šećera nazivaju se aglikoni. Stupanj glikolize direktno utječe na antioksidativnu sposobnost flavonoida. Obično, aglikoni miricetina i kvercetina su aktivniji od njihovih glikozidnih oblika.

Flavonoidi su glavni bioaktivni sastojci koji se nalaze u voću te su raspoređeni u 6 podklasa: flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavan-3-oli, flavoni i antocijani.¹



Slika 1. Osnovna kemijska struktura flavonoida

Izvor slike:

https://www.google.hr/search?q=osnovna+kemijska+struktura+tanina&rlz=1C1AWFC_enHR734HR735&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiBkon0kuvVAhWDuhoKHdXFCRcQ_AUICigB&biw=1536&bih=710

Flavonoidi čine otprilike dvije trećine prehrambenih fenola i uglavnom su prisutni kao glikozidi i dijelom kao esteri, dok ih uglavnom ne pronalazimo kao slobodne spojeve.

Flavonoidi ili bioflavonoidi su široko rasprostranjeni u voću te su prepoznati kao prirodni antioksidansi; dosad je identificirano više od 5000 flavonoida. Ove tvari imaju važne uloge u obrani biljaka od stresa, kao i u zaštiti od štete prouzrokovane patogenima, ranama ili pretjeranoj izloženosti UV svjetlu. Termin flavonoid je obično korišten za opisivanje širokog raspona prirodnih produkata koji uključuju C6-C3-C6 ugljični kostur ili točnije fenilbenzopiran. Oni su zaslužni za većinu žutih, crvenih i plavih boja u voću. Za ove fitokemikalije se utvrdilo da su veoma učinkoviti „čistači“ slobodnih radikala kroz *in vitro* testove te su veoma važni antioksidansi zbog njihovog visokog redoks potencijala.¹

- *Izoflavoni, neoflavonoidi i halkoni*

Izoflavoni imaju prsten B spojen na C3 poziciju prstena C. Oni se uglavnom mogu pronaći u biljkama mahunarkama. Budući da su grahorice, a posebno soja, iznimno važni dio prehrane u mnogim kulturama, izoflavoni imaju veliki utjecaj na ljudsko zdravlje. Genistein i daidzein su dva glavna izoflavona koja se nalaze u soji zajedno s glicetinom, biokaninom A i formonetinom. Oni su također pronađeni i u crvenoj djetelini. Svi ovi izoflavoni su najčešće pronađeni u obliku 7-O-

glukozida i 6"-*O*-malonil-7-*O*-glukozida. Neoflavonoidi nisu česti u biljnoj hrani, ali dalbergin je najčešći od njih te je relativno široko rasprostranjen u kraljevstvu biljaka. Halkoni otvorenog prstena se mogu pronaći u voću poput jabuka, hmelja ili pivima.

- *Flavoni, flavonoli, flavanoni i flavanonoli*

Ovo su najčešće podgrupe flavonoida koje se mogu pronaći u biljakama. Flavoni i flavanoli, njihovi 3-hidroksi derivati, uključujući njihove glikozide, metoksidi, i druge acilirane produkte na sva tri prstena, čine najbrojniju podskupinu među svim polifenolima. Najčešći aglikoni flavonola, kvercetin i kempferol, sami imaju najmanje 279 i 347 različitih glikozidnih kombinacija. Broj identificiranih flavanona i njihovih 3-hidroksi derivata (flavanonola, poznatih i pod nazivom dihidroflavonoli) je zadnjih 15 godina značajno porastao. Neki flavanoni imaju jedinstven uzorak substitucije, primjerice prenilirani flavanoni, furanoflavonoli, piranoflavonoli, benzilirani flavanoni, što rezultira u velikom broju supstituiranih derivata ove podskupine. Dobro poznati flavanonol je taksifolin iz citrusnog voća.

- *Flavanoli i proantocijanidini*

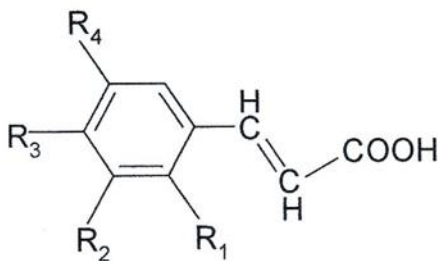
Flavanoli ili flavan-3-oli su često poznati po zajedničkom terminu katehini. Različiti od većine flavonoida, nema dvostruke veze između C2 i C3, te nema C4 karbonila u prstenu 4 na flavanolu. Ova činjenica i hidroksilacija na C3 omogućava flavanolu da ima dva kiralna centra na molekuli (na C2 i C3), dakle četiri moguća diastereoizomera. Katehin je izomer s *trans*-konfiguracijom dok je epikatehin izomer s *cis*-konfiguracijom. Svaka od ove dvije konfiguracije ima dva stereoisomera, tj. (+)-katehin, (-)-katehin, (+)-epikatehin, (-)-epikatehin. (+)-katehin i (-)-epikatehin su dva izomera koja se često mogu naći u biljkama. Monomeri flavanola (katehin i epikatehin), njihovi derivati (npr. galokatehini) su većinski flavanoli u listićima čaja i kakao zrnima (čokoladi). Katehin i epikatehin mogu formirati polimere, koji se često nazivaju i proantocijani budući da je cijepanje polimernih lanaca katalizirano kiselinom proizvodi antocijanidine.

Proantocijanidini se tradicionalno smatraju kondeziranim taninima. Flavanoli i oligomeri (koji sadržavaju 2-7 monomerske jedinice) su poznati kao snažni antioksidansi, koji se povezuju s nekoliko važnih učinaka na zdravlje. Ovisno o interflavanskoj vezi, oligomerni proantocijanidini mogu imati strukturu tipa A u kojoj su monomeri povezani C2-*O*-C7 ili C2-*O*-C5 vezom, ili tipa B u kojoj su uobičajene C4-C6 ili C4-C8 veze. Procijanidin C1 je trimer. Isto tako, flavanoli iz čaja mogu formirati jedinstvene dimere kao što su teaflavin kad dođe do fermentacije.

