

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



NUŠA KONEČNIK

VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI
RESVERATROLA V LAMELARNIH TEKOČIH KRISTALIH
EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
RESVERATROL IN THE LAMELLAR LIQUID CRYSTAL

LJUBLJANA, 2013

Diplomsko delo – smer Kozmetologija sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorstvom asist. dr. Mirjam Gosenca.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge, asist. dr. Mirjam Gosenca za spodbudo pri delu, dosegljivost ter pomoč in vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo za vsestransko pomoč. Zahvala gre tudi mojim bližnjim, ki so verjeli vame in me podpirali pri doseganju tega cilja.

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorice asist. dr. Mirjam Gosenca.

Nuša Konečnik

Ljubljana, september 2013

VSEBINA

VSEBINA.....	3
KAZALO SLIK.....	4
KAZALO TABEL.....	5
POVZETEK.....	6
ABSTRACT.....	7
SEZNAM OKRAJŠAV.....	9
1 UVOD.....	10
1.1 KOŽA KOT ORGAN.....	10
1.2 ANTIOKSIDATIVNA OBRAMBA KOŽE.....	11
1.3 POLIFENOLNE SPOJINE.....	12
1.3.1 FENOLNE KISLINE.....	15
1.3.2 FLAVONOIDI.....	17
1.3.3 STILBENI.....	20
1.3.3.1 RESVERATROL.....	20
2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA.....	23
3 EKSPERIMENTALNI DEL.....	24
3.1 MATERIALI.....	24
3.1.1 Sestava nosilnega sistema: tekoči kristali z lamelarno strukturo.....	24
3.1.2 Ostale kemikalije.....	26
3.2 METODE.....	26
3.2.1 Priprava vzorcev.....	26
3.2.2 Spremljanje stabilnosti resveratrola v pripravljenih sistemih.....	27
3.2.3 Določanje AO učinkovitosti resveratrola z DPPH metodo.....	28
3.2.3.1 DPPH metoda.....	28
3.2.3.2 Delovni potek.....	30
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	32
4.1 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST RESVERATROLA Z DPPH METODO.....	32
4.2 SPREMLJANJE AO UČINKOVITOSTI RESVERATROLA V TK in SMES.....	34
4.3 FUNKCIONALNA STABILNOST RESVERATROLA v TK in SMES.....	38
4.4 ORGANOLEPTIČNO VREDNOTENJE IZBRANIH NOSILNIH SISTEMOV TK IN SMES.....	42

5	SKLEP	46
6	LITERATURA	48

KAZALO SLIK

Slika 1:	<i>Kemijska struktura cimetine kisline.</i>	16
Slika 2:	<i>Kemijska struktura flavonoidov.</i>	17
Slika 3:	<i>Kemijska struktura trans- in cis- resveratrola.</i>	21
Slika 4:	<i>Kemijska formula fosfatidilholina, R₁ in R₂ predstavljata maščobni kislini, ki sta lahko enaki ali različni.</i>	25
Slika 5:	<i>Kemijska struktura Tween-a 80.</i>	25
Slika 6:	<i>Vzorci TK, shranjeni v steklenih vsebnikih in pripravljani na pogoje staranja (levo – UV lučka, sredina – svetloba, desno – tema).</i>	27
Slika 7:	<i>Vzorca TK (desna, 2 tedna staranja) in SMES (leva, čas 0) pod UV lučko z valovno dolžino $\lambda = 365$ nm.</i>	28
Slika 8:	<i>Sestava UV-VIS spektrofotometra z njegovimi najpomembnejšimi deli.</i>	28
Slika 9:	<i>Reakcija DPPH in resveratrola, pri čemer resveratrol deluje kot donor vodika, ki ga prejme DPPH radikal. Rezultat reakcije je radikal resveratrola, ki reagira z novo DPPH molekulo.</i>	29
Slika 10:	<i>Umeritvena premica DPPH z enačbo premice in pripadajočim R².</i>	33
Slika 11:	<i>Vpliv koncentracije resveratrola na absorbanco DPPH radikala, prikazani kot ln (% DPPH v ravnotežnem stanju) v odvisnosti od molarnega razmerja resveratrola:DPPH.</i>	34
Slika 12:	<i>% preostalega DPPH radikala po dodatku TK in SMES z resveratrolom med staranjem v temi.</i>	36
Slika 13:	<i>% preostalega DPPH radikala po dodatku TK in SMES z resveratrolom med staranjem vzorcev, izpostavljenih UV sevanju.</i>	37
Slika 14:	<i>% preostalega DPPH radikala po dodatku TK in SMES z resveratrolom, med shranjevanjem na svetlobi.</i>	38
Slika 15:	<i>Vsebnost vgrajenega resveratrola v TK in SMES med staranjem v temi.</i>	39
Slika 16:	<i>Vsebnost vgrajenega resveratrola v TK in SMES med staranjem. izpostavljenosti UV sevanju.</i>	40
Slika 17:	<i>Vsebnost vgrajenega resveratrola v TK in SMES med staranjem na svetlobi.</i>	40

Slika 18: TK po 6. tednih staranja: v temi (levo), na UV lučki (sredina), na svetlobi (desno), skupaj z vidno spremembo obarvanja sistema iz svetlo rumene, do temno rjave barve. 43

KAZALO TABEL

Tabela I: Cimetna kislina in njeni najpogostejši derivati; -R v strukturi predstavlja možne substituyente, vezane na aromatski obroč, prikazane v tretjem stolpcu. 16

Tabela II: Osnovna struktura flavonov z možno vezavo OH skupin, pri čemer dobimo različne predstavnike, kot so apigenin, luteolin, krisin. 18

Tabela III: Predstavniki flavonolov, z vezanimi OH skupinami na 3-hidroksiflavonu. 19

Tabela IV: Predstavniki katehinov, z vezanimi pripadajočimi OH skupinami na osnovno kemijsko strukturo. 20

Tabela V: Sestava TK in SMES (%). 26

POVZETEK

Resveratrol, spojina s kemijskim imenom 3,5,4-trihidroksistilben, spada v razred polifenolnih spojin, imenovanih stilbeni. Ugodno vpliva na naše telo, saj s svojimi antioksidativnimi, protimikrobnimi, protivnetnimi učinki pripomore k boljšemu delovanju in zaščiti telesa.

V diplomski nalogi smo se osredotočili na vrednotenje antioksidativne učinkovitosti resveratrola, ki smo ga vgradili v nosilni sistem tekočih kristalov z lamelarno fazo, za primerjavo pa smo izdelali tudi samomikroemulgirajoči sistem z resveratrolom, z uporabljenimi enakimi komponentami v enakem razmerju, a z odsotnostjo vode kot hidrofilne faze. V obeh nosilnih sistemih je bila koncentracija resveratrola enaka, to je 1%. Izdelane sisteme smo izpostavili različnim dejavnikom okolja in sicer temi, UV sevanju in svetlobi ter v določenem času hranjenja vzorcev (po 2., 4. in 6. tednu), preko vsebnosti določali funkcionalno stabilnost resveratrola. Za ovrednotenje antioksidativne učinkovitosti resveratrola smo uporabili difenilpikrilhidrazilno metodo in ugotovili, da je obseg redukcije DPPH radikala odvisen od koncentracije. Višje koncentracije resveratrola so povzročile večjo redukcijo DPPH radikala. Rezultati spremljanja vsebnosti resveratrola v izbranih sistemih kažejo, da resveratrol v tekočih kristalih ostaja funkcionalno stabilna spojina skozi celoten čas hranjenja vzorcev neodvisno od pogojev (tema, svetloba, UV sevanje). Enako velja za resveratrol v samomikroemulgirajočem sistemu v temi in UV sevanju, medtem ko smo na svetlobi zasledili večji padec vsebnosti resveratrola. Razlike med sistemoma na svetlobi in posledično večjo stabilnost resveratrola v tekočih kristalih pripisujemo njihovi večji viskoznosti, ki zagotavlja omejen dostop kisika in boljšo imobilizacijo resveratrola. Med shranjevanjem smo ovrednotili tudi spremembe v organoleptičnih lastnostih, ki so nastale pri izpostavljenosti vzorcev UV sevanju in svetlobi in so posledica fotoizomerizacije, kjer se *trans*- oblika resveratrola spremeni v *cis*- obliko, kar se kaže v obarvanju svetlo rumene do temno rjave barve in prisotnostjo neprijetnega vonja. Na osnovi rezultatov diplomskega dela lahko zaključimo, da resveratrol deluje kot dober antioksidant, katerega učinek je odvisen od koncentracije. Njegova funkcionalna stabilnost je odvisna od dejavnikov okolja in vpliva nosilnega sistema, najbolj občutljiv je vgrajen v samomikroemulgirajoči sistem pri svetlobni izpostavljenosti. Kljub vgradnji v različne nosilne sisteme je na svetlobi nestabilen, kjer proces fotoizomerizacije spremlja sprememba barve in vonja.

ABSTRACT

Resveratrol, a compound with a chemical name 3,5,4-trihydroxy-stilbene belongs to the class of polyphenolic compounds called stilbenes. It has a positive effect on our body since it contributes with its antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory properties to a better functioning and protection of the human body.

In the thesis, we focused on assessment of antioxidative efficiency of the resveratrol which had been built in supporting system of liquid crystals with lamellar phase, and for comparison we built also a self-microemulsifying system with resveratrol, with used equal components in the same ratio but with absence of water as a hydrophilic phase. In both supporting systems the concentration of resveratrol was the same, thus 1%. The completed systems were exposed to different environmental factors, and thus the dark, UV radiation and light; and over a certain storage period of the samples (after 2, 4 and 6 weeks) we determined the functional stability of resveratrol through the content. For assessment of antioxidative efficiency of resveratrol we used the diphenylpicrylhydrazyl method and established that the extent of reduction of the DPPH radical depends on the concentration. Higher concentrations of resveratrol caused greater reduction of the DPPH radical. The results of tracking the resveratrol content in selected systems indicate that resveratrol in liquid crystals remains functionally stable compound throughout entire sample storage time irrespective of the conditions (dark, light, UV radiation). The same holds for resveratrol in self-microemulsifying system in the dark and under UV radiation, while in the light we detected a major drop of the resveratrol content. The differences between the systems in the light and consecutively a greater stability of resveratrol in liquid crystals are attributed to a greater viscosity, the latter that assures a limited access of oxygen and a better immobilization of resveratrol. During storage, we assessed also the changes in organoleptic properties that came into existence at exposure of the samples to UV radiation and the light and are the result of the photoisomerization where the *trans*- form of resveratrol converts into *cis*- form, which can be seen in colouration from light-yellow to dark-brown colour and with the presence of unpleasant smell. On the basis of the results of the thesis, it can be concluded that resveratrol acts as a good antioxidant whose effect depends on

concentration. Its functional stability depends on factors of the environment and the influence of the supporting system; the most sensitive one is built-in the self-microemulsifying system at disposure to light. In spite of building in different supporting systems it is unstable in light where the process of photoisomerization is accompanied by change of colour and smell.

SEZNAM OKRAJŠAV

AO	antioksidant
CAT	katalaza
COX	ciklooksigenaza
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPPH	2-difenil-1-pikrilhidrazil
GPX	glutation-peroksidaza
GRAS	status varne snovi (ang.: <i>generally recognised as safe</i>)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HLB	hidrofilna lipofilna ravnotežna vrednost
IL	interlevkin
iNOS	NO-sintaza, sintaza dušikovega oksida
IPM	izopropilmiristat
LDL	lipoprotein nizke gostote
LP	lipidna peroksidacija
NF-κB	transkripcijski jedrski dejavnik
-OH skupina	hidroksilna skupina
PAF	trombocitni aktivacijski faktor
PO·	fenoksilni radikal
ROH	polifenoli
R·	radikal
RNS	reaktivne dušikove spojine
ROS	reaktivne kisikove spojine
SOD	superoksid-dismutaza
SMES	samomikroemulgirajoči sistem
TK	tekoči kristali
TNFα	dejavnik tumorske nekroze α
UV sevanje	ultravijolično sevanje

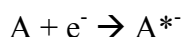
1 UVOD

1.1 KOŽA KOT ORGAN

Koža je vsestranski organ, nujno potreben za delovanje celotnega organizma. Kot največji organ našega telesa, ki je v neposrednem stiku z zunanjim okoljem, je nenehno izpostavljena različnim kemijskim in fizikalnim dejavnikom. Zaradi tega ima več življenjsko pomembnih vlog, ki se jih v vsakdanjem življenju redko zavedamo. Predstavlja bariero med zunanjim svetom in notranjostjo telesa in tako skrbi za izmenjavo številnih snovi, kot so elektroliti in voda ter istočasno ščiti pred dehidracijo telesa. Je odličen toplotni regulator in čutilo. Sodeluje pri imunskem odzivu in predstavlja mesto nastanka, delovanja ter metabolizma številnih proteinov, lipidov, signalnih molekul in glikanov. Tekom evolucije je koža razvila številne obrambne mehanizme, s katerimi zagotavlja zaščito tudi pred učinki radikalov; in sicer tako endogenimi, ki nastajajo kot posledica vsakodnevnih fizioloških procesov, kamor uvrščamo aerobni metabolizem in najrazličnejše vnetne odzive kot eksogenimi, ki nastajajo kot posledica zunanjih vplivov. Tukaj lahko izpostavimo ultravijolično (UV) sevanje, onesnaženost okolja ali vpliv osebnega življenjskega sloga (kajenje, pretirano pitje alkohola) (1).

