

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Radoslava N. Pravić

**DIFUZIJA POLIFENOLNIH
JEDINJENJA IZ MIKROČESTICA
DOBIJENIH RAZLIČITIM TEHNIKAMA
INKAPSULACIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2016. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Radoslava N. Pravić

**DIFFUSION OF POLYPHENOLS FROM
MICROPARTICLES OBTAINED FROM
DIFFERENT ENCAPSULATION
TECHNIQUES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Mentor teze:

Dr Branko Bugarski, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

Dr Nevenka Bošković-Vragolović, venredni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Rada Pjanović, docent
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Verica Đorđević, viši naučni saradnik
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Viktor Nedović, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Kandidat:

Radoslava Pravilović, diplomirani inženjer tehnologije

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru istraživanja predloženih u projektu integralnih i interdisciplinarnih istraživanja (III 46010): „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenti u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu od 2011. do 2016. godine. Deo istraživanja je ostvaren kroz bilateralni projekat između Republike Srbije i Republike Hrvatske pod nazivom „Microencapsulation of plant polyphenols aimed for functional food products“, u nepuody od 2009. do 2010. godine.

Eksperimentalni deo rada ove doktorske disertacije je izveden u laboratorijama Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i u Laboratoriji za kemiju i tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rezime

Sistemi za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci predstavljaju istraživačku oblast koja se intenzivno proučava zbog niza prednosti koje ovi sistemi pružaju i mogućeg unapređenja dosadašnjih, tradicionalnih formi lekova.

Vodeni ekstrakt biljke majčine dušice je inkapsuliran u alginatne čestice, kao i alginat-hitozan i alginat-inulin čestice elektrostatičkom ekstruzijom. Pored hidrogel čestica, ispitivane su i suve i liofilisane forme.

Takođe, fosfolipidne mikročestice (lipozomi) su se pokazale potencijalno pogodnim nosačima polifenolnih jedinjenja u sistemima ovog tipa.

Eksperimenti su izvedeni korišćenjem *Franz-ove* difuzione ćelije, u kojima je praćena difuzija polifenola iz: čajnog ekstrakta, alginatnih čestica, alginat-hitozan, alginat-inulin čestica, disperzije konvencionalnih lipozoma, disperzije lipozoma modifikovanih *Span-om 20*, *Span-om 40*, *Tween-om 20* i disperzije lipozoma modifikovanih *Tween-om 60*. Obradom eksperimentalnih rezultata određeni su koeficijenti difuzije za svaki od sistema, kao i odgovarajući difuzioni otpori.

Dobijene alginatne čestice su bile veličine oko 730 μm , dok su lipozomi bili u opsegu od 350 do 900 nm. Step en inkapsulacije za alginante čestice je bio visok, preko 90 %. Osim toga, analiza je pokazala da postupak inkapsulacije nije degradirao polifenolna jedinjenja, jer je ukupan sadržaj antioksidanasa ostao nepromenjen. Odsustvo hemijskih interakcija između ekstrakta čaja i alginata je dokazano i FTIR analizom.

Jedan od predmeta ovog rada je ispitivanje uticaja sastava membrane lipozoma na brzinu oslobađanja inkapsuliranih polifenola. Eksperimentalna ispitivanja treba da pokažu kako modifikacija membrane lipozoma utiče na prenos mase, u odnosu na konvencionalne lipozome. Lipozomi su modifikovani površinski aktivnim materijama *Span 20*, *Span 40*, *Tween 20* i *Tween 60*.

Takođe, na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da se inkapsulacijom polifenola u fosfolipidne mikročestice – lipozome, značajno usporava njihova difuzija, a da se modifikacijom membrane može postići dodatno usporavanje prenosa mase, što

zavisi od strukture molekula kojim se modifikacija vrši. Molekuli *Tween-a* 20 su se pokazali uspješnijim modifikatorima membrane lipozoma od molekula *Tween-a* 60. Otpor koji membrana modifikovana *Tween-om* 20 pruža difuziji polifenola je veći i dovodi do 4.93 puta sporije difuzije u odnosu na sistem sa neinkapsuliranim polifenolima.

Interesantno je da je otpor difuziji polifenola veći kod membrane modifikovane *Span-om* 20, nego *Span-om* 40, iako je sorbitan mono-laurat manji molekul od sorbitan mono-palmitata. Moguće objašnjenje za ovo je da se molekuli sorbitan mono-palmitata pravilnije „pakuju“ sa fosfolipidima u membrani lipozoma, pa neznatno usporavaju difuziju u odnosu na čiste fosfolipide.

Ova istraživanja pokazuju mogućnost korišćenja kako hidrogel materijala, tako i fosfolipidnih mikročestica za inkapsulaciju polifenolnih jedinjenja, što poboljšava njihovu stabilnost i funkcionalnost u farmaceutskim i prehrambenim proizvodima.

Ključne reči: polifenoli, alginatne čestice, lipozomi, koeficijent difuzije, difuzioni otpor, modifikacija membrane, polisorbati

Naučna oblast: Hemija i hemijska tehnologija

Uža naučna oblast: Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj:

Summary

Polyphenols are compound which are widely studied because of their antioxidative and potential therapeutic properties. Systems for the controlled release of drugs offer a number of benefits comparing with traditional forms of medicines and because of that these systems are widely researched.

Encapsulation of *Thymus serpyllum* L. aqueous extract within Ca-alginate beads was studied in order to produce dosage formulations containing polyphenolic compounds. Electrostatic extrusion was applied for encapsulation of thyme aqueous extract in alginate gel beads. In addition to hydrogel beads, heat-dried and freeze-dried forms of beads were examined.

The obtained beads with approximately 2 mg g⁻¹ of gallic acid equivalents encapsulated in 0.015 g ml⁻¹ of alginate were uniformly sized spheres of about 730 μm. Encapsulation efficiency varied in the range 80-98 % depending on the encapsulation method. Besides, the analysis reveals that the encapsulation process and the material used did not degrade the bioactive compounds, as the total antioxidant content remained unchanged. This was verified by the FTIR analysis proving the absence of chemical interactions between extract compounds and alginate. Addition of a filler substance such as sucrose and inulin in the dried product reduced its collapse and roundness distortion during drying process.

Also, the objective of this paper is to investigate the possibility of using liposomes as carriers of polyphenols and influence the membrane composition on the release rate of encapsulated polyphenols.

Experiments show how the membrane modification affects the mass transfer comparing to a conventional liposomes. Liposomes were modified with surfactants *Span 20*, *Span 40*, *Tween 20* and *Tween 60*, and thyme tea extract was used as a source of polyphenols.

The diffusion of polyphenols from thyme extract, dispersion of conventional liposomes and liposomes modified with *Span 20*, *Span 40*, *Tween 20* and *Tween 60* was studied using Franz diffusion cell. From the experimental data diffusion coefficients

were determined for each of the systems, as well as the corresponding diffusion resistances.

From the obtained results it can be concluded that the encapsulation of polyphenols in liposomes significantly slows diffusion, and with membrane modification can be achieved further slowing. The diffusion resistance of the liposome membrane modified with *Tween 20* and *Tween 60* is about 5 times higher compared to the diffusion of unencapsulated polyphenols from the thyme extract.

This study demonstrates the potential of using hydrogel material and liposomes for encapsulation of plant polyphenols to improve their functionality and stability in food and pharmaceutical products.

Keywords: tea polyphenoles, alginate beads, liposomes, diffusion coefficient, diffusion resistance, membrane modification, polysorbate

Scientific field: Chemistry and Chemical technology

Scientific discipline: Biochemical engineering and biotechnology

UDC number:

Sadržaj

Uvod.....	1
1. Teorijske osnove.....	5
1.1. Antioksidansi.....	5
1.1.1. Polifenoli.....	6
1.1.1.1. Antioksidativno/peroksidativno delovanje polifenola	7
1.1.1.2. Preporučeni dnevni unos polifenola.....	8
1.1.1.3. Čaj kao izvor polifenola.....	10
1.1.1.4. Klasifikacija polifenola	11
1.1.1.5. Dejstvo polifenola na ljudski organizam	12
1.1.1.6. Metode određivanja polifenola	13
1.1.1.7. Bioaktivni potencijal biljke majčine dušice	15
1.2. Alginat	17
1.2.1. Hemijska struktura alginata	18
1.2.2. Interakcije alginata sa katjonima i mehanizam formiranja gela	19
1.2.3. Karakteristike alginatnih čestica	21
1.2.4. Difuzione karakteristike i poroznost gela	23
1.2.5. Primena alginata.....	24
1.3. Hitozan	25
1.3.1. Hemijska struktura hitozana.....	25
1.3.2. Primena hitozana	25
1.4. Inulin	26
1.4.1. Hemijska struktura inulina	26
1.4.2. Primena inulina	27
1.5. Inkapsulacija.....	28
1.5.1. Definicija i podela tehnika inkapsulacije	30
1.5.2. Postupci za dobijanje čestica gela sa imobilisanom aktivnom komponentom	30
1.5.3. Elektrostatička ekstruzija	32
1.6. Lipozomi	34
1.6.1. Strukturne komponente lipozoma	34
1.6.1.1. Lipidi	34

1.6.1.2. Fosfolipidi.....	35
1.6.2. Metode dobijanja lipozoma.....	37
1.6.3. Klasifikacija lipozoma.....	39
1.6.4. Karakteristike lipozoma kao nosača aktivnih komponenti	40
1.6.5. Modifikacija membrane lipozoma	42
1.6.5.1. Modifikacija membrane lipozoma polisorbitima.....	43
1.6.5.2. Modifikacija lipozomne membrane sorbitol estrima.....	45
1.6.5.3. Ugradnja polisorbata u lipozomnu membranu	47
1.7. Kontrolisano otpuštanje.....	48
1.8. Prenos mase.....	51
1.8.1. Difuzija.....	51
1.8.2. Sistemi za eksperimentalno određivanje koeficijenta difuzije.....	55
2. Ciljevi rada	60
3. Eksperimentalna ispitivanja	62
3.1. Materijali.....	62
3.2. Priprema ekstrakta čaja.....	62
3.3. Određivanje ukupnih polifenola – FC metoda.....	63
3.4. Određivanje udela pojedinačnih polifenola – HPLC analiza.....	64
3.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti – ABTS metoda	65
3.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti - FRAP metoda	67
3.7. Metode pripreme i karakterizacije alginatnih čestica	67
3.7.1. Pripremanje rastvora alginata i rastvora kalcijum-hlorida.....	67
3.7.2. Formiranje čestica	68
3.7.3. Liofilizacija alginatnih čestica	70
3.7.4. Ispitivanje veličine alginatnih čestica	70
3.7.5. Snimanje uzoraka pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa.....	70
3.7.6. FTIR analiza (Fourier Transform Infrared Spectroscopy).....	70
3.7.7. Termička analiza alginata.....	71
3.7.8. Termička analiza čestica	72
3.7.9. Određivanje stepena inkapsulacije polifenola u alginatne čestice	72
3.7.10. Difuzioni eksperimenti.....	72
3.8. Metode pripreme i karakterizacije fosfolipidnih čestica.....	74

3.8.1. Priprema lipozoma	74
3.8.2. Liofilizacija lipozomnih disperzija.....	75
3.8.3. Merenje veličine čestica i zeta potencijala	76
3.8.4. SEM analiza lipozoma	76
3.8.5. Difuzioni eksperimenti	77
3.9. Određivanje koncentracije polifenola u uzorcima	78
4. Rezultati i diskusija	79
4.1. Baždarni dijagrami i rezultati HPLC analize	79
4.2. Karakterizacija alginatnih čestica	82
4.2.1. Određivanje veličine hidrogel čestica optičkim mikroskopom.....	82
4.2.2. SEM analiza alginatnih čestica	83
4.2.3. Termička analiza alginatnih čestica	85
4.2.4. FTIR analiza alginatnih čestica	88
4.2.5. Određivanje stepena inkapsulacije	90
4.3. Kinetika otpuštanja polifenola.....	91
4.3.1. Kinetika otpuštanja polifenola iz alginatnih čestica u stakleni sud.....	91
4.3.2. Kinetika otpuštanja polifenola – ABTS metoda	93
4.3.3. Kinetika otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta i alginatnih čestica – Franz-ova ćelija.....	94
4.4. Izračunavanje koeficijenta difuzije	97
4.5. Difuzioni otpori.....	101
4.6. Karakterizacija fosfolipidnih čestica	103
4.6.1. Dobijena veličina fosfolipidnih čestica	103
4.6.2. Dobijeni SEM snimci disperzije lipozoma.....	107
4.6.3. Dobijeni SEM snimci liofilizovanih lipozoma.....	108
4.7. Kinetika otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta i lipozomnih disperzija – Franz – ova ćelija	109
4.8. Izračunavanje koeficijenta difuzije polifenola iz lipozomnih disperzija	116
4.9. Izračunavanje difuzionih otpora konvencionalnih i modifikovanih lipozoma ..	120
4.10. Uticaj veličine čestica na difuziju polifenola	124
5. ZAKLJUČAK	126
Literatura.....	131

Spisak slika.....	140
Spisak tabela.....	144
Biografija.....	145

Uvod

Tokom poslednjih decenija naučna istraživanja su naročito usmerena ka prirodnim antioksidansima, posebno polifenolima i prehrambenim i farmaceutskim proizvodima bogatim tim sastojcima (Lee i sar. 2003). Jedinjenja sa antioksidativnim dejstvom deluju tako što vezuju slobodne radikale i usporavaju proces lipidne peroksidacije, pa na taj način sprečavaju kvarenje namirnica i lekova i produžuju im rok upotrebe (Henning i sar. 2005). Antioksidansi takođe štite i ljudski organizam, odnosno ćelije od slobodnih radikala. Oni usporavaju napredak mnogih hroničnih bolesti (Kwak i Jukes, 2001), pa se samim tim javila sve veća potreba za prirodnim izvorima antioksidanasa. Polifenoli se nalaze u čokoladi, vinu, pivu, jabukama, čaju i nekim drugim namirnicama, a od ranije je potvrđeno da ova materija deluje blagotvorno i na neke bolesti srca, krvnih sudova, kod pojedinih virusa i alergija (Gusman i sar. 2001, Baur i Sinclair 2006).

Upotreba lekovitih biljaka i njihovih ekstrakata idealan je način obogaćivanja i kreiranja inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda zbog bogatog i raznolikog bioaktivnog sastava, koji uključuju širok raspon bioaktivnih materija poznatih zdravstvenih učinaka. Većina pozitivnih učinaka pripisuje se polifenolnim spojevima koji vodenim ekstraktima različitih lekovitih biljaka daju i karakterističan ukus i aromu (Dapkevičius i sar. 2002). Budući da je većina polifenolnih spojeva hidrofilne prirode, njihova je direktna upotreba u prehrambenim i farmaceutskim proizvodima ograničena zbog potrebne ekstrakcije iz polaznog biljnog materijala (Diplock i sar. 1999).

Polifenoli se često i u velikim količinama unose u organizam ispijanjem čaja. Među biljkama koje su prirodno prisutne i uzgajaju se u Srbiji, a čiji ekstrakti poseduju visok udeo polifenola, kao i izražena antioksidativna svojstva je majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.). Međutim, prilikom pripreme ili skladištenja, aktivni sastojci mogu lako biti izloženi dejstvu kiseonika ili vlage iz vazduha (Fang i Bhandari 2010). Jedan od načina da se sačuvaju korisna svojstva biljnih ekstrakata je njihova inkapsulacija u matricu ili membranu čestice. Inkapsulacija je inovativna tehnika pakovanja čvrstih ili tečnih materija u male, zatvorene kapsule koje pod određenim uslovima mogu oslobađati svoj sadržaj. Svrha inkapsulacije je da se poboljša stabilnost ekstrakta prilikom transporta, skladištenja ili obrade. Zahvaljujući inkapsulaciji željeni aktivni sastojci mogu da se implementiraju u različite prehrambene ili farmaceutske proizvode.

Ovi inkapsulirani oblici omogućuju stabilnost i očuvanost polifenolnih komponenti. Inkapsulacija, također, smanjuje količinu polifenola koja se dodaje po jedinici proizvoda kako bi se ostvario isti antioksidativni efekat u odnosu na neinkapsulirani oblik doziranja (Diplock i sar. 1999). Takvi proizvodi predstavljaju veliki doprinos unapređenju kvaliteta modernog načina života. Drugi poželjni efekti inkapsulacije su maskiranje neprijatnih ukusa (kao što je gorak ukus polifenola), kao i poboljšanje konačnog kvaliteta proizvoda (Kosaraju i sar. 2006, Zuidam i Heinrich 2010, Deladino i sar. 2008).

Pregledom aktuelne naučne literature ustanovljeno je da se još uvek traga za adekvatnim formulacijama sa inkapsuliranim polifenolima. Do sada su za inkapsulaciju polifenola korišćene sledeće tehnike: sprej sušenje, koacervacija, molekulska inkluzija i emulzifikacija (Thies 2005, Zuidam i Shimoni 2010). Sprej sušenje je najprimenljivija tehnika u industrijskim uslovima (Madene i sar. 2005). Međutim, osnovni problem pri sprej-sušenju su visoke temperature kojima su izloženi polifenoli tokom procesiranja, pa dolazi do gubitaka njihove aktivnosti (ulazna temperatura vazduha i preko 160°C). Molekulska inkluzija u ciklodekstrine je pogodna samo za inkapsulaciju hidrofobnih molekula malih molekulskih masa, dakle ne i za polifenole iz vodenih ekstrakata (Szente i Szejtli 2004, Goh i sar. 2009, Zuidam i Shimoni, 2010). Koacervacija se generalno smatra skupom metodom, pa se postavlja pitanje ekonomske opravdanosti inkapsulacije nutrijenata (Thies 2005). Emulzije mogu da obezbede visok stepen inkapsulacije polifenola, ali efekat zaštite od lipidne peroksidacije u emulzijama varira i zavisi i od polarnosti molekula i od antioksidativnog kapaciteta (Zuidam i Shimoni 2010). Lipozomi se nameću kao jedno od rešenja za kontrolisano otpuštanje polifenola (Pichandy i sar. 2010). Međutim, dobijanje lipozoma se često svodi na procese koji traju dugo ili se čak odvijaju u više faza, pa je potrebno razviti brze postupke čiji se kapaciteti mogu relativno lako uvećati.

Zbog toga se u ovoj doktorskoj tezi razvijaju novi sistemi mikro i nano veličina za inkapsulaciju polifenola. Za racionalno projektovanje procesa inkapsulacije potrebno je poznavati fenomene prenosa mase polifenola kod ovih sistema, pa je tema ove doktorske teze upravo ispitivanje difuzije polifenolnih jedinjenja iz mikročestica dobijenih različitim tehnikama.

U ovoj doktorskoj disertaciji se kao jedan od nosača polifenolnih jedinjenja koristi alginat. Alginat je prirodni polisaharid, čija je primena dozvoljena u ishrani (George i Abraham 2006). Odabran je zbog svojih pozitivnih osobina, kao što su: biokompatibilnost, biodegradabilnost i netoksičnost. Kao i svi sistemi, tako i alginatni hidrogelovi imaju i svoje nedostatke, može lako doći do gubitka aktivne komponente tokom pripreme (Won i sar. 2005) ili do naglog otpuštanja aktivne komponente (George i Abraham 2006). Uzrok ovih nedostataka je veličina pora kod alginantih gelova (Gombotz i Wee, 2012). Kao moguće rešenje je primena nekog punioca ili dodatnog sloja polimera (Zohar-Perez i sar. 2004). U ovom radu je ispitan uticaj inulina kao punioca i hitozana kao dodatnog omotača oko alginatne čestice, na brzinu difuzije polifenolnih jedinjenja. Punioci su poznati po tome da izazivaju promene u strukturi nosača, kao što je povećanje krtosti (na pr. kod „crunch“ proizvoda) (Rassis i sar. 2002), ali imaju i veliku primenu u prehrambenoj industriji, naročito inulin koji se koristi i kao funkcionalna hrana (Kim i sar. 2001).

Takođe, pored hidrogel alginatnih čestica, ispitane su i suve i liofilisane forme, koje imaju niz prednosti, među kojima i jača mehanička svojstva i pogodnije su u primeni u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Nussinovitch i Gershon 1996).

Lipozomi, kao nosači aktivne komponente, su uvedeni 1980. godine (Immordino i sar. 2006) i inkapsulacija u liposome predstavlja noviji pristup (Pichandy i sar. 2010). Sastavljeni su od vodenog jezgra i jednog ili više lipidnih dvoslojeva, tako da su pogodni za inkapsulaciju i hidrofilnih i hidrofobnih supstanci (Immordino i sar. 2006). Zbog sposobnosti inkapsulacije različitih supstanci, lipozomi su proučavani za mnoge terapijske svrhe (Immordino i sar. 2006, Bangham i sar. 1965, Storm i Crommelin 1998). Mogućnost da se prilagodi brzina oslobađanja aktivne komponente i mesto delovanja izmenom površinskih svojstava membrane, učinila je razvoj lipozoma kao nosača popularnim i sve više ispitivanim (Marzio i sar. 2011, Immordino i sar. 2006). Nedostatak lipozoma je njihova ograničena stabilnost tokom skladištenja (Tasi i sar. 2003) što je dovelo do napredovanja tehnologije pripreme lipozoma od konvencionalnih vezikula na „druge generacije lipozoma“, u kojima im je membrana modifikovana površinski aktivnim molekulima (surfaktanti) (Immordino i sar. 2006). Konvencionalni lipozomi su vezikule koje se sastoje od fosfolipida i/ili holesterola (Storm i Crommelin 1998), dok su surfaktanti neophodni kao sredstva za rastvaranje prilikom izolovanja,

prečišćavanja i modifikacije membrane. Najčešće se koriste nejonski polisorbati (na primer Tween surfaktanti) (Fadda i sar. 1998, Tasi i sar. 2003, Pichandy i sar. 2010).

Kao što je rečeno, inkapsulacija aktivnih supstanci se koristi za njihovo kontrolisano i produženo oslobađanje, što dovodi do smanjenja koeficijenta prenosa mase i do sporije difuzije (Pjanovic i sar. 2010, Mourtas i sar. 2007, Bonina i sar. 2005, Pavelic i sar. 2001, Singh i sar. 1996). U cilju karakterizacije sistema sa produženim oslobađanjem, potrebno je odrediti koeficijente difuzije i difuzione otpore. Takođe, dobijene mikročestice sa inkapsuliranim ekstraktima čaja ispitane su i sa aspekta stepena inkapsulacije, veličine i uniformnosti čestica, morfoloških karakteristika, i interakcija koje se javljaju između aktivnih komponenata ekstrakata i nosača.

1. Teorijske osnove

1.1. Antioksidansi

Kada su istraživači početkom devedesetih godina otkrili da slobodni radikali koji nastaju u ljudskom organizmu oštećuju ćelije i izazivaju neke od najčešćih bolesti, javila se velika potreba za ispitivanjem antioksidanasa. Slobodni radikali ili oksidansi su atomi, joni ili molekuli koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona, pa su zato vrlo nestabilni i reaktivni (Percival, 1998). Ukoliko se nalaze ili nastaju u ćeliji, reaguju sa makromolekulima ćelije, kao što su lipidi i proteini ćelijske membrane. Tokom godina može doći do nastanka velikog broja različitih bolesti, uzrokovanih oštećenjem ćelijske membrane, proteina ili mutacije DNK (Valko i sar. 2004). Slobodni radikali nastaju usled izlaganja sunčevom zračenju, pri lošoj ishrani, unosu alkohola, konzumiranju duvana, usled stresa, pri svakodnevnom izlaganju elektromagnetnom zračenju, radijaciji, ali i pri normalnom metabolizmu ćelije (James i sar. 2003). Najpoznatiji slobodni radikali su reaktivni spojevi kiseonika (Reactive Oxygen Species - ROS), koji uključuju superoksid jon ($O_2^{\cdot-}$), peroksil (ROO^{\cdot}), alkoksil (RO^{\cdot}), hidroksil (HO^{\cdot}) i radikal azotovog oksida (NO^{\cdot}). U organizmu se nalaze i ROS spojevi koji nisu radikali, kao na primer molekul kiseonika (O_2), vodikovog peroksida (H_2O_2) ili hipokloritne kiseline ($HOCl$). ROS spojevi imaju svoju biološku ulogu u organizmu (Halliwell, 1997) posredujući u stvaranju energije, fagocitozi, regulaciji ćelijskog rasta (indukcija ćelijskog starenja i apoptoze) i međućelijske signalizacije (sekundarni glasnici intracelularne signalizacijske kaskade). Uprkos tome, ROS i ostali slobodni radikali uključeni su u patogene procese razvoja mnogih hroničnih oboljenja (Diplock, 1994, Sies, 1997), uključujući i dve najraširenije hronične bolesti razvijenih zemalja - aterosklerozu i rak, kao i čitav niz hroničnih degenerativnih bolesti - artritis, autoimune bolesti, prerano starenje itd.

Antioksidansi ili antioksidativni agensi su biološki aktivne komponente koje umanjuju negativan efekat slobodnih radikala vezujući se za njih, a pokazano je i da mogu da pomognu u oporavku ćelija koje su već pretrpele oštećenje (Božin i sar. 2007).