- *Antocijanidini*

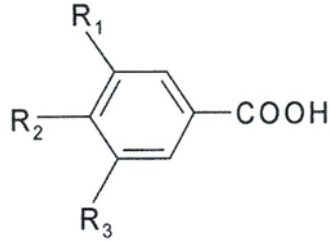
Antocijanidini su glavne komponente crvenih, plavih i ljubičastih pigmenta kod većine latica cvijeća, voća i povrća, te određenih vrsta žitarica, npr. crne riže. Antocijanidini u biljkama uglavnom postoje u glikozidnim oblicima za koje se često kaže da su antocijani. Cijanidin, delfinidin i pelargonidin su najrašireniji antocijanidini, uz još više od dvanaest drugih monomera antocijanidina (ukupno 31 antocijanidina). Ustvari, 90% struktura antocijanidina se temelji na cijanidinu, delfnidinu i pelargonidinu i njihovim metiliranim derivatima. Ukupni broj od više od 500 poznatih antocijana, ovisno o hidroksilaciji, uzorcima na prstenu B i glikolizaciji s različitim šećernim jedinicama. Boja antocijana je pH-ovisna, tj. crvena u kiselim uvjetima, a plava u bazičnim uvjetima. Ipak, drugi faktori kao što su stupanj hidroksilacije ili uzorak metilacije na aromatskim prstenovima i uzorak glikolizacije, tj. šećer vs. acilirani šećer mogu isto tako utjecati na boju antocijana. Antocijani su kemijski stabilni u kiselim otopinama.²

Druga najvažnija skupina fitokemikalija obuhvaća fenolne kiseline koje predstavljaju gotovo cijelu trećinu preostalih prehrambenih polifenola i oni su prisutni u voću u vezanom obliku. Ove supstance su podijeljene u dvije podgrupe: derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Za razliku od drugih fenolnih spojeva, ove dvije kiseline predstavljaju kiselinski karakter koji ovisi o prisutnosti jedne karboksilne skupine u molekuli. Spojevi hidroksicimetne kiseline su uglavnom prisutni kao derivati s C6-C3 kosturom. Ferulična kiselina, *p*-kumarinska kiselina i kafeinska kiselina su samo neki od primjera ove iz ove skupine. Hidroksibenzojeve kiseline (C6-C1) nalaze se u raznom voću i uglavnom se javljaju kao esteri. Najčešće fenolne kiseline nađene u voću u ovoj kategoriji su galna, vanilinska, elaginska i siriginska kiselina.



Slika 2. Kemijska struktura hidroksicimetne kiseline

Izvor slike: <http://atelim.com/nutricionizam-kristina-greblo-5276n-antioksidativno-i-antimikr.html?part=3>



Slika 3. Kemijska struktura hidroksibenzojeve kiseline

Izvor slike:

<http://atelim.com/nutricionizam-kristina-greblo-5276n-antioksidativno-i-antimikr.html?part=3>

Tanini su treća klasa polifenola koji se nalaze u voću te su najčešće prisutni kao fenolni polimeri. Tanini su opore i gorke supstance različite molekularne mase i neke od njih, posebno hidrolizabilni tanini, su topljivi u vodi. Oni su skupina polihidroksi-flavan-3-ola oligomeri i polimeri s ugljik-ugljik vezom između flavanolskih podjedinica. Tanini imaju sposobnost taloženja proteina. Dva glavna tipa tanina su kondenzirani i hidrolizabilni. Galotanin ili taninska kiselina su vrste hidrolizabilne kiseline pronađene u voću. Kondenzirani tanini (proantocijanidini) su glavni fenolni spojevi pronađeni u grožđu. Proantocijanidini, kada dođu u kontakt sa salivarnim proteinima, su odgovorni za oporost kod voća.

Stilbeni su skupina deriviranih fenilpropanoid spojeva koje karakterizira 1,2-difeniletilenski kostur (C6-C2-C6). U ljudskoj prehrani su prisutne niske količine stilbena, a njihov glavni predstavnik je resveratrol, uglavnom u glikoliziranom obliku. Resveratrol je fitoaleksin. Ova supstance se uglavnom proizvode u grožđu kao odgovor na ozljedu i gljivičnu infekciju, a glavni prehrambeni izvor resveratrola je pokožica crvenog grožđa. Nekoliko istraživanja je pokazalo da resveratrol ima sposobnost prevencije raka i koronarnih, neuroloških i degenerativnih bolesti. Resveratrol prisutan u crvenom vinu je povezan s tzv. *Francuskim paradoksom* odnosno zaključcima studije koja je pokazala da Francuzi pate od relativno niske učestalosti koronarnih srčanih bolesti iako je njihova prehrana relativno bogata zasićenim mastima. Nadalje, učestalost srčanih infarkata u Francuskoj je oko 40% niža nego u ostatku Europe za što se smatra da je zaslužna kontinuirana i umjerena konzumacija proizvoda od grožđa, posebice crvenog vina, koja igra ključnu ulogu u prevenciji srčanih bolesti.

Peta skupina polifenola obuhvaća lignane, veliku raznovrsnu grupu individualnih struktura koji se uglavnom sastoje od dvije fenolpropanoidne jedinice povezane preko njihova bočnog lanca C8 ugljika, koji se obično pojavljuju kao glikozidi. Lignani su jedna od većih skupina fitoestrogena koji su kemikalije slične estrogenu.¹

2.2. Fenolni spojevi iz kultivirane borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.)

Borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) se smatraju jednim od najbogatijih izvora fenolnih spojeva te one sadrže značajne količine antocijana, flavona, klorogenske kiseline i procijanidina, koji imaju visoku biološku aktivnost. Predominantni flavonoidi koji se nalaze u bobičastom voću su antocijani i flavonoli, koji su gotovo isključivo prisutni u glikoliziranim oblicima. Antocijani mogu također postojati kao diglikozidi ili kao acilirani oblici glikozida. Uz ostale antioksidativne komponente, fenolni spojevi kao prirodni sekundarni metaboliti pokazali su se kao vrijedni u smanjenju pojave kardiovaskularnih bolesti. Zaštitni učinci bi mogli biti posljedica njihovih svojstava: hvatači slobodnih radikala, spojevi koji imaju sposobnost donirati vodik i uhvatiti singletni kisik i/li kelatori metalnih iona.³

Među sekundarnim biljnim metabolitima pronađenima u borovnicama, flavonoidna podklasa antocijana je zaokupila najviše pažnje; iako su flavanoli (uglavnom derivati kvercetina), fenolne kiseline (kafeinska, klorogenska, *p*-kumarinska i ferulična kiselina) i proantocijanini također prisutni .

Voće-kultivirana borovnica, <i>Vaccinium corymbosum</i> L.	
Sadržaj ukupnih polifenola	223,41 mg / 100 g FW
Sadržaj ukupnih antocijana	164,37 mg / 100 g FW

Slika 4. Sadržaj ukupnih fenola i antocijana u kultiviranoj borovnici (*Vaccinium corymbosum* L.)