Radikali so atomi, ioni, molekule ali kompleksi, ki imajo v svoji strukturo vsaj en nesparjen elektron, posledica česa je njihova kemijska reaktivnost in nestabilnost nastalega radikala. V tem pa se med seboj tudi razlikujejo: radikali s sodim številom elektronov, med katerimi sta vsaj dva elektrona na različnih nivojih, s spinoma obrnjenima v isti smeri, so kemično bolj stabilni od radikalov z lihimi številom elektronov ali sodim številom nesparjenih elektronov, ki imajo spine obrnjene v nasprotni smeri. Zaradi njihove reaktivnosti reakcija z drugimi molekulami poteka zelo hitro (2, 3). Spodnje reakcije prikazujejo tri možne načine nastanka radikalov:

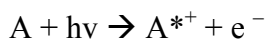
- Enoelektronske reakcije



- Homolitska cepitev kovalentne vezi



- Ionizacija snovi



Radikali so kratkožive strukture nizkih koncentracij, nastajajoče v vsakdanjem življenju in reagirajo s snovjo, ki jo srečajo v svoji okolici. Nastali produkt je odvisen od spojine, s katero radikal reagira. Možna je adicija radikala na dvojno vez in privzem vodika, pri čemer je rezultat nastanek novega radikala. Radikali pa lahko reagirajo tudi med seboj, pri čemer dobimo neradikalni produkt (2). Radikali pogosto nastanejo kot posledica neustreznega metabolizma kisika, nujno potrebnega za človeško življenje; imenujemo jih kisikovi radikali in reaktivne kisikove spojine (ROS), ki povzročajo oksidativni stres. Z izrazom oksidativni stres opišemo vse učinke škodljivega delovanja radikalov. Oksidativni stres nastane kot posledica porušenega ravnotežja med nastajanjem škodljivih reaktivnih zvrsti in odstranjevanjem le teh, kar vodi do nastanka povečanih količin reaktivnih zvrsti oziroma pretirane izrabe obrambnih mehanizmov v telesu. Oksidativni stres lahko povzroči motnje v presnovi celic, poškodbe DNA, lipidno peroksidacijo (LP). Povzroči lahko tudi številne poškodbe na koži, ki se kažejo kot prezgodnje staranje, pojav gub, lis in pigmentacij, izgubo elastičnosti ter prožnosti kože ali celo pojav različnih malignih transformacij (4). Antioksidativno zaščito telesa omogočajo številni obrambni mehanizmi. Pomembna je pri zagotavljanju ustreznega ravnotežja med nastajanjem škodljivih reaktivnih zvrsti in njihovem odstranjevanju oziroma preprečevanju posledic oksidativnega stresa. Sestavljajo jo številni antioksidanti (AO), ki se med seboj močno prepletajo (4–6).

1.2 ANTIOKSIDATIVNA OBRAMBA KOŽE

AO je vsaka spojina, ki v manjših koncentracijah kot potencialno oksidirana snov, prepreči, odloži ali zavre oksidacijo te snovi. AO neposredno reagirajo z nastalimi radikali in jih spreminjajo v stabilnejše produkte. Delujejo na različne načine, saj lahko znižujejo lokalne koncentracije kisika, razgrajujejo perokside in ostale reaktivne zvrsti v neradikalne produkte, zavirajo LP, vežejo oziroma kelirajo kovinske ione v obliko, ki onemogoča začetek ali širitev radikalskih reakcij ter prekinjajo in preprečujejo nadaljnje verižne reakcije (2, 3, 6, 7). Delujejo lahko na različnih stopnjah oksidacijskega procesa.

Poznamo več načinov delitev antioksidantov, na primer: glede na učinkovitost in zastopanost v organizmu, glede na fizikalno-kemijske lastnosti (hidrofilni, lipofilni, amfifilni) ali glede na mesto nastanka in mehanizem delovanja (3, 8):

Glede na mesto nastanka ločimo endogene AO, ki so normalno prisotni v telesu in eksogene AO. Predstavniki endogenih so lahko encimski ali neencimski AO. Med encimske AO uvrščamo superoksid-dismutazo (SOD), glutation-peroksidazo (GPX), katalazo (CAT), glutation-reduktazo (GR), medtem ko so pomembni predstavniki endogenih neencimskih AO koencim Q10, glutation, sečna kislina, albumin, lipojska kislina in drugi. S staranjem se količina in aktivnost endogenih AO zmanjšuje (3, 8).

Eksogenih AO pa telo ni sposobno sintetizirati in jih vnašamo s pomočjo hrane, največ z zelenjavo (paradižnik, česen, korenje, brokoli), s sadjem (borovnice, citrusi, rdeče grozdje) pa tudi z oreščki, čokolado, kavo, čaji.. V hrani rastlinskega izvora jih torej poznamo kot karotenoide, flavonoide, polifenole, pa tudi različne minerale (selen, cink) in vitamine (vitamin C, E) (7).

Glede na mehanizem delovanja jih razdelimo na prave AO, redoks stabilizatorje in AO sinergiste. *Pravi AO* lovijo radikale in s tem zavirajo verižno reakcijo. Pri tem se oksidirajo v relativno stabilen in nereaktiven radikal, ki se obnavlja ali izloča iz organizma. Snov, s katero reagira, spremenijo v obliko, ki za človeka ni škodljiva in predstavlja nereaktivne oziroma manj reaktivne produkte. Lahko jim rečemo žrtveni antioksidanti, saj delujejo kot donorji elektronov, ki reagirajo z radikali, preden bi ti lahko reagirali z drugo snovjo v organizmu. Najbolj znan predstavnik je vitamin E. *Redoks stabilizatorji* so zaradi manjšega redoks potenciala od potencialno oksidirane snovi sposobni zmanjšati obseg oksidacije te snovi. Mednje spadajo askorbinska kislina, glutation, tiomlečna kislina, cistein. *AO sinergisti* pa so kelatorji, ki nase vežejo ione prehodnih kovin, zlasti bakrove in železove ione ter preprečijo njihovo interakcijo z vodikovim peroksidom (H_2O_2) in superoksidnim radikalom. Kot primer lahko izpostavimo EDTA, ki je znan kelator (2, 7, 8). Polifenole kot obsežno skupino AO, lahko glede na mehanizem delovanja uvrstimo v vse tri skupine (7). Predstavljajo eksogene AO, z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi.

1.3 POLIFENOLNE SPOJINE

Polifenoli so spojine naravnega izvora, ki jih uvrščamo med fenole. Fenoli imajo značilno kemijsko strukturo, sestavljeno iz fenolnih skupin, vezanih na aromatski obroč. Poznamo več različnih razredov fenolov, od najpreprostejšega fenola z enim obročem do polifenolnih skupin, katerih kemijska struktura se razlikuje po številu ogljikovih atomov (C atomov) oziroma aromatskih obročev ter nanj vezanih fenolnih skupin (9). Glede na to jih je Harborne razdelil v več kot deset različnih razredov: preproste fenolne spojine, benzokinoni, fenolne kisline, acetofenoni, fenilacetilne kisline, hidroksicimetne kisline, fenilpropeni, kumarini in izokumarini, kromoni, naftokinoni, ksantoni, stilbeni, antrakinoni, flavonoidi, lignani in neolignani ter lignini (10).

Polifenoli sestavljajo široko zastopano skupino sekundarnih metabolitov v rastlinah, poleg vitaminov in mineralov (7). Posredujejo številne fiziološke učinke (9, 10). Danes v to skupino uvrščamo že več kot 8.000 različnih spojin (11). Včasih so polifenole povezovali predvsem z zmožnostjo vezave in obarjanja makromolekul, npr. proteinov in ogljikovih hidratov, kot neželjeno lastnostjo, danes pa se na podlagi *in vitro* raziskav na živalih uveljavljajo kot spojine z različnimi zelenimi funkcijami v rastlinah: poleg tega, da imajo vlogo barvila za liste, cvetove in plodove, izkazujejo tudi protimikrobno, protiglivično, protivnetno, antiestrogeno, antimutageno in antikarcinogeno delovanje (11, 12). Antikarcinogeno delovanje, ki so ga opazili pri fenolnih kislinah, taninih, flavonoidih,.. se kaže v preprečevanju patoloških stanj (maligni tumor) in zaščiti DNA molekule pred oksidativnimi poškodbami. Antimutageni učinki se nanašajo na zaviranje ekspresije mutagenih genov in zmanjšanju aktivnosti encimov, ki lahko povzročijo pred-rakava stanja. Preprečujejo tudi kardiovaskularna obolenja, zmanjšajo možnosti za nastanek razjed želodca in dvanajstnika, različnih alergij, krhkosti žilja, bakterijskih in virusnih infekcij. Z vplivom na aktivnost encimskih sistemov omogočajo detoksifikacijo in odstranitev ksenobiotikov iz organizma. Delovanje in učinki pa so odvisni glede na rastlino, iz katere izoliramo proučevano spojino, njene biološke razpoložljivosti, mehanizma delovanja, sinergizma z ostalimi spojinami v hrani oziroma človeškemu telesu in vsebnosti polifenolov (10, 13).

Polifenoli nastanejo iz skupnega predhodnika, aminokisline fenilalanina, redkeje tudi iz tirozina (9, 14). S hrano jih vsakodnevno zaužijemo okoli 1 g/dan, kar predstavlja desetkratno količino v primerjavi z vitaminom C in stokratno količino glede na zaužite količine vitamina E ali karotenoidov (15). Prisotni so v hrani rastlinskega izvora, kot so

zelenjava, sadje, žita, stročnice, čaj, kava in čokolada (7). V rastlinah prav tako delujejo kot antioksidanti, saj ščitijo rastline pred UV sevanjem, keliranjem kovinskih ionov in lovljenjem radikalom, nastajajočih med fotosintezo (7). Njihova vsebnost v hrani je odvisna od številnih intrinzičnih (genetika, vrsta rastline) in ekstrinzičnih dejavnikov, kot so kultivacija rastlin, sestava prsti, različni pogoji rasti, stopnja zorenja in način shranjevanja pridelka (9). Ustrežno shranjevanje je pomembno za ohranitev učinka polifenolnih spojin, zaradi njihove občutljivosti na oksidacijo. Pri procesu oksidacije nastajajo polimerne spojine, kar vpliva na kakovost, barvo in organoleptične lastnosti hrane. Spremembe so sicer lahko dobrodošle, kot v primeru črnega čaja, kjer flavonoidi oksidirajo in razvijejo tipično trpko in močno aromo, lističi pa postanejo bakreno rjave barve, medtem ko je pri sadju opazno neželjeno rjavo obarvanje (12, 15).

POLIFENOLI KOT ANTIOKSIDANTI

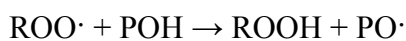
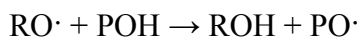
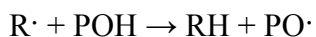
Polifenolno spojino opredelimo kot antioksidant, če zadosti naslednjima zahtevama:

- v nižjih koncentracijah kot potencialno oksidirajoča snov prepreči, upočasni ali zakasni njeno oksidacijo;
- rezultat delovanja polifenolne spojine je stabilen radikal, ki prekine verižno reakcijo oksidacije;

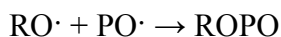
Kot spojine z AO delovanjem so polifenoli pomembni pri obrambi rastlin v stresnih pogojih, kamor spadajo temperaturna nihanja, UV sevanje, napadi patogenih organizmov, parazitov in plenilcev (13). AO delovanje polifenolov je odvisno od kemijske strukture. Fenol kot izhodiščna spojina izkazuje šibkejšo AO delovanje kot *orto-* in *para-*substituirani polifenoli.

AO delovanje polifenolov lahko poteka po več mehanizmih (10, 13):

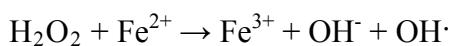
- Lovijo radikale in reaktivne zvrsti, kot so ROS/RNS in kelirajo kovinske ione. V svoji strukturi imajo namreč vodik/elektron donorske skupine, ki reagirajo s peroksilnim radikalom in ostalimi reaktivnimi zvrstmi (hidroksilni (OH \cdot), nitroksidni radikal), kar se odraža v nastanku alkilnega hidroperoksida in stabilnega fenoksilnega (PO \cdot) radikala. S takšnim delovanjem preprečujejo lipidno peroksidacijo. Spodnje reakcije prikazujejo reagiranje polifenolov (POH) z reaktivnimi zvrstmi, kjer nastaja stabilen PO \cdot radikal.



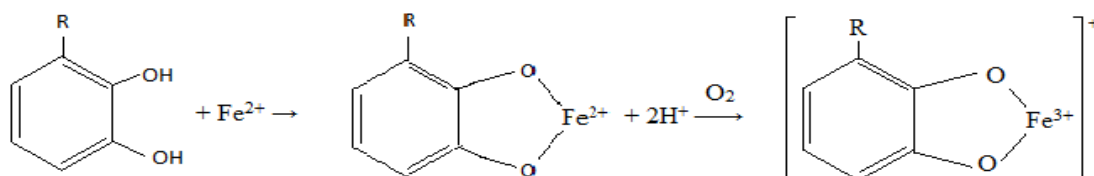
- Nastali $PO\cdot$ reagira z reaktivnimi zvrstmi, prepreči njihovo tvorbo in verižno reakcijo, rezultat česar je neradikalni produkt, kar prikazuje reakcija spodaj:



- Konjugirajo ione prehodnih kovin in preprečujejo nastanek radikalov. Ioni, kot so Cu^+ ali Fe^{2+} , namreč lahko reagirajo z H_2O_2 preko Fentonove reakcije, kjer prihaja do nastanka $OH\cdot$ radikala, prikazano na spodnji reakciji.



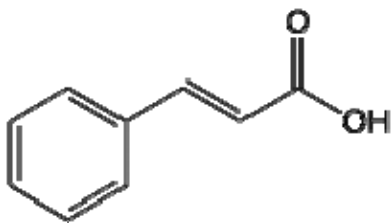
Zaradi velike nestabilnosti in reaktivnosti nastalega $OH\cdot$ radikala, ki lahko povzroči radikalno reakcijo, polifenoli preventivno reagirajo z Fe^{2+} , spodbudijo avtooksidacijo Fe^{2+} ali omogočajo nastanek neradikalnih kompleksov Cu^{2+} in Fe^{2+} in tako preprečijo radikalno reakcijo, kar nam prikazuje spodnja reakcija:



Keliranje ionov prehodnih kovin je tako najbolj značilno za polifenole, ki imajo na aromatskem obroču vezani dve -OH skupini (13).

1.3.1 FENOLNE KISLINE

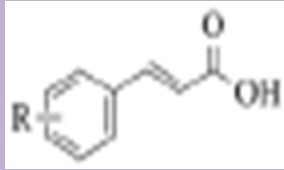
Fenolne kisline v splošnem razdelimo v dva velika razreda, in sicer derivate benzojske kisline in derivate cimetine kisline. Trans-3-fenil-2-propenojska kislina, znana tudi kot cimena kislina (slika 1), in njeni derivati so prisotni v večini sadja in zelenjave.



Slika 1: *Kemijska struktura cimetne kisline.*

Biosinteza cimetne kisline poteka iz aminokisline fenilalanina in predstavlja pomemben prekurzor pri biosintezi flavonoidov in lignina. Najdemo jo v obliki estrov z drugimi hidroksilnimi kislinami, kot sta kina kislina ali vinska kislina. V prosti obliki je prisotna le v nizkih koncentracijah, saj je nizko polarna in slabo vodotopna spojina. Najpogostejši derivati cimetne kisline so *para*-kumarna, kavna, ferulna, izoferulna in sinapijska kislina. Med seboj se razlikujejo glede na substitucijo na fenilnem obroču (Tabela I), nahajajo pa se v celičnih stenah večine rastlin (16).