Pored ovoga, otkriveno je da antioksidansi imaju još jednu pozitivnu ulogu. Ako se jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima dodaju namirnicama i farmaceutskim

preparatima, ona usporavaju proces lipidne peroksidacije, pa je tako rok upotrebe namirnica odnosno farmaceutskih preparata znatno produžen.

Sve ovo je posljednjih godina dovelo do potrebe za pronalaskom novih prirodnih izvora antioksidanasa. Istraživanja su takođe usmerena ka otkrivanju novih antioksidativnih jedinjenja biljnog porekla. Do sada su najčešće korišćeni sintetski antioksidansi - butil hidroksianizol (BHA), butil hidroksitoluen (BHT), propilgalat i terc-butil hidrohinon. Međutim, upotreba BHA i BHT u namirnicama je ograničena zakonskim regulativama zbog sumnje da imaju toksične i kancerogene efekte. Zbog toga javio se ogroman interes i potražnja za prirodnim, netoksičnim antioksidansima za primenu u prehrambenoj industriji (Chun i sar. 2001, Gülçin, 2010).

1.1.1. Polifenoli

Postoji veliki broj supstanci koje imaju antioksidativna svojstva. Najpoznatiji su vitamin C, vitamin E i karotenoidi zajedno sa mineralima selenom i magnezijumom. Takođe se u antioksidanse ubrajaju i glutation, koenzim Q10, flavonoidi, fenoli, polifenoli i fitoestrogeni. Superoksid dizmutaza (SOD), katalaza i glutation peroksidaza ubrajaju se u enzimske antioksidanse (Huang i sar. 2005).

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti čija je primarna uloga u biljci zaštita od ultraljubičastog zračenja i djelovanja patogena (Beckman, 2000). Polifenoli su najzastupljeniji prirodni antioksidansi u ishrani. Njihov dnevni unos može da bude i više od 1g dnevno, što je 10 puta veća količina od dnevnog unosa vitamina C i 100 puta veća količina od dnevnog unosa vitamina E i karotenoida. Glavni izvori polifenola u ishrani su voće i proizvodi biljnog porekla kao što su voćni sokovi, čaj, kafa i crveno vino. Povrće, žitarice, čokolada i mahunarke su takođe izvor polifenola. Uprkos njihovoj širokoj zastupljenosti u biljkama, efekat polifenola na zdravlje privukao je pažnju tek nedavno. Do sredine devedesetih godina dvadesetog veka najviše proučavani antioksidanti bili su vitamini, karotenoidi i minerali. Istraživanja flavonoida i drugih polifenola, njihovih antioksidativnih svojstava i njihovog preventivnog efekta na razne bolesti, počela su da se odvijaju tek od 1995. godine. Glavni razlog koji je odložio ovaj početak je izuzetna raznolikost i kompleksnost strukture polifenola, koja je karakteristična po tome što sadrži više od jednog fenolnog jezgra (sa jednom ili više hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu) (Scalbert i sar. 2005).

Polifenoli nastaju sekundarnim metabolizmom biljaka i učestvuju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko delovanje), deluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlače oprašivače i učestvuju u pigmentaciji biljaka (Beckman i sar. 2000). U namirnicama doprinose gorčini, oštini, boji, ukusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti. Javljaju se u obliku prostih fenolnih molekula, kao i u obliku polimerizovanih jedinjenja težina većih od 30000 Da (1 kg je jednak $6,02213665168 \cdot 10^{26}$ Da) (Bravo, 1998).

1.1.1.1. Antioksidativno/peroksidativno delovanje polifenola

Uloga antioksidansa u ishrani i zdravlju, kao i njihov mehanizam delovanja, detaljno su proučavani (Serafini, 2006). Epidemiološke studije sprovedene posljednjih 10 godina pokazale su inverzni odnos između rizika razvoja hroničnih bolesti kod ljudi i ishrane bogate polifenolima (Scalbert i sar. 2005, Arts i Hollman, 2005). Fenolne skupine polifenola mogu prihvatiti elektron i formirati relativno stabilne fenoksil radikale i na taj način prekinuti lančane reakcije oksidacije u ćelijskim strukturama (Clifford, 2000). Konzumiranjem hrane bogate polifenolima dolazi do povećanja antioksidativnog kapaciteta plazme, što se može objasniti prisutnošću redukujućih polifenola i njihovih metabolita u plazmi, sinergističkim efektom s drugim endogenim antioksidansima ili apsorpcijom prooksidativno delujućih sastojaka hrane (npr. gvožđa) (Scalbert i sar. 2005). Usprkos velikom interesu za polifenole, zbog njihovih izraženih antioksidativnih svojstava, neka naučna istraživanja pokazala su kontroverzne rezultate, posebno pri upotrebi visokih koncentracija polifenola. Vrsta, doziranje i matriks egzogenih antioksidanasa dominantni su faktori koji utiču na ravnotežu između povoljnih i nepoželjnih efekata antioksidansa (Bouayed i Bohn, 2010). Iako biološke funkcije polifenola i njihov metabolizam u ljudskom telu još nisu u potpunosti utvrđeni, smatra se da je antioksidativna aktivnost polifenola, posebno flavonoida, kombinacija svojstva heliranja metala i „gašenja“ slobodnih radikala (Bohm i sar. 1998, Bravo, 1998). Neki autori takođe, navode i inhibiciju enzima, posebno oksidaza, kao što je lipoksigenaza (LO), ciklooksigenaza (CO), mijeloperoksidaza (MPO), NADPH oksidaza i ksantin oksidaza (XO) (Groot i Rauen, 1998), kao važnih enzima za izbegavanje generiranja ROS *in vivo*, kao i organskih hidroperoksida. Prema tome, polifenoli inhibiraju enzime indirektno uključene u oksidativne procese, kao što je fosfolipaza A2 (FLA2) (Lindahl i Tagesson, 1997), a stimulišu enzime s poznatim antioksidativnim delovanjem, kao što

su katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD) (Sudheesh i sar. 1999). No, neki polifenoli mogu imati i prooksidativnu aktivnost pod određenim uslovima, kao što su visoke koncentracije ili prisutnost jona metala (Azam i sar. 2004, Bouayed i Bohn, 2010, Decker, 1997, Watjen i sar. 2005). Do takvog delovanja dolazi zbog činjenice da oksidativni stres mogu indukovati prooksidativni agensi, bilo formiranjem reaktivnih kiseonikovih radikala ili inhibicijom antioksidanasa (Puglia i Powell, 1984). Na taj način dolazi do generiranja oksidativnih oštećenja biomolekula, kao što su proteini, DNK i lipidi, pa eventualno i ćelija i tkiva (Aruoma, 2003, James i sar. 2003). Prooksidansi katalizuju oksidativne reakcije biomolekula što dovodi do disfunkcije ćelija i završava se ćelijskom smrti (Aruoma, 2003). Međutim, utvrđeno je da prooksidativno delovanje prirodnih polifenola, za razliku od njihovih antioksidativnih svojstava, ima specifično ciljano delovanje na određene ćelije, budući da deluje preventivno na neke tipove raka (Lambert i Elias, 2010). Zbog toga je prooksidativno delovanje pojedinih vrsta polifenola iz hrane i njihova sposobnost indukovanja disfunkcije mitohondrija i posledično apoptoze, predloženo kao potencijalni mehanizam prevencije raka (Galati i O'Brien, 2004).

1.1.1.2. Preporučeni dnevni unos polifenola

Značajan procenat populacije razvijenih zemalja ne ostvaruje dovoljan unos bioaktivnih spojeva (posebno polifenolnih antioksidanasa) uobičajenom ishranom, što je rezultat savremenog načina života i neadekvatne ishrane, usprkos mnogobrojnim naučnim dokazima, koji su pokazali da konzumiranje polifenola u većim količinama ima pozitivne zdravstvene efekte (Hu i sar. 2007). Kao rezultat nepravilne ishrane siromašne svežim voćem i povrćem, povećana je konzumacija prehrambenih suplemenata, pa zato mnogi potrošači pokazuju interes za dodatnim unosom polifenolnih antioksidanasa u svrhu postizanja zaštite od oksidativnog stresa i degenerativnih bolesti. Tačne podatke o udelu polifenola unešenih u organizam putem normalne ishrane, kao i o preporučenom dnevnom unosu teško je odrediti zbog nekoliko faktora:

- nepotpune baze podataka koje pružaju vrlo ograničene rezultate o udelu polifenola u namirnicama i prerađenim prehrambenim proizvodima,

- udeo polifenola u pojedinim namirnicama varira, pa tako čak i između jedne vrste proizvoda postoje razlike u udelu od nekoliko redova veličine, što je posledica genetskih razlika, razlika u poreklu, okolnim uslovima, kao i uslovima berbe, skladištenja i proizvodnje neke namirnice,
- nedostatak komercijalno dostupnih standarda za analizu i identifikaciju svih polifenolnih proizvoda.

Prema trenutnim podacima, prosečan dnevni unos i apsorpcija antioksidanasa mora se udvostručiti ili utrostručiti kako bi prosečan potrošač u potpunosti dostigao pozitivne učinke biljnih antioksidanasa na zdravlje. Prema preporukama, konzumacijom 5 voća i povrća dnevno, unos polifenola iznosio bi između 500 – 1000 mg, pri čemu flavonoidi čine 150-300 mg od tog iznosa ali, taj se iznos značajno povećava konzumacijom čaja, kakaovih proizvoda i kafe (Williamson i Holst, 2008) i može dostići do 1 g dnevno, što je znatno više u odnosu na druge poznate antioksidanse, kao što su vitamin C (oko 10 puta više), vitamin E i karotenoidi (oko 100 puta više) (Scalbert i Williamson, 2000). Kao posledica sve veće popularnosti polifenola u obliku prehrambenih suplemenata, pojavljuje se trend povećanog unosa samo jednog ili kombinacije dva ili više polifenola jedne skupine ovih jedinjenja, što prelazi udeo tih spojeva koji se unosi u organizam normalnom ishranom. Prema preporukama industrije prehrambenih suplemenata, savetuje se dnevna konzumacija 50 mg/izoflavona i 100-300 mg ekstrakta kože grožđa koji je bogat proantocijanidinima. Prema Mennen-u i saradnicima (2005), podaci o preporučenom dnevnom unosu pojedinih polifenola, dostupni na internetu, iznose 300 mg kvercetina, 1 g flavonoida iz limuna ili 20 mg resveratrola. Unos ovih količina omogućio bi ~100 puta veći udeo konzumiranih polifenola od procenjenog udela koji se konzumira normalnom ishranom. Preporučeni dnevni unos (DRI „Dietary Reference Intake“) polifenola još nije određen, zbog nekoliko razloga. Preporučeno je da se DRI vrednost polifenola izjednači sa DRI vrednosti za vitamin C, zbog niske toksičnosti polifenola. Međutim, vrlo je teško odrediti tačan i sveobuhvatan iznos DRI vrednosti za polifenole ukupno, zbog njihove raznovrsnosti i razlika u biološkoj aktivnosti, a i nedostatka kliničkih istraživanja tokom dugih perioda kako bi se tačno ustanovilo delovanje pojedinog polifenola u organizmu i elimisali potencijalni negativni učinci. Prema tome, DRI vrednosti se moraju razlikovati za pojedine vrste i podskupine polifenola (Williamson i Holst, 2008). Zato treba da postoje preporuke o prehrambenom

unosu i regulatorne smernice za bilo koji proizvod (uključujući funkcionalni) obogaćen polifenolnim jedinjenjima. Za ekstrakte bogate ovim jedinjenjima i prehrambene suplemente koji sadrže polifenole moraju se ograničiti vrednosti unosa na normalan udeo sličan DRI vrednostima drugih poznatih antioksidanasa, kako bi se izjednačile te vrednosti i izbeglo unošenje mega-doza ovih spojeva.

1.1.1.3. Čaj kao izvor polifenola

Čaj spada u tople napitke, koji se u 19. veku prenosi van granica Kine i stiče popularnost širom sveta.

Pored vitamina C, B1 i B2, gvožđa i kofeina čajni napitak sadrži i polifenole, koji spadaju u prirodne antioksidanse, te imaju pozitivno dejstvo na ljudski organizam. Poslednjih godina su vršena razna eksperimentalna i klinička ispitivanja pozitivnog dejstva polifenola na ljudski organizam i utvrđeno je da pored antioksidativnog, polifenoli imaju i antibakterijsko, antivirusno, protivupalno, antialergijsko dejstvo, kao i to da sprečavaju razvoj malignih ćelija (Bravo, 1998).

Zeleni čaj je jedan od najbogatijih izvora polifenola, kao i neki biljni čajevi koji se od davnina koriste u narodnoj medicini, a pripremljeni su od listova majčine dušice (lat. *Thymus serpyllum*), koprive (lat. *Urtica dioica*) ili masline (lat. *Olea europaea*). Uobičajeni način unošenja biljnih polifenola je priprema i ispijanje čajnog ekstrakta, dobijenog procesom ekstrakcije vodom. Ovakav način pripreme može dovesti do oštećenja aktivnih komponenata dejstvom kiseonika ili nekompatibilnih jedinjenja tokom skladištenja. Zato se sve češće na tržištu mogu naći proizvodi na bazi zelenog čaja i drugih biljaka bogatih polifenolima, koji omogućavaju unos dnevno dozvoljenih i preporučenih količina polifenola. Budući da su neki polifenoli (flavonoidi) zaslužni za ukus i boju mnogih vrsta voća, povrća, cveća, a takođe ispoljavaju i blagotvorno dejstvo, ove supstance se koriste i u cilju dodatnog poboljšanja kvaliteta i biološke vrednosti konditorskih proizvoda (Belščak-Cvitanović i sar. 2011).

Da bi se polifenoli, kao aktivne supstance, mogli primeniti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (pretpostavlja se da bi polifenoli mogli da se koriste i u kombinaciji s drugim lekovima), kao i da bi ih zaštitili, neophodno je inkapsulirati ih.

1.1.1.4. Klasifikacija polifenola

Ova velika grupa jedinjenja se, prema načinu nastajanja, može podeliti na sintetske i prirodne polifenole. Sintetski polifenoli se dalje mogu podeliti na tri grupe (Handique i Baruah, 2002):

- Polifenole sa otvorenim lancem
- Mešovite
- Ciklične

Kako se pod terminom *polifenoli* podrazumevaju prirodni polifenoli, u nastavku će biti detaljnije prikazana njihova klasifikacija.

Kao što je već spomenuto, prirodni polifenoli se mogu naći u biljkama i predstavljaju zaista brojnu grupu jedinjenja, koja se prema hemijskoj strukturi može podeliti na najmanje 10 različitih podgrupa. Ako se uzme u obzir rasprostranjenost i značaj u praktičnoj primeni, kao najvažnije, mogu se izdvojiti sledeće podgrupe (Bravo, 1998, Pandey i Rizvi, 2009):

- **Prosti fenoli** – izuzetno rasprostranjena grupa prirodnih polifenola koja se u velikim količinama nalazi u hrani i piću. Ovde se ubrajaju jedinjenja male molekulske mase, kao što je sam fenol, krezol, timol itd.
- **Fenolne kiseline** – ovde spadaju galna kiselina koja se može naći u karanfiliću, benzoeva kiselina, vanilinska kiselina, čiji je izvor vanila i cimetna kiselina koja se nalazi u cimetu.
- **Kumarini** – kumarinska kiselina je prekursor svih kumarinskih derivata i ubraja se u polifenole sa veoma jednostavnom strukturom. Ova grupa jedinjenja se odlikuje izuzetno prijatnim mirisom vanile ili svežeg pokošenog sena, pa često ulaze u sastav parfema i mirisnih ulja. Kumarini ispoljavaju jako antikoagulativno dejstvo, a u većim količinama mogu izazvati oštećenja jetre. Izvori ovih jedinjenja su kokosovo ulje, lavanda, kajsija, višnja, jagoda i cimet.
- **Flavonoidi** – ovo je najveća grupa prirodnih fenola, ujedno i najtemeljnije proučavana. Do sada je poznato preko 5000 ovih jedinjenja. Mnogi flavonoidi pokazuju nizak nivo toksičnosti na sisare. Sva jedinjenja iz ove grupe imaju u

svojoj strukturi 2-fenil-benzopiron ili flavonon. U flavonoide spadaju: flavanoli, flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni i antocijanini.

- **Tanini** – za razliku od prethodno navedenih grupa polifenola, tanini su jedinjenja srednje do visoke molekulske mase. Tanini izolovani iz biljaka mogu biti hidrolizirajući (pirogalni) ili kondenzovani (katehinski) tanini:
 - Hidrolizirajući tanini su poliestri galne kiseline ili njenih derivata i centralnog molekula šećera (najčešće je to glukoza).
 - Kondenzovani tanini stvoreni su najčešće kondenzacijom dva ili tri molekula flavan-3-ola (katehina, epikatehina) ili flavan-3,4-diola.

Tanini (ili štavne materije) su složena jedinjenja biljnog porekla koja su produkt njihovog odbrambenog mehanizma. Nalaze se u stablima i listovima nekih biljaka, a sadrže ih i zeleni plodovi koji zbog toga imaju opor ukus. Najviše tanina nalazi se u hrastu i bagremu, tako da je upravo tanin razlog zašto se žir ne koristi u ljudskoj ishrani. Osim u medicini, našli su primenu u industriji kože gde se koriste za štavljenje, jer razlažu belančevine. Sem u voću, prisutni su u vinu, čokoladi, čaju.

Određene karakteristike čaja, kao što su boja i jačina, direktno zavise od polifenola i njihovih transformacija. Čaj bogat taninima prepoznaje se po gorčini.

1.1.1.5. Dejstvo polifenola na ljudski organizam

Intenzivna naučna istraživanja su pokazala da polifenoli mogu imati antioksidativno, antikancerogeno, antiaterogeno, antiinflamatorno, antiviralno i antibakterijsko dejstvo, što sve zavisi od strukture određene grupe/molekula polifenola (Stojanović i sar. 2001). Vrsta dejstva u velikoj meri zavisi i od unete količine ovih jedinjenja. Kao glavni doprinos polifenola ljudskom organizmu ističe se njihov snažan antioksidativni učinak.

Procenat polifenola u ljudskoj ishrani varira u zavisnosti od tipa, količine i kvaliteta konzumiranih namirnica. Preporučljivo je unošenje polifenola u količini od 1 g dnevno. Kuvanjem se smanjuje sadržaj polifenola u namirnicama zbog čega treba konzumirati sveže namirnice i izbegavati pripremanje hrane na visokim temperaturama.

Prirodni polifenoli se smatraju kandidatima za korišćenje u terapijske svrhe kod oboljenja kao što su AIDS, kardiovaskularna oboljenja, formiranje čira, bakterijske infekcije, bolesti neurona (Peake i sar. 1991).

Antioksidativno dejstvo znači da polifenoli štite ćelije od patoloških promena. Antioksidansi su molekuli koji sprečavaju oksidaciju drugih molekula i time onemogućavaju reakciju oksidacije u kojoj nastaju slobodni radikali, koji su veoma reaktivni i stupaju u lančane reakcije sa drugim molekulima izazivajući oštećenje ćelija. Slobodni radikali se oslobađaju kao nusproizvodi usled metabolizma ćelija, nakon čega mogu oštetiti ćelijske membrane ili razoriti DNK i time ubrzati proces starenja. Antioksidansi imaju sposobnost da spreče stvaranje slobodnih radikala, ali i da ih uklone iz organizma u slučaju da su već nastali. Do sada je otkriveno da najmanje osamnaest flavonoida ima veće antioksidativno dejstvo od vitamina C i E.

Antikancerogeno dejstvo polifenola se ogleda u preventivnom delovanju na gen p53 koji mutira u preko 50% ljudskih tumora (sprečava njegove promene koje vode ka nastanku tumora). Neka novija istraživanja pokazala su da određeni polifenoli (na primer resveratrol iz grupe flavonoida) prekidaju rast tumorskih ćelija i pri tome ne oštećuju normalne ćelije (resveratrol ima takav učinak kod raka dojke). Polifenoli deluju blagotvorno i pomažu kod nekih vrsta kancera, kao što su kancer kože, pluća, pankresa, creva itd.

Antiaterogeno dejstvo se ogleda u oksidaciji lipida čime se sprečava taloženje holesterola i lipida na zidovima krvnih sudova i samim tim se održava njihova elastičnost i smanjuje rizik od kardio-vaskularnih oboljenja.

Antiinflamatorno, antiviralno, antibakterijsko i druga dejstva – mnoge studije su pokazale da polifenoli mogu pomoći pri prevenciji bakterijskih, virusnih infekcija i upala, kao i da smanjuju rizik od pojave šloga, osteoporoze i oboljenja jetre (Mukhtar i Ahmad, 2000, Simpol i sar. 1994).

1.1.1.6. Metode određivanja polifenola

Sirovi ekstrakti voća, povrća, začina i drugih biljnih materijala bogatih fenolima su od posebnog značaja za prehrambenu industriju pošto usporavaju oksidativnu degradaciju lipida i na taj način poboljšavaju kvalitet i nutritivnu vrednost hrane. U

prehrambenoj industriji ukupna količina polifenola se često određuje u namirnicama, pa je tako određivanje sadržaja polifenola u vinu jedan od obaveznih postupaka u laboratorijama vinarija. S obzirom da je trend u prehrambenoj industriji i nauci usmeren ka funkcionalnoj hrani sa specijalnim zdravstvenim efektima, takođe, raste zainteresovanost istraživača, proizvođača hrane i potrošača prema antioksidativnim sastojcima u namirnicama. Pri analizi antioksidativnog kapaciteta namirnica, merenje sadržaja ukupnih polifenola je prvi korak u određivanju indeksa ukupnih antioksidanasa. Namirnice sadrže različite fenolne komponente, pa se meri njihov ukupni sadržaj koji se naziva: *indeks ukupnih polifenola* (Berend i Grbarić, 2008).

Polifenoli se mogu kvalitativno i kvantitativno odrediti primenom različitih tehnika, kao što su:

- UV/VIS spektrofotometrija
- HPLC (tečna hromatografija pod visokim pritiskom)
- TLC (hromatografija na tankom sloju)
- Kapilarno-zonska elektroforeza

Najjednostavnija metoda je spektrofotometrijska, gde se direktno meri apsorbanca uzorka. Budući da se spektrofotometrijska merenja mogu vršiti na različitim talasnim dužinama, postavlja se pitanje na kojoj talasnoj dužini je pouzdano vršiti merenje. Kao najpouzdanija metoda pokazala se *Folin-Ciocalteu* (FC) metoda (Lachman i sar. 1998). Smetnje koje se mogu javiti tokom rada jesu reagovanje drugih redukujućih supstanci sa reagensom, pa se može desiti da je određen sadržaj fenola veći od stvarnog.



Slika 1.1. Reakcija polifenola i *Folin-Ciocalteu* reagensa – obojenost zavisi od koncentracije polifenola u uzorku

Reakcijom polifenola i FC reagensa (smeša fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) u blago alkalnim uslovima dolazi do stvaranja relativno stabilnog obojenog kompleksa, čiju apsorbanču možemo spektrofotometrijski odrediti na talasnoj dužini od 765 nm. Pri oksidaciji polifenolnih jedinjenja, fosfovolframova i fosfomolibdenska kiselina se redukuju u volframov oksid i molibdenov oksid, koji su plavo obojeni (slika 1.1) (Singleton i sar. 1999a, Singleton i sar. 1999b).

Da bi se izmerene apsorbanče prevele u vrednosti koncentracije mora postojati kalibraciona (baždarna) kriva. Za ovu metodu baždarna kriva se izrađuje merenjem apsorbanči standardnih rastvora galne kiseline. Izbor galne kiseline kao standarda je izvršen zbog njene stabilnosti i čistoće, dok je istovremeno jeftinija od drugih opcija.

1.1.1.7. Bioaktivni potencijal biljke majčine dušice

Iako je velika pažnja posvećena polifenolnom sastavu i antioksidativnoj aktivnosti polifenola iz zelenog čaja i medicinskih biljaka i začina, manje je poznato da listovi nekih široko rasprostranjenih biljaka, koji se od davnina tradicionalno koriste u narodnoj medicini, ali i kulinarstvu, takođe poseduju visok udeo polifenola (Belščak-Cvitanović i sar. 2011). Među biljkama koje su prirodno prisutne i uzgajaju se u Srbiji, a čiji ekstrakti takođe poseduju visok udeo polifenola, kao i izražena antioksidativna svojstva su: majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.), kopriva (*Urtica dioica* L.), stolisnik (*Achillea millefolium* L.), maslina (*Olea europaea* L.), glog (*Crataegus oxyacantha* L.) i malina (*Rubus idaeus* L.).

Majčina dušica (slika 1.2) je rod višegodišnjih zeljastih biljaka iz familije *Lamiaceae*. Vrste ovog roda jako liče jedna drugoj i podjednako se koriste kao lekovite biljke, dok se jedna vrsta, timijan, uzgaja i koristi kao začinska. Lekoviti sastojci se nalaze jedino i isključivo u listu i cvetu majčine dušice. Sastav čine timol i karvakrol, dva fenolna jedinjenja od kojih potiču lekovitost, antiseptička moć i svojstven miris ove biljke, zatim kofeinska i ruzmarinska kiselina, tanin i još jedna goroka materija (serpilin).