<http://phenol-explorer.eu/contents/food/95>

2.3. Stabilnost fenolnih spojeva (čimbenici okoliša, uvjeti u probavnom sustavu)

Postoji mnogo čimbenika koji utječu na fenolni sastav i antioksidativnu sposobnost borovnica. Rezultati dobiveni različitim studijama sugeriraju da na sastav i sadržaj fenolnih spojeva u borovnicama utječe vrsta, sezona uzgoja i lokacija uzgoja. Varijacija u ukupnom broju fenolnih spojeva, antocijana, flavonoida i voćnoj masi među različitim genotipovima je bila mnogo veća nego ona koju se promatralo između dvije sezone uzgoja, što ukazuje na to da genetika igra važniju ulogu od sezone uzgoja na fenolni sastav borovnica. Kombinirani učinak sezone uzgoja i genetike na antocijane i voćnu masu pokazuje da okolišni uvjeti rasta mogu imati značajan utjecaj na razine fenolnih spojeva u borovnicama. Nadalje, genotipovi s manjim plodovima su imali veću razinu ukupnih fenolnih spojeva, antocijana i flavonoida nego li genotipovi velikih borovnica.³

U literaturi su također dostupne informacije o promjenama fenolnog sastava i antioksidativnog djelovanja tijekom skladištenja i rukovanja poslije berbe, kao i tijekom obrade. Zaključeno je da na sadržaj fenola u bobičastom voću ne utječu samo genetske razlike, uvjeti u okolišu prije berbe, već i stupanj zrelosti tijekom berbe. U tom pogledu, pokazalo se da se akumulacija antocijana nastavlja i nakon perioda optimalne zrelosti (kod prezrelih borovnica), kao i nakon njihove berbe i tijekom skladištenja.⁴

Apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje flavonoida i povezanih fenola nakon njihove konzumacije su teme koje su sve više i više u fokusu novijih istraživanja. Nakon konzumacije, dolazi do apsorpcije nekih, ne svih, komponenata u krvožilni sustav tankog crijeva. Obično se apsorpcija flavonoid glikozida, povezuje s cijepanjem i otpuštanjem aglikona kao rezultat djelovanja laktaze-florizin hidrolaze (LPH) na tzv. četkastoj granici (*brush border*) epitelnih stanica tankog crijeva.⁵

Prije nego što prijeđu u krvotok, aglikoni prolaze kroz jedan stupanj faze II metabolizma formiranja sulfata, glukurondin i/li metilirani metaboliti preko odgovarajućeg djelovanja sulfotransferaze (SULTs), uridin-5'-difosfat glukuronosiltransferaze (UGT) i katehol-O-metiltransferaze (COMTs). Isto tako, dolazi do isticanja nekih metabolita natrag u lumen tankog crijeva, i smatra se da ovaj proces uključuje članove adenosin trifosfat-vezajuće kazete (ABC) obitelji prijenosnika, uključujući i protein zadužen za otpornost na višestruke lijekove (MRP) i P-glikoprotein. Jednom kada dođu u krvotok, metaboliti brzo dođu do jetre gdje se mogu podvrgnuti

sljedećoj fazi II metabolizma, te enterohepatska recirkulacija može rezultirati reciklažom natrag u tanko crijevo.

Konjugati polifenola sa šećernim polovicama koji su otporni na djelovanje LPH/CBG nisu apsorbirani u tanko crijevo u nikakvoj količini već prelaze direktno u debelo crijevo. Analiza crijevnih fluida skupljenih iz ileostome nakon konzumacije raznolike hrane je pokazala da čak i kada su prehrambeni (poli)fenoli apsorbirani u proksimalnom GIT-u, značajne količine svejedno prolaze iz tankog u debelo crijevo, gdje crijevna mikrobiota cijepa konjugirane polovine, a aglikoni koji su rezultat toga procesa su podvrgnuti cijepanju prstena što vodi do proizvodnje manjih molekula, uključujući fenolne kiseline i hidrokscinamate.⁵

Zdravstveni učinci polifenola ovise i o njihovom unosu i o biodostupnosti koje mogu značajno varirati. Iako su veoma obilni u našoj ishrani, proantocijani su ili veoma loše apsorbirani ili nisu uopće apsorbirani te je stoga njihova aktivnost ograničena na crijevni trakt. Pokazalo se da isto vrijedi i za antocijane, osim ako neki od njihovih metabolita nisu još identificirani, ali su dobro apsorbirani. Unosi flavonola monomera, flavona i flavanola su relativno niski, a koncentracije u plazmi rijetko prijeđu 1 $\mu\text{mol/L}$ zbog ograničene apsorpcije i brze eliminacije. Flavanoli i izoflavanoli su flavonoidi s najboljim profilima biodostupnosti i koncentracija plazme može doseći 5 $\mu\text{mol/L}$. Ipak, distribucija ovih spojeva je ograničena na citrusne i soju. Konačno, hidrokscimetne kiseline su pronađene u različitim vrstama hrane, često u visokim koncentracijama, ali esterifikacija smanjuje njihovu intestinalnu apsorpciju. Kao opće pravilo, metaboliti polifenola su brzo eliminirani iz plazme, što ukazuje na to da konzumacija biljnih proizvoda na dnevnoj bazi je potrebna kako bi se zadržala visoka koncentracija metabolita u krvi.

Nedavne studije su značajno povećale znanje o koncentraciji plazme i urinarnom izlučivanju polifenolnih metabolita kod ljudi. Ipak, vrijednosti za ove varijable se ne čine dobro povezane s koncentracijama izmjerenima u tkivima. Dostupni podatci, uglavnom oni dobiveni iz istraživanja na životinjama, ukazuju na činjenicu da se neki polifenolni metaboliti mogu akumulirati u određenim odredišnim tkivima umjesto da samo balansiraju između krvi i tkiva. Prisutni metaboliti mogu se razlikovati između tkiva i plazme, a priroda ovih metabolita se mora detaljnije razjasniti. Potrebno je još istraživanja na životinjama kako bi se istražio intracelularni metabolizam i akumulacija polifenolskih metabolita u specifičnim organima. Ipak, neke važne razlike mogu postojati između životinja i ljudi u nekim metaboličkim procesima, osobito u procesu konjugacije.

Pojam biodostupnosti integrira nekoliko varijabli, kao što su intestinalna apsorpcija, izlučivanje glukorida prema intestinalnom lumenu, metabolizam mikroflore, intestinalni i hepatski metabolizam, kinetiku plazme, prirodu cirkulirajućih metabolita, vezanje na albumin, stanični unos, intracelularni metabolizam, akumulacija u tkivima, te bilijarno i urinarno izlučivanje. Poteškoća leži u integraciji svih informacija i povezivanju varijabli s učincima na zdravlje na razini organa. Ovi zadatci su još i teži time što relativna masa svake varijable može ovisiti o polifenolu koji se promatra. Neki polifenoli se manje učinkovito apsorbiraju nego drugi, ali, ipak, dosegnu ekvivalentne koncentracije plazme zbog nižih lučenja prema intestinalnom lumenu i nižih metabolizama i eliminacije.