Tabela I: *Cimetna kislina in njeni najpogostejši derivati; -R v strukturi predstavlja možne substituentne, vezane na aromatski obroč, prikazane v tretjem stolpcu.*

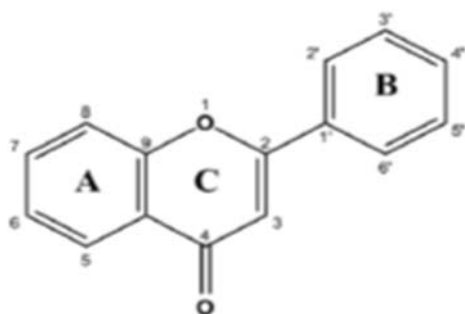
Spojina	Kemijsko ime [IUPAC]	Struktura
osnovna struktura		
cimetna kislina	<i>(E)</i> -3-fenil-2-propenojska kislina → <i>trans</i> -fenilakrilna kislina	H
<i>para</i> -kumarna kislina	<i>(E)</i> -3-(4-hidroksifenil)-2-propenojska kislina	3-OH
kavna kislina	<i>(E)</i> -3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propenojska kislina	3,4-diOH
ferulna kislina	<i>(E)</i> -3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)prop-2-enojska kislina	3-OCH ₃ -4-OH
izoferulna kislina	<i>(E)</i> -3-(3-hidroksi-4-metoksifenil)prop-2-enojska kislina	3-OH-4-OCH ₃
sinapijska kislina	<i>(E)</i> -3-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)prop-2-enojska kislina	4-OH-3,5-diOCH ₃

Za cimetno kislino so potrdili številne biološke učinke kot so AO, protibakterijsko, protivirusno in protiglivično delovanje. AO učinki so posledica prisotnosti -OH skupine, zmožne reagirati z radikali in tvoriti resonančno stabilizirani PO· radikal ter prisotnosti propenojske stranske verige, kjer zaradi konjugiranih dvojnih vezi prihaja do stabilizacije

nastalega $PO\cdot$ radikala. S tem omejujejo oksidativni stres. Tako kavna, ferulna in sinapinska kislina delujejo kot močni AO in so se v študijah izkazali kot učinkoviti lovilci reaktivnih kisikovih zvrsti (hidroksilnega, superoksidnega, peroksilnega radikala ter singletnega kisika). Posredujejo pa tudi druge fiziološke učinke (protimikrobno, protivnetno, protibakterijsko delovanje) zaradi katerih bi se lahko uporabljale tudi na področju farmacije, vendar je njihova uporaba še vedno usmerjena predvsem na kozmetično industrijo. Tako se derivati cimetine kisline pojavljajo kot sestavina različnih dišav, dekorativne kozmetike, šamponov in toaletnih mil. Razširjeni so različni estri le te, najpogostejši med njimi so metil-, etil- in benzilcinamat (15-18).

1.3.2 FLAVONOIDI

Flavonoidi so najbolj množično zastopane spojine v rastlinah, saj je znanih je že več tisoč spojin (7). So pigmenti, zaslužni za rumeno, oranžno in rdečo barvo rastlin. Njihovo osnovno strukturo predstavlja 2-fenilbenzopiran. V svoji molekuli imajo 15 C-atomov urejenih v difenilpropanoidno ogrodje. V naravi se pojavljajo kot samostojne spojine ali nastopajo kot 3-O-glikozidi. Na sliki 2 je predstavljena osnovna struktura z označenimi obroči A, C in B. Na obroč C se lahko vežejo sladkorne enote na tretji C-atom, medtem ko se na obroču A sladkorne enote nahajajo na mestih C5 ali C7. Vezava na obroč označen z številko B je redka. Sladkorno enoto lahko predstavljajo glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manoza ali kompleksnejši oligo-saharidi. Poznamo 12 razredov flavonoidov, ki jih razdelimo glede na oksidacijo na tretjem C-atomu v flavone, flavonole, katehine (flavan-3-oli), flavanone, dihidroflavonole, proantocianidine, antocianidine, izoflavonoide, neoflavone, halkone, hidihrohalkone in avrone (15, 16).



Slika 2: *Kemijska struktura flavonoidov.*

Flavonoidi imajo zmožnost lovljenja radikalov, torej izkazujejo AO delovanje, na katerega vplivajo (7, 13):

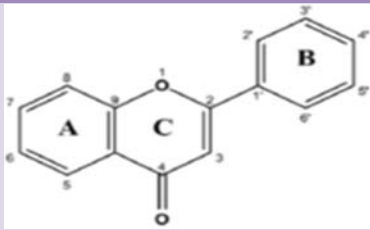
- 3',4' –kateholna skupina v obroču B, z močnimi elektron donorskimi lastnostmi, ki močno ojača AO delovanje.
- Dvojna vez med C2 in C3 mestom in keto- skupina obroča C, odgovorna za delokalizacijo elektronov obroča B, kar pripomore k stabilizaciji strukture.
- Hidroksilne skupine, vezane na tretji in peti C-atom obroča A in C, skupaj z keto-skupino obroča C, ki imajo sposobnost lovljenja radikalov.
- Glikozilacija na tretjem C atomu, ki v primerjavi z ne-glikoziliranimi produkti zmanjšuje AO učinkovitost.

Močno izraženo AO delovanje skupaj z ostalimi fiziološkimi učinki imajo flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavan-3-oli in flavanoli (15, 16). Imajo pomembno vlogo pri rasti, razvoju in obrambi rastlin. Od karotenoidov se razlikujejo po vodotopnosti, kar jim omogoča zaščito hidrofilnih delov celic. V človeškem telesu izkazujejo številne biološke učinke, saj delujejo protivnetno, protialergijsko in protitumorno (15).

FLAVONI

Flavoni so brezbarvne kristalinične spojine, za katere je značilna slaba topnost v vodi. Molekulska formula spojin je $C_{15}H_{10}O_2$. V rastlinah se nahajajo v obliki O- ali C-glikozidov. Osnovno kemijsko strukturo predstavlja 2-fenil-1-benzopiran-4-on, kamor so na različna mesta vezane -OH skupine, s čimer dobimo različne predstavnike, prikazane v tabeli II (16):

Tabela II: Osnovna struktura flavonov z možno vezavo OH skupin, pri čemer dobimo različne predstavnike, kot so apigenin, luteolin, krisin.

Osnovna struktura	Mesta vezave stranskih skupin			
	5	7	3'	4'
				
apigenin	OH	OH	/	OH
luteolin	OH	OH	OH	OH
krisin	OH	OH	/	/

FLAVONOLI

Flavonoli so skupina flavonoidov, za katere je značilna osnovna kemijska struktura flavonov (2-fenil-1-benzopiran-4-on), z dodatno OH skupino, vezano na tretji C atom. Spadajo med hidroksilne derivate flavonov. Flavonoli se v rastlinah pojavljajo kot O-glikozidi, vezani na sladkorne enote. Rastlino ščitijo pred UV sevanjem in določajo barvo cvetov (19).

Z vezavo -OH skupin na različna mesta dobimo predstavnike flavonolov, kot so kvercetin, kamferol, galangin (tabela III) (16).

Tabela III: Predstavniki flavonolov, z vezanimi OH skupinami na 3-hidroksiflavonu.

Položaj	5	7	3'	4'
kvercetin	OH	OH	OH	OH
kamferol	OH	OH	/	OH
galangin	OH	OH	/	/

FLAVANONI

Flavanoni so spojine kemijsko strukturo, imenovano flavan-4-on. Imajo največjo biološko razpoložljivost v primerjavi z ostalimi skupinami flavonoidov. Največje koncentracije se nahajajo v citrusih, še posebej v pomarančnem soku, kjer vsebnost flavanonskih glikozidov znaša 90 mg/150 ml soka. Pomembna predstavnika sta hesperidin in narigenin, ki delujeta podobno kot lipofilen vitamin E, torej preprečujeta LP in zmanjšujeta koncentracije škodljivega LDL holesterola v krvi in žilah (15, 16).

FLAVANOLI

Predstavljajo največjo skupino flavonoidov. Glede na njihovo kemijsko strukturo jih delimo na katehine z značilno monomerno strukturo, proantocianidine s polimerno strukturo in tanine, velike polifenolne spojine, ki vsebujejo številne -OH in druge (karboksilne) skupine, ki tvorijo velike komplekse z makromolekulami. Tanini so vodotopne fenolne spojine z molekulsko maso med 500 in 3000 g/mol (20). Poleg sodelovanja v reakcijah, značilnih za vse polifenole, so zmožni tudi obarjanja alkaloidov,

želatine in drugih proteinov. Inhibirajo prebavne encime ter znižujejo razpoložljivost vitaminov in mineralov v hrani, zato se pogosto smatrajo kot neželene spojine. V nasprotju pa tanini posredujejo tudi antimitogene, antimikrobne in antikarcenogene učinke. Delujejo antioksidativno, saj z vključevanjem v Fentonovo reakcijo in lovljenjem radikalov, inhibirajo LP ter COX-1 in -2 (20). V največji meri so odgovorni za trpek, grenak okus številne hrane in pijače. Predstavnik flavanolov je taksifolin (16).

KATEHINI/FLAVAN-3-OLI

Katehini spadajo v razred flavanolov. So monomerne strukture, katerih osnovna kemijska struktura je 2-fenil-3,4-dihidro-2H-kromen-3-ol. Prisotna sta dva kiralna centra, na drugem in tretjem C-atomu, posledica česar so štiri diastereoizomeri, dva v *trans*- obliki, imenovana katehin, dva v *cis*- obliki z imenom epikatehin, skupaj z dodatnim predstavnikom, epigalokatehinom (tabela IV) (21), (16):

Tabela IIIV: Predstavniki katehinov, z vezanimi pripadajočimi OH skupinami na osnovno kemijsko strukturo.

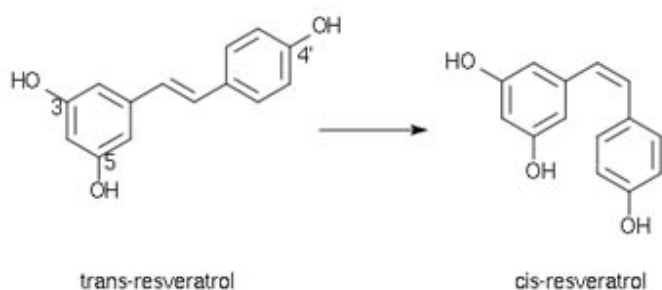
Položaj	5	7	3'	4'	5'
katehin	β OH	OH	OH	OH	/
epikatehin	α OH	OH	OH	OH	/
epigalokatehin	α OH	OH	OH	OH	OH

1.3.3 STILBENI

So nizko molekularne spojine z molekulsko maso 200-300 g/mol. Njihovo strukturo sestavljata dva stereoizomera; *trans*-1,2-difeniletlen ali *trans*-stilben in *cis*-1,2-difeniletlen ali *cis*-stilben. V naravi je pogosteje zastopana *trans*- oblika (22), ki ima močnejše izražene antikarcenogene in antioksidativne učinke. Vsi stilbeni nudijo kardiovaskularno zaščito, izkazujejo protivnetno in protimikrobno delovanje. Rastline ščitijo pred UV sevanjem in boleznimi, v teh primerih se tudi poveča sinteza stilbenov v rastlinah. Zaradi pozitivnih učinkov jih pogosto imenujejo fitoaleksini. Najdemo jih predvsem v lesu, sadežih ali listih rastlin (22).

1.3.3.1 RESVERATROL

Najbolj znan in raziskan stilben je resveratrol s kemijskim imenom 5-(4-hidroksistiril)benzen-1,3-diol oziroma *trans*-3,5,4-trihidroksistilben (slika 3). Je bel prašek z rahlo rumenim odtenkom (23). Izolirali so ga leta 1940 iz belega teloha (*Veratrum album*), danes pa ga najdemo v preko 70 različnih vrstah rastlin in njihovih plodovih, npr. v grozdju, arašidih, evkaliptusu, rži (24). Nastaja kot stranski produkt rastlinskega odziva na stres. V rastlinah je v več oblikah; prosti (aglikon) in glikozilirani (piceid), ter kot *cis*- in *trans*- izomer (slika 3). Najpogostejši vir resveratrola je rdeče grozdje pri katerem se največje koncentracije nahajajo v koži grozdnih jagod (24). V grozdju je običajno v glikozilirani obliki, kar pripomore k manjšemu obsegu razgradnje, prav tako se lahko podaljša čas shranjevanja grozdja, manj občutljiv pa je tudi na dejavnike okolja, katerim je izpostavljen pri transportu grozdja (25).



Slika 3: Kemijska struktura *trans*- in *cis*- resveratrola.

Trans- obliko resveratrola povezujejo s številnimi pozitivnimi učinki in je tudi najbolj proučevana. Njegove AO sposobnosti se nanašajo na sposobnost inhibicije peroksidnega in hidroperoksidnega radikala ter LP; s tem ščiti tudi pred UV sevanjem. Deluje tudi kot kelator kovinskih ionov. Študije na miših so pokazale, da ščiti organizem pred debelostjo in sladkorno boleznijo. Z uživanjem resveratrola se zmanjša možnost pojava koronarnih bolezni arterij, torej deluje kardioprotektivno zaradi dokazane manjše stopnje holesterola v krvi, zmanjšane možnosti pojava krvnih strdkov in inhibicije oksidacije lipoproteiov nizke gostote (LDL). Francoski paradoks govori, da imajo Francozi, kljub uživanju hrane, bogate z nasičenimi maščobami, relativno nizko pojavnost bolezni srca in ožilja. Vzrok bi lahko bilo uživanje rdečega vina, ki ima visoko vsebnost resveratrola (23-26).

Resveratrol izkazuje tudi antiaterogene aktivnosti, in sicer kot pomoč pri celjenju in pojavljanju različnih poškodb, vnetij, okužb arterij, rezultat katerih je ateroskleroza in regulira proliferacijo celic v gladki mišici. Učinkuje na različnih ravneh vnetja. Pri

aterogenezi se poveča migracija levkocitov, ki se nato v večjem obsegu adherirajo na stene žilja. Za resveratrol so »*in vitro*« dokazali, da preprečuje ekspresijo adhezijskih molekul VCAM in ICAM-1, ki vplivata na izražanje provnetnih dejavnikov, kot so monociti in povzročata njihovo adhezijo na endotelij. Vpliva tudi na provnetne učinke trombocitnega aktivacijskega faktorja (PAF), ki že v zelo nizkih koncentracijah povzroča vnetja, agregacijo trombocitov in alergični odziv. Študije vpliva resveratrola na transkripcijske faktorje, ki regulirajo ekspresijo vnetnih mediatorjev, na primer dejavnik tumorske nekroze α (TNF α), interleukin-1 β (IL-1 β) in interleukin-6 (IL-6) ter dušikova oksid sintaza (iNOS), ki zmanjšajo oksidativni stres v telesu, preprečujejo propad endotelija in vplivajo na pro-aterogenezne procese, kažejo, da naj bi resveratrol z inhibicijo transkripcijskega jedrskega dejavnika (NF- κ B) in aktivacijo iNOS posredno pripomogel k večji zaščiti telesa (25).