Majčina dušica je omiljen lek ne samo u narodnoj, nego i u naučnoj medicini (Mihailović-Stanojević i sar. 2013). Kod nas se vekovima upotrebljava, pre svega, kao lek za lečenje organa za varenje, kao i organa za disanje. Samo dve kašičice majčine dušice zadovoljava čak 20 odsto dnevnih potreba organizma za gvožđem, a odličan je izvor i mangana - minerala koji poboljšava funkcionisanje mozga, održava zdravlje

kostiju i kože, i potpomaže formiranje hrskavice. Majčina dušica ulazi u sastav mnogih lekovitih preparata koji se izrađuju bilo u apotekama, bilo u farmaceutskoj industriji, a njeno etarsko ulje i timol daju se protiv crevnih parazita, naročito protiv dečjih glista. Takođe, pomenuto isparljivo ulje ima svojstvo da olakšava iskašljavanje i umirujuće deluje na respiratorni trakt kod velikog kašlja, bronhitisa (upala bronhija), promuklosti, astme. U slučaju bronhitisa i astme, priprema se mešavina ove biljke sa lišćem podbela, bokvice, sleza i jagorčevine. Čaj ima jako antiseptičko dejstvo i delotvoran je kod zapaljenja jetre i bubrega. Za zaštitu u vreme epidemija se preporučuje svakodnevna upotreba čaja od majčine dušice, jer ona ima svojstvo da zaustavlja razvoj mnogih patogenih klica, a neke i uništava. U periodu rekonvalescencije (oporavka) od tifusne groznice i zaraznih oboljenja, priprema se kupka sa ekstraktima majčine dušice, čijem delovanju pacijent treba da bude izložen 20 minuta. Ulje od majčine dušice se koristi kod paralize, infarkta, multipla skleroza, muskularne atrofije (sušenja mišića), reumatizma, luksacija (uganuća), trbušnih poremećaja. Tinktura od majčine dušice se koristi pri masaži, u cilju jačanja udova kod debilne dece. Delotvorna je u slučajevima paralize i multipla skleroze. Kupka sa majčinom dušicom se preporučuje nervoznoj deci, kao i osobama koje pate od depresije i razdražljivosti. Majčina dušica se takođe preporučuje u slučajevima kriznih stanja epileptičnih bolesnika - konzumiraju se 2 šolje na dan 3 nedelje.

Osim za poboljšanje zdravlja, majčina dušica se koristi u kulinarstvu, kao začim. Sitno iseckani listovi dodaju se salatama, picama, jajima, specijalitetima sa roštilja, supama, marinadama, umacima i sosovima. Koristi se i za pripremanje školjki i divljači.

Treba naglasiti da ne treba kuvati majčinu dušicu, jer se lekoviti sastojci veoma mirisne i lekovite biljke kuvanjem brzo i potpuno izgube. Zbog toga se preporučuje da se majčina dušica samo popari ključalom vodom, poklopi i ostavi da odstoji dva sata. Takođe, može se slobodno pripremiti i jači čaj, jer majčina dušica ni dužom upotrebom ne izaziva nikakve znake nelagodnosti niti navikavanja.



Slika 1.2. Biljka majčine dušice

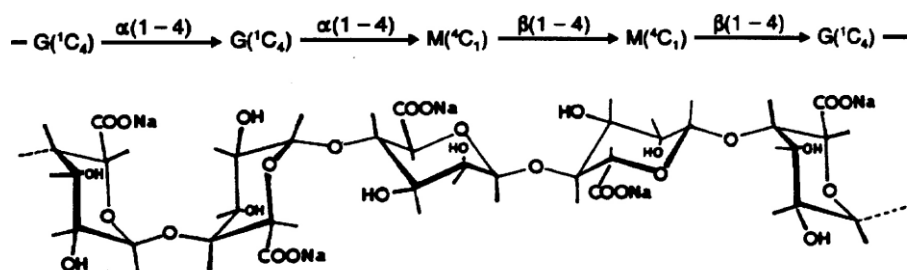
1.2. Alginat

Alginat je prvi otkrio britanski hemičar E.E.C. Stanford 1881. godine kada je istraživao korisne supstance iz algi. On je razvio proces alkalne ekstrakcije viskoznog materijala, algina, i kasnije uspešno istaložio alginat pomoću mineralnih soli. Čist alginat je izolovan tek 15 godina nakon pronalaska. Komercijalnu prodaju alginata započela je kompanija Kelco Co. u Kaliforniji 1929. godine, a 1934. alginat počinje da se upotrebljava u ishrani kao stabilizator sladoleda i sve više dobija na značaju (Degroot i Neufeld, 2001).

Najzastupljeniji alginat u prirodi je polisaharid u smeđim morskim algama. Vrste smeđih algi iz kojih se izdvajaju komercijalni alginati su *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* i *Ascophyllum nodosum*, dok su manje komercijalne vrste *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia nigrascens* i *Sargassum sp.* Alginat se nalazi u intercelularnom matriksu u obliku gela koji sadrži jone natrijuma, kalcijuma, magnezijuma, stroncijuma i barijuma. Osnovna funkcija alginatnih gelova jeste da daju čvrstinu i savitljivost algama koja je neophodna za njihov rast u moru. Alginat (kao polisaharid) mogu sintetizovati i *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas putida* gajeni u kontinualnim kulturama na glukozu i fruktozu kao izvorima ugljenika. Značajne količine alginata dobijene su i kontinualnim gajenjem imobilisane kulture *Azotobacter vinelandi*.

Godišnje se u svetu proizvede preko 22 000 tona alginata, neuključujući tržište Kine. Proizvodnju alginata kontrolisao je mali broj zapadnih kompanija (Kelco, Protan & Fagertun i Mero-Rousselot-Satia), ali ovo se poslednjih godina drastično promenilo.

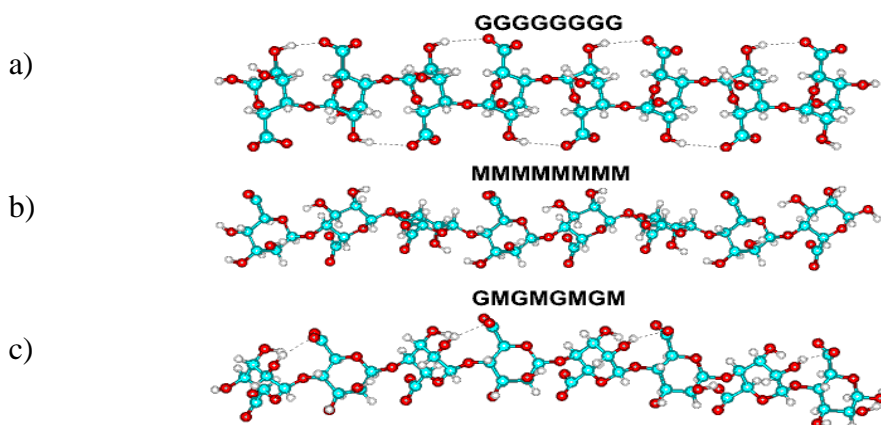
1.2.1. Hemijska struktura alginata



Slika 1.3. Struktura natrijum alginata (G – guluronska kiselina; M – manuronska kiselina)

Alginati su linearni polisaharidi rastvorni u vodi i sastoje se od ostataka β -D-manuronske (M) i α -L-guluronske kiseline (G), koji su međusobno povezani 1,4-glikozidnim vezama (slika 1.3). U strukturi polimera postoje blokovi alternirajućih kopolimera (GMGMGM) i homopolimera (GGGGG i MMMMM) (slika 1.4) (Nedović 1999, Donati i Paoletti 2009, Manojlović i sar. 2006).

Geometrije oblasti, u kojima su G-blokovi i onih u kojima su M-blokovi, bitno su različite usled specifičnog oblika monomera i njihovog načina vezivanja u polimer. Tako su G-blokovi uvrnuti, a M-blokovi imaju oblik istegnute trake. Između homopolimernih M- i G- blokova nalaze se oblasti u kojima se javljaju alternirajući M- i G-blokovi. Ne postoji određeno pravilo po kome se monomerne jedinice vezuju u alginatu. Sastav i veličina pojedinih blokova kao i ukupna molarna masa određuju fizička svojstva alginata (Nedović 1999; Donati i Paoletti 2009). Struktura segmenata se može odrediti tehnikom nuklearne magnetne rezonance (NMR).



Slika 1.4. Blokovi homopolimera (a,b) i alternirajućih kopolimera (c)

Rastvaranjem alginata u vodi dobija se viskozni rastvor, a viskoznost raste sa porastom dužine alginatnih molekula, odnosno broja monomernih jedinica (Donati i Paoletti 2009). Nakon rastvaranja alginata u vodi, molekuli počinju da hidratišu i rastvor postaje viskozozan. Za hidratizane i rastvorene molekule karakteristično je intramolekulsko elektrostatičko odbijanje između susednih negativnih naelektrisanja koje dovodi do širenja lanaca. Lanci poseduju određenu fleksibilnost, ali je njihova rotacija sprečena na glikozidnoj vezi što rezultuje očvršćavanjem lanca. Ova karakteristična nefleksibilnost alginatnih molekula u rastvoru zavisi od strukture segmenata i raste po redosledu $MG < MM < GG$. Rastvori čvrstih makromolekula biće vrlo viskozni, upravo zahvaljujući očvršćavanju lanaca. Duži makromolekulski lanci daće viskoznije rastvore u odnosu na kraće pri istim koncentracijama alginata (Manojlović 2008).

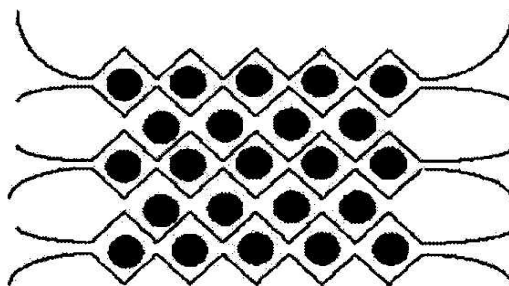
Molekulska struktura lanaca alginata, a takođe i njegove viskozne karakteristike zavise od celokupnog jonskog okruženja. Pošto je alginat takođe polielektrolit, elektrostatičko odbijanje između naelektrisanih grupa na polimernom lancu u prisustvu jona, povećaće njegovu viskoznost. Pri većim koncentracijama jona, alginatni molekuli mogu da se talože, što rezultira smanjenjem viskoznosti.

1.2.2. Interakcije alginata sa katjonima i mehanizam formiranja gela

Geliranje alginata može da se izvede pod vrlo blagim uslovima i upotrebom netoksičnih reaktanata. Proces geliranja zavisi od koncentracije alginata i koncentracije gelirajućih jona. Alginati pokazuju veliki afinitet prema katjonima. Afinitet opada u

nizu: $Pb^{2+} > Cu^{2+} = Ba^{2+} > Sr^{2+} > Cd^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$ (Smidsrod i Skjak Braek 1990). Za geliranje se najčešće koriste dvovalentni katjoni, kao što je Ca^{2+} .

Mikrosfere se mogu dobiti ako se rastvor natrijum-alginata sa aktivnom komponentom, dodaje kap po kap u rastvor dvovalentnog sredstva za umrežavanje. Jednovalentni katjoni i Mg^{2+} ne dovode do obrazovanja gela. Umrežavanje se odvija razmenom jona natrijuma sa dvovalentnim katjonima i obrazovanjem specifičnih struktura između guluronskih grupa, tzv. kutija za jaja (*egg-box*). Grant i saradnici (1973) su uveli pojam modela *egg-box* koji se i danas koristi za opisivanje specifičnih interakcija između dvovalentnih katjona i polisaharidnih lanaca, a te interakcije dovode do čvrste kohezije između lanaca i stvaranja čvrste gel strukture. Po ovom modelu se dva ili više poliuronatnih lanaca međusobno vezuju stvarajući šupljine poput onih u kutiji za jaja za smeštanje dvovalentnih katjona. Na slici 1.5. je prikazan dvodimenzionalni model, a međusobno povezani lanci u jednoj ravni mogu stvarati i prostorne agregate vezujući lance i u trećoj dimenziji (Manojlović, 2008).



Slika 1.5. *Egg-box* model. Crni krugovi predstavljaju Ca^{2+} jone smeštene između susednih ostataka guluronske kiseline (konture u V obliku), dok su susedni ostaci manuronske kiseline prikazani kao krive na krajevima *egg-box*-a.

Kalcijum reaguje sa α -L-guluronskim blokovima i umreženi blok može biti sastavljen od više od 20 monomernih ostataka. Alginati se najčešće koriste kao gelovi ili sfere u koje se ugrađuju aktivne komponente. Ovi gelovi su po svojstvima slični čvrstim materijama (zadržavaju oblik pri dejstvu napona), ali se sastoje od 99-99.5% vode. Kada je količina kalcijuma u gelu mala, ovi gelovi nisu trajni, odnosno nastaju vrlo viskozni tiksotropni rastvori. U slučaju da se unese više kalcijuma dolazi do obrazovanja trajnih mreža. Ispitivanja su pokazala da katjon ima veliki uticaj na

svojstva gela kao što su: poroznost, bubrenje, stabilnost, jačina gela, biodegradabilnost i biokompatibilnost.

Alginati mogu da se talože ili formiraju gelove u kiselj sredini. pKa vrednosti za manuronsku i guluronsku kiselinu su 3.38 i 3.65, što kao rezultat daje da su alginati polianjoni pri neutralnoj pH vrednosti. U farmaceutskoj primeni, promena rastvornog alginata u nerastvornu alginatnu kiselinu pri niskoj pH vrednosti je osobina koja se koristi kao anti-refluks lek, jer dolazi do formiranja sloja alginatne kiseline preko stomalnog sadržaja. Jedinstvenost primene alginata kao sredstva za imobilizaciju u biomedicini zasniva se na osobini alginata da formira gelove koji su stabilni na temperaturama koje odgovaraju fiziološkoj sredini. Najviše se koriste kalcijumovi alginatni gelovi, mada alginat formira gelove i sa većinom dvo- i više-valentnih katjona. Monovalentni katjoni i magnezijumovi joni ne izazivaju stvaranje alginatnih gelova dok joni kao Ba^{2+} i Sr^{2+} stvaraju gelova veće jačine od kalcijum-alginatnih gelova.

Dok traje proces geliranja alginatne čestice, površina između alginatnog rastvora i gela može da se posmatra pod svetlosnim mikroskopom. Brzina geliranja se najpre smanjuje, a zatim ubrzava u blizini centra čestice. Brzina geliranja je približno 100 $\mu\text{m}/\text{min}$ u 50 mM CaCl_2 , što znači da se čestica prečnika oko 500 μm izgelira za 2.5 min. Ovo je približno brzina slobodne difuzije kalcijumovih jona.

1.2.3. Karakteristike alginatnih čestica

Alginatne čestice se dobijaju u rasponu veličina od 100 μm do 3 mm. U zavisnosti od načina formiranja čestica i od tehnike imobilizacije koja se primenjuje, aktivne komponente su manje ili više slučajno raspoređene unutar nosača. Tokom procesa dobijanja gela dolazi do kontrakcije čestica pri čemu dolazi do pojave dva efekta. Prvi je da se smanjuje sadržaj vode i povećava koncentracija alginata u odnosu na početnu koncentraciju u suspenziji, a drugi je da dolazi do relativnog povećanja koncentracije aktivne komponente u matrici alginata. Ova kontrakcija se najviše uočava kod čestica sa malim sadržajem GG segmenata u alginatu (Manojlović i sar. 2006).

Mehanička otpornost čestica gela zavisi od sastava alginata. Najbolju mehaničku otpornost su pokazale alginatne čestice kod kojih je sadržaj α -L-guluronske kiseline viši od 70% i kod kojih je srednja dužina GG segmenata oko 15 jedinica povezanih monomera.

Pri imobilizaciji ćelija u alginatnom nosaču, treba imati u vidu neke kritične parametre kao što su: koncentracija alginata, raspodela molekulske mase alginata, struktura alginata i raspodela M/G segmenata, prisustvo nečistoća, koncentracija biološkog materijala (biološki aktivnih molekula), željena veličina čestica, koncentracija gelirajućih jona, koncentracija negelirajućih jona i gelirajućih komponenata (Martinsen i sar. 1989).

Alginat, kao nosač aktivnih komponenti, ima i svojih nedostataka. Osnovni nedostatak je njegova smanjena hemijska stabilnost u prisustvu pojedinih jedinjenja koja učestvuju u formiranju helatnih kompleksa (Thu i sar. 1996). Tako je Ca-alginatni gel osetljiv i hemijski nestabilan u prisustvu fosfata, citrata i laktata, kao i u prisustvu katjona Na^+ i Mg^{2+} koji deluju antigelirajuće. Najlakši način da se prevaziđe ovaj nedostatak je da se alginatne čestice drže u medijumu koji sadrži Ca^{2+} jone u višku i u kome je odnos između jona Na^+ i Ca^{2+} manji od 25:1 u alginatu sa visokim sadržajem GG segmenata, odnosno manji od 3:1 u alginatu sa niskim sadržajem GG segmenata (Thu i sar. 1996). Druga mogućnost da se postigne hemijska stabilnost alginatnih čestica je da Ca^{2+} joni budu zamenjeni dvovalentnim katjonima koji imaju veći afinitet prema alginatu, a koji nisu toksični, kao na primer Ba^{2+} i Sr^{2+} . Međutim, nedavna istraživanja su pokazala da otpuštanje barijuma iz gela može negativno uticati na ćelije i da se najveća biokompatibilnost čestica postiže korišćenjem stroncijuma kao gelirajućeg jona. Treća mogućnost stabilizacije kalcijum alginata je dodavanje viševalentnih katjona kao što su Ti^{3+} , Al^{3+} i Fe^{3+} (Thu i sar. 1996).

Osetljivost alginatnih gelova na antigelirajuće komponente koristi se u svrhe rastvaranja gela i "oslobađanja" aktivnih komponenti. Za alginatne gelove obično se koriste rastvarači kao što su citrat ili EDTA. U svrhu stabilizacije gela i smanjenja njegove poroznosti koriste se polikatjoni kao hitozan, polipeptidi i sintetički polimeri, koji sa alginatima formiraju komplekse koji nisu osetljivi na prisustvo fosfata, citrata, laktata i "antigelirajućih" katjona.

Jedno od potencijalnih ograničenja pri korišćenju alginata je njegovo nekontrolisano i nepredviđeno rastvaranje, koje se manifestuje otkidanjem dvovalentnih katjona u okolni medijum. Potreba da se poboljšaju osobine alginatnih čestica dovela je do razvoja tehnika inkapsulacije odnosno oblaganja čestica alginata membranom.

Inkapsulirane čestice su jače od neinkapsuliranih čestica u primeni *in vivo*, a materijal koji se koristi za omotač čestice može se primeniti i za smanjenje poroznosti gela (Huguet i Dellacherie, 1996.). Alginati formiraju jake komplekse sa katjonima kao što su hitozan ili polipeptidi (npr. poli-L-lizin ili poliornitin) ili sintetički polimeri (polietilenamin), što se koristi u cilju stabilizacije gela. Ovi katjonski kompleksi čine čestice stabilnim u prisustvu "antigelirajućih" katjona ili kalcijum helatora. Dodavanjem antigelerajućih sredstava (citrata ili EDTA) inkapsuliranim česticama, dolazi do rastvaranja alginatnog jezgra u kapsuli. Ovakvo nastaje polianjonski-polikatjonski kompleks koji se ponaša kao semipermeabilna membrana sa imobilisanim ćelijama unutar tečnog jezgra. Ovakav postupak može da ošteti neke mikrokapsule, ali daje nešto veću mehaničku otpornost mikrokapsulama i veći unutrašnji osmotski pritisak.

1.2.4. Difuzione karakteristike i poroznost gela

Difuzione karakteristike alginatnih čestica, veličina njihovih pora i raspodela pora gela bitne su kada se alginat koristi za inkapsulaciju aktivnih komponenti. Ova svojstva utiču na zadržavanje i kinetiku otpuštanja aktivne komponente kao i na brzinu prenosa molekula iz spoljašnje sredine kroz matricu gela. Pore alginatnih čestica imaju dimenzije od nekoliko nanometara pa do 200 nm (Smidsrod i Skjaek-Braek, 1990). Njihova veličina zavisi od koncentracije alginata, hemijske strukture gela i kinetike formiranja gela (Willaert i sar. 1996).

Brzina difuzije zavisi od veličine pora i koncentracije alginata. Zapaženo je da su najveće brzine difuzije proteina u alginatima sa visokim procentom G segmenata (Willaert i sar. 2008). Homogenost čestica, odnosno kinetika formiranja gela imaju veliki uticaj na poroznost čestica i difuzione karakteristike. U homogenim česticama fluks proteina je veći nego u nehomogenim, u kojima je alginat koncentrovan na površini čestice. Brzina difuzije niskomolekularnih jedinjenja kroz alginatnu matricu je manja od brzine difuzije ovih jedinjenja kroz vodu (brzine difuzije molekula glukoze ili etanola iznose oko 90 % brzine difuzije ovih molekula u vodi), dok je difuzija visokomolekularnih jedinjenja jako usporena, ali ne i neizvodljiva. Do usporavanja difuzije dolazi zbog toga što matrica polimera smanjuje raspoloživu zapreminu za odvijanje difuzije, a nepropusni segmenti molekula polimera povećavaju dužinu puta za difuziju određenog supstrata. Sa porastom koncentracije alginata opada koeficijent

difuzije molekula. U zavisnosti od brzine pritanja hranljivih komponenti iz medijuma i brzine kojom ih imobilisane ćelije troše, moguće su sledeće situacije:

- ukoliko se reakcija na nivou ćelija u površinskim i unutrašnjim slojevima nosača odvija većom brzinom od one kojom nutrijenti pritiču, u okolini ćelija se formira zona osiromašena hranljivim materijama, a proces je kontrolisan brzinom transporta nutrijenata;
- ukoliko je brzina difuzije nutrijenata veća od brzine kojom ih ćelije troše, proces je kinetički kontrolisan, odnosno brzinu procesa određuje brzina enzimske reakcije ćelija.

1.2.5. Primena alginata

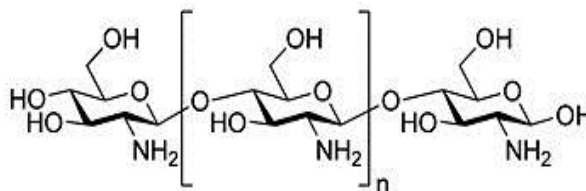
Još 1964. godine Čeng je predložio da se izvrši zamena proizvoda ćelija koji su nestali usled različitih bolesti, pomoću imobilisanih enzima i ćelija i ova mogućnost se sve više primenjivala sa sve većim saznanjima o bolestima prouzrokovanim nemogućnosti tela da proizvede neophodne molekule, kao što su faktori rasta, enzimi i hormoni. Čestice alginata se koriste i za implantaciju, kao i za inkapsulaciju lekova i nutrijenata. Alginat je ispitivan i kao nosač ćelija različitih tkiva uključujući i hondrocite u oblasti inženjerstva strukturalnih integrisanih tkiva. Mogućnost da se ubrizga na minimalno invazivan način u tkiva, čini ga vrlo atraktivnim u procesu inkapsulacije i imobilizacije u oblasti biomedicine. Često je korišćen u istraživanjima koja se sprovode u cilju dobijanja veštačkih organa i u cilju ispitivanja mogućnosti njegove primene u lečenju različitih bolesti, kao Parkinsonova bolest, hronična oboljenja, bolesti jetre i hipokalcemija. Verovatno je najpoznatiji primer potencijalne primene alginata u medicinske svrhe njegovo korišćenje za imobilizaciju ćelija Langerhansovih ostrvca u lečenju diabetesa tipa A. Danas se alginat istražuje kao nosač za imobilisanje živih ćelija u oblasti biomedicine za potencijalno lečenje mnogih oboljenja, kao što su: regulacija insulina pri lečenju diabetesa lečenje hemofilije B, regulisanje faktora rasta u lečenju bolesti patuljastog rasta, lečenje bolesti bubrega, lečenje bolesti jetre, lečenje Parkinsonove bolesti, lečenje paratiroidne žlezde, lečenje hroničnih upala, lečenje kancera mozga, regeneracija koštanog i hrskavičavog tkiva, regeneracija nerava, lečenje uretralnog refluks, ispitivanje angiogeneze tumora (Melvik i Dornish, 2004).

1.3. Hitozan

Hitozan je ugljeni hidrat, koji se izoluje iz školjki morskih račića i drugih morskih ljuskara, kao što je *Pandalus borealis* (slika 1.6).



Slika 1.6. *Pandalus borealis*



Slika 1.7. Strukturna formula hitozana

1.3.1. Hemijska struktura hitozana

Hitozan je linearni polisaharid, izgrađen od nasumice raspoređenih D-glukozamina (deacetilovana jedinica) i N-acetil-D-glukozamina (acetilovana jedinica), koji su međusobno povezani β -(1 \rightarrow 4) glikozidnom vezom (slika 1.7).