Bolje znanje o biodostupnosti je esencijalno radi istraživanja učinaka polifenola na zdravlje, neovisno o pristupu koji se koristi. Činjenica da aglikoni nisu važni metaboliti u krvi, zbog ekstenzivnih intestinalnih i hepatskih konjugacija, se dosad naveliko ignorirala, te mnoga *in vitro* istraživanja o mehanizmima djelovanja polifenola se i dalje koncentriraju na aglikone ili glikozide umjesto na identificirane metabolite, često u koncentracijama koje se realno ne mogu dobiti u tijelu. Dakle, od esencijalne je važnosti potvrditi učinke uočene s aglikonima kroz istraživanja koristeći fiziološke koncentracije metabolita uistinu pronađenih u tijelu.

Istraživanja o biodostupnosti polifenola bi nam konačno trebala dopustiti da povežemo unos polifenola s jednim ili nekoliko preciznih mjerenja biodostupnosti (kao što su koncentracija ključnih bioaktivnih metabolita u plazmi i tkivu) s potencijalnim učincima na zdravlje u epidemiološkim studijama. Mora se doći do znanja o ovim povezanostima usprkos poteškoćama vezanima uz višu raznolikost polifenola, njihovu različitu biodostupnost, i visoki stupanj interindividualne varijabilnosti koji je uočen u nekim metaboličkim procesima, posebno u onima u kojima je uključena mikroflora.⁶

2.4. Tehnike inkapsulacije u cilju povećanja stabilnosti fenolnih spojeva

Nestabilnost i biodostupnost polifenola naveliko ograničava njihove potencijalne pogodne učinke na zdravlje u pogledu prevencije starenja, raka, upala i neurodegenerativnih bolesti. Upotrebom zaštićene inkapsulacije i sustava dostavljanja može se poboljšati stabilnost i biodostupnost polifenola. Do danas se razvio široki raspon tehnologija za inkapsulaciju polifenola. Među njima, inkapsulacija primjenom emulzija se smatra jednom od najobječavajućih tehnika za zaštitu i dostavljanje polifenola zbog njene visoke učinkovitosti prilikom inkapsulacije, održavanja kemijske stabilnosti spojeva i njihovog kontroliranog otpuštanja.

Upotreba inkapsuliranih polifenola umjesto slobodnih molekula poboljšava i stabilnost i biodostupnost molekula *in vivo* te *in vitro*. Već su ustanovljeni mnogi sustavi dostavljanja za polifenole bazirani na emulzijama i oni uključuju jedinstvene, višestruke i nano-emulzije. Ipak, varijacije u kompoziciji i tehnologijama pripreme rezultiraju formiranjem niza emulzija novih svojstava s ogromnim potencijalom za dostavljanje polifenola ili drugih bioaktivnih nutrijenata, primjerice koristeći nezasićene masne kiseline kao uljnu fazu što se može postići dostavljanjem višestrukih nutrijenata u isto vrijeme. Nadalje, vrlo je mali broj istraživanja provedenih o *in vivo* apsorpciji, prijenosu i otpuštanju polifenola preko inkorporiranih emulzija, koje su ključne za dublju i širu primjenu. Stoga, potrebno je sistematično i intenzivno istraživanje metabolizma i fizioloških učinaka inkapsuliranih polifenola ili drugih potencijalnih bioaktivnih nutrijenata *in vivo*.⁷

Razvio se široki raspon tehnologija kako bi se inkapsulirali polifenoli, uključujući sušenje sprejom, koacervaciju, emulzije, liposome, micelle, nanočestice, ledeno sušenje, kokristalizaciju i inkapsulaciju gljivica. Svaka od ovih tehnologija ima svoje specifične prednosti i mane u inkapsulaciji, zaštiti, dostavljanju, troškovima, statusu regulacije, lakoći korištenja, bioraspodljivosti i biokompatibilnosti. Među ovima, za emulzije se najviše smatra jednim od najpopularnijih sustava inkapsulacije i dostavljanja za široki raspon lipofilnih, hidrofilnih i amfifilnih bioaktivnih molekula zbog njihove izrazito učinkovite inkapsulacije, održavanja kemijske stabilnosti inkapsuliranih molekula i kontroliranog otpuštanja. Nadalje, neki polifenoli, inkapsulirani preko emulzija, pokazali su još i jaču biološku aktivnost u usporedbi sa čistim slobodnim molekulama.⁷

Unatoč činjenici da su primijećeni značajni terapijski učinci polifenola koji su bili potvrđeni i u *in vitro* te u *in vivo* istraživanjima, primijetilo se da postoje i određena ograničenja. Ukratko, četiri su glavna problema u njihovoj primjeni: slaba topljivost u vodi što sa sobom povlači slabu biodostupnost, npr. kurkumin, resveratrol, kvercetin i elaginska kiselina; nestabilnost kada su izloženi svjetlu i/li određenim pH uvjetima, npr. resveratrol, kvercetin ili elaginska kiselina; slaba oralna i gastrointestinalna apsorpcija (zbog degradacije, niske propusnosti ili brzog metabolizma), npr. Epigalokatehin galat, kurkumin, resveratrol, kvercetin ili elaginska kiselina; i veoma kratak polu-život i brza eliminacija iz tijela, npr. Epigalokatehin galat, resveratrol ili elaginska kiselina. Svi ovi čimbenici mogu voditi ka gubitku u biodostupnosti ovih spojeva i smanjenim pozitivnim učincima na zdravlje. ⁷

2.4.1.Primjena emulzijskih sustava

Emulzija se sastoji od dvije nemješljive tekućine, obično ulje i voda, od čega je jedna tekućina raspršena u obliku malih sferičnih kapljica u drugoj. Emulzije se mogu klasificirati prema relativnoj prostornoj distribuciji ulja i vodene faze. Sustav koji se sastoji od uljnih kapljica raspršenih u vodenoj fazi naziva se emulzija ulje-u-vodi (U/V), npr. mlijeko i juhe; dok se sustav koji se sastoji od kapljica vode raspršenih u uljnoj fazi naziva emulzija voda-u-ulju (V/U), npr. maslac. U posljednja dva desetljeća, su se uspješno razvile različite emulzije s poželjnim strukturama i svojstvima za zaštićenu inkapsulaciju i dostavljanje mnogih vrsta bioaktivnih nutrijenata sa značajnim pozitivnim učincima na zdravlje. Emulzije su, stoga, esencijalni sustavi inkapsulacije u mnogim primjenama, posebno u prehrambenoj industriji. Formulacija, odnos struktura-funkcionalnost i ponašanje emulzija prilikom dostavljanja su također u fokusu istraživanja.⁷