Delovanje resveratrola je primerljivo z acetilsalicilno kislino, saj inhibira COX-1, ki katalizira oksidacijo in ciklizacijo arahidonske kisline v endoperokside, le ti pa lahko povzročijo simptome vnetij in različne bolečine. V primeru alergij na acetilsalicilno kislino lahko kot alternativo preprečevanja agregacije trombocitov uporabimo resveratrol (23), (25).

Ugotovili so, da je resveratrol zmožen upočasniti proces staranja in povečati življenjsko dobo preprostih evkariontov, kot so *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*. Študije na resveratrolu tako obetajo razvoj novih terapevtskih metod za starejšo populacijo (23-26).

2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Namen diplomskega dela je vrednotenje antioksidativne učinkovitosti in posredno funkcionalne stabilnosti resveratrola v izbranem nosilnem sistemu liotropnih tekočih kristalov z lamelarno strukturo. Slednji je sestavljen iz izopropilmiristata kot lipofilne faze, površinsko aktivnih snovi lecitina in Tween-a-80 in destilirane vode. S primerjavo bomo ovrednotili antioksidativno učinkovitost resveratrola, vgrajenega v samomikroemulgirajoči sistem, sestavljen iz istih komponent v enakem razmerju, vendar brez vode.

Funkcionalno stabilnost resveratrola bomo določali s spremljanjem njegove antioksidativne učinkovitosti v različnih časovnih točkah (ob času 0, po 2, 4 in 6 tednih), pri različnih pogojih staranja (UV svetloba, svetloba in tema). Antioksidativno učinkovitost bomo določali z DPPH metodo. Izdelane sisteme bomo spremljali tudi organoleptično, saj bomo ovrednotili izgled, barvo ter vonj izbranega nosilnega sistema.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

3.1.1 Sestava nosilnega sistema: tekoči kristali z lamelarno strukturo

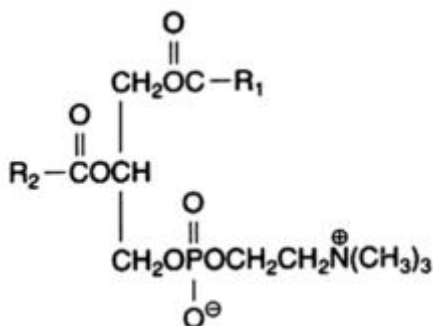
- **Izopropilmiristat** - $C_{17}H_{34}O_2$ (Fluka, Nemčija)

Izopropilmiristat (IPM) je bistra oljna tekočina, brez barve in vonja, z nizko viskoznostjo. Kemijsko je ester propan-2-ola in miristinske kisline. Topen je v acetonu, kloroformu, 95% etanolu, etilacetatu, tekočih ogljikovodikih, toluenu, maščobnih kislinah in voskih, medtem ko se z vodo, glicerolom in glikoli ne meša. Je sestavina kozmetičnih in farmacevtskih oblik za dermalno uporabo (oljne kopeli, kreme, losjoni, pripravki za lase, nohte in ustnice, deodoranti) (27).

- **Lecitin** (Lipoid GmbH, Nemčija)

Lecitin uvrščamo med fosfolipide in je kompleksna zmes fosfatidilholina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina in fosfatidilinozitola v kombinaciji z različnimi količinami trigliceridov, maščobnih kislin in ogljikovih hidratov. Pogosto se izraz lecitin uporablja kot sinonim za fosfatidilholin (slika 4), ki predstavlja najpomembnejšo komponento lecitina. Koncentracije fosfatidilholina se razlikujejo glede na stopnjo čistoče in vrste lecitina. Različna kemijska sestava se odraža tudi na videzu lecitina, ki variira od viskoznih, poltrdnih sistemov do praškov (v obliki pudra) v odvisnosti od prisotnosti prostih maščobnih kislin. Razlikujejo se tudi po barvi, vse od rjave do svetlo rumene, kar je posledica beljenja ali različne stopnje čistoče. Lecitin je občutljiv na izpostavljenost zraku, saj lahko pride do oksidacije, posledica česar je sprememba barve v temno rumeno ali rjavo. Je higroskopen, posledično podvržen mikrobiološki kontaminaciji in brez vonja. Lecitin, pridobljen iz zelenjavnih virov (sojino olje, sončnice) ima blag, oreščkom ali soji podoben okus. Zaradi amfifilnega značaja se uporablja kot solubilizator, emulgator in stabilizator. Je netoksičen in biokompatibilen. Uporablja se v parenteralnih farmacevtskih oblikah, v injekcijah za transdermalno uporabo ter v dermalnih farmacevtskih oblikah, kot so kreme in mazila. Ima GRAS (generally recognised as safe) status.

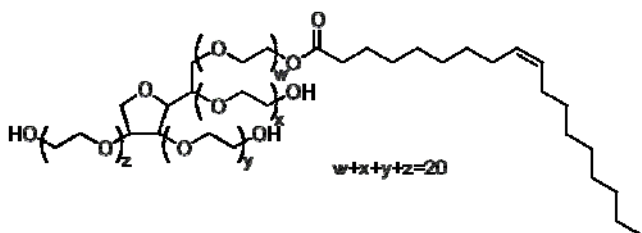
Uporabljen lecitin, Lipoid S100 vsebuje velik delež fosfatidilholina (> 94%), v manjših koncentracijah so prisotni še fosfatidiletanolamin, lizofostatidilholin, trigliceridi, D1-tokoferol ter voda. Spada med prečiščeno vrsto sojinega lecitina, od tod tudi njegov značilen vonj. Ima rumeno voskasto strukturo in je dobro topen v maščobnem olju in dietiletru (27, 28).



Slika 4: Kemijska formula fosfatidilholina, R_1 in R_2 predstavljata maščobni kislini, ki sta lahko enaki ali različni.

Tween-80 - $C_{24}H_{44}O_6$ (Fluka, Nemčija)

Tween-80 je monoester sorbitana z oleinsko kislino s kemijskim imenom polioksietilen sorbitan monooleat (slika 5). Je viskozna, vodotopna tekočina rumene barve. Je hidrofilen neionogeni emulgator s hidrofilno lipofilno ravnotežno vrednostjo (HLB) 15. Estri sorbitana se široko uporabljajo v kozmetičnih, prehranskih in farmacevtskih oblikah. V kozmetičnih oblikah se uporabljajo kot sestavine krem, emulzij in mazil za dermalno uporabo. So varni, netoksični in imajo status GRAS (27).



Slika 5: Kemijska struktura Tween-a 80.

- **Destilirana voda**

Pridobljena s postopkom destilacije na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

- **Resveratrol** - C₁₄H₁₂O₃ (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Resveratrol, fenolna spojina s kemijskim imenom 5-(4-hidroksistiril)benzen-1,3-diol oziroma trans-3,5,4-trihidroksistirilben, je bel prašek z rahlo rumenim odtenkom. Nahaja se v rastlinah, kot so beli teloh, grozdje, arašidi, evkaliptus, rž. Je stabilen do temperature 40°C in 75% relativne vlažnosti. Pri izpostavljenosti UV svetlobi se *trans*- oblika s pomočjo fotoizomerizacije spremeni v *cis*- obliko, kar je razvidno kot močno rumeno ali rjavo obarvanje (slika 3). Je hidrofoben, torej praktično netopen v vodi, dobro topen pa je v etanolu in maščobnih komponentah (23-26).

3.1.2 Ostale kemikalije

- **Metanol** (CH₃OH): (Merck KGaA, Nemčija); uporaba pri redčenju vzorcev.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorcev

Resveratrol smo vgradili v nosilni sistem lamelarnih tekočih kristalov (TK) in v samomikroemulgirajoči sistem (SMES). TK so sestavljeni iz IPM, ki predstavlja lipofilno fazo a, lecitina in Tween-a-80, v razmerju 1 / 1 kot emulgatorske zmesi ter destilirane vode kot hidrofilne faze (tabela V). Sestavine SMES so enake kot v primeru TK, vendar brez hidrofilne faze (tabela V). V oba sistema smo vgradili 1% (m/m) resveratrola.

Tabela V: Sestava TK in SMES (%).

Sestavine (%)	TK	SMES
Izpropilmiristat	28	28
Tween 80 / Lecitin	36 / 36	36 / 36
Destilirana voda	37,5	/

TK z lamelarno strukturo smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico najprej zatehtali IPM, lecitin in Tween-80 ter mešali na magnetnem mešalu do nastanka homogene zmesi. Nato smo dodali ustrezno količino resveratrola, zmes z alu-folijo zaščitili pred svetlobo in nadaljevali z mešanjem, dokler se resveratrol ni popolnoma raztopil. Na ta način smo dobili SMES z vgrajenim resveratrolom. Za izdelavo TK smo zmesi dodali še predpisano količino vode in ponovno mešali na magnetnem mešalu do nastanka TK.

3.2.2 Spremljanje stabilnosti resveratrola v pripravljenih sistemih

Za ovrednotenje funkcionalne stabilnosti resveratrola, vgrajenega v TK in SMES, smo pomerili AO učinkovitost resveratrola takoj po izdelavi, nato pa ju ustrezno razdelili v dobro zaprte steklene vsebnike (slika 6). Izpostavili smo jih različnim pogojem staranja (UV svetloba, sončna svetloba, tema). Vzorec, izpostavljen UV sevanju, smo obsevali z UV svetilko z valovno dolžino $\lambda = 365$ nm, ki spada v območje UV-A svetlobe, za katerega je značilno prehajanje skozi običajno steklo (slika 7). AO učinkovitost resveratrola smo spremljali v vnaprej določenih časovnih intervalih ($t = 2$ tedna, 4 tedne, 6 tednov) in posledično preko vsebnosti določili njegovo funkcionalno stabilnost.



Slika 6: Vzorci TK, shranjeni v steklenih vsebnikih in pripravljeni na pogoje staranja (levo – UV lučka, sredina – svetloba, desno – tema).



Slika 7: Vzorca TK (desna, 2 tedna staranja) in SMES (leva, čas 0) pod UV lučko z valovno dolžino $\lambda = 365 \text{ nm}$.

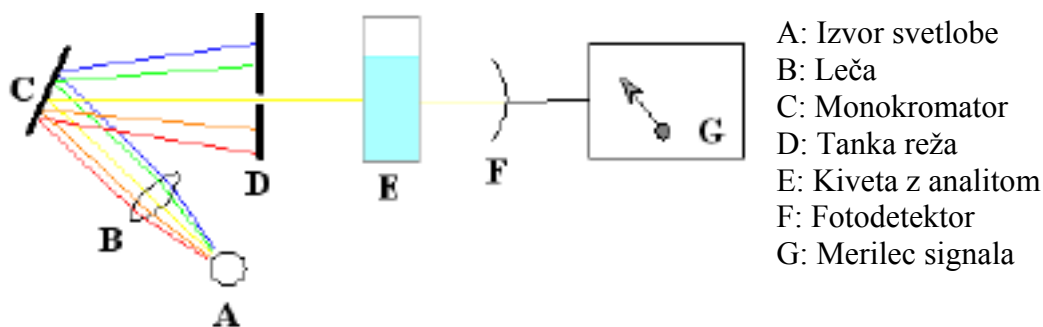
3.2.3 Določanje AO učinkovitosti resveratrola z DPPH metodo

3.2.3.1 DPPH metoda

DPPH metoda se uporablja za vrednotenje celokupne AO učinkovitosti, pri kateri so AO donorji vodikovih atomov. Za izvajanje metode uporabljamo reagent 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) kot radikal. Uporablja se tako za tekoče kot trdne vzorce, omogoča hitro pridobitev rezultatov, je cenovno ugodna in enostavna. Z DPPH metodo smo določali AO učinkovitost resveratrola, pri čemer smo njegovo koncentracijo določali spektrofotometrično.

- **Uporaba UV-VIS spektrofotometra:** spektrofotometer meri intenziteto žarka, ki prehaja skozi analizirani vzorec in ga primerja z intenziteto vpadnega žarka. Intenziteta žarka, ki prehaja analizirani vzorec, je absorbanca. Merimo jo pri maksimalni valovni dolžini, kjer je razmerje med absorbanco in koncentracijo linearno in je napaka pri merjenju posledično najmanjša.
- **Sestava UV-VIS spektrofotometra:** sestava aparature je prikazana na sliki 8.

Vsebuje:



Slika 8: Sestava UV-VIS spektrofotometra z njegovimi najpomembnejšimi deli.

Kot izvor elektromagnetnega valovanja lahko za meritev absorpcije v območju vidne svetlobe uporabimo vodikovo žarnico, za meritev absorpcije UV svetlobe pa vodikovo/devterijevo žarnico. Svetloba potuje do monokromatorja in skozi kiveto, v primeru uporabe dvožarkovnega spektrofotometra še do referenčnega vzorca. Prepuščena svetloba potuje do fotodetektorja, ki pretvori energijo svetlobnih fotonov v električno

napetost, ki jo računalnik spremeni v digitalni signal, prikazuječ absorpcijski spekter v odvisnosti od valovne dolžine.

▪ **Pogoji merjenja z UV-VIS spektrofotometrom:**

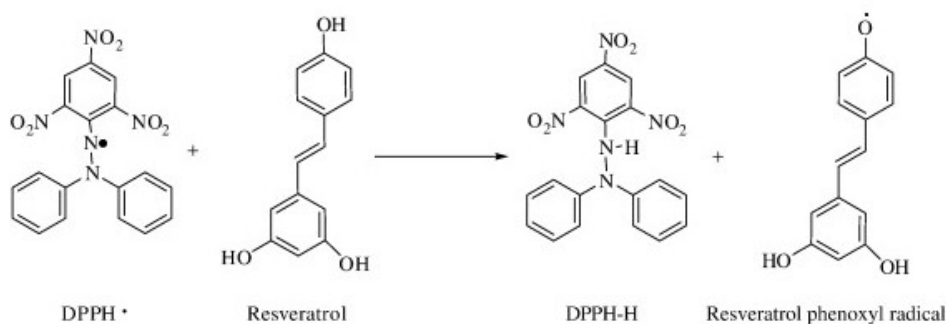
Za določanje absorbance smo uporabljali UV-VIS spektrofotometer Hewlett Packard 8453, Nemčija, katerega izvor elektromagnetnega valovanja je volframova žarnica. Kot topilo smo izbrali metanol, saj ne vpliva na sam potek reakcije. Analizo smo izvajali v zatemnjenem prostoru, da se izognemo vplivu svetlobe. Vse pripravljene vzorce smo merili pri absorpcijskem maksimumu metanolne raztopine DPPH, in sicer pri valovni dolžini $\lambda = 516$ nm. Izmerjene koncentracije smo izrazili v mM oziroma 10^{-3} M (mmol/L).