Hitozan se komercijalno proizvodi deacetilovanjem hitina, koji je strukturni element egzoskeletona ljuskara (kraba, račića, itd.) i ćelijskog zida gljiva. Stepenn deacetilovanja može biti određen NMR spektroskopijom. Kod komercijalnih hitozana taj procenat iznosi u opsegu od 60-100 %. Ima brojne komercijalne i moguće biomedicinske primene.

1.3.2. Primena hitozana

U poljoprivredi, hitozan se primarno koristi kao prirodni tretman za semena i poboljšanje rasta biljaka. Pored toga, hitozan podstiče fotosintezu, stimuliše apsorpciju nutrijenata, podstiče klijanje i nicanje biljaka, i omogućava jedrinu biljaka. Takođe, hitozan predstavlja ekološki prihvatljiv biopesticid, koji potpomaže urođenu sposobnost biljaka da se samostalno štite od gljivičnih infekcija.

Pored upotrebe u poljoprivredi, hitozan se koristi u procesu prerade vode, kao deo filtracionog procesa. Hitozan prouzrokuje slepljivanje finih sedimentnih čestica koje se potom uklanjaju tokom filtracije peskom. Hitozan takođe služi za uklanjanje fosfora,

teških metala i ulja iz vode. Filtracijom peskom uklanja se oko 50% nečistoća, dok hitozan u kombinaciji sa filtracijom peskom uklanja oko 99% nečistoća.

Biomedicinska primena hitozana je veoma široka. Svojstva hitozana omogućavaju brzo zgrušavanje krvi, i sve više se koristi u bandažiranju, jer veoma brzo zaustavlja krvarenje, i u poređenju sa standardnim metodama previjanja rana gazom, smanjuje gubitak krvi i povećava procenat preživljavanja pacijenata. Koriste ga vojske SAD i Velike Britanije na ratištima Iraka i Avganistana. Hitozan je hipoalergen i ima prirodna antibakterijska svojstva, što ga čini još pogodnijim za primenu u bandažiranju.

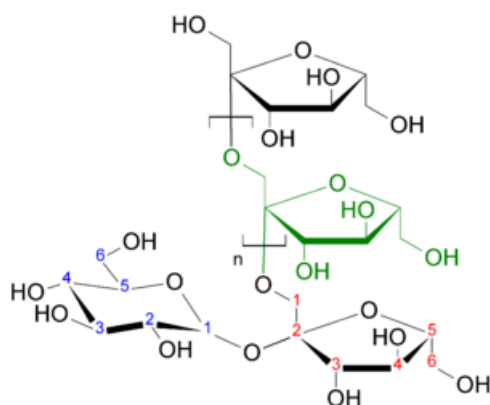
Takođe, hitozan se zbog svojih svojstava sve više koristi u sistemima za kontrolisano otpuštanje. Amino grupa hitozana ima pKa vrednost ~6,5, što hitozan čini pozitivno naelektrisanim i rastvorljivim u kiselim do neutralnim sredinama. Ovo hitozanu daje svojstva bioadhezivnosti i omogućava vezivanje za negativno naelektrisane površine, kao što su mukozne membrane. Hitozan poboljšava transport polarnih lekova preko epitelijalnih površina. Bitna svojstva hitozana su i njegova biokompatibilnost i biodegradabilnost.

1.4. Inulin

Inulin pripada grupi prirodnih polisaharida, koje proizvode različite vrste biljaka iz reda *Compositae*, kao što su maslačak, georgina, dalija, cikorija, itd. U nekim biljkama inulin služi kao rezervoar energije, i obično se nalazi u korenu ili rizomu biljke. Većina biljaka koje sintetišu i skladište inulin, ne poseduju druge rezervne materije, kao što je skrob.

1.4.1. Hemijska struktura inulina

Inulin pripada klasi polifruktozana.



Slika 1.8. Strukturna formula inulina

Inulin je heteropolisaharid, izgrađen uglavnom od monosaharidnih jedinica D-fruktoze, a u poslednje vreme je konstantovano da osim fruktoze sadrži i D-glukozu. Prema tome, osnovni polisaharidni niz inulina je polifruktozan, koji je nastao uspostavljanjem β -(2 \rightarrow 1) glikozidnih veza, dok su ostaci D-glukoze vezani na krajevima niza (slika 1.8). Utvrđeno je da inulin ima nizak stepen polimerizacije (manji od 10), i da njegov makromolekulski niz sadrži svega 30-35 monosaharidnih jedinica.

1.4.2. Primena inulina

Inulin se sve više koristi u prehrambenoj industriji, jer ima veoma adaptibilne karakteristike. Njegov ukus ide od neutralno do blago slatkog (približno 10% slatkoće šećera/saharoze). Može se koristiti kao zamena za šećer, masti i brašno. Ovo je posebno značajno, jer inulin sadrži četvrtinu do trećinu hranljivih sastojaka šećera i drugih ugljenih hidrata, i devetinu do šestinu hranljivih sastojaka masti. Takođe, inulin ima i pozitivna dejstva na zdravlje. On povećava apsorpciju kalcijuma i magnezijuma, i pospešuje rast intestinalnih bakterija. Inulin se često kategorizuje kao probiotik, jer se smatra formom rastvorljivih vlakana. U skladu sa ograničenjima ljudskog organizma da obradi polisaharide, inulin minimalno utiče na povećanje nivoa šećera u krvi, i za razliku od fruktoze, ne povećava nivo triglicerida, što ga čini generalno prihvatljivim za dijabetičare.

Inulin se takođe koristi u medicinske svrhe, u cilju merenja ukupne količine ekstracelularne zapremine, i određivanja funkcije bubrega.

Inulin zadovoljava GRAS standard (Generally Recognized As Safe), po principima FDA (U.S. Food and Drug Administration).

1.5. Inkapsulacija

Budući da potrošači preferiraju prehrambene proizvode koji su ukusni, zdravi i praktični za konzumaciju, inkapsulacija kao proces imobilizacije aktivnih komponenata u kapsule, jedan je od praktičnih načina ostvarivanja tih zahteva potrošača. Mikroinkapsulacija se već duži niz godina primenjuje u prehrambenoj tehnologiji, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, kao i biotehnologiji i medicini za imobilizaciju ćelija, enzima i drugih aktivnih molekula. U prehrambene svrhe, primenom ove tehnologije može se ostvariti diferencijacija ukusa i arome, maskirati loše ili nepoželjne sastojke arome, stabilizovati prehrambeni sastojci i/ili povećati bioraspoloživost pojedinih sastojaka (Gouin, 2004, Zuidam i Shimoni, 2010, Fiore i sar. 2012). Metoda inkapsulacije podrazumeva smeštanje živih ćelija ili molekula unutar mikročestica obloženih polupropusnom membranom, pri čemu veličina nastalih mikročestica iznosi od nekoliko nanometara do nekoliko milimetara. Za proizvodnju mikročestica mogu se koristiti različite metode, a izbor metode zavisi od vrste materijala jezgra i omotača, kao i od konačne primene mikročestica. Supstanca koja se inkapsulira naziva se jezgro, aktivna supstanca, punjenje ili interna faza. Supstanca u koju se vrši inkapsulacija može se nazvati „coating“, membrana, ljuska, nosač, eksterna faza ili matriks. Nosač za inkapsulaciju koji se koristi u prehrambene svrhe mora biti prikladan za tu svrhu (“food grade”). Imobilizacija ćelija i biološki aktivnih materija omogućava poboljšanje njihovih karakteristika, stabilnosti kao i razvoj komercijalnih proizvoda. Primjenjuje se gde god se koriste biološki aktivne komponente, kao što su nutritivni sastojci, enzimi, citokini, hormoni rasta, mikroorganizmi (npr. probiotici), kao i pri transplantaciji ćelija u kliničkoj praksi, a takođe i za potrebe transporta i kontrolisanog otpuštanja aktivnih komponenti u cilju povećanja njihove efikasnosti.

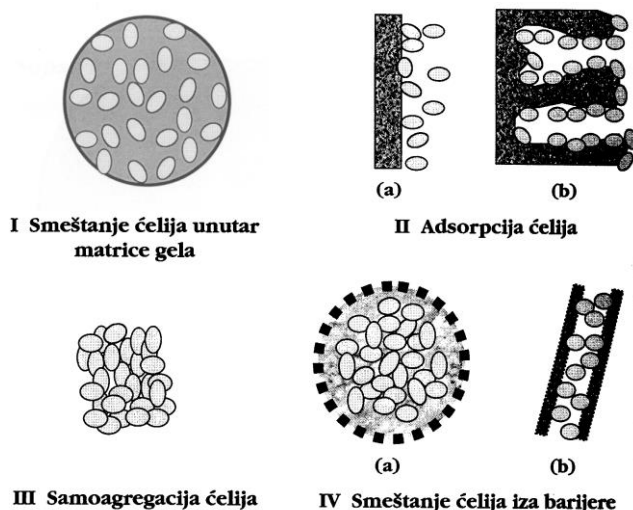
Prednosti primene mikroinkapsuliranih sastojaka u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji su (Zuidam i Shimoni, 2010):

- praktičnije rukovanje aktivnim sastojkom (npr. konverzija aktivnog sastojka u tečnom stanju u prah koji ima bolja svojstva tečenja i neutralniji miris),
- imobilizacija aktivnog sastojka u sistemima procesiranja prehrambenih proizvoda,

- poboljšana stabilnost u konačnom proizvodu i tokom procesiranja (npr. manje isparavanja materija arome kao aktivnog sastojka i/ili smanjena degradacija ili interakcija s ostalim sastojcima proizvoda),
- poboljšana sigurnost (npr. smanjena zapaljivost isparljivih materija),
- mogućnost stvaranja vizuelnih i teksturalnih efekata,
- mogućnost prilagođavanja svojstava aktivne materije (veličina čestica, struktura, topljivost u vodi ili ulju, boja),
- maskiranje nepoželjnih ukusa,
- kontrolisano otpuštanje.

Opsežna istraživanja koja se sprovode poslednjih decenija pružila su mnoštvo opcija za imobilizaciju aktivnih komponenti, a sve metode imobilizacije mogu se svrstati u četiri osnovne grupe (slika 1.9):

- smeštanje aktivne komponente unutar matrice polimernog nosača;
- adsorpcija aktivne komponente;
- samoagregacija aktivne komponente;
- smeštanje aktivne komponente u ili iza barijere.



Slika 1.9. Metode imobilizacije ćelija

1.5.1. Definicija i podela tehnika inkapsulacije

Inkapsulacija se može definisati kao proces kojim se jedna materija imobilizuje unutar druge materije i na taj način se proizvode čestice veličine od nekoliko nm do nekoliko mm. Razlikuju se dve vrste mikročestica: akumulacijski tip i matrični tip. Akumulacijski tip oko aktivne materije ima ljusku odnosno čauru, pa se još naziva i kapsula. Primena pritiska rezultuje lomom ovog tipa kapsula i posledično ispuštanjem njihovog sadržaja. Takođe, postoji i poliježgreni tip kapsula s nekoliko akumulacijskih komora unutar kapsule. U matričnom tipu kapsula aktivni je sastojak puno intenzivnije raspršen u materijalu nosača i može biti u obliku vrlo malih kapljica ili homogeno raspodeljen unutar kapsule. Za razliku od akumulacijskog tipa, aktivna materija u matričnom tipu kapsule prisutna je i na površini kapsule (osim ukoliko nemaju dodatan omotač).

Kapsule mogu biti sferičnog oblika, ali isto tako mogu poprimiti cilindrični, ovalni ili nepravilni oblik. Inkapsulirane materije takođe se mogu razlikovati i podeliti prema veličini kapsula, npr. na nanočestice, mikrokapsule, mikrorezervoare itd.

1.5.2. Postupci za dobijanje čestica gela sa imobilisanom aktivnom komponentom

Za dobijanje sfernih, polimernih čestica sa imobilisanom aktivnom komponentom koristi se više različitih ekstruzionih postupaka.

• Metoda ukapavanja

Metoda jednostavnog ukapavanja suspenzije u rastvor za geliranje se najčešće koristi za dobijanje čestica u laboratorijskim uslovima. Metoda se zasniva na potiskivanju suspenzije ćelije i polimera kroz iglu određenog prečnika, sa čijeg vrha se pod uticajem gravitacione sile odvajaju kapljice suspenzije i padaju u rastvor gde dolazi do želiranja i nastajanja čestica gela (slika 1.10.a). Metodom ukapavanja dobijaju se prečnici čestica od 2 do 3 mm, i ne mogu se postići veliki kapaciteti proizvodnje.

• Metoda ukapavanja uz dejstvo sekundarnog toka vazduha

Metoda ukapavanja se može poboljšati uvođenjem sekundarnog toka vazduha u nivou otvora igle da bi se dobile sitnije čestice (slika 1.10.b). Veličina čestica dobijenih ovim sistemom zavisi od koncentracije i viskoznosti alginata, prečnika igle, rastojanja

između vrha igle i rastvora za želiranje, brzine protoka suspenzije, brzine protoka vazduha. Na ovaj način mogu se dobiti čestice prečnika u rasponu od 0.2 do 3 mm. Problemi koji se javljaju pri uvećanju razmera ovog postupka su nemogućnost postizanja velikih kapaciteta, neujednačenost veličine čestica i česte opstrukcije, naročito pri korišćenju igala manjih prečnika i pri koncentracijama alginata većim od 1%.

- Vibraciona metoda

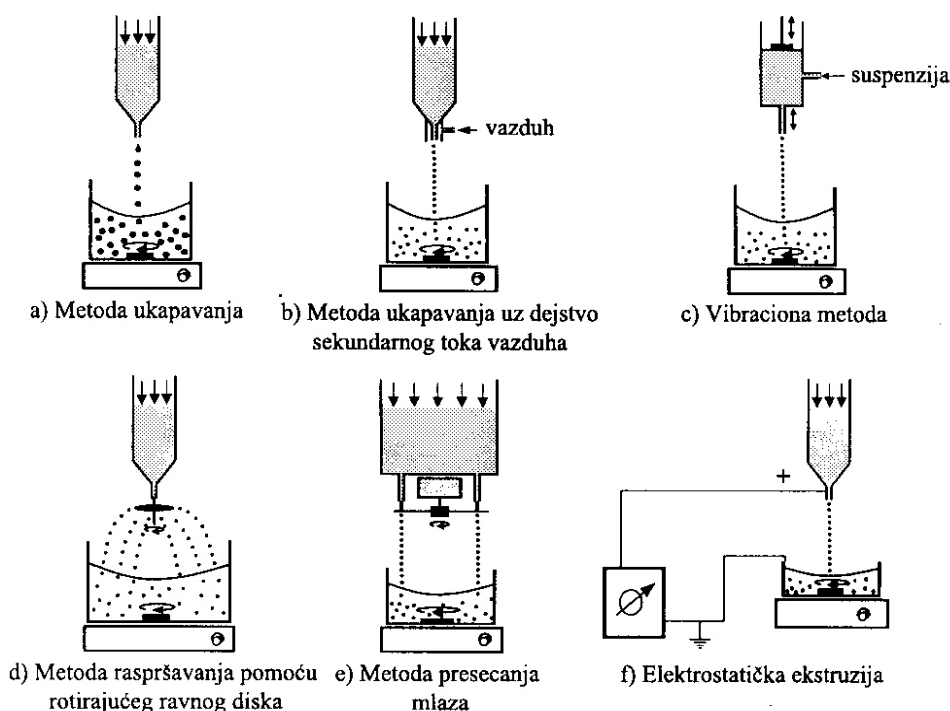
Vibraciona metoda se zasniva na propuštanju suspenzije polimera i ćelija u vidu mlaza, velikom brzinom, dok kapilara vibrira (osciluje), pri čemu oscilovanje kapilare dovodi do prekida mlaza i formiranja kapljica ujednačenih veličina (slika 1.10.c). Veličina čestica najviše zavisi od primenjene frekvencije i od brzine protoka mlaza tečnosti kroz kapilaru. Ovom metodom mogu da se dobiju sitne čestice (< 1 mm) uniformne raspodele, a uvećanjem razmera mogu se postići veliki kapaciteti.

- Metoda raspršivanja pomoću rotirajućeg ravnog diska

Za vrlo viskozne suspenzije pogodno je koristiti metodu raspršivanja pomoću diska, koja se zasniva se na dovođenju suspenzije alginata i ćelija putem šuplje cevi na površinu diska, koji rotira velikom brzinom. Rotirajući disk raspršuje suspenziju u sitne kapi koji padaju u rastvor za želiranje (slika 1.10.d). Prečnik čestica zavisi od brzine proticanja suspenzije, brzine rotiranja diska, prečnika diska i fizičkih karakteristika suspenzije.

- Metoda presecanja mlaza

Metoda presecanja mlaza se zasniva na korišćenju žice koja rotira velikom brzinom i preseca mlaz suspenzije, pri čemu se najpre formiraju segmenti cilindričnog oblika koji zatim dobijaju oblik sfernih čestica na putu ka rastvoru za želiranje (slika 1.10.e). Ovom metodom nastaju uniformne čestice, prečnika manjih od 1 mm, a metoda se može primeniti i za viskozne suspenzije polimera i ćelija, uz velike kapacitete.



Slika 1.10. Ekstruzione metode za dobijanje polimernih čestica sa imobilisanim biokatalizatorom (Nedović, 1999)

1.5.3. Elektrostatička ekstruzija

Elektrostatička ekstruzija je jedna od novijih metoda (Keshavartz i sar. 1992, Bugarski i sar. 1993). Koristi se za dobijanje izuzetno malih čestica (nekoliko stotina mikrona) uniformne raspodele (Bugarski i sar. 2006). Ova metoda se zasniva na ekstruziji suspenzije kroz iglu primenom elektrostatičkog polja i u sakupljanju kapi u rastvoru za geliranje. Uređaj za generisanje kapljica (ekstruder) i rastvor u kome se kapljice sakupljaju i očvršćavaju, povezuju se na generator napona pomoću elektroda (slika 1.11). Između elektroda se javlja elektrostatički potencijal koji indukuje određeno naelektrisanje na površini rastvora polimera. Ovo naelektrisanje smanjuje površinski napon rastvora polimera i dovodi do drastičnog smanjenja veličine čestica koje se otkidaju (Poncelet i sar. 1999, Manojlović, 2008, Kostić i sar. 2012, Manojlović i sar. 2006). Otkidanje polimera i generisanje većeg broja manjih kapljica dešava se na mestu gde je "vrat" najtanji. "Vrat" predstavlja suženje u obliku vlakna i veći je kod više viskoznih polimera. Dok glavni deo vlakna tečnosti brzo formira novu kap, izduženo tečno vlakno se razbija u veliki broj manjih kapi. Na ovaj način nastaju jedna veća kap i veći broj manjih kapi (Manojlović, 2008).



Slika 1.11. Elektrostatički ekstruder

Veličina dobijenih čestica zavisi od fizičkih karakteristika suspenzije, unutrašnjeg prečnika igle, rastojanja između elektroda i primenjenog napona (Nedović, 1999, Nedović i sar. 2001, Kostić i sar. 2012). Što je viskoznost rastvora veća, to je veći udeo malih kapi u ukupnoj raspodeli veličina kapi, pa su dobijene čestice manje uniformnosti. Primenom većih napona (iznad 6 kV) obrazuje se više manjih (satelitskih) kapi, jer je u ovom slučaju izraženije izduženje „vrata“ koje prethodi otkidanju kapi. Na ovaj način, u uslovima kontrolisanih procesnih parametara dobijene čestice mogu da budu od 6 do 10, pa i više puta manje u prečniku od čestica koje bi se dobile jednostavnim ekstruzionim postupkom bez primenjenog električnog potencijala.

Kada ekstruder nije priključen na generator napona, kap koja nastaje na vrhu igle raste sve do trenutka kada njena težina postaje veća od ukupne vertikalne komponente sile površinskog napona. U tom trenutku kap se odvaja i pada u rastvor za očvršćavanje. Zato su ovako nastale čestice većih dimenzija. Drugi nedostatak klasičnog procesa ekstruzije je, kako je u mnogim istraživanjima navedeno, mali kapacitet vodeno rastvornih komponenti (Moses i sar. 2000, Kulkarni i sar. 2000). Ovaj fenomen se može objasniti činjenicom da aktivna komponenta lako difunduje u rastvor za geliranje.

1.6. Lipozomi

Lipozomi su (fosfo)lipidne sferične mikro- ili nanočestice, koje spontano nastaju. To su dvoslojne koncentrične čestice, koje je otkrio Alek Bangham 1961. godine i prvo su se koristile za proučavanje bioloških membrana, a zatim su našle primenu u mnogim poljima nauke. Lipozomi se kao nosači lekova proučavaju od sedamdesetih godina prošlog veka, a budući da se uspešno mogu koristiti za inkapsulaciju lekova i za njihovo kontrolisano otpuštanje, postali su veoma popularna tema, koja je predmet mnogih istraživanja (Isailović i sar. 2013a, Kerdudo i sar. 2014, Peng i sar. 2014, Rashidinejad i sar. 2014, Pjanović, 2010).

1.6.1. Strukturne komponente lipozoma

Membrana lipozoma se sastoji iz lipida i najčešće su to amfoterni molekuli fosfolipida. Kao dodatna komponenta u sastavu membrane lipozoma često se nalazi holesterol. On ima ulogu da poboljša mehaničke osobine membrane, kao što su povećanje uređenosti i smanjenje permeabilnosti (Doshi i Mehta, 2011).

1.6.1.1. Lipidi

Lipidi su jedinjenja različitog sastava, po pravilu nerastvorna u vodi, a rastvorna u organskim rastvaračima. Molekuli lipida su veoma značajni u biološkim sistemima, jer čine osnovnu komponentu bioloških membrana i utiču na njihovu propustljivost, učestvuju u predaji nervnih impulsa, stvaraju kontakte među ćelijama, čine energetske rezerve, štite organizam od mehaničkih povreda i formiraju termoizolacioni sloj. Iz navedenog sledi da lipidi predstavljaju biomolekule, ali za razliku od drugih grupa biomolekula, oni ne čine jedinstvenu grupu i njihova struktura može značajno da varira. Lipidi su hidrofobni ili amfoterni molekuli. Amfoterna priroda nekih lipida dozvoljava formiranje specifičnih struktura u vodenoj sredini, kao što su micelle ili lipozomi.

Lipidi se dele na:

➤ **Proste** – supstance čiji se molekuli sastoje samo od ostatka masnih kiselina i alkohola (najčešće glicerola). Ovde spadaju: masti, ulja i voskovi.

➤ **Složene** – grupa jedinjenja koja obuhvata: fosfolipide (derivati fosforne kiseline), glikolipide (lipidi koji sadrže ostatke ugljenih hidrata) i steroide (sadrže ugljenički skelet ciklopentanoperhidrofenantrena).

Lipidi imaju četiri biološke uloge:

1. *Energetsku*

Energetska uloga lipida se ogleda u tome što se njihovim razlaganjem oslobađa velika količina energije. Skladište se u ćelijama masnog potkožnog tkiva, odakle se mogu prema potrebi organizma koristiti.

2. *Regulatornu*

Regulatornu ulogu imaju hormoni koji su steroidi. Steroidni hormoni čoveka su polni hormoni i hormoni kore nadbubrežne žlezde, dok su ostali hormoni uglavnom proteini ili derivati aminokiselina.

3. *Grativnu*

Grativna uloga se odnosi na to što se deo masti koristi za izgradnju i obnovu ćelija i njihovih delova. Najpoznatiji strukturni lipidi su:

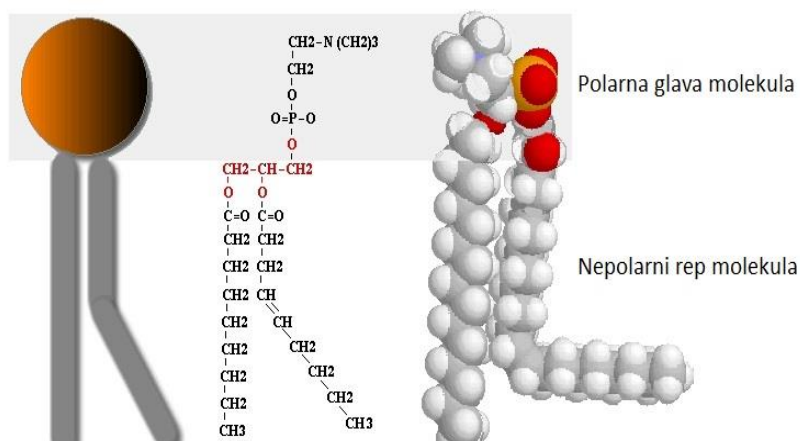
- Fosfolipidi – grade ćelijske membrane,
- Holesterol – pripada steroidima i ulazi u sastav ćelijskih membrana,
- Voskovi – obrazuju zaštitni sloj na koži, krznu, perju, lišću i plodovima biljaka.

4. *Zaštitnu*

Zaštitnu ulogu imaju masno tkivo koje okružuje bubrege i potkožni sloj masti koji predstavlja toplotni izolator.