Konvencionalne ulje-u-vodi emulzije (U/V) se sastoje od kapljica ulja raspršenih u vodenoj kontinuiranoj fazi, s tim da su kapljice ulja okružene tankim graničnim slojem koji se sastoji od molekula emulgatora. Koncentracija i distribucija veličine čestica kapljica ulja u emulzijama se može kontrolirati tehnologijama omjera i pripreme uljne faze. Kapljice ulja obično imaju dijаметar između 0,1 i 100 μm , dok je granični sloj općenito debeo između 1 nm i 10 nm za emulgatore, npr. površinski aktivne tvari, fosfolipidi, proteini ili polisaharidi. Električni naboj na kapljicama se može kontrolirati tako što se odabere emulgator s prikladnim nabojem, koji može biti pozitivan, bez naboja i negativan.

Niz raznih metoda može biti korišten kako bi se pripravili polifenoli inkapsulirani u U/V emulzijama, a klasični uređaj dizajniran da provede ovaj proces naziva se homogenizator. Priprema sustava emulzije direktno iz dvije odvojene tekućine se može smatrati primarnom homogenizacijom, dok se redukcija veličine kapljica u već postojećim emulzijama definira kao sekundarna homogenizacija; priprema emulzija uvijek podrazumijeva korištenje jedan ili oba procesa homogenizacije. Na svojstva emulzije pripremljene homogenizacijom često uvelike utječu uvjeti pod kojima se odvija homogenizacija, uključujući temperaturu, tlak i cikluse. Ova svojstva uglavnom uključuju veličinu kapljice, stabilnost i viskoznost. Dakle, mogu se dobiti emulzije s poželjnim svojstvima na način da se kontroliraju uvjeti homogenizacije za ciljanu inkapsulaciju i dostavljanje polifenola.⁷

U/V emulzije pokazuju mnogo potencijalnih prednosti za inkapsulaciju i sustave dostavljanja za lipofilne polifenole. Prvo, fizička i kemijska stabilnost polifenola može biti dobro zaštićena tako da se dizajnira granični sloj ulje-voda ili da se kontrolira fizička lokacija polifenola. Nadalje, moguće je dizajnirati emulzije s različitim reološkim svojstvima, koja mogu imati neke specifične primjene u dostavljanju lipofilnih polifenola. Potom, U/V emulzije se mogu koristiti u mokrom stanju ili se mogu osušiti u čvrsti prah, što uvelike olakšava njihovu obradu, transportaciju, skladištenje i, naposljetku, primjenu u inkapsulaciji i dostavljanju polifenola.

Unatoč tome da su U/V emulzije naširoko korištene kao sustavi vezanih raznih bioaktivnih nutrijenata te pokazuju ogroman potencijal, postoje i neki nedostaci. Primjerice, U/V emulzije su obično osjetljive na okolišni stres kao što je toplina, hlađenje, ekstremne pH koncentracije i koncentracije soli; sve ovo može voditi njihovoj fizičkoj i kemijskoj nestabilnosti, npr. vrhnjenju, flokulaciji, koagulaciji, lomljenju i Ostwaldovom zrenju za česte fizičke nestabilnosti te oksidaciji i hidrolizi za česte kemijske nestabilnosti. Postoji mogućnost da sve ove nestabilnosti mogu prouzrokovati štetu ili čak kvar emulzija, te će zato smanjiti fizičku i kemijsku stabilnost inkapsuliranih polifenola i njihove pozitivne učinke na zdravlje. Potrebne su emulzije sa sofisticiranijim strukturama za neke posebne primjene.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali – uzorci borovnice

U istraživanju su korišteni uzorci plodova borovnice koji su nabavljeni na tržnici u Splitu, u srpnju 2015. godine. 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 °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, pri temperaturi od – 55 °C. Treća grupa plodova je pohranjena na temperaturi od – 20 °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 1. prikazuje eksperimentalni dizajn tretmana ultrazvukom visokog intenziteta (preuzeto iz diplomskog rada Zvonimira Mostarca, 2016)

Tablica 1.: Dizajn tretmana uzoraka borovnice ultrazvukom visokog intenziteta

Uzorak	Amplituda (%)	Tretman vrijeme (min)	P (W)	T1 (°C)	T2 (°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

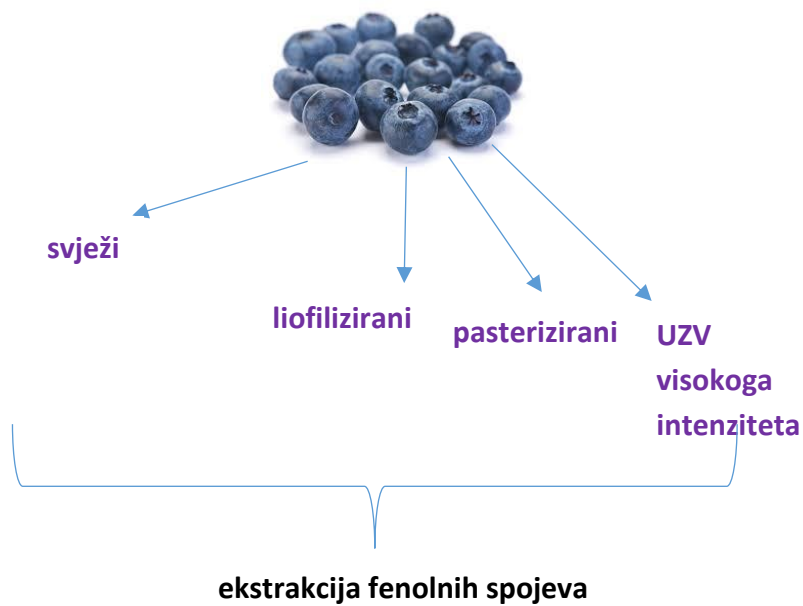
Ukupno 11 uzoraka smrvljenih plodova borovnice obrađeno je sondom pri čemu su korištene različite temperature tretmana, različita snaga te različito vrijeme trajanja postupka obrade.

P – Snaga (W)

T1 – Početna temperatura

T2 – Krajnja temperatura

Na slici 5. prikazana je schema raspodjele i obrade uzoraka plodova kultivirane borovnice.