▪ **Princip DPPH metode**

Osnova metode je uporaba DPPH molekule kot stabilnega radikala z nesparjenim elektronom, delokaliziranim po celotni molekuli. Delokalizacija pomeni kroženje prostih elektronov okoli krožno razporejenih atomov, med katerimi se izmenjujejo enojne in dvojne vezi, kar se odraža v večji stabilnosti molekule. Zaradi delokalizacije je raztopina DPPH močno vijolično obarvana z absorpcijskim maksimum pri $\lambda = 516$ nm. Po dodatku AO k raztopini DPPH se DPPH radikal reducira do 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina, ki je rumene barve (reakcija spodaj). Posledično nastopi zmanjšanje intenzivnosti signala pri $\lambda = 516$ nm, ki je obratno sorazmeren s koncentracijo AO in reakcijskim časom, kar je razvidno tudi v spremembi barve od intenzivno vijolične do blede rumene barve.

- $\text{DPPH}^* + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^*$
- $\text{DPPH}^* + \text{R}^* \rightarrow \text{DPPH-R}$

Reakcijo uporabljenega AO resveratrola z DPPH radikalom, prikazuje slika 9.



Slika 9: Reakcija DPPH in resveratrola, pri čemer resveratrol deluje kot donor vodika, ki ga prejme DPPH radikal. Rezultat reakcije je radikal resveratrola, ki reagira z novo DPPH molekulo.

3.2.3.2 Delovni potek

PRIPRAVA UMERITVENE PREMICE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE DPPH

Za pripravo umeritvene premice smo natančno natehtali dve različni natehti DPPH, redčili z metanolom do koncentracijo približno 1,30 mM in 1,00 mM, ter raztopini nadalje ustrezno redčili (koncentracijsko območje med 0,003 - 0,08 mM). Raztopinam smo spektrofotometrično izmerili absorbanco pri 516 nm.

PRIPRAVA OSNOVNE RAZTOPINE DPPH

Za spremljanje AO učinkovitosti smo v različnih časovnih točkah pripravili svežo raztopino DPPH. Natančno smo natehtali približno 10 mg DPPH, ustrezno redčili z metanolom, postavili na ultrazvočno kadičko za 1 min. in nato mešali na magnetnem mešalu (30 min), da smo zagotovili, da se je DPPH popolnoma raztopil, nato pa osnovno raztopino ustrezno redčili do koncentracije 0,05 mM. 2400 μL raztopine smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini $\lambda = 516 \text{ nm}$ in tako določili absorbanco raztopine DPPH ob času 0. Nato smo dodali 100 μL metanola in upoštevali padec absorbance v raztopini DPPH zaradi redčenja. Pri merjenju smo kiveto zapirali s pokrovčkom in tako preprečili izhlapevanje metanola. Reakcijsko zmes smo pripravili tako, da smo enaki količino raztopine DPPH (2400 μL) dodali raztopino vzorca pripravljenih sistemov z resveratrolom (100 μL).

PRIPRAVA VZORCEV DPPH IN RESVERATROLA

Za proučevanje vpliva dodatka resveratrola na DPPH smo pripravili svežo raztopino resveratrola v metanolu. Natančno smo natehtali približno 14,2 mg resveratrola in ga redčili v koncentracijskem območju 0,25 – 1,0 mM. Za vsako redčitev smo pripravili reakcijsko zmes z DPPH (v slednji so bile koncentracije resveratrola za faktor 25 nižje (2400 μL + 100 μL)). Izvedli smo dve paraleli. Vsako meritev smo opravili po 90 minutah, saj glede na literaturne podatke reakcija takrat doseže ravnotežno stanje.

PRIPRAVA VZORCEV TEKOČIH KRISTALOV IN
SAMOMIKROEMULGIRAJOČEGA SISTEMA RESVERATROLA Z DPPH:

Po pripravi TK in SMES smo, v vnaprej določenih časovnih intervalih (čas 0, 2, 4, 6 tednih) natančno natehtali približno 228 mg posameznega sistema (z vgrajenim 1% (m/m) resveratrolom) in ga raztopili z metanolom do oznake. Tako smo dobili osnovno raztopino, glede na natehno in delež resveratrola v vzorcu s koncentracijo cca. 30 μM in ustrezno količino le te dodali raztopini DPPH. Nato smo izmerili absorbanco pri 516 nm po 90 minutah in s pomočjo enačbe 1 določili delež DPPH radikala v ravnotežnem stanju glede na osnovno DPPH raztopino in s tem posredno določili AO učinek resveratrola:

$$\% \text{ DPPH radikala} = A_t/A_o \times 100 \quad \text{Enačba 1:}$$

A_o: absorbanca raztopine DPPH ob času 0, brez dodanega vzorca;

A_t: absorbanca raztopine DPPH po reakciji z resveratrolom v določeni časovni točki.

Ob času 0 smo preverili, ali resveratrol, vgrajen v TK in SMES v primerjavi z njegovo metanolno raztopino, obdrži popolno AO učinkovitost, za kar smo uporabili enačbo 2:

$$\text{Relativna AO učinkovitost resveratrola} = \text{AO ucin. RES}_t / \text{AO ucin. RES}_0 \times 100 \quad \text{Enačba 2:}$$

AO ucin. RES_t = AO učinkovitost reakcijske zmesi resveratrola v TK in SMES ob času 0

AO ucin. RES₀ = AO učinkovitost metanolne raztopine resveratrola

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V okviru diplomske naloge smo želeli ovrednotiti AO učinkovitost resveratrola (1% m/m) vgrajenega v sistem TK z lamelarno strukturo, v primerjavi z njegovo učinkovitostjo v sistemu SMES, ki vsebuje enake komponente v enakem razmerju, vendar brez vode kot hidrofilne faze. Posredno smo na osnovi AO učinkovitosti, ki smo jo določali v različnih časovnih točkah (čas 0, po 2, 4, 6 tednih) in pri različnih pogojih staranja (tema, UV-A sevanje, svetloba) določili funkcionalno stabilnost resveratrola, vgrajenega v izbrana sistema. Slednjo smo vrednotili tudi organoleptično, kjer smo se osredotočili na izgled, barvo in vonj.

4.1 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST RESVERATROLA Z DPPH METODO

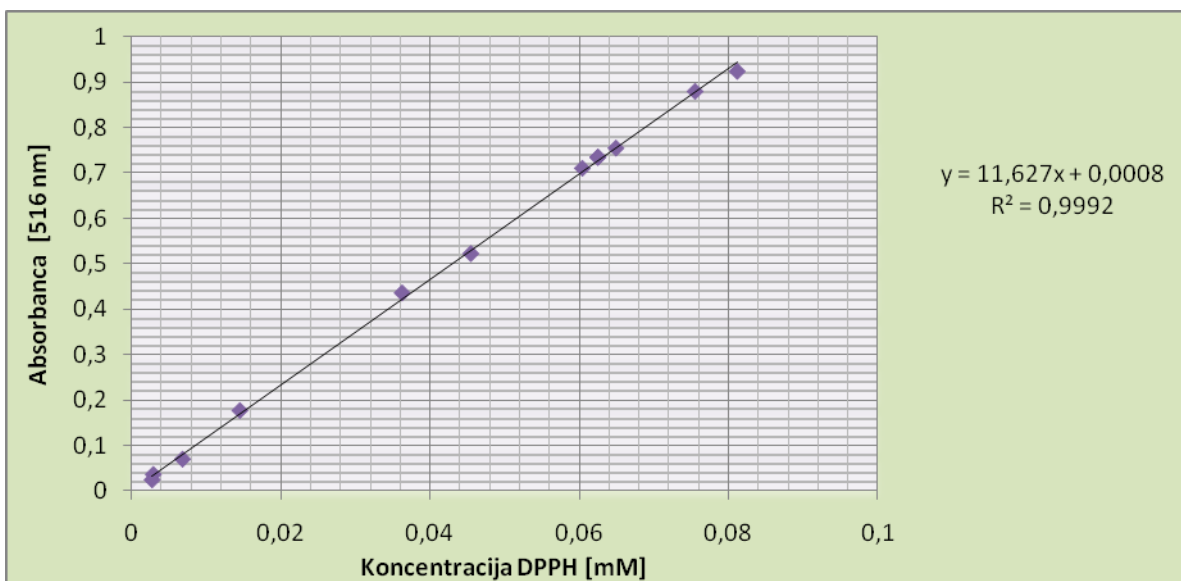
UMERITVENA KRIVULJA

Za proučevanje AO učinkovitosti smo najprej naredili umeritveno krivuljo DPPH v koncentracijskem območju 0,003 – 0,8 mM ter spektrofotometrično ($\lambda = 516$ nm) izmerili pripadajoče absorbanco (slika 10).

Enačba umeritvene premice:

$$y = 11,627x + 0,0008$$

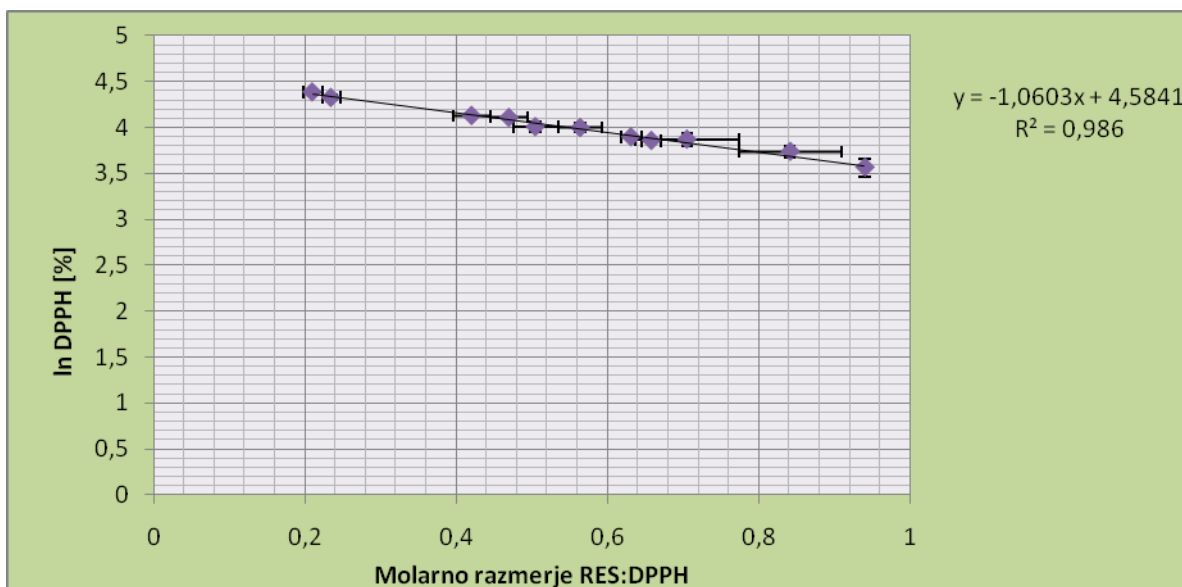
z $R^2 = 0,9992$ (slika 10).



Slika 10: Umeritvena premica DPPH z enačbo premice in pripadajočim R^2 .

KONCENTRACIJSKA ODVISNOST ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI RESVERATROLA

V nadaljevanju smo primerjali AO učinkovitost resveratrola v odvisnosti od njegove koncentracije. Absorbanca DPPH radikala se zmanjšuje v odvisnosti od koncentracije dodanega AO. Pripravili smo različne raztopine resveratrola z metanolom v koncentracijskem območju 0,25 – 1,0 mM ter določili padec absorbance DPPH radikala oz. delež preostalega DPPH radikala v reakcijski zmesi po dosegu ravnotežnega stanja, tj. 90 min. Rezultati so prikazani kot naravni logaritem DPPH v ravnotežnem stanju (\ln DPPH v %) glede na molarno razmerje RVS : DPPH (slika 11).



Slika 11: Vpliv koncentracije resveratrola na absorbanco DPPH radikala, prikazani kot ln (% DPPH v ravnotežnem stanju) v odvisnosti od molarnega razmerja resveratrola:DPPH.

Absorbanca pada s koncentracijo resveratrola; največji padec absorbance zasledimo pri molarnem razmerju 0,94, torej pri najvišji koncentraciji resveratrola (cca. 1,0 mM raztopina resveratrola) ter najmanjšega pri koncentraciji raztopine resveratrola cca. 0,25 mM. Določili smo EC_{50} , ki nam predstavlja koncentracijo raztopine resveratrola, ki zmanjša absorbanco DPPH radikala za 50%. Ta je pri molarnem razmerju RVS : DPPH 0,56, kjer imamo raztopino resveratrola s koncentracijo 0,60 mM. Dobljeni rezultati torej nakazujejo obratno sorazmerno odvisnost med deležem preostalega DPPH radikala in koncentracijo raztopine resveratrola. Isti trend so dokazali tudi za ostale AO, kot primer navajamo katehin, kjer so dokazali premo sorazmerno odvisnost med obsegom redukcije DPPH radikala in koncentracijo raztopine katehina (29).