1.6.1.2. Fosfolipidi

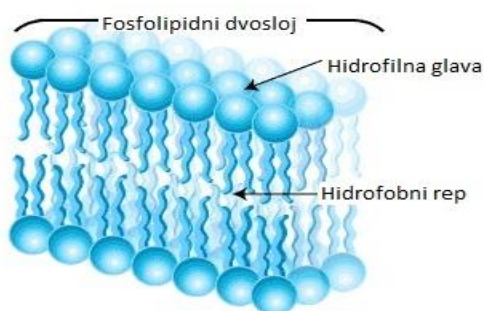
Fosfolipidi su klasa lipida i to druga po rasprostranjenosti u prirodi. Ova jedinjenja predstavljaju estere glicerola i masnih kiselina, ali za razliku od masti, u fosfolipidima je esterifikacija dve –OH grupe izvršena masnim kiselinama dok je esterifikacija treće (terminalne) –OH grupe izvršena fosfornom kiselinom.



Slika 1.12. Struktura molekula fosfolipida

Molekuli fosfolipida se sastoje od polarne fosfatne grupe – glava molekula i od nepolarnog para masnih kiselina – rep molekula. Ova dva dela molekula su povezana glicerolom. Budući da se na jednom molekulu nalaze polarna (hidrofilna) i nepolarna (hidrofobna) grupa, on pokazuje amfoterne osobine (slika 1.12). To znači da će u zavisnosti od karakteristika sredine u kojoj se molekuli fosfolipida nalaze, doći do njihovog različitog grupisanja.

Fosfolipidi se nalaze u membranama biljnih i životinjskih ćelija. Ćelijske membrane kod ljudi su uglavnom izgrađene od fosfolipida koji su uređeni u dva sloja – repovi fosfolipidnih molekula su okrenuti jedni prema drugima („unutra“), dok su glave molekula okrenute ka „spolja“ (slika 1.13).



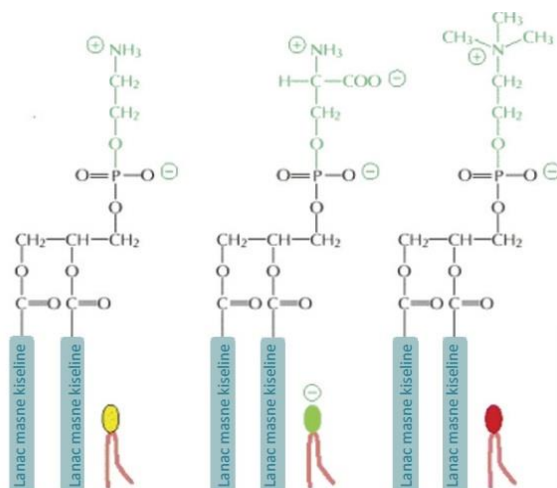
Slika 1.13. Fosfolipidni dvosloj

U fosfolipide spadaju fosfogliceridi i sfingolipidi (Pjanović, 2010).

Četiri najdominantnija fosfolipida u membranama ćelija sisara su: fosfatidilholin, sfingomielin, fosfatidilserin i fosfatidiletanolamin. Ova četiri fosfolipida čine više od 50% mase svih lipida u većini ćelijskih zidova (Pjanović, 2010).

Već je rečeno da molekuli fosfolipida obrazuju karakteristične strukture u zavisnosti od sredine u kojoj se nalaze. U prisustvu polarnih rastvarača, kao što je voda, polarni delovi molekula se orijentišu ka rastvaraču i na taj način štite nepolarne delove molekula. U slučaju da je koncentracija fosfolipida visoka, dobijaju se tečno-kristalne faze koje nakon dodavanja vode (razblaživanja) formiraju relativno stabilne koloidne čestice – lipozome, heksazome i kubozome (Pjanović, 2010).

Fosfolipid koji se najčešće koristi za pripremanje lipozoma jeste fosfatidilholin, koji se može dobiti iz prirodnih izvora, ali i sintetičkim putem. Pored fosfatidilholina (PC), fosfatidiletanolamin (PE) i fosfatidilserina (PS) su prirodni fosfolipidi koji se takođe koriste za dobijanje lipozoma (slika 1.14) (Doshi i Mehta, 2011).



Slika 1.14. Struktura fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina i fosfatidilholina

1.6.2. Metode dobijanja lipozoma

Sa porastom interesovanja za lipozome, razvijen je i veliki broj metoda za njihovo dobijanje. U zavisnosti od metode pripreme, isti tip lipozoma može imati različite osobine, kao što su stabilnost, permeabilnost i količina inkapsulirane supstance (Lasic, 1993).

Iako su lipozomi koloidne čestice koje spontano nastaju, pa se kao takve mogu naći u prirodi, oni se mogu dobiti i eksperimentalnim putem, u laboratoriji. Kada se fosfolipidi nalaze u vodenoj sredini doći će do stvaranja pomenutih dvoslojeva, a ako postoji dovoljna količina vode i još se primeni određeni pritisak ili vrši mešanje (dodatna mehanička energija), doći će do zatvaranja dvosloja u sferičnu česticu – lipozom. Membranu ove čestice čini fosfolipidni dvosloj (Pjanović, 2010).

Metode dobijanja lipozoma se, najuopštenije, mogu podeliti u dve grupe (Lasic, 1993):

- Metode pasivne inkapsulacije – kod ovih metoda se inkapsulacija, odnosno vezivanje aktivnih supstanci, vrši pre ili tokom postupka pripreme lipozoma. U ovu grupu spadaju i popularna metoda tankog filma (najstariji pristup) i prolipozomna metoda.

- Metode aktivne inkapsulacije – u ovom slučaju se zbog specifičnih osobina aktivnih supstanci njihovo „uvođenje“ u lipozome može vršiti nakon formiranja lipozomnih čestica.

Bez obzira na željeni sastav i veličinu, prvi korak u dobijanju lipozoma je formiranje tankog lipidnog filma. Nakon toga, primenjuju se različite metode za redukciju veličine čestica i one se mogu podeliti na:

- Ultrazvučnu metodu
- Metoda sušenja zamrzavanjem, pa rehidracija
- Reverzno-fazno isparavanje
- Iscrpljivanje površinski aktivnih materija
- Homogenizaciju pod visokim pritiskom.

Generalni postupak za dobijanje lipozoma se može podeliti na tri koraka (Pjanović, 2010):

- **Priprema fosfolipida za hidrataciju** – predstavlja rastvaranje fosfolipida u organskom rastvaraču kako bi se obezbedila homogena smeša lipida. Za rastvaranje se najčešće koristi hloroform ili smeša hloroforma i metanola. Prvo se lipidi rastvore, zatim sledi blago mešanje u cilju homogenizacije i na kraju uklanjanje rastvarača da bi

se dobio lipidni film. Rastvarač se uklanja isparavanjem pod vakuumom, na temperaturi fazne transformacije fosfolipida. U ovom stupnju se, pored fosfolipida, mogu dodati i druge supstance, kao što su holesterol, površinski aktivne materije i sl.

- **Hidratacija** – Hidratacija se vrši dodatkom željenog vodenog rastvora u pripremljene fosfolipide. Neophodno je intenzivno mešanje koje će obezbediti sitnije čestice i uniformnost dimenzija čestica. Tokom mešanja temperatura se mora održavati iznad temperature fazne transformacije fosfolipida.

- **Redukcija veličine čestica** – Nakon prve dve faze dobijaju se čestice veličine nekoliko mikrona kod kojih postoji više fosfolipidnih slojeva (multilamelarni lipozomi). U zavisnosti od potreba, veličina čestica se može redukovati tehnikama kao što su ekstruzija i soniciranje. Najčešće se redukcijom veličine čestica dobijaju unilamelarni lipozomi koji mogu biti različitih veličina (> 20 nm).

1.6.3. Klasifikacija lipozoma

Lipozomi se mogu klasifikovati na osnovu sledeća tri kriterijuma:

1. strukturni parametri,
2. metode dobijanja,
3. sastav membrane i primena lipozoma.

1. Na osnovu strukturnih parametara, razlikuju se sledeće klase lipozoma:

a) MLV – multilamelarne vezikule (prečnik $>0,5$ μm) se sastoje od velikog broja bliskih, koncentričnih lipidnih dvoslojeva,

b) OLV – oligolamelarne vezikule (0,1 – 1 μm) se sastoje od manjeg broja koncentričnih lipidnih dvoslojeva (2 – 10), sa većim međusobnim rastojanjem,

c) UV – unilamelarne vezikule čini jedan lipidni dvosloj koji okružuje vodeno jezgro. Prema veličini ove vezikule se dalje dele na:

- SUV – male unilamelarne vezikule (20 – 100 nm)
- MUV – srednje unilamelarne vezikule
- LUV – velike unilamelarne vezikule (>100 nm)

- GUV – džinovske unilamelarne vezikule ($>1 \mu\text{m}$)
 - d) MVV/MV – multivezikularne vezikule ($>1 \mu\text{m}$) karakteriše prisustvo većeg broja vezikula u okviru jednog lipidnog dvosloja, koje se nalaze jedna unutar druge, ali ne formiraju koncentričnu strukturu.

2. Na osnovu metode dobijanja lipozomi se dele na:

- a) REV – male unilamelarne ili oligolamelarne vezikule dobijene metodom reverzno-fazne evaporacije
- b) MLV – REV, multilamelarne vezikule dobijene metodom reverzno-fazne evaporacije
- c) SPLV – stabilne plurilamelarne vezikule
- d) FATMLV – smrznute i odmrznute MLV
- e) VET – vezikule nastale ekstruzijom
- f) DRV – vezikule dobijene metodom dehidracije-rehidracije.

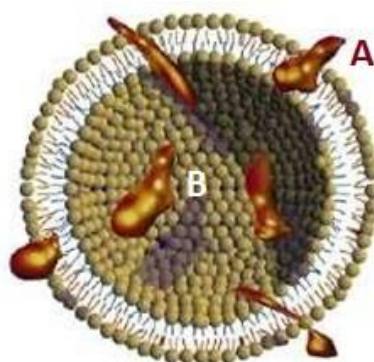
3. Lipozomi se na osnovu sastava membrane i primene klasifikuju u četiri grupe:

- a) Konvencionalni lipozomi – sastoje se samo od fosfolipida i/ili holesterola.
- b) Dugocirkulišući lipozomi („stealth“ lipozomi) – nova formulacija lipozoma koji opstaju duži period u krvi.
- c) Imunolipozomi – imaju specifična antitela ili njihove fragmente na površini što im pruža mogućnost boljeg vezivanja za ciljano mesto.
- d) Katjonski lipozomi – najnovija vrsta lipozoma koja služi za prenos genetičkog materijala.

1.6.4. Karakteristike lipozoma kao nosača aktivnih komponenti

Ponašanje lipozoma je veoma kompleksno i zavisi od sredine u kojoj se nalaze, od njihovih mehaničkih osobina i osobina njihove površine, koje su određene sastavom, veličinom i lamelarnošću (Lasic, 1993).

Među različitim sistemima za kontrolisano otpuštanje aktivnih komponenti koji se izučavaju, veliki je broj nosača leka tipa vezikula: mikrosfere, nanočestice, lipoproteini, micelarni sistemi i lipozomi. Ono što lipozome čini posebno pogodnim za inkapsulaciju aktivnih supstanci je njihova mogućnost da inkapsuliraju i hidrofobne i hidrofilne supstance, za šta je zaslužna fosfolipidna struktura njihove membrane. Hidrofobne (nepolarne) supstance se inkapsuliraju unutar membrane čestice, a hidrofilne (polarne) unutar jezgra lipozoma (slika 1.15).



Slika 1.15. Hidrofobne (A) i hidrofilne (B) aktivne supstance inkapsulirane u lipozomu

Još jedna prednost lipozoma je neškodljivost po imuni sistem, budući da su i ćelijske membrane kod ljudi sačinjene od fosfolipida. Takođe, korišćenjem lipozoma kao nosača, moguće je zaštititi određene organe (kao što su srce, bubrezi, mozak) od dejstva aktivne supstance koja se unosi u organizam, jer dolazi do drugačijeg transporta leka kroz organizam i zaobilaznja određenih tkiva.

Zbog specifičnosti lipozomnih čestica, moguće je transformisati njihove fizičko-hemijske, kao i strukturne karakteristike. Modifikacijom membrane lipozoma se čak može postići i vezivanje lipozoma za tačno određene ćelije u ljudskom organizmu (takozvani „inteligentni lipozomi“).

Osnovne karakteristike lipozoma kao nosača aktivnih supstanci su (Pjanović, 2010):

- koncentracija i sastav fosfolipida u membrani,
- raspodela veličine čestica,
- površinsko naelektrisanje i pH vrednost suspenzije lipozoma,

- stepen inkapsulacije aktivne komponente.

Aktivne supstance inkapsulirane u liposome, a posebno one koje se nalaze u vodenoj unutrašnjosti čestica, su zaštićene od spoljašnjih neželjenih uticaja i biodegradacije. U suštini, lipozomi predstavljaju mikrorezervoare aktivnih supstanci koje se postepeno otpuštaju iz njih. Čak i da se ne može obezbediti kontrolisana brzina otpuštanja aktivne supstance, oni će svakako obezbediti produženo otpuštanje, čime omogućavaju manju toksičnost leka i ređe uzimanje (Pjanović i sar. 2010, Isailović i sar. 2013). Lipozomi kao nosači aktivnih supstanci, mogu biti formulisani u vidu suspenzija, aerosola, gelova, krema i prahova.

1.6.5. Modifikacija membrane lipozoma

Na osnovu prethodno navedenih svojstava lipozoma, može se zaključiti da ono što ih izdvaja i čini izuzetno pogodnim nosačima lekova, jeste specifična struktura njihove membrane. Specifičnost se ogleda u tome što membranski sastav prvenstveno uslovljava netoksičnost, biodegradabilnost i lako spajanje lipozoma sa ćelijama, ali takođe otvara i širok spektar mogućnosti za njegovo transformisanje (Fadda i sar. 1998). Menjanjem sastava membrane može se:

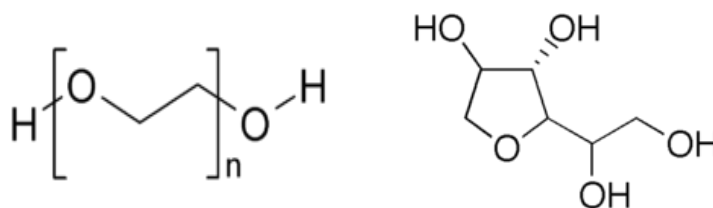
- omogućiti inkapsulacija različitih aktivnih supstanci,
- uticati na ponašanje lipozoma u organizmu – na brzinu difuzije aktivne supstance iz lipozoma, dužinu njenog zadržavanja u organizmu, mesto delovanja i sl.

Malim varijacijama sastava membrane mogu se postići potpuno različiti efekti. Upravo ova raznovrsnost predstavlja razlog velikog istraživačkog interesovanja za liposome (Marzio i sar. 2011, Immordino i sar. 2006, Pjanović i sar. 2010, Storm i Cromelin 1996).

Sastav membrane lipozoma će definisati i brzinu difuzije aktivne supstance iz čestice. Brzina difuzije zavisi od udela fosfolipida, drugih lipida, polimera ili nekih drugih supstanci, kao što su surfaktanti, koje (pored fosfolipida) takođe ulaze u sastav membrane. Da bi se tačno utvrdilo kolika će biti brzina difuzije i kako sastav membrane na nju utiče, moraju se sprovesti eksperimentalna ispitivanja kojima će se proučavati prenos mase iz lipozoma određenog sastava membrane (u *in vitro* i *in vivo* uslovima) (Pravić i sar. 2015).

1.6.5.1. Modifikacija membrane lipozoma polisorbatima

Polisorbati su klasa emulgatora koja se koristi u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Često se koriste i u kozmetici za rastvaranje esencijalnih ulja u proizvodima baziranim na vodi (Deo i Somasundaran, 2003, Helenius i sar. 1979, Wenk i sar. 1997). Ova jedinjenja nastaju kada se za sorbitan (derivat sorbitola) esterifikovan masnim kiselinama, kovalentnim vezama vežu polimerni lanci polioksietilena (POE) (slika 1.16). Uobičajeni komercijalni nazivi polisorbata su *Alkest*, *Canarcel* i *Tween*.



Slika 1.16. Strukturne formule polioksietilena (levo) i sorbitana (desno)

Budući da su polisorbati nejonske, površinski aktivne supstance sa građom koja podrazumeva postojanje hidrofilne (glava) i hidrofobne (rep) grupe u molekulu, oni deluju kao solubilizatori. U zavisnosti od toga da li je masna kiselina koja učestvuje u esterifikaciji sorbitana laurinska, palmitinska, stearinska ili oleinska, razlikuju se sledeći polisorbati:

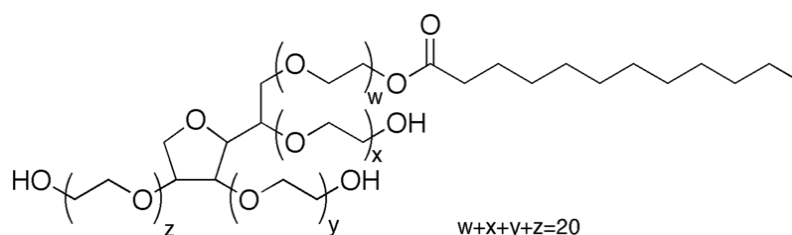
- Polisorbat 20 (polioksietilen (20) sorbitan monolaurat) – *Tween 20*
- Polisorbat 40 (polioksietilen (20) sorbitan monopalmitat) – *Tween 40*
- Polisorbat 60 (polioksietilen (20) sorbitan monostearat) – *Tween 60*
- Polisorbat 80 (polioksietilen (20) sorbitan monooleat) – *Tween 80*

Molekuli svih ovih jedinjenja sadrže po 20 oksietilenskih grupa, dok brojevi u nazivima upućuju na određenu masnu kiselinu koja ulazi u njihov sastav.

Ono što je zajedničko za sve polisorbate je da su biodegradibilni i netoksični po ljudski organizam u količinama do 25 mg/kg. Iako sva navedena jedinjenja ispoljavaju svojstva solubilizatora, razlike u ponašanju svakog od njih zavisice od masne kiseline koja ulazi u strukturu molekula.

Tween 20

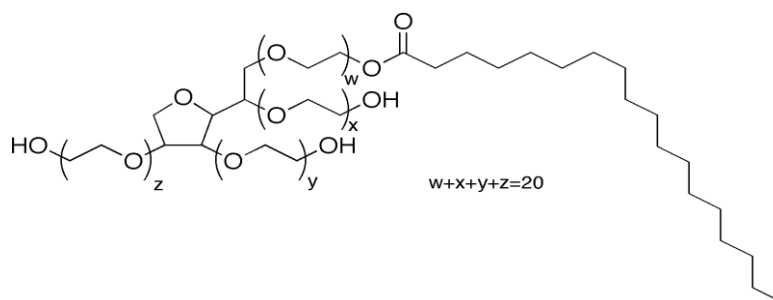
Polisorbat 20 ili *Tween 20* je površinski aktivna supstanca čija stabilnost i relativna netoksičnost otvaraju mogućnost za njegovu široku upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, biološkim tehnikama i nauci. Ovo jedinjenje je polioksietilenski derivat sorbitan monolaurata, tako da je u njegovoj strukturi prisutan alifatični zasićeni lanac od 12 C-atoma koji potiče od laurinske kiseline (slika 1.17). Na sobnoj temperaturi *Tween 20* je bistra, viskozna tečnost, žute do žuto-zelene boje.



Slika 1.17. Struktura Polisorbata 20 (*Tween 20*)

Tween 60

Polisorbat 60 ili *Tween 60* je svetlo-žuta do žuta veoma viskozna tečnost. Za razliku od Polisorbata 20, u strukturu ovog molekula ulazi nešto duži alifatični nezasićeni lanac (slika 1.18), budući da je esterifikacija sorbitana izvršena stearinskom masnom kiselinom (C18).

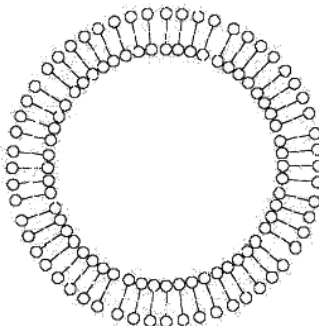


Slika 1.18. Struktura Polisorbata 60 (*Tween 60*)

Što se tiče primene, *Tween 60* se koristi kao emulgator u prehrambenoj industriji (prvenstveno pekarstvu i smrznutim desertima), farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima (šamponima, podlogama, kremama protiv starenja i sl).

Određene formulacije nejonskih površinski aktivnih supstanci se u poslednje vreme istražuju kao potencijalni nosači lekova u sistemima za kontrolisano otpuštanje. U

vodenim rastvorima nejonski amfoterni molekuli spontano obrazuju vezikule koje se nazivaju *niozomi* (slika 1.19). Ova vrsta vezikula se može upotrebiti za inkapsulaciju aktivnih supstanci, pri čemu se znatno usporava brzina njihovog otpuštanja.



Slika 1.19. Struktura niozoma

1.6.5.2. Modifikacija lipozomne membrane sorbitol estrima

Sorbitol estri (takođe poznati pod imenom *Span*) su lipofilne nejonske površinski aktivne materije koje se koriste kao emulgatori prilikom pripremanja emulzija, krema i masti u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Kada se koriste samostalno proizvode stabilne *voda-u-ulju* emulzije, ali veoma često se koriste zajedno sa polisorbitima u različitim proporcijama pri čemu se dobijaju *voda-u-ulju* ili *ulje-u-vodi* emulzije ili kreme sa različitom teksturom i konzistencijom. Sorbitol estri se takođe koriste kao emulgatori i stabilizatori u prehrambenoj industriji (Deo i Somasundaran, 2003, Tasi i sar. 2003).

Kao i polisorbiti, sadrže hidrofilnu glavu i hidrofobni rep. Ova jedinjenja nastaju esterifikacijom sorbitana (derivat sobitola) masnim kiselinama, pri čemu nema kovalentno vezanih polimernih lanaca polioksietilena (POE). U esterifikaciji sorbitana takođe mogu učestvovati različite masne kiseline kao što su laurinska, palmitinska, stearinska ili oleinska i u zavisnosti od vrste masne kiseline, razlikuju se sledeći estri:

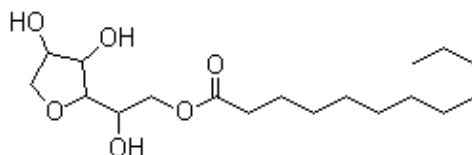
- Sorbitan monododekanoat (sorbitan monolaurat) - *Span 20*
- Sorbitan monopalmitat - *Span 40*
- Sorbitan monooktadekanoat (sorbitan monostearat) - *Span 60*
- Sorbitan monooleat - *Span 80*

Span 20

Sorbitan monolaurat je biodegradabilna površinski aktivna materija koja sadrži laurinsku kiselinu (slika 1.20). Veoma je efikasna kao emulgator za stabilizaciju emulzija tipa *voda-u-ulju*, naročito kada se koristi u kombinaciji sa polisorbitnim derivatom, *Tween 20*.

Takođe se koristi kao stabilizator, mazivo, sredstvo za sušenje u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Fadda i sar. 1998).

Na sobnoj temperaturi je braon uljana tečnost, netoksična, bez mirisa. Rastvara se u ulju i organskim rastvaračima.



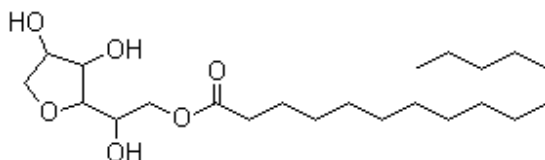
Slika 1.20. Struktura Sorbitan monolaurata (*Span 20*)

Span 40

Sorbitan monopalmitat je biodegradabilna, netoksična površinski aktivna materija, koja predstavlja estar prirodne masne kiseline (palmitinske kiseline) i šećernog alkohola (sorbitola). To je vosak, žuto-braon boje, blago rastvoran u izopropanolu, ksilenu i tečnom parafinu, nerastvoran u vodi (slika 1.21).

Jedan kraj molekula koji sadrži sorbitol je veoma rastvoran u vodi, dok je drugi kraj molekula sa palmitinskom kiselinom rastvoran u mastima. Ove osobine čine molekul veoma efikasnim pri pravljenju emulzija tipa *ulje-u-vodi*, posebno kada se koristi u kombinaciji sa *Tween*-om 40.