3.2. Postupak ekstrakcije fenolne frakcije iz plodova borovnice

Prije ekstrakcije uzorci borovnice usitne se u mikseru. U Erlenmayerovu tikvicu odvaži se $2 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ uzorka, doda se 8 mL 80 % vodene otopine metanola (v/v) koji sadrži 1 % mravlje kiseline (v/v), smjesa se propuše inertnim plinom dušikom te se postupak ekstrakcije provodi na ultrazvučnoj kupelji pri 50 °C tijekom 15 minuta. Po završetku ekstrakcije, ekstrakt se profiltrira kroz filter papir Whatman br. 40 (Whatman International Ltd., Velika Britanija) u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni otapalom za ekstrakciju do oznake. Slika 5 prikazuje uzorke fenolnih frakcija kultivirane borovnice tretirane različitim tehnikama obrade.



Slika 6. Uzorci fenolnih ekstrakata kultivirane borovnice

3.3. Priprema emulzijskih sustava

Mikroemulzije su pripremljene koristeći ekstra djevičansko maslinovo ulje kao uljnu fazu, vodu, etanol i tween 80 u različitim omjerima.

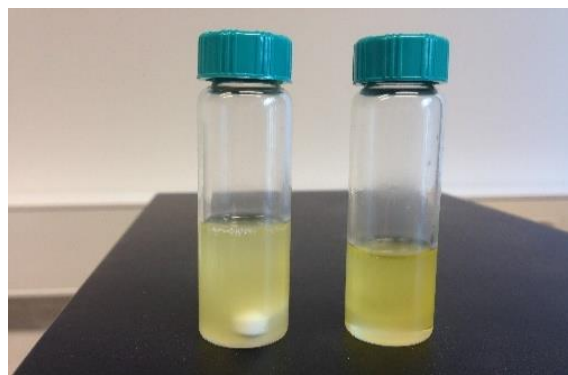
Emulzija 1:

- 20 g maslinovog ulja
- 10 g voda
- 63 g TWEEN
- 7 g etanol

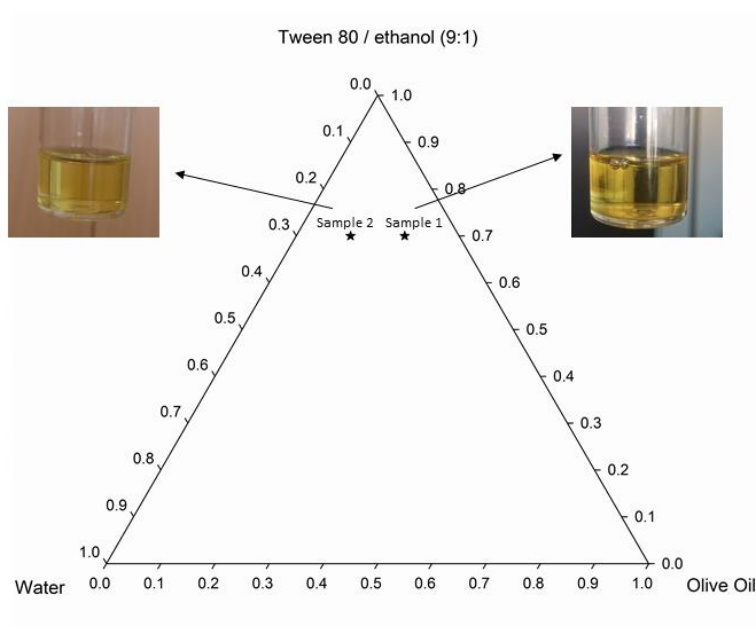
Emulzija 2:

- 10 g maslinovo ulje
- 20 g voda
- 7 g etanol
- 63 g TWEEN

Prvi način pripreme emulzijskih sustava uključuje homogeniziranje smjese sastojaka u emulzijama koristeći mehanički homogenizator Ultra-turaxx (IKA Ultra-turrax T25 Digital Homogenizer) tijekom 10 minuta. Drugi način pripreme emulzijskih sustava uključivao je primjenu ultrazvučnog homogenizatora (Ultrasonic Lab Homogenizer UP200S (Hielscher, Germany), frekvencije od 20 kHz, amplitude 70%, tijekom perioda od 5 minuta. Omjer surfaktant:kosurfaktant,tween 80 i etanol bio je 9:1. Smjese su daljnje karakterizirane kako je prikazano na slici 7.



Slika 7. Homogenizirane emulzije



Slika 8. Ternarni fazni dijagram dodatka tween 80/etanol (9:1) - u mješavini voda – ekstra djevičansko maslinovo ulje na 25 stupnjeva C. Uzorci 1 i 2 predstavljaju spojeve monofaznih, čistih, makroskopski homogenih mješavina koje tvore mikroemulzije. Vrijednosti su dane u masenom udjelu.

3.4. Rancimat metoda

Poznavanje oksidacijske stabilnosti ili održivosti biljnih ulja važno je kako bi se unaprijed moglo odrediti vrijeme za koje se ulje može sačuvati od jače izražene oksidacije, bez bitnih promjena kvalitete.

Oksidacijska stabilnost ispitivanih biljnih ulja određena je testom ubrzanе oksidacije ulja Rancimat testom (ISO 6886:1996). Ovaj test temelji se na ubrzanom kvarenju biljnih ulja pri povišenim temperaturama uz konstantan dovod zraka određene brzine protoka u uzorak ulja. Indukcijski period (IP) oksidacije ulja određuje se na osnovi količine izdvojenih kratko lančanih hlapljivih organskih kiselina, uvedenih u demineraliziranu vodu te mjerenjem porasta vodljivosti indirektno se prati tijek oksidacijskog kvarenja ulja.

Dobivena vrijednost indukcijskog perioda (vrijeme u satima) ukazuje na otpornost ispitivanog ulja prema oksidaciji. Ako je vrijednost indukcijskog perioda veća tada je veća i oksidacijska stabilnost ili održivost ulja.⁸

Korišten je automatski uređaj za određivanje oksidacijske stabilnosti ulja Rancimat model 743 (Metrohm, Švicarska), kod uvjeta rada: masa uzorka ulja 3,0 g, temperatura 121,6 o C, protok zraka 9 L/h. Dobiveni rezultat je izražen kao indukcijski period (IP) u satima.

Vrijeme indukcije (indukcijski period) 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 indukcijskog perioda koju smo preko dolje navedene formule preračunali u produljenje *lag* faze.