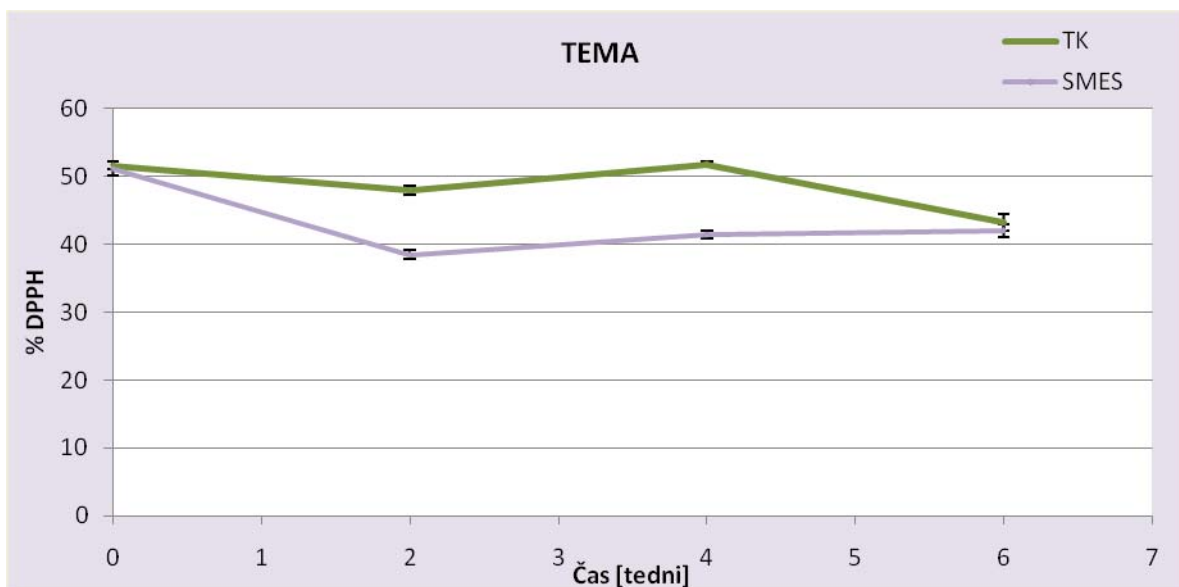
4.2 SPREMLJANJE AO UČINKOVITOSTI RESVERATROLA V TK in SMES

Preučevali smo vpliv izbranih nosilnih sistemov na AO učinkovitost resveratrola (1% m/m), vgrajenega v sistem liotropnih TK z lamelarno strukturo in SMES. V ta namen smo sistema podvrgli različnim pogojem staranja in sicer temi, UV sevanju in svetlobi. Za določitev AO učinkovitosti v različnih časovnih točkah (po 2, 4 in 6 tednih), glede na natehto vzorca (cca. 228 mg) in delež resveratrola v sistemih, smo vzorce zaradi lažje primerjave redčili na končno koncentracijo resveratrola cca. 30 μ M in tako naredili

reakcijsko zmes resveratrola in osnovne raztopine DPPH (s koncentracijo približno 52 μM).

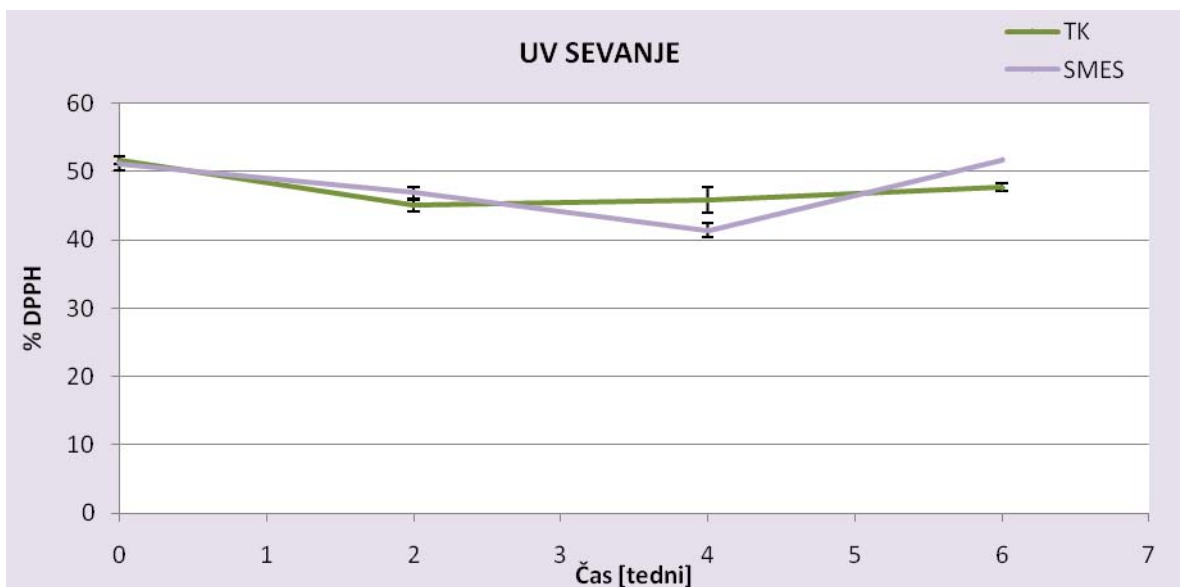
AO učinkovitost resveratrola smo določili posredno glede na vpliv koncentracij resveratrola na DPPH radikal. Ob času 0 je delež preostalega DPPH radikala z reakcijsko zmesjo uporabljenih sistemov (s koncentracijo resveratrola 30 μM), po dosegu ravnotežnega stanja (90 min.) znašal 51% in glede na metanolno raztopino resveratrola z enako koncentracijo (30 μM) s 50% deležem preostalega DPPH radikala, izražal 102% AO učinkovitost. Rezultati ob času 0 tako nakazujejo, da se delež preostalega DPPH radikala (51%) pri vzorcih TK in SMES z metanolom (30 μM), glede na metanolno raztopino DPPH radikala, ne spremeni. S tem potrdimo, da teoretično vgrajen resveratrol, redčen do koncentracije 30 μM , obdrži popolno AO učinkovitost, v vrednosti 102%. Do enakih zaključkov so prišli tudi *Jeong-Beom Nam-a in sodelavci*, kjer je resveratrol, vgrajen v porozne mikrosfere ohranil 93% AO učinkovitost, glede na njegovo raztopino z DPPH, posredno pa so določili še vpliv nosilnega sistema in izpostavljenost različnim okoliščinam (30), katerih rezultate smo navedli pod sklopom rezultatov funkcionalne stabilnosti resveratrola.

Nadalje smo preučevali obseg preostalega DPPH radikala po 2., 4. in 6. tednu izpostavljenosti sistemov temi, UV sevanju in svetlobi. Vzorce smo pripravili enako kot ob času 0, kar je omogočilo primerjavo AO učinkovitosti resveratrola tekom staranja in izpostavljenosti različnim okoljem. Za vsak vzorec smo pripravili dve paraleli. Po 90 minutah (ko je doseženo ravnotežno stanje) smo spektrofotometrično izmerili absorbance. Delež preostalega DPPH (%) v preiskovanih nosilnih sistemih v odvisnosti od časa (tedni) pri različnih pogojih je prikazan na slikah 12-14.



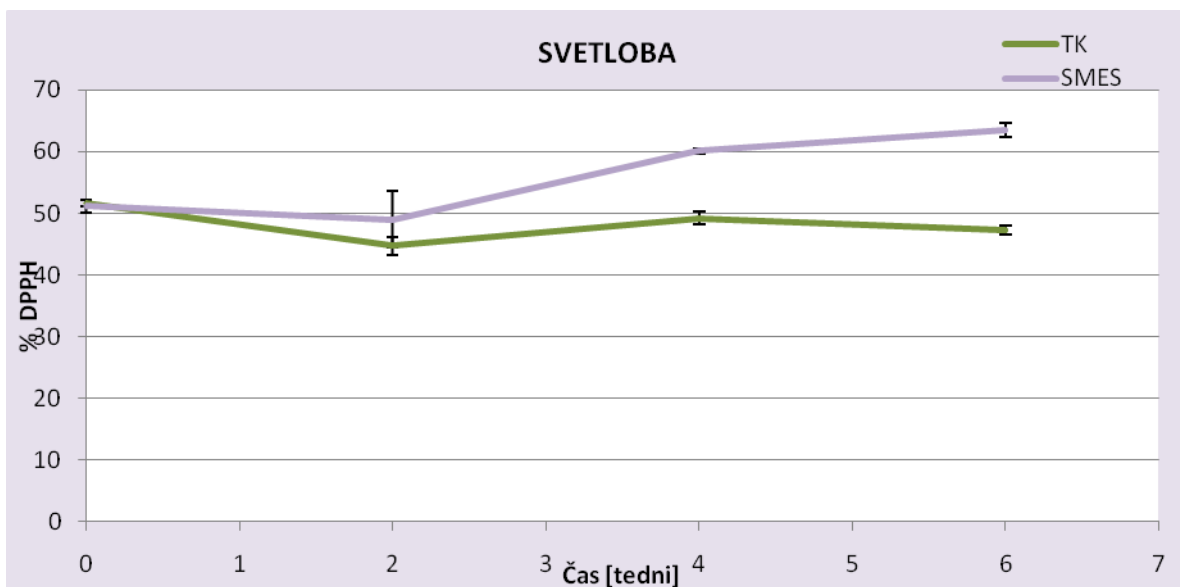
Slika 12: % preostalega DPPH radikala po dodatku TK in SMES z resveratrolom med staranjem v temi.

Slika 12 predstavlja delež DPPH radikala po dodatku TK in SMES z resveratrolom v odvisnosti od staranja vzorcev v temi (6 tednov). Razvidno je, da se delež preostalega DPPH v obeh sistemih ni povečeval, ampak je ostal praktično ~ 50%, kar pomeni da je celotna količina vgrajenega resveratrola ohranila AO učinkovitost. Celo več, pri vzorcih SMES je prišlo celo do zmanjšanja deleža DPPH (v drugem tednu na 39%), kar nakazuje na povečanje AO učinkovitosti vgrajenega resveratrola v SMES, vendar so padci statistično nesignifikantni. Pripisujemo jih eksperimentalni napaki zaradi različnih nateht vzorcev TK in SMES pred redčenjem do reakcijske zmesi, pa tudi različnim natehtam osnovne DPPH raztopine, saj smo v vsaki časovni točki pripravili svežo raztopino.



Slika 13: % preostalega DPPH radikala po dodatku TK in SMES z resveratrolom med staranjem vzorcev, izpostavljenih UV sevanju.

Na sliki 13 je podan delež preostalega DPPH radikala po dodatku TK in SMES z resveratrolom celoten čas hranjenja vzorcev po njihovi izpostavljenosti UV sevanju. Tudi tukaj ne prihaja do izgube AO učinkovitosti resveratrola, saj ta skozi celoten čas ostaja približno enaka začetni. Prisotna variiranja so, tako kot pri vzorcih hranjenih v temi, posledica eksperimentalne napake. Opazimo tudi, da med preskušanima nosilnima sistema ni bistvenih razlik.



Slika 14: % preostalega DPPH radikala po dodatku TK in SMES z resveratrolom, med shranjevanjem na svetlobi.

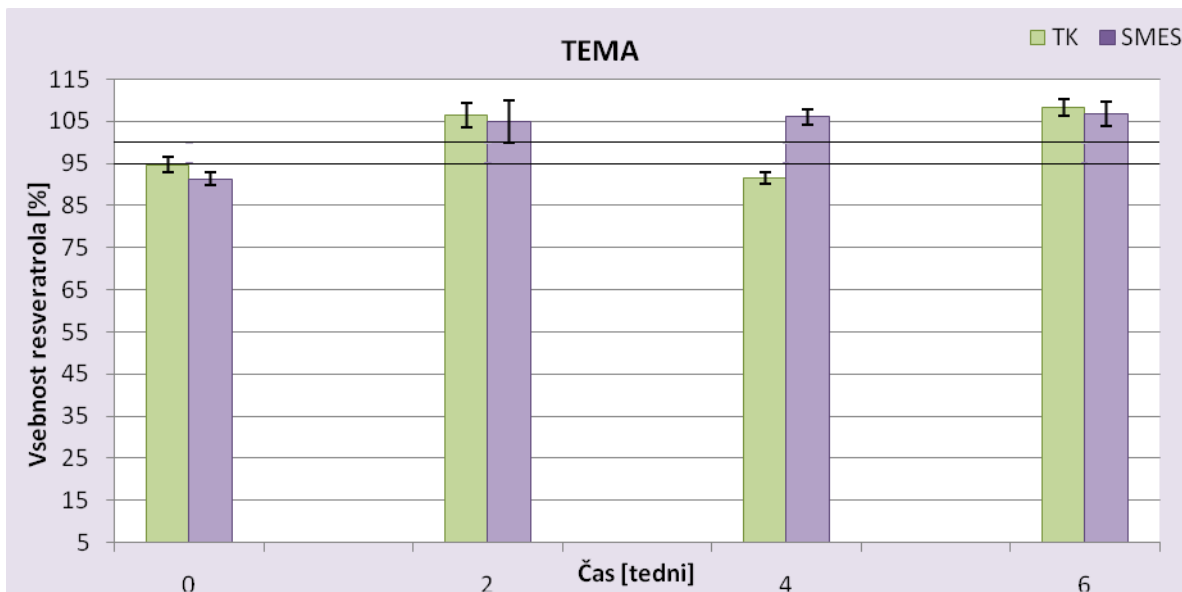
Slika 14 prikazuje delež preostalega DPPH radikala po dodatku TK in SMES z resveratrolom v času izpostavljenosti vzorca svetlobi. Tu so, za razliko od vzorcev starih v temi ali izpostavljenih UV sevanju, pri sistemu SMES razvidne večje razlike v deležu preostalega DPPH radikala. Glede na čas 0 je po 2 tednih hranjenja delež DPPH ostal praktično nespremenjen, medtem pa se je po 4 tednih povečal na 60%, po 6 tednih še za dodatne 3% in na koncu znašal 63%. Koncentracija DPPH radikala (ki je v času 0 znašala približno $2,3 \times 10^{-2}$ mM) se je tako povečala na cca. $3,0 \times 10^{-2}$ mM. Za razliko od SMES pa vzorec TK izpostavljen svetlobi ne kaže sprememb AO učinkovitosti resveratrola, saj se tukaj ohranja delež DPPH radikala.

Iz % preostalega DPPH radikala lahko določimo AO učinkovitost resveratrola v izbranih sistemih. Večja AO učinkovitost pomeni močnejši učinek lovljenja DPPH radikalov, kar se kaže v zmanjšanju deleža DPPH radikala v reakcijski zmesi in spremljajočim padcem absorbance. Če vzamemo čas kot kriterij za AO učinkovitost resveratrola, vidimo, da se AO učinkovitost resveratrola, vgrajenega v TK in SMES v temi in na UV sevanju skozi celotno obdobje staranja vzorcev ne spreminja. V nasprotju s tem pa se kaže vpliv svetlobe na resveratrolu v SMES, saj po 4 in po 6 tednih staranja delež DPPH radikala naraste (iz 51 na 63%), kar pomeni nižjo AO učinkovitost resveratrola. Iz rezultatov lahko sklepamo, da svetloba močno zmanjša AO učinkovitost resveratrola v SMES, nima pa vpliva na AO učinkovitost resveratrola v TK. Zaključimo torej lahko, da je resveratrol vgrajen v SMES, manj zaščiten pred svetlobo, vzrok zato pa pripišemo prav SMES, ki predstavlja manj primeren nosilni sistem za vgradnjo občutljivih komponent, kar smo bolje razložili v naslednjem sklopu rezultatov.