Sorbitan monopalmitat se koristi kao emulgator u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

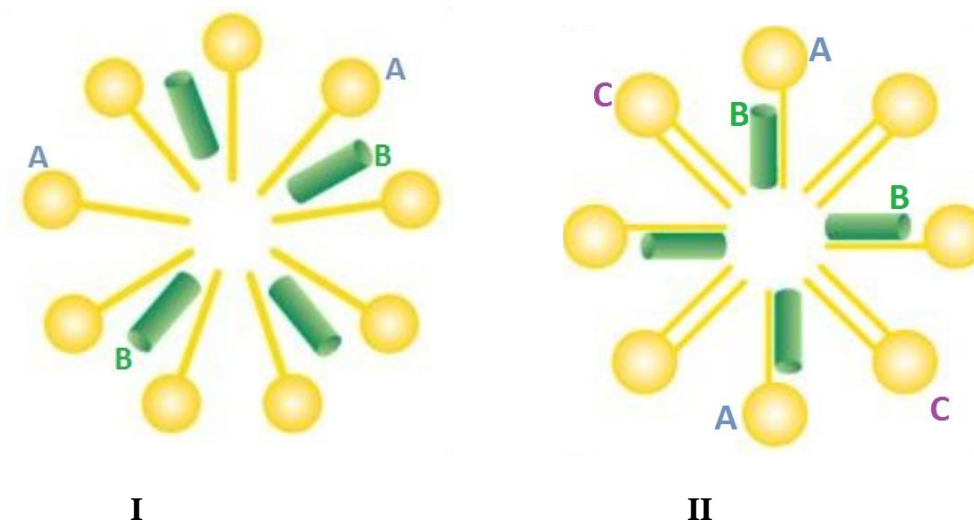


Slika 1.21. Struktura Sorbitan monostearata (*Span 40*)

1.6.5.3. Ugradnja polisorbata u lipozomnu membranu

Dobro je poznato da površinski aktivne materije imaju sposobnost interakcije sa fosfolipidnim vezikulama, što vodi ka obrazovanju različitih agregatnih struktura – stvaranja mešovitih sistema tipa micela ili vezikule, što zavisi od masenog udela površinski aktivne materije, u odnosu na udeo fosfolipida. Sa povećanjem koncentracije površinski aktivne supstance, interakcija sa lipozomima će se odvijati u tri faze (Fadda i sar.1998):

- U prvoj fazi monomeri površinski aktivne supstance se inkorporiraju u fosfolipidni dvosloj, pri čemu dolazi do odgovarajućeg povećanja dimenzija vezikula,
- U drugoj fazi fosfolipidi se postepeno rastvaraju, što vodi do istovremenog postojanja lipozoma i mešanih micela (slika 1.22),
- U trećoj fazi dolazi od potpunog rastvaranja fosfolipida, pa su prisutne samo mešane micelle.



Slika 1.22. (I) Micela, (II) mešana micela; gde je A – molekul površinski aktivne supstance, B – molekul lekovite supstance, C – molekul fosfolipida

Iako se sistemi tipa fosfolipid-površinski aktivna supstanca istražuju već par godina, još uvek nije potpuno utvrđeno na koji način modifikacija ovim supstancama utiče na oslobađanje lekova iz lipozoma (Fadda i sar. 1998). Pri ispitivanju ovakvih sistema

polisorbati su površinski aktivne supstance koje se najčešće koriste za modifikaciju lipozomne membrane, a za to postoji nekoliko razloga (Tasi i sar. 2003, Kronberg i sar. 1990):

- **Povećanje stabilnosti** – ograničena stabilnost lipozoma tokom skladištenja i primene je prepreka njihovoj široj primeni i razvoju. Na stabilizaciji lipozoma se intenzivno radi, pa otuda i nastanak „stealth“ lipozoma. Postoje istraživanja koja ukazuju da inkorporisanje polisorbata u fosfolipidni dvosloj ima za rezultat sternu stabilizaciju lipozomnih čestica, koje pokazuju mnogo veću fizičku stabilnost od nemodifikovanih lipozoma (Fadda i sar. 1998, Tasi i sar. 2003).

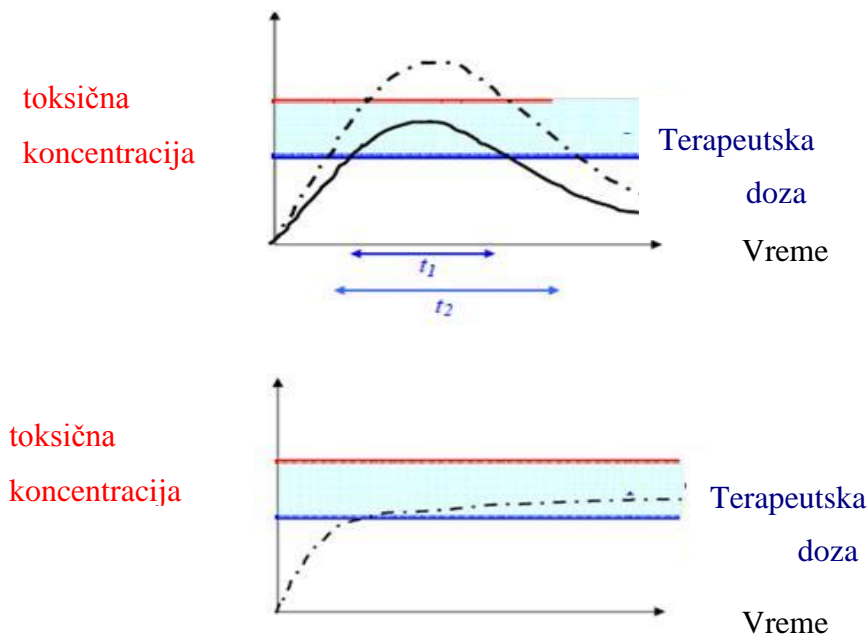
- **Sporije otpuštanje leka** – iako lipozomi usporavaju otpuštanje inkapsulisanog leka, često je potrebno dodatno smanjenje brzine otpuštanja. Polisorbati su se u određenim sistemima (npr. MLV i kafein kao aktivna supstanca) pokazali kao odlični modifikatori lipozomne membrane, koji su obezbedili značajno sporiju brzinu otpuštanja (Fadda i sar. 1998).

- **Povećanje elastičnosti** – kod transdermalnih sistema koji koriste lipozome za dostavu lekova, javlja se problem prodiranja lipozoma u dublje slojeve kože, zbog njene male permeabilnosti. Zbog toga je razvijeno više postupaka kojima se konvencionalni lipozomi mogu unaprediti. Jedno od rešenja je da se lipozomi pripreme od fosfolipida i polisorbata, čime se dobijaju takozvani *elastični lipozomi*. Prisustvo polisorbata u membrani lipozoma povećava deformabilnost čestica (elastičnost), pa je poboljšano prodiranje u dublje slojeve kože, a time i dostava leka (Ita i sar. 2007, Elsayed i sar. 2006).

1.7. Kontrolisano otpuštanje

Danas se upotrebljavaju različite forme lekova, kao što su: kapsule, pilule, tablete, injekcije, rastvori, kreme itd. Upotrebom ovih formi lekova može doći do neželjenih efekata, kao što je prekoračenje koncentracije leka u organizmu, što može biti veoma opasno. Da bi se to sprečilo rađena su istraživanja na sistemima za kontrolisano otpuštanje (Chan i sar. 2009, Deladino i sar. 2008). Kontrolisano otpuštanje je termin pod kojim se podrazumeva u jednom slučaju ciljano otpuštanje lekova u tačno definisanom tkivu ili organu, a u drugom kontrola brzine otpuštanja leka. Osnovni cilj u farmakokinetici jeste upravo ostvarivanje koncentracije leka u krvnoj plazmi koja se

nalazi između minimalne toksične i minimalne terapijske koncentracije. Razlika između korišćenja tradicionalnih formi lekova i sistema sa kontrolisanim otpuštanjem je u dužini dejstva leka (slika 1.23) (Pjanović i sar. 2010).



Slika 1.23. Profili otpuštanja leka (a) tradicionalni sistemi, (b) sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem

Karakteristike koje treba da poseduje lek da bi bio idealan za primenu u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova je visoka efikasnost, minimalni neželjeni efekat, kratko vreme polživota i dostizanje konstantne brzine otpuštanja. Takođe, kontrolisano otpuštanje podrazumeva mogućnost predviđanja i reproduktivnost kinetike oslobađanja leka, što znači da sistem za kontrolisano otpuštanje daje istu kinetiku u svim situacijama. Kod ovih sistema kinetika otpuštanja je nultog reda, tj. koncentracija leka u krvotoku ne zavisi od unete količine leka.

Sistemi za kontrolisano otpuštanje lekova koji su do sada razvijeni, mogu se podeliti na (Pjanović, 2010):

1. Sisteme sa unapred programiranom brzinom otpuštanja leka – brzina otpuštanja leka je programirana izborom sistema koji kontroliše difuziju leka (npr. debljina i sastav membrane nosača) i obično je moguće opisati je Fick-ovim zakonima. Ovakvi sistemi se mogu naći u četiri varijacije:

- sistemi kod kojih polimerna membrana kontroliše difuziju leka,
- sistemi tipa poroznog matriksa,
- hibridni sistemi (kombinacija prethodna dva),
- sistemi tipa mikrozervoara – inkapsulacija leka u mikro- i nanočestice.

Sistemi sa unapred programiranom brzinom otpuštanja leka se mogu naći u komercijalnoj upotrebi, budući da se istražuju već dugi niz godina.

2. *Aktivaciono modulisane sisteme* – oslobađanje leka je aktivirano nekim fizičkim, hemijskim ili biohemijskim procesom, a nekada je potrebna i dodatna energija (npr. osmotski pritisak, pH vrednost, enzimska aktivacija i sl). Brzina otpuštanja se reguliše primenjenim procesom ili količinom unete energije. U komercijalnoj upotrebi se mogu naći sistemi kod kojih se aktivacija vrši osmotskim pritiskom, hidratacijom i pH vrednošću.

3. *Sisteme regulisane mehanizmom povratne informacije* – određeni biomolekuli predstavljaju „okidač“ koji pokreće oslobađanje leka, dok je količina leka koja će biti oslobođena regulisana mehanizmom povratne informacije. Kod ovih sistema postoje senzori koji detektuju koncentraciju biomolekula, pa se na osnovu te informacije podešava količina leka koji će se otpustiti. Sistemi regulisani mehanizmom povratne informacije su još uvek eksperimentalni i nema ih u komercijalnoj upotrebi.

4. *Sistemi sa tačno definisanim mestom dejstva (određeni organ ili tkivo)* – ovakvi sistemi su jako delikatni i komplikovani za projektovanje te su još uvek u fazi istraživanja. Jedan mogući koncept bi podrazumevao sistem koji se sastoji od: leka, nosača leka (npr. polimeri, mikročestice, micelle) i dela koji će obezbediti vezivanje za željeni organ ili tkivo (antitela, proteini, hormoni i sl). O ovakvim sistemima ne postoji dovoljan broj eksperimentalnih podataka, te ne postoji ni dovoljno informacija da bi bili primenjeni u praksi.

1.8. Prenos mase

Da bi se mogli koristiti sistemi sa kontrolisanim i produženim otpuštanjem aktivne supstance oni moraju biti precizno okarakterisani. Aktivna komponenta se nalazi inkapsulirana u česticama koje se nalaze u određenom nosaču (gelu, emulziji i sl.). Da bi aktivna supstnca dospela u organizam, molekuli aktivne supstance moraju da se prenesu kroz membranu čestica, a zatim i kroz nosač čestica. Ovakav prenos molekula leka predstavlja fenomen prenosa mase. Prenos mase u uslovima kontrolisanog otpuštanja se ostvaruje molekulskim mehanizmom prenosa – molekulskom difuzijom. Ukoliko su poznati koeficijent difuzije, otpor difuzije, kao i uslov prenosa mase pruža se mogućnost projektovanja sistema za kontrolisano otpuštanje koji obezbeđuju konstantan fluks aktivne komponente (Pjanović, 2010).

1.8.1. Difuzija

Difuzija predstavlja oblik pasivnog transporta materija kroz ćelijsku membranu. Difuzija je transport materije ili energije pod uticajem odgovarajućeg gradijenta iz zone više u zonu niže energije ili koncentracije. Takođe je i entropijski vođen proces u kojem se energija ili materija koja difunduje uniformno raspoređuje u raspoloživom prostoru podižući time entropiju sistema. Difuzija je direktna posledica drugog principa termodinamike. S obzirom da materija difunduje iz oblasti veće koncentracije u oblast manje koncentracije, sistem prelazi iz uređenijeg u manje uređen sistem, tj. entropija raste. Prenos mase iz oblasti veće koncentracije u oblast manje koncentracije, koji se odvija kretanjem molekula, naziva se molekulska difuzija. Difuzija se opisuje Fick-ovim zakonima.

Prvi Fick-ov zakon glasi: Fluks komponente je proporcionalan gradijentu koncentracije.

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial z} \quad (1.1)$$

gde je C koncentracija komponente koja difunduje, a z je rastojanje u pravcu prenosa. D je karakteristika sistema u kome se odvija difuzija i naziva se koeficijent difuzije. Znak minus u jednačini pokazuje da se difuzija odvija u smeru opadanja koncentracije. Primena prvog Fick-ovog zakona je ograničena pretpostavkom da je koeficijent difuzije konstantna veličina, što je tačno samo kod razblaženih sistema.

Najčešće korišćeni oblici prvog Fick-ovog zakona difuzije za jednodimenzioni prenos u razblaženim rastvorima su:

- jednodimenziona difuzija u pravougaonim koordinatama: $J = -D \frac{\partial C}{\partial z}$
- difuzija u radijalnom pravcu u cilindričnim koordinatama: $J = -D \frac{\partial C}{\partial r}$
- difuzija u radijalnom pravcu u sfernim koordinatama: $J = -D \frac{\partial C}{\partial r}$

Diferencijalni bilans u svim sistemima u kojima dominira prenos mase može se opisati sledećom jednačinom:

$$\frac{DC}{Dt} = D\nabla^2 C + r \quad (1.2)$$

ili ukoliko nema strujanja bilansom:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C + r$$

gde je r brzina nastajanja komponente koja se prenosi, a t vreme.

U jednodimenzionom prenosu mase u nepokretnom sistemu, u kome ne dolazi do stvaranja komponente, opšti diferencijalni bilans prenosa mase je:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (1.3)$$

Gornja jednačina predstavlja drugi Fick-ov zakon prema kome je promena koncentracije sa vremenom proporcionalna gradijentu koncentracije, a koeficijent proporcionalnosti je koeficijent difuzije D .

Stacionarna difuzija

Kada je u pitanju stacionarna difuzija, koncentracija komponente čiji se prenos prati smatra se konstantnom, što znači da se pogonska sila tokom vremena ne menja. Stacionarna difuzija se odvija u sledećim sistemima:

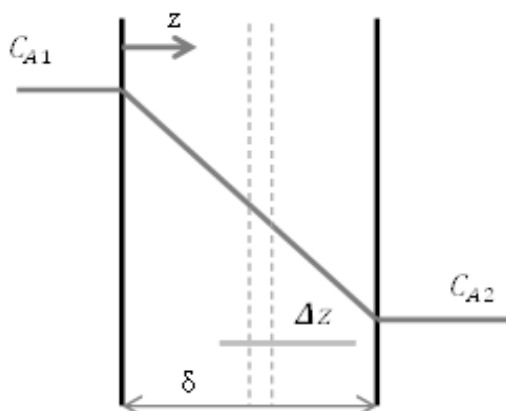
Jednodimenzionalna difuzija kroz film

Kod sistema u kojima se difuzija odvija kroz film, komponenta A difunduje iz oblasti više koncentracije u oblast niže koncentracije i pri tom prolazi kroz film debljine

δ (slika 1.24). Pretpostavlja se da se fluid nalazi sa obe strane membrane, da je idealno izmešan i da je koncentracija uniformna. Koncentracije komponente A sa obe strane, kao i unutar filma su konstantne, pa se drugi Fick-ov zakon svodi na jednačinu:

$$D \frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2} = 0 \quad (1.4)$$

odnosno: $\frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2} = 0$



Slika 1.24. Šematski prikaz jednodimenzionalne difuzije kroz film

Ako se uvedu granični uslovi:

$$z=0 \quad C_A=C_{A1}$$

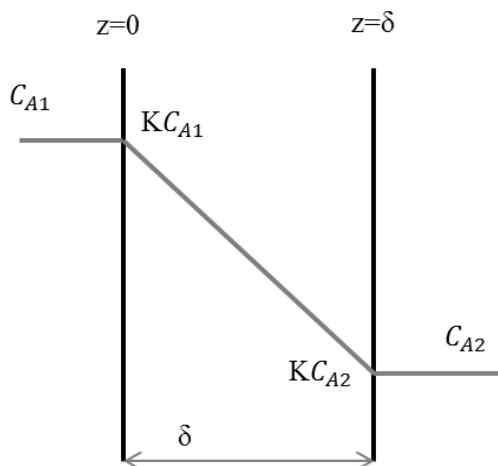
$$z=\delta \quad C_A=C_{A2}$$

dolazi se do izraza za profil koncentracije komponente A unutar filma:

$$C_A = C_{A1} + (C_{A2} - C_{A1}) \frac{z}{\delta}. \quad (1.5)$$

Jednodimenzionalna difuzija kroz membranu

Za razliku od sistema koji se opisuje jednodimenzionalnom difuzijom kroz film, membrana ima različite fizičko-hemijske karakteristike u odnosu na rastvore (slika 1.25).



Slika 1.25. Šematski prikaz jednodimenzionalne difuzije kroz membranu

Kada se uvedu granični uslovi:

$$z=0 \quad C_{Am1}=KC_{A1}$$

$$z=\delta \quad C_{Am2}=KC_{A2}$$

gde su C_{Am1} i C_{Am2} koncentracije komponente A u membrani, a K je koeficijent raspodele, koji predstavlja ravnotežni odnos koncentracija komponente A u membrani i u rastvoru uz samu membranu, dolazi se do izraza za profil koncentracije komponente A:

$$C_A = C_{Am1} + (C_{Am2} - C_{Am1}) \frac{z}{\delta} \quad (1.6)$$

i kada se zamene koncentracije, dobija se:

$$C_A = KC_{A1} + K(C_{A2} - C_{A1}) \frac{z}{\delta} \quad (1.7)$$

Fluks komponente A kroz membranu je:

$$J_A = \frac{DK}{\delta} (C_{A1} - C_{A2}) \quad (1.8)$$

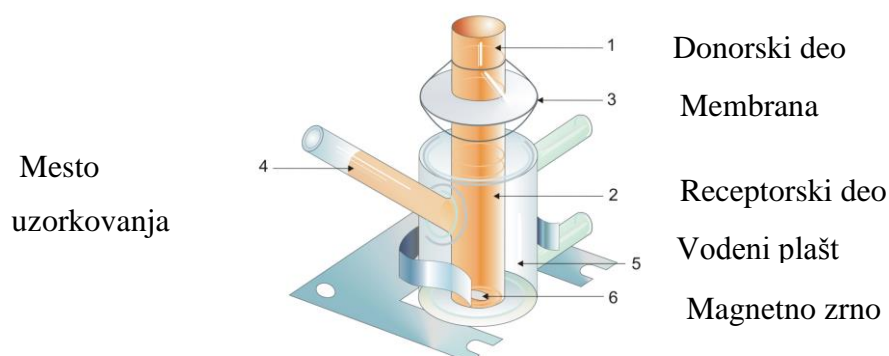
Propustljivost membrane je vrednost člana DK iz jednačine (1.8) dok je koeficijent permeabilnosti membrane vrednost člana $\frac{DK}{\delta}$. U sistemima u kojima se difuzija odvija kroz membranu, jednostavnije je eksperimentalno odrediti koeficijent permeabilnosti membrane nego pojedinačno koeficijent raspodele, koeficijent difuzije ili debljinu

membrane. Takođe, ako nam je poznat koeficijent permeabilnosti membrane, teško je odrediti uticaj pojedinačnih promenljivih na njegovu vrednost. Zato se u literaturi za neke sisteme češće nalaze koeficijenti permeabilnosti nego osnovne veličine (Yu i Amidon 2000).

1.8.2. Sistemi za eksperimentalno određivanje koeficijenta difuzije

Eksperimentalno određivanje koeficijenta difuzije (*in vitro*) je zahtevan, težak i dugotrajan postupak. Ovim eksperimentima se mora pristupiti pažljivo i precizno da bi se dobili što tačniji rezultati. Uređaji koji se koriste za ove eksperimente nazivaju se difuzione ćelije. Ove ćelije se sastoje iz tri dela: donorskog, receptorskog i membrane koja ih razdvaja. Takođe, ove ćelije mogu imati različitu konstrukciju, pa razlikujemo:

- Statičke difuzione ćelije (Franz-ova ćelija) (slika 1.26)
- Ćelije sa protokom receptorskog rastvora

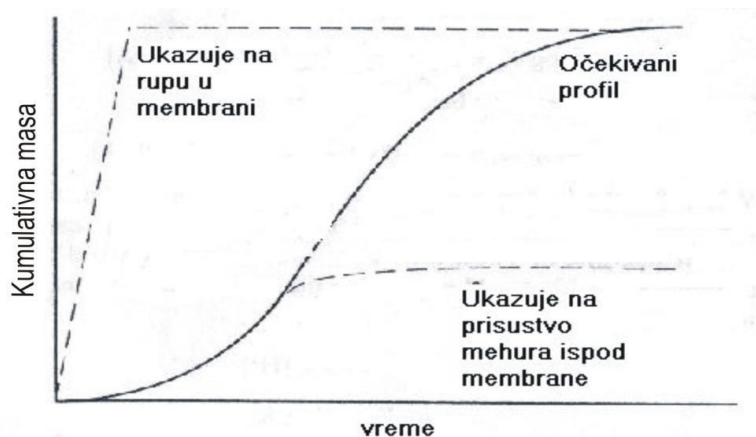


Slika 1.26. Izgled Franz-ove difuzione ćelije

Difuziona ćelija koja se najčešće koristi je Franz-ova difuziona ćelija. Njena konstrukcija obuhvata donorski i receptorski deo koji su razdvojeni horizontalno membranom.

U komori iznad membrane nalazi se donorski deo, a u komori ispod receptorski rastvor. Receptorski rastvor se konstantno meša magnetnom mešalicom. U određenim vremenskim razmacima vrši se uzorkovanje receptorskog rastvora kroz bočno postavljenu cevčicu, radi analize koja nam daje podatke o toku difuzije. Ćelija pruža mogućnost termostiranja kako direktnim uranjanjem u fluid konstantne temperature, tako i proticanjem grejnog fluida kroz plašt. (Pjanović, 2010)

Korišćenje Franz-ove ćelije za određivanje koeficijenta difuzije je pouzdana metoda, ukoliko se kontrolišu eksperimentalni uslovi. U sistemu može doći do fizičkih oštećenja membrane, kao i do prisustva vazduha u receptorskom rastvoru, što utiče na pouzdanost eksperimentalnih rezultata (slika 1.27).



Slika 1.27. Uticaj eksperimentalnih uslova na oslobađanje aktivne supstance

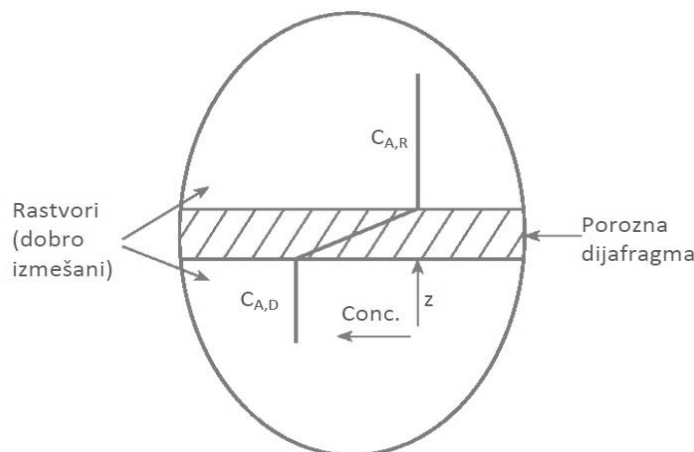
Izborom membrane i opreznim rukovanjem prilikom rada može se izbeći njeno oštećenje. Vazduh koji se nalazi u receptorskom delu membrane može se ukloniti termostatiranjem ćelije pre početka rada. Termostatiranje omogućava da se ćelija i membrana stabilizuju u uslovima u kojima će biti vršen eksperiment. Donorski i receptorski deo se ispune odgovarajućim receptorskim rastvorom, postavi se željena membrana i podesi temperatura na kojoj će se eksperiment odvijati. U ovom stanju ćelija se održava 30-60 minuta. Ukoliko receptorski rastvor sadrži rastvoren vazduh, nakon termostatiranja on se može lako ukloniti, jer će se nalaziti neposredno ispod membrane, u obliku mehurova.

Receptoski rastvor u *in vitro* ispitivanjima treba da oponaša *in vivo* uslove. Ovaj rastvor ne sme da ugrozi integritet membrane i treba da obezbedi stalan maksimalni koncentracioni gradijent. Najčešće se kao receptorski rastvor koristi voda, u slučajevima kada nam je supstanca hidrofilna ili blago lipofilna. Za jonizovane supstance koriste se puferski rastvori, kao što je fosfatni puffer. Za lipofilne supstance i u slučajevima kad su supstance slabo rastvorne u vodi koristi se smeša etanol/voda u različitim odnosima.

Franz-ova ćelija se najčešće primenjuje u eksperimentima čiji je cilj određivanje brzine otpuštanja i difuzije lekova kroz kožu. Pored Franz-ove difuzione ćelije, često se

koriste i Stokes-ova ćelija, horizontalna difuziona ćelija („side-by-side“) i protočna („inline“) ćelija.