Formula za računanje produljenja *lag* faze:

$$\left(\frac{IP_{uzorak} - IP_{kontrola}}{IP_{kontrola}} \right) \times 100 (\%)$$

4. REZULTATI

Tablica 2. prikazuje utjecaj fenolnih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Tablica 2. 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)	$9,82 \pm 0,14$	
Svježi	$0,13 \pm 0,09$	$1,26 \pm 0,04$
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 ± 0,10	1,65 ± 0,14
UZV8	0,18 ± 0,12	1,75 ± 0,12
UZV9	0.00	0.00
UZV10	0.00	0.00
UZV11	0.00	0.00

Tablica 3. prikazuje utjecaj sustava emulzija 1 nakon tretmana mehaničke i ultrazvučne homogenizacije i ekstrakata borovnice (400:200 μ L) na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Tablica 3. Utjecaj sustava emulzija 1 nakon tretmana mehaničke i ultrazvučne homogenizacije i ekstrakata borovnice (400:200 μ L) na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja.

Uzorci (fenolni ekstrakti <i>V.c.</i>)	Homogenizacija		Ultrazvuk	
	Produljenje lag faze (h)	Produljenje lag faze (%)	Produljenje lag faze (h)	Produljenje lag faze (%)
Svježi	3,89 ± 0,22	41,33 ± 0,12	3,22 ± 0,14	40,12 ± 0,02
Pasterizirani	0,78 ± 0,22	5,77 ± 0,14	2,54 ± 0,09	36,25 ± 0,15
Liofilizirani	2,87 ± 0,04	21,24 ± 0,19	7,10 ± 0,04	75,45 ± 0,24
UZV1	3,45 ± 0,05	25,53 ± 0,22	9,66 ± 0,15	110,14 ± 0,14
UZV2	4,71 ± 0,22	53,70 ± 0,15	10,06 ± 0,11	74,46 ± 0,25
UZV3	3,90 ± 0,19	28,71 ± 0,09	3,50 ± 0,08	39,90 ± 0,19

UZV4	4,79 ± 0,12	54,61 ± 0,20	14,92 ± 0,13	110,43 ± 0,14
UZV5	10,21 ± 0,14	75,57 ± 0,13	10,93 ± 0,08	124,62 ± 0,20
UZV6	1,85 ± 0,22	13,69 ± 0,25	12,48 ± 0,12	142,30 ± 0,19
UZV7	3,94 ± 0,27	29,16 ± 0,11	4,98 ± 0,04	56,78 ± 0,10
UZV8	3,48 ± 0,25	25,75 ± 0,12	2,57 ± 0,10	29,30 ± 0,13
UZV9	4,05 ± 0,09	46,18 ± 0,23	7,82 ± 0,14	57,88 ± 0,14
UZV10	6,90 ± 0,12	78,67 ± 0,24	13,95 ± 0,09	103,25 ± 0,03
UZV 11	2,68 ± 0,08	19,83 ± 0,22	4,96 ± 0,15	56,55 ± 0,22

Tablica 4. prikazuje utjecaj sustava emulzija 2 nakon tretmana mehaničke i ultrazvučne homogenizacije i ekstrakata borovnice (400:200 µL) na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Tablica 4. Utjecaj sustava emulzija 2 nakon tretmana mehaničke i ultrazvučne homogenizacije i ekstrakata borovnice (400:200 μ L) na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja

Uzorci (fenolni ekstrakti V.c.)	Homogenizacija		Ultrazvuk	
	Produljenje lag faze		Produljenje lag faze	
	(h)	(%)	(h)	(%)
Svježi	1,49 \pm 0,04	11,02 \pm 0,03	5,55 \pm 0,20	58,97 \pm 0,04
Pasterizirani	4,61 \pm 0,23	34,12 \pm 0,12	5,53 \pm 0,12	58,76 \pm 0,03
Liofilizirani	1,98 \pm 0,14	14,65 \pm 0,16	5,32 \pm 0,04	56,53 \pm 0,12
UZV1	1,38 \pm 0,05	15,73 \pm 0,25	6,63 \pm 0,16	49,07 \pm 0,06
UZV2	4,34 \pm 0,23	32,12 \pm 0,22	3,48 \pm 0,12	39,68 \pm 0,26
UZV3	7,41 \pm 0,22	54,77 \pm 0,12	9,45 \pm 0,13	107,75 \pm 0,17
UZV4	4,70 \pm 0,05	53,59 \pm 0,15	10,79 \pm 0,09	79,86 \pm 0,09
UZV5	4,88 \pm 0,08	36,12 \pm 0,09	4,91 \pm 0,24	55,98 \pm 0,06
UZV6	6,06 \pm 0,07	69,09 \pm 0,09	12,04 \pm 0,24	89,11 \pm 0,12
UZV7	3,00 \pm 0,23	22,20 \pm 0,23	6,50 \pm 0,17	74,11 \pm 0,10
UZV8	1,42 \pm 0,23	16,19 \pm 0,13	3,82 \pm 0,22	28,27 \pm 0,22
UZV9	2,92 \pm 0,21	21,61 \pm 0,14	8,03 \pm 0,25	91,56 \pm 0,24
UZV10	8,49 \pm 0,10	62,84 \pm 0,16	8,02 \pm 0,16	91,44 \pm 0,08
UZV 11	4,29 \pm 0,14	31,75 \pm 0,15	13,03 \pm 0,09	148,57 \pm 0,26

5. RASPRAVA

Među bobičastim voćem, za borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) se smatra da su jedan od najboljih izvora fenolnih spojeva te su hvaljene zbog svog visokog antioksidacijskog djelovanja i blagodatnog djelovanja na ljudsko zdravlje, što ih čini značajnom komponentom pravilne prehrane.

Uloga fenola i drugih biološki aktivnih spojeva, koji su odgovorni za zaštitnički učinak prehrane bogate voćem i povrćem, postaje sve više veoma važno područje istraživanja ljudske prehrane.

Međutim, zdravstveni učinci fenola ovise i o njihovom unosu i o biodostupnosti koje mogu značajno varirati. Iako su veoma obilni u našoj ishrani, većina fenola su ili veoma loše apsorbirani ili nisu uopće apsorbirani te je stoga njihovo djelovanje, ograničeno na crijevni trakt.

Upotrebom zaštićene inkapsulacije može se poboljšati stabilnost i biodostupnost polifenola, ali se i može značajno produljiti rok trajanja namirnica koje su podložne procesu oksidacijskog kvarenja.

U ovom radu u svrhu inkapsulacije primijenili smo dvije vrste emulzija, jer se tehnika inkapsulacije primjenom emulzija smatra jednom od tehnika s najvećim potencijalom za zaštitu i dostavljanje polifenola zbog njezine visoke učinkovitosti prilikom inkapsulacije, održavanja kemijske stabilnosti spojeva i njihovog kontroliranog otpuštanja.

Fenolni spojevi ekstrahirani su iz različito obrađenih uzoraka plodova borovnice (svježi, liofilizirani, uzorci obrađeni ultrazvukom visokog intenziteta (Tablica 1.)).