4.3 FUNKCIONALNA STABILNOST RESVERATROLA v TK in SMES

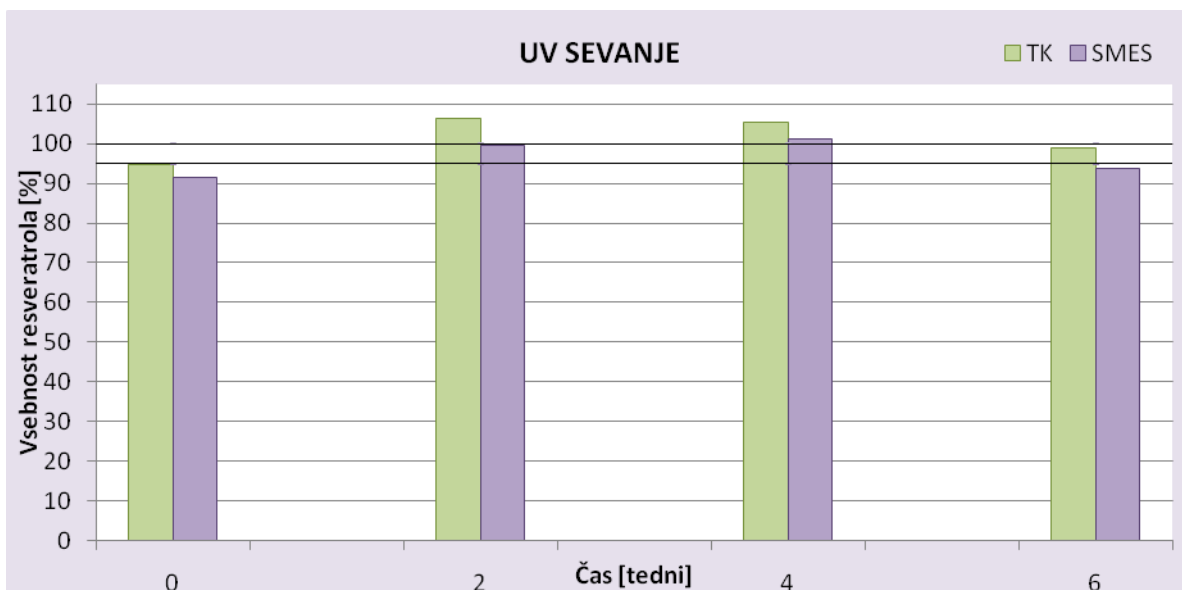
AO učinkovitost smo prikazali tudi prek % vsebnosti resveratrola v TK in SMES, kjer smo iz dobljenih vsebnosti resveratrola, prikazanih na slikah 15, 16 in 17, nadalje določili funkcionalno stabilnost resveratrola v odvisnosti od časa staranja (čas 0, 2, 4, 6 tednov) in različnih dejavnikov okolja (tema, UV sevanje, svetloba). S tem smo lahko ovrednotili tudi vpliv nosilnega sistema (TK in SMES) na funkcionalno stabilnost vgrajenega resveratrola,

katerega vsebnost, mora biti v primeru stabilnega nosilnega sistema od ~ 95 - 100%, na slikah 15-17 prikazano z dvema črtama.



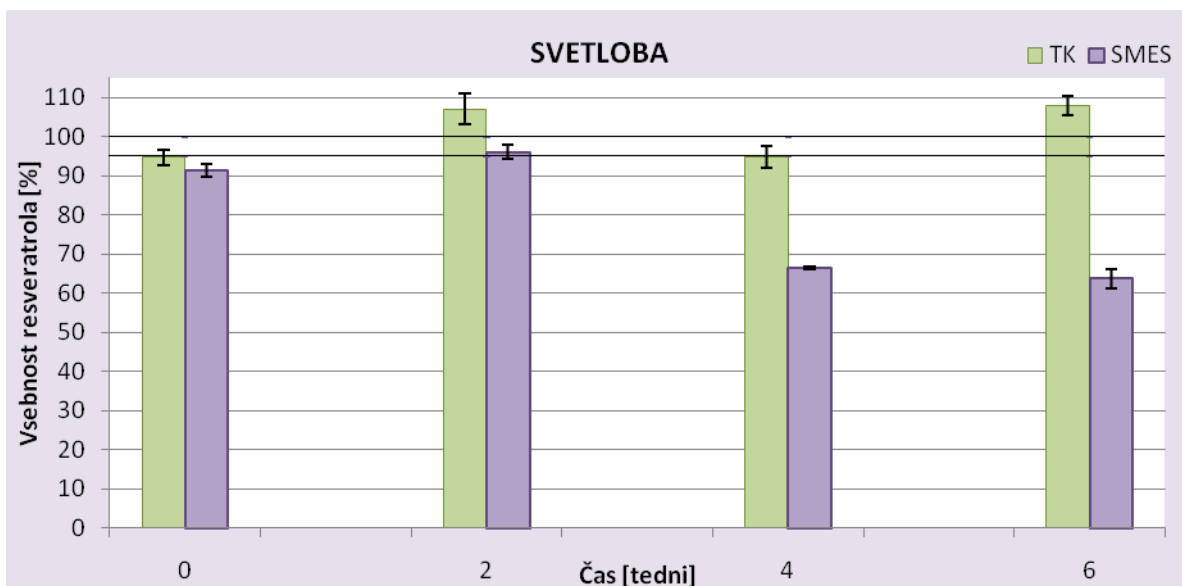
Slika 15: Vsebnost vgrajenega resveratrola v TK in SMES med staranjem v temi.

Rezultati vsebnosti resveratrola, vgrajenega v TK in SMES v temi, so prikazani na sliki 15. Iz njih je razvidno, da se vsebnost resveratrola skozi celotni čas staranja vzorcev ni spremenila in je znašala ~ 100%. Celo več, ob času 0, je bila vsebnost resveratrola v SMES 91%, kasneje pa v vseh časovnih točkah večja od 100%, kar bi lahko pomenilo, da resveratrol tukaj nastaja. Ker tovrsten pojav ni mogoč, prisotna variiranja pripišemo posledici eksperimentalne napake, ki nastane kot posledica različnih nateht vzorcev in DPPH radikala, kot smo to ugotovili že pri AO učinkovitosti.



Slika 16: Vsebnost vgrajenega resveratrola v TK in SMES med staranjem. izpostavljenosti UV sevanju.

Vsebnost resveratrola v izbranih sistemih, ki so bili izpostavljeni UV sevanju, prikazuje slika 16. Vsebnost resveratrola v TK in SMES, kljub izpostavljenosti UV sevanju skozi obdobje 6 tednov, ostaja enaka. Največji padec vsebnosti resveratrola se je pojavil po 6 tednih izpostavljenosti vzorca SMES, a vsebnost je še vedno nad 90% (93%).



Slika 17: Vsebnost vgrajenega resveratrola v TK in SMES med staranjem na svetlobi.

Največje spremembe vsebnosti resveratrola so nastopile v vzorcih, izpostavljenih svetlobi (slika 17). Vsebnost resveratrola se je močno znižala v sistemu SMES, in sicer je po 4. tednu staranja znašala le še 66%, in se nato po 6 tednih zmanjšala še za dodatne 3%. Nasprotno, vsebnost resveratrola pa se je v sistemu TK ohranila.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je funkcionalna stabilnost resveratrola tako kot AO stabilnost odvisna od dejavnikov okolja in od nosilnega sistema. Resveratrol vgrajen v TK in SMES in staran v temi in pod UV svetlobo ostaja celoten čas preiskovanja vzorcev funkcionalno stabilen. Nasprotno pa se vsebnost resveratrola v SMES, izpostavljenemu svetlobi, močno zniža, medtem ko v TK ostane nespremenjena.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da tudi nosilni sistem vpliva na funkcionalno stabilnost resveratrola, boljše so se izkazali TK. Ti se na področju farmacije in kozmetologije uporabljajo kot koloidni nosilni sistemi za različne načine aplikacije. Imajo veliko sposobnost solubilizacije hidrofilnih in lipofilnih učinkovin, kjer posledično povečajo njihovo kemijsko in fizikalno stabilnost in omogočajo nadzorovano sproščanje. Zaradi visoke viskoznosti je omejen dostop kisika v sistem (30), (31). To pomeni, da kompaktna struktura preprečuje dostop molekul kisika, tako pa prihaja do manjšega stika med molekulami kisika in resveratrolom. Dokazali so namreč, da je degradacija oziroma razgradnja občutljivih komponent odvisna od trkov z različnimi molekulami. Tako v sistemih, kjer je mobilnost občutljivih komponent večja, prihaja do več trkov, posledica česar je njihova večja razgradnja. V našem primeru to pomeni, da je v TK zaradi večje viskoznosti prisotnih manj molekul kisika, resveratrol pa je bolj imobiliziran oziroma močneje vgrajen, posledica česar je manjše število trkov med molekulami kisika in resveratrolom, odražajoč se v izboljšani stabilnosti resveratrola (32). Tovrstne zaščite resveratrol v SMES ni imel, saj so SMES, kljub izboljšanju topnosti in hitrosti raztapljanja slabo topnih učinkovin, nizko viskozni sistemi, kjer ima kisik večje možnosti vdora in reagiranja z resveratrolom, ki je slabše imobiliziran (bolj mobilen), kar pa se odraža v njegovi manjši funkcionalni stabilnosti, oziroma izgubi AO učinkovitosti.

V nasprotju z našimi rezultati pa so *Bonda in sodelavci* dokazali, da se z izpostavljenostjo resveratrola UV svetlobi zmanjša tudi njegova AO učinkovitost, kar je presenetljivo, saj v našem primeru tovrstnega vpliva ni bilo in se je AO učinkovitost resveratrola ohranjala celoten čas hranjenja vzorcev. Vzrok zato bi lahko pripisali uporabljenim nosilnim

sistemom, saj za razliko resveratrola v TK in SMES, v študiji preučujejo vpliv UV sevanja na raztopino resveratrola v metanolu (33).

Znane so številne študije, npr. študija *Jeong-Beom Nam-a in sodelavcev*, kjer so resveratrol, vgrajen v mikrosfere izpostavili svetlobi in preučevali stabilnost v primerjavi z njegovo etanolno raztopino ter ugotovili, da je resveratrol v poroznih mikrosferah stabilen 5 tednov hranjenja, medtem ko se njegova vsebnost v etanolni raztopini v tem času močno zmanjša. Rezultate so povzeli s hipotezo, da delci v poroznih mikrosferah popolnoma razpršijo svetlobo in s tem zaščitijo vgrajen resveratrol (30). V drugi študiji je *Maria Coimbra s sodelavci* preučevala stabilnost resveratrola v liposomih, izpostavljenih UV sevanju. Za primerjavo so naredili še raztopino resveratrola ter ga izpostavili UV sevanju in shranili v temi. Po določenem časovnem razporedu so vzorcem določili vsebnost. Ugotovili so, da je po 16. minutah izpostavljenosti resveratrola UV sevanju v liposomih, prisotnega še 70% resveratrola, medtem, ko je delež resveratrola v metanolni raztopini znašal 10%. V temi do razlik ni prišlo. Na podlagi dobljenih rezultatov so sklenili, da z vgrajevanjem resveratrola v liposome, prisotni lipidi poskrbijo za njegovo zaščito in tako ohranijo vsebnost (34). Tako lahko poleg vpliva nosilnega sistema in pregleda literature zaključimo tudi, da z izpostavljenostjo različnim okoljem, dosežemo različne vplive na resveratrol.

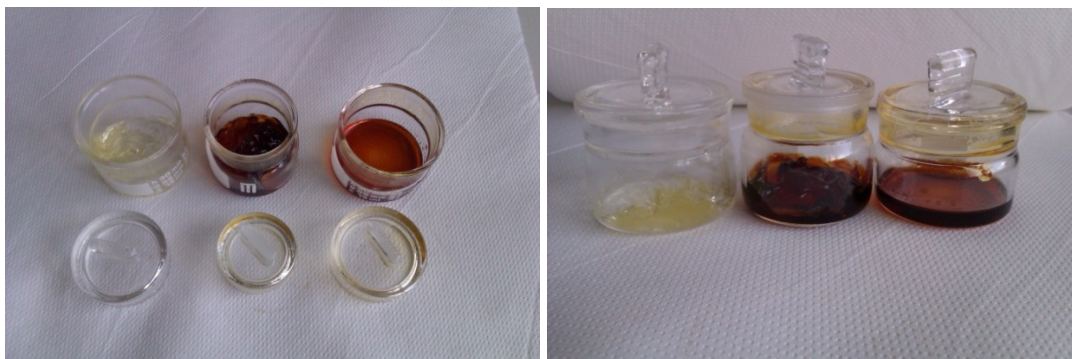
4.4 ORGANOLEPTIČNO VREDNOTENJE IZBRANIH NOSILNIH SISTEMOV TK IN SMES

Poleg preučevanja AO učinkovitosti in funkcionalne stabilnosti resveratrola vgrajenega v TK in SMES, smo spremljali tudi organoleptične lastnosti izbranih sistemov v enakih časovnih točkah, kjer smo se osredotočili na njihov izgled, barvo in vonj.

▪ TEKOČI KRISTALI

TK so ob izdelavi izkazovali visoko viskozno strukturo, bili so rahlo rumeno obarvani ter brez vonja. Po 6 tednih hranjenja vzorca v temi se lastnosti niso spremenile; vzorec je ohranil svojo konsistenco, viskoznost in rahlo rumeno obarvanje z odsotnostjo vonja. Pri vzorcu TK izpostavljenem UV sevanju, je prišlo do sprememb, ki so se začele pojavljati po približno tednu dni, in so po 4 in 6 tednih postajale vedno bolj izrazite. Po 2 tednih staranja se je na površini vzorca naredila temnejša plast, vzorcu se je povečala viskoznost. Prišlo je do spremembe barve, saj je vzorec postal temno rjave barve. Prisoten je bil tudi močan neprijeten vonj. Podobne spremembe kot pri vzorcu izpostavljenem UV sevanju, smo

opazili tudi pri vzorcu TK na svetlobi, le da so se prvič pojavile po cca. 4 dneh staranja vzorca in se s časom še povečevale. V nasprotju z vzorcem na UV sevanju, smo tu opazili zmanjšanje viskoznosti vzorca. Po 6 tednih je bil vzorec že skoraj čisto tekoč in primerljiv z vzorcem SMES. Prišlo je do temno rjavega obarvanja sistema. Po 6 tednih smo opazili prisotno trdo, temnejšo plast na površini vzorca, to je spremljal še neprijeten vonj.



Slika 18: TK po 6. tednih staranja: v temi (levo), na UV lučki (sredina), na svetlobi (desno), skupaj z vidno spremembo obarvanja sistema iz svetlo rumene, do temno rjave barve.