Korišćenjem Franz-ove ćelije dobijaju se podaci o koncentraciji aktivne supstance u receptorskom delu, koje je potrebno iskoristiti za izračunavanje vrednosti koeficijenta difuzije. Izračunavanja se vrše uz pomoć matematičkog modela koji opisuje difuziju iz rastvora u ćelijama sa dijafragmom (slika 1.28). Receptorski deo ćelije je ispunjen rastvorom poznate koncentracije, donorski aktivnom supstancom čija se difuzija ispituje, a koja je formulisana u određenom obliku (disperzija, gel itd), dok dijafragma ima mnogo manju zapreminu od rastvora, pa se smatra da je profil koncentracija unutar dijafragme linearan, tj. da je difuzija stacionarna. Ovaj sistem se opisuje drugim Fick-ovim zakonom (Pjanović, 2010).



Slika 1.28. Ćelija sa dijafragmom

Rešavanje drugog Fick-ovog zakona, za sistem prikazan na slici 1.28, izvršeno je uz sledeće pretpostavke koje pojednostavljaju komplikovano rešenje (Pjanović, 2010):

- fluks kroz dijafragmu veoma brzo dostiže vrednost fluksa pri stacionarnim uslovima;
- difuzija je stacionarna (ne zavisi od vremena), pa sledi da je:

$$J_A = \frac{DK}{\delta} (C_{A,D} - C_{A,R}) \quad (1.9)$$

gde je:

J_A – molski fluks komponente A koja se prenosi, $\text{kmol/m}^2\text{s}$

D – koeficijent difuzije, m^2/s

K – koeficijent raspodele

C_A – koncentracija komponente A, kg/m^3

δ – debljina membrane, m

Indeksi D i R se odnose na donorski, odnosno receptorski deo ćelije.

Na osnovu bilansa mase sledi:

$$V_D \frac{dC_{A,D}}{dt} = -A \cdot J_A \quad (1.10)$$

$$V_R \frac{dC_{A,R}}{dt} = A \cdot J_A \quad (1.11)$$

gde je:

V – zapremina, m^3

A – površina dijafragme, m^2

Na osnovu jednačina (1.9), (1.10) i (1.11) dobija se:

$$\frac{d}{dt}(C_{A,D} - C_{A,R}) = D\beta(C_{A,D} - C_{A,R}) \quad (1.12)$$

gde je:

t – vreme, s

β – geometrijska konstanta koja karakteriše određenu ćeliju koja se koristi (ako nije poznata vrši se kalibracija ćelije rastvorom koji ima poznat koeficijent difuzije):

$$\beta = \frac{AK}{\delta} \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_R} \right) \quad (1.13)$$

Početni uslov za ovaj sistem glasi:

$$t = 0, \quad C_{A,D} - C_{A,R} = C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0$$

Ako je receptorski deo na početku ispunjen čistim rastvaračem onda važi: $C_{A,R}^0 = 0$.

Integracijom jednačine (1.13) za navedeni početni uslov, dobija se jednačina (1.14):

$$\frac{C_{A,D} - C_{A,R}}{C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0} = e^{-\beta Dt} \quad (1.14)$$

Transformacijom jednačine (1.14) dobija se jednačina (1.15), čiji je oblik pogodan za određivanje koeficijenta difuzije:

$$D = -\frac{1}{\beta t} \ln \left(\frac{C_D - C_R}{C_D^0 - C_R^0} \right) \quad (1.15)$$

gde je:

C_D – koncentracija leka u donorskom delu u trenutku t ,

C_R – koncentracija leka u receptorskom delu u trenutku t ,

C_D^0 – početna koncentracija leka u donorskom delu u trenutku $t = 0$,

C_R^0 – početna koncentracija leka u receptorskom delu u trenutku $t = 0$.

Jednačina (1.15) pokazuje da se koeficijent difuzije može odrediti praćenjem promene koncentracije komponente A sa vremenom, u segmentima ćelije sa dijafragmom. Ovako određen koeficijent difuzije predstavlja efektivni koeficijent difuzije (D_{eff}), koji je vezan za tačno određenu ćeliju sa dijafragmom. Dve aproksimacije koje su primenjene da bi se dobila jednačina (1.15) mogu dovesti u pitanje tačnost izračunate vrednosti efektivnog koeficijenta difuzije. Ipak, literaturni podaci govore da se vrednosti koeficijenata difuzije dobijene na ovaj način ne razlikuju mnogo od onih određenih drugim metodama (Liebenberg i sar. 2004, Pjanović 2010).

2. Ciljevi rada

Predmet predložene doktorske disertacije je ispitivanje difuzije polifenolnih jedinjenja iz različitih mikročestičnih sistema. U ovom radu će vodeni ekstrakti majčine dušice biti inkapsulirani u mikročestice na bazi: (1) hidrogelova, kao što su alginat i hitozan i (2) fosfolipida. Antioksidansi, posebno polifenoli, imaju niz pozitivnih efekata na ljudsko zdravlje, te je sve veća potreba za prirodnim izvorima antioksidanasa. Polifenoli se nalaze u čokoladi, vinu, pivu, voću, ali se u organizam unose najviše konzumacijom čaja. Međutim, polifenoli imaju neprijatan, gorak ukus, te se kroz hranu i piće ne unose u dovoljnim količinama. Inkapsulacijom se maskira ukus polifenola i istovremeno se oni prevode iz tečnih ekstrakata u čvrste formulacije, koje se onda mogu koristiti kao aditivi u prehrambenim proizvodima. Od posebnog je interesa dobiti formulacije koje sadrže smeše polifenola upravo takvog sastava kakvog su biljni ekstrakti, jer se određeni pozitivni efekti na ljudsko zdravlje mogu postići samo sinergističkim dejstvom polifenolnih jedinjenja. Generalno, inkapsulacija predstavlja proces obavljanja neke supstance zaštitnim omotačem ili njeno smeštanje unutar strukture određenog nosača.

Osnovni cilj ove disertacije je da se utvrdi u kojoj meri inkapsulacija polifenola usporava prenos mase. Potrebno je odrediti otpore prenosu mase koji se javljaju zbog prisustva membrane, odn. nosača pri otpuštanju polifenola iz mikročestica u vodeni medijum. Hidrogel mikročestice (alginat, alginat-hitozan i alginat-inulin) će biti dobijene metodom elektrostatičke ekstruzije, koja omogućuje kontrolisanu proizvodnju mikročestica željenih dimenzija. Za dobijanje lipozoma će biti korišćena prolipozomna metoda, koja je jednostavna i brza, te posebno pogodna za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj tehnologiji. Dobijene mikročestice sa inkapsuliranim ekstraktima čaja će biti ispitane sa aspekta stepena inkapsulacije, veličine i uniformnosti čestica, morfoloških karakteristika, i interakcija koje se javljaju između aktivnih komponenata ekstrakata i nosača. Franz-ova difuziona ćelija će biti korišćena za praćenje kinetike otpuštanja polifenola i određivanje koeficijenata difuzije i otpora koji se javljaju pri difuziji kroz matricu gela, odn. kroz fosfolipidnu mebranu. Takođe, bitan parametar za opravdanost inkapsulacije je i antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja. Tako je jedan od ciljeva rada utvrđivanje očuvanosti antioksidativne aktivnosti polifenola pri

inkapsulaciji. Da bi se dobile mikročestice koje su stabilne u dužem vremenskom periodu potrebno je optimizovati proces sušenja. U tu svrhu će posebno biti ispitano koliko punioci (inulin i saharoza) utiču na promene u morfologiji čestica pri sušenju (na vazduhu i pri liofilizaciji).

Poseban deo rada će biti posvećen uticaju sastava membrane lipozoma na brzinu oslobađanja inkapsuliranih polifenola. Biće ispitana mogućnost modifikovanja membrane različitim površinski aktivnim materijama, kao što su: *Tween 20*, *Tween 60*, *Span 20* i *Span 40*, u cilju postizanja kontrolisanog otpuštanja polifenola. Konačno, cilj rada je uporediti različite mikročestične sisteme sa inkapsuliranim polifenolima i odabrati optimalne formulacije koje omogućavaju produženo otpuštanje polifenola.

3. Eksperimentalna ispitivanja

3.1. Materijali

Kao izvor polifenola korišćena je sledeće biljka majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) od koje je pripremljen čajni ekstrakt. Biljka majčina dušica je proizvod instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr. Josif Pančić“, (Beograd, Srbija). Za inkapsulaciju polifenola korišćen je natrijumalginat male viskoznosti Protanal LF 20/40 (FMC BioPolymer, Norveška) molske mase 60000 kDa. Folin-Ciocalteu reagens, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-katjona), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilne kiseline (Trolox) i gvožđe(III)-tripiridiltriazina (Fe^{3+} - TPTZ) su kupljeni od kompanije Sigma Aldrich (St. Louis, MA, SAD). Metanol (HPLC čistoće) je nabavljen od kompanije J.T.Baker (Deventer, Holandija). Galna kiselina, ruzmarinska kiselina, kalijum-sulfat (K_2SO_4), kao i kalcijumhlorid-dihidrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (rastvor za prikupljanje čestica) su dobijeni od kompanije Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka). Mravlja kiselina, kalijumperoksi-disulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), natrijum-karbonat (Na_2CO_3), gvožđe(III)-hlorid-heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), gvožđe(II)-sulfat-heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), hlorovodonična kiselina (HCl), askorbinska kiselina i natrijum-citrat su analitičke čistoće i dobijeni od kompanije Kemika (Zagreb, Hrvatska). Hitozan (Acros Organics, New Jersey, SAD) je korišćen za oblaganje alginatnih čestica, a kao punilac je upotrebljen inulin (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Za pripremu lipozoma upotrebljen je Phospholipon 90 G (Phospholipid GmbH) koji predstavlja prečišćeni fosfatidilholin (min 94,0% mas), sa niskim sadržajem lizofosfatidilholina (max 4,0% mas) i tokoferola (max 0,3% mas).

3.2. Priprema ekstrakta čaja

Ekstrakcija polifenola vršena je iz usitnjenog čaja ključalom destilovanom vodom (10 g čaja, 200 ml destilovane vode) u trajanju od 30 minuta uz povremeno mešanje staklenim štapićem. Nakon filtracije kroz pamučnu gazu dobijen je čajni ekstrakt u kome je određen sadržaj polifenola.

3.3. Određivanje ukupnih polifenola – FC metoda

Koncentracija polifenola se može odrediti na različite načine, ali je najčešći način UV/VIS spektrofotometrija (slika 3.1), a najpouzdanija metoda *Folin-Ciocalteu*-ova. Metoda se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji *Folin-Ciocalteu* reagensa s nekim redukujućim reagensom (fenoli). *Folin-Ciocalteu* reagens je smeša fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koji reaguje s fenoksid jonom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-jon oksiduje, a *Folin-Ciocalteu* reagens redukuje do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sar. 1999a, Singleton i sar. 1999b). Nakon dva sata reakcije u kojoj svi fenolni spojevi izreaguju s *Folin-Ciocalteu* reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988). Očitavanje apsorbance proporcionalno je intenzitetu razvijene plave boje i koncentraciji antioksidansa.



Slika 3.1. UV spektrofotometar

Primena ove metode zahteva prethodno određivanje baždarnog dijagrama koji je karakterističan za određenu talasnu dužinu i reagense koji se koriste. Baždarni dijagram predstavlja zavisnost apsorbance (A) od koncentracije polifenola (C). Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g uzorka (Singleton i Rossi, 1965).

Spektrofotometrijska merenja vršena su na talasnoj dužini od 765 nm, upotrebom kiveta od kvarcnog stakla, a za izradu baždarnog dijagrama, kao standardna supstanca, korišćena je galna kiselina.

U cilju izrade baždarnog dijagrama, pripremljen je standardni rastvor galne kiseline u etanolu, koncentracije 500 mg/l. Ovaj rastvor je razblažen i pripremljeno je četiri rastvora galne kiseline koncentracija: 50, 100, 150 i 250 mg/l .

Po 0.5 ml svakog od pet uzoraka galne kiseline razblaženo je sa 30 ml destilovane vode, 2.5 ml *Folin-Ciocalteu* reagensa (razblaženog destilovanom vodom u odnosu 1:2) i 7.5 ml 20%-tnog rastvora natrijum-karbonata. Sadržaj je dobro izmešan i zatim dopunjen destilovanom vodom do 50 ml. Epruvete sa uzorcima su čuvane na sobnoj temperaturi tokom 2 sata, a zatim je merena apsorbanca svakog od njih. Apсорbanca je merena na UV spektrofotometru (UV/VIS Scanning Models / UV - 3100 (PC), China). Za svaku koncentraciju galne kiseline napravljene su po dve probe. Vršena su merenja apsorbanca za obe probe i izračunata je srednja vrednost, koja je korišćena za konačno određivanje baždarne krive.

3.4. Određivanje udela pojedinačnih polifenola – HPLC analiza

Razvijena je metoda koja je pomoću gradijentne elucije rastvarača omogućila dobru separaciju i kvantifikaciju polifenolnih spojeva prisutnih u ispitivanim uzorcima (Belščak-Cvitanović i sar. 2011). Jedan od najzastupljenijih polifenolnih jedinjenja je ruzmarinska kiselina. Ruzmarinska kiselina poseduje širok spektar bioloških aktivnosti i poznata je kao antioksidans. Koncentracija ruzmarinske kiseline je određena u ekstraktu majčine dušice i u česticama koje sadrže polifenolna jedinjenja. Ekstrakti su pre injektiranja profiltrirani kroz celulozno-acetatne mikrofiltere veličine pora 0.45 μm (Nylon Membranes, Supelco, Bellefonte, USA). U hromatografski sastav injektirano je 20 μl tako profiltriranog ekstrakta, pa je sprovedena analiza prema dole navedenim uslovima (tabela 3.1).

Hromatografski uslovi:

Hromatografska kolona: Gemini NX-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)

Mobilna faza: A – acetonitril : mravlja kiselina = 97% : 3%

B - voda : mravlja kiselina = 97% : 3%

Protok: 0.9 ml/min

Eluiranje: gradijentno

Detekcija: UV–Vis Diode Array ($\lambda=278$ nm)

Temperatura kolone: sobna

Vreme trajanja analize: 30 min

Tabela 3.1. Gradijent rastvarača za HPLC analizu spojeva prisutnih u ekstraktima

t [min]	Rastvarač A [%]	Rastvarač B [%]	Protok [ml/min]
0	10	90	0.9
20	40	60	0.9
30	70	30	0.9

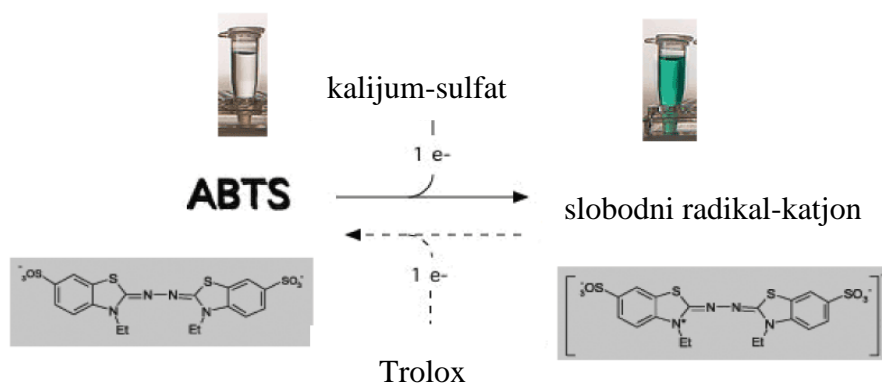
Izdvojeni spojevi detektovani su pomoću *Diode Array Detector*-a pri talasnim dužinama od 190 do 400 nm, uz rezoluciju od 1.2 nm. Hromatogrami su snimljeni na talasnoj dužini od 278 nm. Prikupljanje i obrada podataka dobijenih HPLC analizom omogućena je primenom posebnog računarskog programa *Chem32 Chromatography Workstation*. Ruzmarinska kiselina je identifikovana poređenjem vremena zadržavanja (R_t) izdvojenih pikova na hromatogramima s vremenima zadržavanja odgovarajućih standarda. Kvantitativna determinacija spojeva omogućena je korišćenjem jednačina baždarnih pravaca pojedinih standarda. Sve analize su ponovljene po tri puta.

3.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti – ABTS metoda

Ova metoda se zasniva na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-katjona 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal katjon), koji se formira hemijskom ili enzimskom oksidacijom rastvora ABTS-a nekoliko sati pre analize (slika 3.2). Za oksidaciju rastvora ABTS-a korišćen je rastvor kalijum-persulfata, pri čemu je maksimum apsorbance dostignut na talasnim dužinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultuje oksidacijom prethodno proizvedenog ABTS radikala, što uveliko zavisi od antioksidativne aktivnosti ispitivanog antioksidansa, njegove koncentracije i trajanja reakcije. Stoga se udeo ABTS-a radikala koji „gase“ različiti antioksidansi izražava kao funkcija koncentracije i vremena, i meri praćenjem apsorbance ABTS radikala, pa se upoređuje sa smanjenjem apsorbance koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E koji se rastvara u vodi pri istim uslovima.

Za izradu baždarne krive pripremljen je osnovni rastvor Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-askorbinska kiselina), koncentracije 1 mM u etanolu (0.0125 g Trolox-a rastvoriti u 50 ml čistog etanola). Iz tako pripremljenog rastvora su napravljeni razblaženi rastvori Troloxa, koncentracija 0.2 mM, 0.4 mM, 0.6 mM i 0.8 mM.

Prvo je određena apsorbanca slepe probe, tj. A (20 μ l vode i 2 ml rastvora ABTS radikala) na 734 nm. Zatim su određene A prethodno pripremljenih razblaženja rastvora Troloxa. Uzimano je 20 μ l svake koncentracije Trolox-a i u kiveti je pomešano sa 2 ml rastvora ABTS radikala. Nakon što reakcija odstoji 6 minuta, merena je apsorbanca na 734 nm (Re 1999).



Slika 3.2. Formiranje ABTS radikal katjona

Na osnovu izmerenih vrednosti nacrtana je baždarna kriva: na apscisu su nanete vrednosti koncentracije Trolox-a (mM), a na ordinatu vrednosti izmerene apsorbance na 734 nm. Vrednosti ΔA se dobijaju oduzimanjem apsorbance svakog pojedinog uzorka od apsorbance slepe probe.

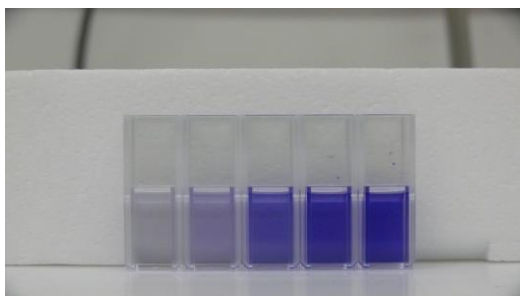
Za određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka pripremi se rastvor ABTS radikala, tako što je pomešano 88 μ l rastvora kalijum-peroksodisulfata (0.378448 g kalijum-peroksodisulfata u 10 ml destilovane vode) sa rastvorom ABTS reagensa (0.019204 g ABTS reagensa u 5 ml destilovane vode). S obzirom da ABTS i kalijum-peroksodisulfat reaguju u stehiometrijskom odnosu 1:0.5 neće doći do potpune oksidacije, pa je stoga potrebno pripremljen rastvor umotati aluminijumskom folijom i ostaviti da odstoji preko noći (min. 12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize rastvor se razredi etanolom (96 %-tnim) do konačne koncentracije ABTS radikala od 1%, tako da apsorbanca tog rastvora iznosi 0.70 ± 0.02 ($0.680 < A < 0.720$).

Alikvot od 20 μ l uzorka (razblaženog sa vodom u odnosu 1:10; tj. 100 μ L uzorka u 900 μ L vode) se pomeša sa 2 ml rastvora ABTS reagensa u kiveti i nakon 6 minuta se izmeri apsorbanca na 734 nm. Dolazi do obezbojavanja ABTS reagensa, usled reakcije polifenola sa ABTS radikalom, tj. usled oksidacije polifenola. Što je sadržaj polifenola u uzorku veći, i obezbojenje ABTS reagensa je intenzivnije. Rezultati se izražavaju kao

mM ekvivalenta Troloxa, upotrebom baždarne krive. Svaki uzorak pripremljen je u tri paralelne probe, a rezultat je izražen kao srednja vrednost dobijenih rezultata.

3.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti - FRAP metoda

Metoda se zasniva na redukciji bezbojnog kompleksa gvožđe(III)-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) u fero formu (Fe^{2+}) intenzivne plave boje (slika 3.3) (Benzie i Strain, 1996). Antioksidativni kapacitet ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski merenjem apsorbance pri talasnoj dužini od 593 nm. FRAP reagens se dobija mešanjem 300 mM acetatnog pufera, 10 mM TPTZ i 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ u odnosu 10:1:1. Zatim se uzorku od 200 μL doda 3.8 mL FRAP reagensa. Posle 4 min se meri apsorbancu plavo obojenog kompleksa. Standardna kriva se dobija korišćenjem različitih koncentracija jona Fe^{2+} (100-1200 μM). Za izračunavanje koncentracije (u mM gvožđe(II)-sulfat-heptahidrata) prema baždarnom pravcu, potrebno je oduzeti apsorbancu slepe probe od apsorbance uzorka te tako dobijenu razliku apsorbanci koristiti za preračunavanje (Benzie i Strain, 1996). Svaki uzorak pripremljen je u tri paralelne probe, a rezultat je izražen kao srednja vrednost dobijenih rezultata. Rezultati se u ovom istraživanju izražavaju kao mmol Fe (II)/g uzorka.



Slika 3.3. Redukcija bezbojnog kompleksa u fero formu plave boje

3.7. Metode pripreme i karakterizacije alginatnih čestica

3.7.1. Pripremanje rastvora alginata i rastvora kalcijum-hlorida

Za dobijanje alginatnih čestica je korišćen rastvor alginata niske viskoznosti. Rastvor alginata je napravljen rastvaranjem praha natrijum-alginata, Protanal LF 20/40 molarne mase 60000 kDa, u ekstraktu čaja, u odgovarajućem masenom odnosu, tako da je dobijeno 100 ml rastvora koncentracije 1.5%. Rastvor alginata je rastvaran na sobnoj temperaturi u toku 24 časa, nakon čega je korišćen u eksperimentima.

Za pripremanje rastvora za prikupljanje čestica je korišćen kalcijum-hlorid-dihidrat. Rastvoreno je 0.32 g kalcijum-hlorida-dihidrata u 19.7 ml čajnog ekstrakta, čime je dobijeno 20 ml 1.5% rastvora kalcijum-hlorida.

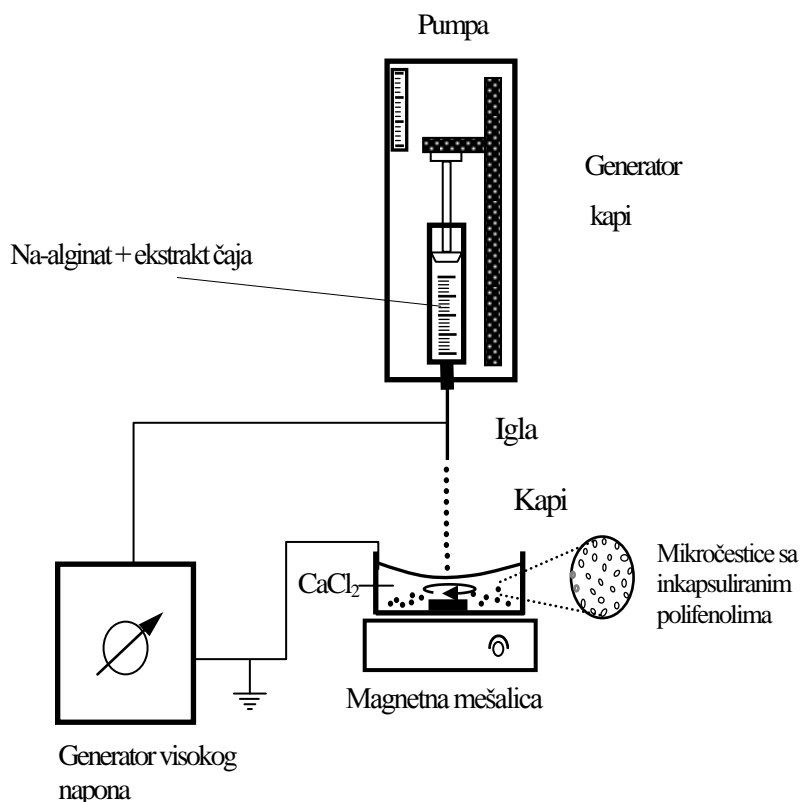
3.7.2. Formiranje čestica

Uzorak od 5 ml rastvora natrijum-alginata u čajnom ekstraktu je prebačen u plastični špric od 10 ml, i istiskivan kroz iglu infuzionom pumpom (Razel, Scientific Instruments, Stamford, CT) stalnim zapreminskim protokom. Iz generatora visokog napona (Model 30R, Bertan Associates, Inc., New York) izvedena je pozitivna elektroda i povezana sa iglom, a u rastvor kalcijum-hlorida uronjena je uzemljena elektroda. Na ovaj način se između vrha igle i gornjeg nivoa rastvora kalcijum-hlorida stvara određeno električno polje, pa se tečnost koja je potiskivana pumpom kroz špric do vrha igle otkidala od nje u obliku mlaza sitnih naelektrisanih kapljica pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile. Kapi su sakupljane u rastvoru kalcijum-hlorida (rastvor za geliranje) mešanim magnetnom mešalicom, pri čemu je dolazilo do očvršćavanja kapi u čestice sfernog oblika (slika 3.4). Kada je proces stvaranja čestica završen, isključen je generator napona i čestice su ostavljene da stoje u rastvoru kalcijum-hlorida sat vremena (Manojlović i sar. 2006).