Proces lipidne oksidacije može biti inhibiran različitim procesima koji uključuju prevenciju pristupa kisiku, inaktivaciju enzima katalizatora oksidacije, redukciju pritiska kisika, korištenje niže temperature i korištenje prikladnog pakiranja. Druga metoda zaštite od oksidacije je korištenje specifičnih aditiva zvanih antioksidansi.

Međutim, sve više se počelo pokazivati zanimanje za korištenje prirodnih fenolnih spojeva kao antioksidansa u svrhu produljenja oksidacijske stabilnosti.

Prema rezultatima koji prikazuju utjecaj fenolnih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja (Tablica 2.) možemo reći da su pojedini uzorci koji su obrađeni ultrazvukom visokog intenziteta (UZV1-5,93 ± 0,13 %, UZV2-10,60 ± 0,07%, UZV3-8,75 ± 0,22% , te UZV4-10,70 ± 0,24 % (koji ujedno pokazuje i najveći postotak produljenja lag faze

od svih uzoraka)) učinkovitiji u produljenju lag faze od svježih ($1,26 \pm 0,04$ %) i pasteriziranih ($7,49 \pm 0,10$ %) uzoraka, dok se liofilizirani uzorci nisu uopće pokazali učinkovitima.

Iz Tablica 3.i 4. koje prikazuju utjecaj sustava emulzija 1 i 2 nakon tretmana mehaničke i ultrazvučne homogenizacije i ekstrakata borovnice (400:200 μ L) na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja vidljivo je da na produljenje lag faze značajno više utječu uzorci tretirani ultrazvučnim homogenizatorom od onih tretiranih postupkom mehaničke homogenizacije.

Zanimljivo je da su rezultati liofiliziranih uzoraka za razliku od onih iz Tablice 1.gdje je postotak produljenja lag faze bio 0% dodatkom emulzija 1 i 2 primjenom oba načina pripreme emulzija pokazali pozitivan predznak u produljenju lag faze. Isto tako, i kod liofiliziranih uzoraka dodatkom emulzije 1 (Tablica 3.) i emulzije 2 (Tablica 4.) vidimo da je oksidacijska stabilnost veća kod ultrazvučno tretiranih uzoraka.

Utjecaj sustava emulzija 1 nakon tretmana mehaničke i ultrazvučne homogenizacije i ekstrakata borovnice (400:200 μ L) na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja (Tablica 3.) se pokazao boljim u većini uzoraka od utjecaj sustava emulzija 2 nakon tretmana mehaničke i ultrazvučne homogenizacije i ekstrakata borovnice (400:200 μ L) na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja (Tablica 4.).

Uzorak UZV10 koji u ispitivanju utjecaja fenolnih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja nije pokazao rezultat, ima najveći postotak produljenja lag faze sustava emulzija 1 ($78,67 \pm 0,24$ %) i 2 ($62,84 \pm 0,16$) nakon tretmana mehaničke homogenizacije i ekstrakata borovnice (400:200 μ L) na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja.

Što se tiče homogeniziranih uzoraka (Tablica 3), uzorak UZV6 (koji u ispitivanju utjecaja fenolnih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja nije pokazao rezultat) produljio je lag fazu za $142,30 \pm 0,19$ %. To je ujedno i najveći postotak kad se govori o utjecaju sustava emulzija 1 na oksidacijsku stabilnost ulja.

U Tablici 4 je vidljiva ista situacija s uzorkom UZV11 ($148,57 \pm 0,26$).

6. ZAKLJUČAK

Metoda inkapsulacije primjenom mehanički i ultrazvučno homogeniziranih emulzija 1 i 2 u kombinaciji s fenolnim ekstraktima borovnice pokazala se obećavajućom tehnikom u svrhu produljenja lag faze, odnosno oksidacijske stabilnosti, u ovom slučaju, ekstra djevičanskog maslinovog ulja.

Vezano za utjecaj čistih fenolnih ekstrakata borovnice na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja, uzorci koji su obrađeni ultrazvukom visokog intenziteta učinkovitiji su u produljenju lag faze od svježih i pasteriziranih uzoraka, dok se liofilizirani uzorci nisu uopće pokazali učinkovitima u istu svrhu.

Primjenom različito pripremljenih emulzija 1 i 2 na produljenje lag faze općenito značajno su se pokazali boljim uzorci tretirani ultrazvučnim homogenizatorom od onih tretiranih postupkom mehaničke homogenizacije.

7. LITERATURA

1. Charles W. I. Haminiuk,^{1*} Giselle M. Maciel,² Manuel S. V. Plata-Oviedo¹ & Rosane M. Phenolic compounds in fruits – an overview, *Peralta International Journal of Food Science and Technology* 2012. **1-6., 15.-16.**
2. Rong Tsao , Guelph Food Research Centre, Agriculture & Agri-Food Canada, 93 Stone Road West, Guelph Ontario, N1G 5C9, Canada,
Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols **1231.-1238.**
3. Verica Dragovic-Uzelac, Zvonimir Savic, Ana Bral, Branka Levaj, Danijela Bursa Kovacevic, Ante Bicko; Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Blueberry Cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) Grown in the Northwest Croatia, **214.-215.**
4. Alejandro David Rodarte Castrejoⁿ a, Ines Eichholza, Sascha Rohnb, Lothar W. Krohb, Susanne Huyskens-Keilc, a Section Fruit Science, Institute of Horticultural Science, Humboldt-Universitat zu Berlin, Germany,
Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening, **564.-565.**
5. Daniele Del Rio,¹ Ana Rodriguez-Mateos,² Jeremy P.E. Spencer,² Massimiliano Tognolini,³ Gina Borges,⁴ and Alan Crozier,
Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases, **1819.-1827.**
6. Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian R  m  sy, and Liliana Jiménez,
The American Journal of Clinical Nutrition; Polyphenols: food sources and bioavailability^{1,2}, **727., 740.**
7. Wei Lu, , Alan L. Kelly, Song Miao; Teagasc Food Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co.Cork, Ireland 6 2School of Food and Nutritional Sciences, University College Cork, Ireland, Emulsion-Based Encapsulation and Delivery 1 Systems for 2 Polyphenols, **1.-14.**
8. [file:///C:/Users/%23%C5%BEivimHajduk/Downloads/Komparativna studija oksidacije stabilnosti razlicitih biljaka s rancimat metodom i oven testom.pdf](file:///C:/Users/%23%C5%BEivimHajduk/Downloads/Komparativna_studija_oksidacije_stabilnosti_razlicitih_biljaka_s_rancimat_metodom_i_oven_testom.pdf) 17.08.2017.