▪ SMES

Podobne spremembe kot pri TK smo opazili tudi pri SMES. Ker so slednji nizko viskozni sistemi, očitnih sprememb v viskoznosti ni bilo moč zaslediti. Ob izdelavi je imel vzorec SMES v primerjavi z TK bolj intenzivno rumeno obarvanje, tudi tukaj ni bilo prisotnega vonja. Po hranjenju SMES v temi, je ta tekom celotnega časa obdržal značilno rumeno obarvanje, brez vonja. Pri SMES, izpostavljenem UV sevanju, je nastopila sprememba rumene v temno rjavo barvo. Prisoten je bil še močnejši vonj kot v primeru TK, podobne spremembe smo opazili tudi pri svetlobni obremenitvi SMES, kjer je do obarvanja v temno rjavo barvo prišlo še hitreje kot pri TK (po cca. 1 dnevu).

Iz opažanj lahko zaključimo, da organoleptično oba sistema v temi izkazujeta enake lastnosti celotni čas staranja (6 tednov). Za razliko pa izpostavljenost resveratrola UV sevanju in svetlobi povzroči obarvanje obeh sistemov v temno rjavo barvo. Posledica tega bi lahko bila pretvorba *trans*- oblike resveratrola (svetlo rumena barva) v *cis*- obliko (temno rjava barva) v procesu fotoizomerizacije, ki poteka ob prisotnosti svetlobe (slika 18). V SMES, izpostavljenih svetlobi do temno rjavega obarvanja pride hitreje, kot v TK.

Na podlagi dobljenih rezultatov o funkcionalni stabilnosti, AO učinkovitosti resveratrola in organoleptičnih lastnostih lahko zaključimo, da je resveratrol spojina, občutljiva na kisik in svetlobo. Ob izpostavljenosti kisiku namreč prihaja do oksidacije resveratrola, kar se odraža v njegovi manjši AO učinkovitosti oziroma funkcionalni stabilnosti, kar smo dokazali v sistemih SMES, ki so se glede na TK izkazali za manj primeren sistem za vgradnjo. TK v nasprotju s SMES zagotavljajo višjo viskoznost, s čimer se omeji vdor kisika v sistem in zmanjša možnost oksidacije resveratrola. Kljub prisotnosti hidrofilne faze (voda) zagotavljajo učinkovitejšo vgradnjo resveratrola in omogočajo izboljšano imobilizacijo, tako pa prihaja do manj trkov med molekulami kisika in resveratrolom.

Na podlagi organoleptičnega vrednotenja lahko zaključimo, da v sistemih izpostavljenih svetlobi in UV sevanju poteče hitra fotoizomerizacija *trans*- resveratrola v njegovo *cis*- obliko, kar se odraža v temno rjavem obarvanju sistemov. Kljub procesu fotoizomerizacije pa smo s preučevanjem AO učinkovitosti sistemov, izpostavljenih svetlobi in UV sevanju dokazali, da tovrstna sprememba oblike ne vpliva na AO učinkovitost in funkcionalno stabilnost resveratrola. To pomeni, da tako *trans*-, kot tudi *cis*- oblika resveratrola posredujeta AO učinek. Rezultate lahko potrdimo s študijo *Lucie A. Stivala s sodelavci*, ki so preučevali AO učinkovitost *trans*- resveratrola in *cis*- resveratrola. *Trans*- obliko resveratrola so pretvorili v *cis*- obliko, tako da so pripravili raztopino *trans*- resveratrola z acetonitrilom in ga izpostavili UV sevanju za približno 40 min. oziroma do vzpostavitve razmerja *trans*- / *cis*- resveratrol = 1 : 1. Uporabili so DPPH metodo in rezultate zapisali v EC_{50} , torej koncentraciji resveratrola, kjer delež DPPH radikala pade za polovico in ugotovili, da je ta podobna pri obeh oblikah resveratrola (35). Tudi *Jean-Philippe Baslyt in sodelavci* so izvedli podobno študijo, kjer so *cis*- resveratrol pridobili z UV obsevanjem etanolne raztopine *trans*- resveratrola ($\lambda=366$ nm) 2 uri, pri sobni temperaturi. Zanimivo je, da so v nasprotju z našimi rezultati ugotovili, da *cis*- oblika resveratrola izkazuje močnejšo AO učinkovitost kot njegova *trans*- oblika. Rezultate so prikazali s pomočjo parametra EC_{50} , ki je v primeru *cis*- resveratrola nižji (36).

Iz rezultatov in pregleda literature tako lahko potrdimo, da resveratrol v preskušanih nosilnih sistemih ohranja AO učinkovitost ne glede na potek fotoizomerizacije. Ker ta poteče tako v primeru vgradnje v SMES kot v TK, sklepamo, da nosilni sistem pri tem nima vloge, v nasprotju z njegovim vplivom na AO učinkovitost. Glede vprašanj o tem, ali katera od izomernih oblik resveratrola izkazuje boljšo AO učinkovitost in če, katera, pa

številske študije kažejo različne rezultate, kar pomeni, da bi za konkretne zaključke bile potrebne nadaljnje raziskave.

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo za proučevanje AO učinkovitosti in funkcionalne stabilnosti resveratrola uporabili DPPH metodo, ki se je izkazala za primerno. Ugotovili smo, da na sposobnost lovljenja DPPH radikalov oziroma AO učinek vpliva koncentracija uporabljenega AO: višja koncentracija resveratrola povzroči večjo redukcijo DPPH radikala oziroma je odgovorna za močnejše AO delovanje.

Za proučevanje funkcionalne stabilnosti resveratrola v nosilnih sistemih smo izdelali sistem TK, kjer smo uporabili IPM kot lipofilno fazo, lecitin in Tween-80 (v razmerju 1 / 1) kot emulgatorsko zmes in destilirano vodo kot hidrofilno fazo. Za primerjavo pa smo izdelali še SMES, kjer hidrofilne faze ni bilo prisotne. V oba sistema smo vgradili 1% (m/m) resveratrola.

Vzorcem smo določili AO učinkovitost ob času 0, nato jih izpostavili različnim dejavnikom okolja, in sicer temi, UV sevanju in svetlobi ter preučevali njihov vpliv po 2, 4 in 6 tednih staranja. S tem smo posredno ovrednotili vpliv nosilnega sistema na stabilnost vgrajenega resveratrola. Ugotovili smo, da je resveratrol ohranil svojo AO učinkovitost v TK in SMES celotno obdobje 6 tednov, tako pri shranjevanju vzorcev na temi kot pri izpostavljenosti UV sevanju ($\lambda = 365$ nm), saj tukaj ni bilo razlik v preostanku DPPH radikala v reakcijski zmesi. Spremembe pa so bile prisotne pri sistemu SMES, izpostavljenemu svetlobi, kjer smo opazili zmanjšano AO učinkovitosti, kar je bilo razvidno kot večanje preostalega deleža DPPH radikala v reakcijski zmesi.

Iz AO učinkovitosti smo določili funkcionalno stabilnost resveratrola v sistemih, ki smo jo prikazali kot delež vsebnosti resveratrola. Tako smo dokazali, da ostane resveratrol v TK in SMES funkcionalno stabilen skozi celoten čas staranja vzorcev v temi in pri izpostavljenosti UV sevanju, medtem ko se njegova vsebnost v SMES, izpostavljenem sončni svetlobi, začne zmanjševati po 4 tednih staranja, kar nakazuje na funkcionalno nestabilnost resveratrola. Do sprememb v vsebnosti resveratrola v TK izpostavljenih svetlobi ni prišlo. Vzrok za to smo pripisali nosilnemu sistemu TK, ki z svojo strukturo (visoka viskoznost) zagotavlja boljšo zaščito oziroma omejenost dostopa kisika v nosilni sistem in s tem vpliva na funkcionalno stabilnost resveratrola. Zaradi visoke viskoznosti pa

je v sistemu tudi manj prisotnega kisika, kar se odraža v manj pogostih trkih med molekulami kisika in resveratrolom in posledično njegove manjše oksidacije.

Ugotovili smo tudi, da izpostavljenost izdelanih nosilnih sistemov različnim dejavnikom okolja vpliva na njihove organoleptične lastnosti. Spremembe v TK in SMES v temi niso bile prisotne, pri izpostavljenosti UV sevanju in svetlobi pa je bil resveratrol nestabilen, saj je potekel proces fotoizomerizacije, kjer se *trans*- oblika resveratrola spremeni v njegovo *cis*- obliko. To je vidno kot sprememba rumene barve v temno rjavo, kar je spremljal tudi neprijeten vonj. V primeru TK izpostavljenih UV sevanju je vzorec kljub visoki viskoznosti tekom časa postal še bolj viskozen, za razliko sončni izpostavljenosti, kjer je viskoznost sistema padla.

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da resveratrol izkazuje AO učinkovitost, ki je odvisna od njegove koncentracije. V nasprotju z SMES je bil pri vseh testiranih dejavnikih okolja stabilen v sistemu TK, tako da lahko zaključimo, da so TK primerni kot nosilni sistemi za funkcionalno nestabilne učinkovine kot so antioksidanti. Za razliko od funkcionalne stabilnosti pa so večje razlike prisotne pri kemijski stabilnosti resveratrola, kjer nastopi fotoizomerizacija, pri izpostavljenosti UV sevanju in svetlobi, vendar kot smo dokazali, to ne vpliva na funkcionalno stabilnost resveratrola, saj AO učinkovitost ostaja prisotna pri obeh nastalih izomerih.

5.1

6 LITERATURA

- (1): Kristl J. Sodoben pogled na kožo in dogajanja v njej. Izbrane vsebine iz kozmetologije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2009.
- (2) Pečar S. Koža in prosti radikali. Koža-sonce-zdravje-lepota, Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani; Podiplomsko izobraževanje; 2004: 23-33.
- (3) Sies H. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 1997; 82; 291-295
- (4) Manček B, Pečar S. Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farm. Vestnik* 2001; 52: 133-144.
- (5) Kreft S, Pečar S. Vloga radikalov pri obolenjih. *Farm. Vestnik* 1998; 49: 469-481.
- (6) Gašperlin M, Gosenca M. Main approaches for delivering antioxidant vitamins through the skin to prevent skin ageing. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2011.
- (7) Obreza A, Vovk T. (urednika). Prehranska dopolnila. Podiplomsko strokovno izobraževanje (izbrana poglavja). Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2011.
- (8) Lobo V, Patil A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev* 2010; 4(8); 118-126.
- (9) Faller A.L.K, Fialho E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. Elsevier Inc 2010; 561-568.
- (10) Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance 1998; 56(11): 317-33.
- (11) Ferguson L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* 2001; 475: 89 – 111.
- (12) Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727–747.

- (13) Dai J, Mumper J. R. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 2010; 15: 7313-7352.
- (14) Craft D. B, Kerrihard L. A, Amarowicz R, Pegg B. R. Phenol-based antioxidants and the »in vitro« methods used for their assessment. *Comprehen. Rev. Food Sci. Food Saf* 2012; 11(2): 148-173.
- (15) Rice - Evans A. C, Packer L. (urednika). *Flavonoids in health and disease*, Marcel Dekker, New York, 2003. Izbrana poglavja.
- (16) Saxena M, Saxena J, Pradhan A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res* 2012; 16(2); 130-134.
- (17) Chen H. J, HO C. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Biofactors*.2010; 36(5): 394-400.
- (18) Sova M. Biološki učinki derivatov cimetne kisline. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, *Farm. Vest* 2012; 63; 178-184.
- (19) Wikipedija (online) 2002 elektronski vir. Dostopno na naslovu: <http://en.wikipedia.org/wiki/Flavonols>
- (20) Amarowicz R. Tannins: the new natural antioxidants? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007; 109: 549–551.
- (21) Wikipedija (online) 2002 elektronski vir. Dostopno na naslovu: <http://en.wikipedia.org/wiki/Flavan-3-ol> (dopolnilo)
- (22) Roupe A. K, Remsberg M. C, Yáñez A. J, Davies M. N. Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic. *Current Clinical Pharmacology* 2006; 1: 81-101.
- (23) Higdon J. (online) Linus Pauling Institute: Micronutrient Research for Optimum Health, Oregon State University, USA. (citirano marca 2005). Dostopno na naslovu: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/resveratrol/>
- (24) Wang Y, Chen h, Yu O. Metabolic engineering of resveratrol and other longevity boosting compounds. *Biofactors* 2010; 36(5): 394-400.

- (25) Labinskyy N, Csiszar A, Veress G, Stef G, Pacher P, Oroszi G, Wu J, Ungvari Z. Vascular dysfunction in aging: potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Curr Med Chem*. 2006; 13(9): 989–996.
- (26) Alonso C, Martí M, Martínez V, Rubio L, Parra L. J, Coderch L. Antioxidant cosmeo-textiles: Skin assessment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2013; 84: 192–199.
- (27) Rowe C, Sheskey PJ, Weller JP. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 4th ed, Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association 2003; 348-349, 385-387, 549-553.
- (28) Wabel C. (online) Influence of Lecithin on structure and stability of parenteral fat emulsions 1998; Dissertationen Online Team im CCC der Universität Erlangen (citirano 30. 07. 1998). Dostopno na naslovu: http://www2.chemie.uni-erlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Christoph_Wabel/html/Title.html#TopOfPage
- (29) Villano D, Fernandez-Pachon M.S, Moya M.L, Troncoso A.M, Garca – Parrilla M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007; 71: 230–235.
- (30) Nam J, Ryu J, Kim J, Chang I, Suh K. Stabilization of resveratrol immobilized in monodisperse cyano-functionalized porous polymeric microspheres. *Polymer* 2005; 46: 8956–8963.
- (31) Gosenca M, Gašperlin M. Tekoči kristali v farmaciji: struktura in metode za fizikalno-kemijsko vrednotenje. *Farm. Vestnik* 2011; 62: 15-25.
- (32) Ted Waszkuc, NOW Methods Development Scientist (online). Trans- resveratrol as a dietary supplement ingredient - A question of shelf life and laboratory potency determination. *Now Foods - Nutrition for Optimal Wellness*. Dostopno na naslovu: <http://www.nowfoods.com/M041369.htm>
- (33) Bonda C, Jean Zhang J, Pavlovic A. The Photostability and Photostabilization of trans-Resveratrol. *Cosmetics & Toiletries® magazine* 2011; 126 (9).

(34) Coimbra M, Isacchib B, Blooisa L, Toranoc S. J, Keta A, Wu X, Broered F, Merselaara M. J, Rijckena J.F. C, Storma G, Biliab R, Schiffelersa M. R. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 416: 433–442.

(35) Stivala A. L, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni M. U, Albini A, Prospero E, Vannini V. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 22586-22594.

(36) Baslyt J, Marre-Fournier F, Le Bail J, Habrioux G, Chulia A. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)- resveratrol. *Life Sciences* 2000; 66 (9): 769-777.