Pri eksperimentalnom ispitivanju elektrostatičke ekstruzije korišćeni su sledeći procesni parametri:

- napon: 6.4 kV;
- rastojanje između elektroda: 2.3 cm;
- igla od 23 G (unutrašnji prečnik 1/2'')

Nakon isteka jednog sata formirane čestice su izdvojene iz rastvora kalcijum-hlorida filtriranjem i izmerene na analitičkoj vagi. Ovako dobijene alginatne čestice sadržale su polifenole iz ekstrakta čaja.



Slika 3.4. Šematski prikaz eksperimentalne aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije

Alginatne čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja. Uzorak od 5 ml rastvora Na-alginata u ekstraktu čaja uzima se u špric, i istiskuje kroz iglu infuzionom pumpom. Kapljice se prikupljaju u 20 ml rastvora kalcijum-hlorida. Kada se proces dobijanja čestica završi, nastavi se sa mešanjem dobijenih čestica u rastvoru kalcijum-hlorida još sat vremena.

Alginatne čestice. Dobijaju se na isti način kao i alginatne čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja, s tim što se natrijum-alginat i kalcijum-hlorid ne rastvaraju u ekstraktu čaja, već u istoj zapremini destilovane vode.

Čestice alginat-hitozan sa inkapsuliranim ekstraktom čaja. Čestice su dobijene dodavanjem hitozana u rastvor za geliranje, kao supstance koja formira zaštitnu membranu oko alginatne čestice. 0.40 g askorbinske kiseline (regulator kiselosti) rastvoreno je u 20 ml ekstrakta čaja, zatim je dodato 0.10 g hitozana, mešano, i na kraju 0.40 g kalcijum-hlorida. Rastvor Na-alginata je dobijen na već opisani način. Čestice sa hitozanom moraju da odstoje 24h pre nastavka eksperimenta.

Čestice alginat-inulin i alginat-saharoza sa inkapsuliranim ekstraktom čaja. Rastvor Na-alginata pripremljen je od 0.30 g alginata, koji je umešan u 20 ml ekstrakta čaja, a zatim je dodan 1.0 g inulina ili 1.0 g saharoze. Rastvor za geliranje (CaCl_2 u ekstraktu čaja) je napravljen na već opisani način.

Suve alginatne čestice. Alginatne čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja, kao i alginat –inulin i alginat-saharoza čestice su dobijene sušenjem odgovarajućih hidrogel čestica u sušnici na 50 °C tokom 24 časa.

3.7.3. Liofilizacija alginatnih čestica

U cilju dobijanja liofilizovanih alginatnih čestica, hidrogel čestice su zamrznute na -80 °C jedan sat pre početka procesa liofilizacije. Proces je trajao 24 časa na temperaturi od -50 °C i pritisku od 1.1 Pa (GAMMA Martin Christ, GmbH, Osterode am Harz, Germany).

3.7.4. Ispitivanje veličine alginatnih čestica

U cilju određivanja veličine alginatnih čestica i raspodele njihovih veličina, vršeno je snimanje čestica optičkim mikroskopom (Carlzeiss Jena). Uzimani su uzorci od 30-tak čestica iz svakog eksperimenta i mereni su im prečnici. Očekivana je veličina od nekoliko stotina mikrona.

3.7.5. Snimanje uzoraka pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM)

Površinska morfologija čestica, a potom i liofilizovanih alginatnih čestica je ispitana korišćenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM, model Jeol JSM 6460LV).

SEM analiza alginatnih čestica

Uzorci su pažljivo liofilizovani do tačke u kojoj su čestice uglavnom u svom prvobitnom obliku i dehidrovane dovoljno da budu ispitane pomoću SEM-a. Zatim se čestice prenose na držač uzorka i njihova površina presvlači zlatom do debljine od otprilike 30 nm, koristeći uređaj za "presvlačenje", Baltec SCD 005.

3.7.6. FTIR analiza (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Transmisioni spektri pripremljenih alginatnih čestica su snimljeni na FTIR spektrofotometru (BOMEM, Hartmann & Braun), koristeći metodu KBr diska. Uzorci

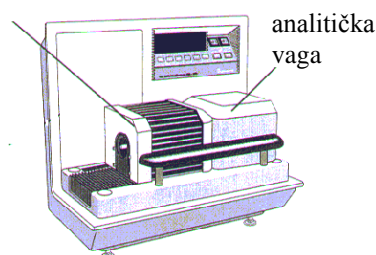
alginatnih mikročestica su osušeni u vakuum desikatoru, pomešani sa KBr prahom i kompresovani u disk koristeći ručnu presu za tablete. Disk je zatim smešten u držač uzorka i skeniran od 4000 do 450 cm^{-1} , sa rezolucijom od 4 cm^{-1} .

3.7.7. Termička analiza alginata

Uzorak Ca-alginata za termalnu analizu je pripremljen na sledeći način. Na- alginat je rastvoren u destilovanoj vodi, tako da se dobije rastvor koncentracije 1.5 mas.%. Elektroističkom ekstruzijom su dobijene mikročestice koje su ostavljene 1 h u rastvoru CaCl_2 da potpuno izgeličaju. Zatim su izvađene iz rastvora CaCl_2 i filtrirane pod blagim vakuumom, a onda stavljene u sušnicu (Sterimatic ST-11, Instrumentaria, Zagreb) na 120 °C. Sušenje je trajalo oko 3 h kako bi se sa sigurnošću uklonila sva količina vode.

Čestice alginata su analizirane dvema termoanalitičkim tehnikama: diferencijalno skenirajućom kalorimetrijom (DSC) i termogravimetrijskom analizom (TGA). DSC tehnikom se meri oslobađanje toplote (izražene preko razlike toplotnih flukseva uzorka i referentne supstancije) kao funkcija vremena/temperature, dok se TGA tehnikom meri promena mase uzorka sa promenom temperature. Termičko ponašanje čestica je ispitivano primenjujući paralelnu DSC-TGA tehniku na TA instrumentu SDT Q-600 (New Castle, Delaware, US). Jedan tipičan DSC-TGA instrument prikazan je na slici 3.5.

Uzorci mase oko 20 mg su postepeno zagrevani u standardnoj aluminijumskoj posudi. Sva merenja su vršena u atmosferi vazduha brzine strujanja 0.1 dm^3/min , pri brzini zagrevanja od 10 °C/min. Eksperimenti su ponovljeni nekoliko puta da bi se potvrdila ponovljivost i preciznost rezultata.



Slika 3.5. DSC-TGA uređaj: šema spoljašnjosti uređaja

3.7.8. Termička analiza čestica

Alginatne čestice sa inkapsuliranom polifenolnim jedinjenjima su filtrirane pod blagim vakuumom, a zatim ostavljene da 2h odstoje u atmosferi zasićenog kalijumsulfata (relativne vlažnosti 97 %). Pokazalo se da nakon dva sata pod uslovima velike vlažnosti, gubitak mase alginatnih čestica usled procesa sušenja postaje zanemarljiv. Takođe je utvrđeno da ovaj korak pre TG merenja doprinosi reproduktivnosti rezultata termalne analize.

Pripremljeni uzroci su zatim analizirani DSC-TGA metodom, na isti način kao što su analizirane i prazne alginatne čestice (kao što je opisano u poglavlju 3.10.4).

3.7.9. Određivanje stepena inkapsulacije polifenola u alginatne čestice

Efikasnost inkapsulacije polifenola se računa kao odnos količina polifenola inkapsuliranih u mikročestice (m) i količine ukupnih polifenola potrošenih za pripremu mikročestica (m_{uk}), kao što je prikazano u formuli (3.1):

$$EE\% = \frac{m}{m_{uk}} \cdot 100 \quad (3.1)$$

Količina polifenolnih jedinjenja u mikročesticama je merena nakon hemijskog rastvaranja mikročestica u rastvoru Na-citrata (2 mas%). Sveže mikročestice se homogenizuju sa Na-citratom (u masenom odnosu 1:5) 15 min energičnim mešanjem, koristeći Vortex (EV-102 Tehnica Zelezniki, Slovenija), kako bi se hemijski rastvorile. Polifenolno-citratni rastvor se analizira na sadržaj ukupnih polifenola spektrofotometrijski, koristeći *Folin-Ciocalteu* metodu, prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.3. Takođe, rastvor razbijenih čestica korišćen je i za HPLC analizu pojedinačnih polifenolnih spojeva, kako bi se omogućilo poređenje pojedinih polifenolnih spojeva u svakom biljnom ekstraktu pre i nakon inkapsulacije.

3.7.10. Difuzioni eksperimenti

Početni difuzioni eksperimenti su izvedeni sa alginatnim česticama i modifikovanim alginatnim česticama (alginat-hitozan i alginat-inulin) u sudu sa destilovanom vodom. Alginatne čestice su izdvojene iz rastvora za geliranje i osušene pri kontrolisanim uslovima u vakuumu na 37 °C. U njima se nalaze inkapsulirani polifenoli i njihova masa je iznosila 3.407g. Ove čestice su potopljene u sud u kome se nalazi 50 ml destilovane

vode. Nakon 30 sekundi od potapanja iz suda se uzima 2 ml uzorka. Uzorci se dalje uzimaju nakon 1 minuta, 2 minuta, 5 minuta, 10 minuta, 15 minuta, 20 minuta i poslednji, nakon pola sata. Ovi uzorci se dalje koriste za određivanje kinetike otpuštanja polifenola iz alginatnih čestica.



Slika 3.6. Franz-ova statička difuziona ćelija

Kod difuzionih eksperimenata kod kojih se lipozomi koriste kao nosači, kao eksperimentalni sistem je korišćena standardna Franz-ova difuziona ćelija (slika 3.6). Korišćena ćelija ima efektivnu površinu za difuziju od 4.91 cm^2 i zapreminu receptorskog dela od 20 ml. Membrana koja je upotrebljena je sintetička, na bazi celuloznog acetata, sa prosečnom veličinom pora od $0.20 \mu\text{m}$. Za receptorski rastvor je odabrana destilovana voda. Eksperimenti su izvođeni na sobnoj temperaturi uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici (700 o/min).

Pre početka eksperimenta izvršeno je termostatiranje Franz-ove difuzione ćelije. Prilikom termostatiranja donorski i receptorski deo su ispunjeni destilovanom vodom, koja je tokom daljeg toka eksperimenta korišćena kao receptorski rastvor. Ćelija je termostatirana na sobnoj temperaturi (25°C), pri čemu je receptorski rastvor mešan na magnetnoj mešalici na 700 o/min. Proces termostatiranja je trajao 30 min.

Zatim su urađeni i eksperimenti sa standardnom Franz-ovom difuzionom ćelijom i alginatnim česticama, kako bi se mogla uporediti brzina otpuštanja polifenolnih jedinjenja iz čestica i lipozomne disperzije.

Difuzija polifenola iz čajnog ekstrakta

Prvi difuzioni eksperiment u Franz-ovoj ćeliji bio je difuzija polifenola iz čajnog ekstrakta majčine dušice. Eksperiment je trajao 3 h, a uzorci su uzimani u intervalima od 15 min tokom prva dva sata, a zatim u intervalima od 30 min.

Pre početka eksperimenta izvršeno je termostatiranje Franz-ove difuzione ćelije.

Nakon termostatiranja u donorski deo ćelije uneto je 2.081 g čajnog ekstrakta. U određenim vremenskim intervalima iz receptorskog dela je uziman uzorak zapremine 0.5 ml. Nakon uzimanja uzorka, 0.5 ml svežeg receptorskog rastvora je vraćano u ćeliju.

Koncentracija polifenola u uzetim uzorcima, kao i u ekstraktu čaja, određena je spektrofotometrijski.

Difuzija polifenola iz alginatnih čestica

Sledeći difuzioni eksperiment bio je difuzija polifenola iz alginatnih čestica, kao i modifikovanih alginatnih čestica sa inkapsuliranim ekstraktom čaja. Eksperiment je trajao 6 h, a uzorci su uzimani u intervalima od 5, 10, 15 min tokom prva dva sata, a zatim u intervalima od 30 min. U donorski deo ćelije uneto je 2.1505 g čestica alginata, alginat-hitozan i alginat-inulin čestica, respektivno. U određenim vremenskim intervalima iz receptorskog dela je uziman uzorak zapremine 0.5 ml. Nakon uzimanja uzorka, 0.5 ml svežeg receptorskog rastvora je vraćano u ćeliju. Koncentracija polifenola u uzetim uzorcima određena je spektrofotometrijski. Svi difuzioni eksperimenti su rađeni dva puta, kako bi se proverila reproduktivnost rezultata. Srednje vrednosti koncentracija polifenola, određene na osnovu difuzionih eksperimenata, korišćene su u svim proračunima.

3.8. Metode pripreme i karakterizacije fosfolipidnih čestica

3.8.1. Priprema lipozoma

Lipozomi su pripremljeni prolipozomnom metodom (Perrett i sar. 1991). Kod ove metode je kao rastvarač fosfolipida korišćena smeša vode i etanola, a u lipozome je inkapsuliran ekstrakt čaja majčine dušice.

Za pripremu lipozoma upotrebljen je Phospholipon 90 G (Phospholipid GmbH) koji predstavlja prečišćeni fosfatidilholin (min 94.0% mas), sa niskim sadržajem

lizofosfatidilholina (max 4.0% mas) i tokoferola (max 0.3% mas). Fosfatidilholin je stabilisan sa 0.1% mas. askorbilpalmitata, da bi se sprečila oksidacija, budući da je reč o nezasićenim fosfolipidima.

Priprema konvencionalnih lipozoma

Konvencionalni lipozomi su dobijeni tako što je najpre u 0.5 g fosfolipida dodato 0.5 g etanola i 1 g vode. Smeša je homogenizovana na magnetnoj mešalici na 700 o/min i temperaturi od 60°C. Nakon ovog stupnja smeša se mora ohladiti do sobne temperature, a zatim sledi lagano ukapavanje 10 g čajnog ekstrakta, uz istovremeno mešanje na 700 o/min. Kada se doda sav čaj, smeša se ostavi na mešalici još 15 minuta, pri čemu brzina mešanja ostaje nepromenjena.

Priprema modifikovanih lipozoma

Postupak pripreme modifikovanih lipozoma je isti kao postupak dobijanja konvencionalnih lipozoma, osim što se smeši fosfolipida, etanola i vode, dodaje i određena količina odgovarajućeg polisorbata. Za pripremu 20 g lipozoma, potrebno je 0.89 g fosfolipida, 0.17g *Span 20*, *Span 40*, *Tween 40* ili *Tween 60*, 1 g vode i 2 g etanola. Količina čajnog ekstrakta koja se dodaje u ovom slučaju je 20 g.

3.8.2. Liofilizacija lipozomnih disperzija

Liofilizacija lipozomnih disperzija je izvedena u uređaju Beta 1-8 K CHRIST LMC-2, pri sledećim radnim uslovima:

- Vreme trajanja procesa: $t = 24$ h
- Pritisak: $p = 0,140$ mbar
- Uzorak je zamrznut na: $\theta = -39^{\circ}\text{C}$
- Otparavanje vlage je izvršeno na temperaturi: $\theta = 25^{\circ}$
- Temperatura kondenzatora: $\theta = -56^{\circ}\text{C}$

3.8.3. Merenje veličine čestica i zeta potencijala

Veličina lipozoma, indeks polidisperzije (engl. *Polydispersity index*, PDI) i površinsko (zeta) naelektrisanje ispitani su metodom laserske difrakcije pomoću uređaja čiji se rad zasniva foton-korelacionoj spektroskopiji (slika 3.7) (Zetasizer Nano Series, Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Ovo je najpouzdanija metoda za određivanje raspodele veličina čestica. Uzorci su razblaženi demineralizovanom vodom i analizirani. Na osnovu veličine čestica može se zaključiti i kakva je struktura lipozoma: unilamelarna ili multilamelarna. Merena su vršena u triplikatu na sobnoj temperaturi.



Slika 3.7. Zetasizer Nano ZS

3.8.4. SEM analiza lipozoma

Priprema uzoraka lipozoma

Uzorci iz disperzije lipozoma su poređani na aluminijumskim nosačima prekrivenim dvostruko lepljivom ugljenikovom trakom, a potom su ostavljeni da se osuše na vazduhu, dok uzorke liofilizovanih fosfolipida nije bilo potrebno sušiti. S obzirom da se analiza materijala vrši pod elektronskim snopom, ispitivani materijal mora da bude provodan, kako ne bi došlo do nagomlavanja naelektrisanja i zagrevanja uzorka. Uzorci fosfolipida, nisu provodni, pa je neophodno prethodno neparivanje, tj. prekrivanje tankim slojem (15-25 nm) elektroprovodnog materijala. Kao elektroprovodni materijal je korišćeno zlato.

Snimanje uzoraka

Nakon uparavanja, uzorci su ubačeni u komoru i stavljeni su na stočić, koji se može pomerati duž pet osa omogućavajući time posmatranje i analiziranje iz različitih projekcija. Sliku daju sekundarni elektroni koji su dislocirani (izbačeni) sa površine skeniranog uzorka nakon bombardovanja od strane primarnog elektronskog snopa.

Sekundarni elektroni dolaze do detektora (pozitivnog naelektrisanja) gde se indukuje električni signal koji se pojačava i digitalizuje. Kao rezultat na ekranu se pojavljuje topografska slika površine ispitivanog objekta.

3.8.5. Difuzioni eksperimenti

Difuzija polifenola iz konvencionalnih lipozoma

Sledećim difuzionim eksperimentom praćena je difuzija polifenola iz disperzije nemodifikovanih lipozoma. Lipozomi su pripremljeni prolipozomnom metodom, postupkom opisanim u odeljku 3.13. Eksperiment je trajao 6 h, a uzorci su uzimani u intervalima od 15 min tokom prvih dva sata, a tokom preostalih 4 h, u intervalima od 30 min.

Postupak termostatiranja i uzimanja uzoraka je isti kao i kod prvog difuzionog eksperimenta. Jedina razlika je u donorskom rastvoru. Sada je kao donorski rastvor upotrebljeno 2.107 g disperzije lipozoma.

Koncentracija polifenola je određena spektrofotometrijski u uzetim uzorcima, kao i u ekstraktu čaja koji je korišćen za pripremu lipozoma.

Difuzija polifenola iz modifikovanih lipozoma

U sledećim eksperimentima praćena je difuzija polifenola iz disperzije lipozoma koji su modifikovani polisorbitima (*Span-om 20*, *Span-om 40*, *Tween-om 20*, odnosno *Tween-om 60*). Eksperimenti su trajali po 6 h, a uzorci su uzimani u intervalima od 15, odnosno 30 min.

Postupak termostatiranja i uzimanja uzoraka je isti kao i kod prethodnih difuzionih eksperimenata, jedino su sada kao donorski rastvori upotrebljene disperzije lipozoma čija je membrana modifikovana (tabela 3.2).

Tabela 3.2. Masa disperzije lipozoma u donorskom delu za različite vrste čestica

Vrsta čestice	Masa disperzije u donorskom delu [g]
Lipozomi modifikovani Span-om 20	2.500
Lipozomi modifikovani Span-om 40	2.412
Lipozomi modifikovani Tween-om 20	2.074
Lipozomi modifikovani Tween-om 60	2.100

Koncentracija polifenola je određena spektrofotometrijski u svim uzetim uzorcima, kao i u ekstraktima čaja koji su korišćeni za pripremu lipozoma modifikovanih *Span*-om 20, *Span*-om 40, *Tween*-om 20, odnosno *Tween*-om 60.

3.9. Određivanje koncentracije polifenola u uzorcima

Koncentracija ukupnih polifenola u svim uzorcima određena je spektrofotometrijski *Folin-Ciocalteu* metodom.

0.1 ml uzorka je razblaženo sa 6 ml destilovane vode, nakon čega je dodato 0.5 ml *Folin-Ciocalteu* reagensa (razblaženog destilovanom vodom u odnosu 1:2) i 1.5 ml 20%-tnog rastvora natrijum-karbonata. Smeša je homogenizovana i dopunjena destilovanom vodom do 10 ml. Nakon 2 h na sobnoj temperaturi određena je koncentracija polifenola u uzorcima prema ranije opisanoj metodi. Kao slepa proba korišćena je destilovana voda.

Svi difuzioni eksperimenti su rađeni dva puta, kako bi se proverila reproduktivnost rezultata. Srednje vrednosti koncentracija polifenola, određene na osnovu difuzionih eksperimenata, korišćene su u svim proračunima.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Baždarni dijagrami i rezultati HPLC analize

Jednačina baždarne prave za određivanje ukupnih polifenola ima sledeći oblik: $A=0.00097 \cdot c$, gde je A – izmerena vrednost apsorbance na talasnoj dužini od 765 nm, a c – koncentracija rastvora galne kiseline (mg/l).

Jednačina baždarne prave za ABTS metodu je: $y = 0.3115 \cdot x$, gde je x – koncentracija rastvora Trolox-a (mmol/l), y – izmerene vrednosti apsorbance pri talasnoj dužini od 734 nm, dok je jednačina baždarne prave za FRAP metodu: $y = 1,0682 \cdot x$, gde je x – koncentracija rastvora Fe(II) (mmol/l), y – izmerene vrednosti apsorbance pri talasnoj dužini od 593 nm.

U tabeli 4.1. su prikazani ukupni sadržaj polifenola i sadržaj ruzmarinske kiseline inkapsulirani u alginantne čestice primenom HPLC analize. Od svih polifenolnih jedinjenja, ruzmarinska kiselina je najzastupljenija u ekstraktu biljke majčine dušice (Stojanović i sar. 2012, Rusak i sar. 2008) i zato se ovo jedinjenje navodi kao pokazatelj. Ispitane su i suve forme čestica, kao i efekat punjenja čestica inulinom i saharozom.

U zavisnosti od vrste čestica, sadržaj ukupnih polifenola se kretao od 1.7 do 4.1 mg(GAL)/g. Ukupni sadržaj polifenola, kao i sadržaj ruzmarinske kiseline u hidrogel česticama odgovaraju teorijskim vrednostima. Rezultati takođe pokazuju da se posle sušenja dobijaju oblici čestica koji su koncentrovaniji. To potvrđuju i HPLC analize sadržaja ruzmarinske kiseline, koja je iznosila 0.5 mg/g za hidrogel čestice, a 7.9 mg/g za liofilizovane čestice (tabela 4.1). Takođe, dodatak inulina ili saharoze kao punioca ne utiče mnogo na sadržaj ukupnih polifenola, dobijena je slična vrednost kao i za alginatne hidrogel čestice (tabela 4.1).

U ovoj tezi, antioksidativna aktivnost je određena na dva načina: pomoću ABTS metode i FRAP metode. Prema dobijenim rezultatima (tabela 4.1), antioksidativna aktivnost liofilizovanih čestica je 15 puta (ABTS metoda) ili 13 puta (FRAP metoda) veća od antioksidativne aktivnosti hidrogel čestica. Ovaj rezultat je u skladu sa istraživanjima Čena i sar, koji tvrde da hidrogel čestice napravljene od alginata sa visokim sadržajem G-segmenata izražavaju veću antioksidativnu aktivnost kada se

sadržaj vode smanjuje (tj. sušenjem). Oni, takođe, navode da čestice napravljene od alginata sa visokim sadržajem M-segmenata ne pokazuju značajne promene u antioksidativnoj aktivnosti posle sušenja istih. Prema prethodnim istraživanjima, alginat korišćen u ovom radu ima visok sadržaj G-segmenata (67%) i GG blokova (55%) (Manojlović i sar. 2008).

Kao što se može videti iz tabele 4.1, liofilizovane čestice pokazuju veću antioksidativnu aktivnost od suvih čestica (oko dva puta), bilo da je antioksidativna aktivnost određena ABTS ili FRAP metodom, što ukazuje na to da liofilizacija čuva antioksidativnost polifenolnih jedinjenja bolje nego proces sušenja (Langley-Evans 2000). Visoka temperatura dovodi do degradacije i gubitka polifenolnih jedinjenja, tako da je sušenje zamrzavanjem (liofilizacija) efikasniji proces od klasičnog sušenja na povišenoj temperaturi za proizvodnju suvih formi čestica (Katsube i sar. 2009, Fletcher i sar. 2005).

Tabela 4.1. Sadržaj ukupnih polifenola, sadržaj ruzmarinske kiseline i antioksidativni kapacitet čajnog ekstrakta i alginatnih čestica (Stojanović i sar. 2012)

	Ukupni polifenoli	Ruzmarinska kiselina	ABTS	FRAP
	$\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{čestica}}^{-1}$	$\text{mg} \text{g}_{\text{čestica}}^{-1}$	$\mu\text{mol Trolox} \text{g}_{\text{čestica}}^{-1}$	$\mu\text{mol Fe(II)} \text{g}_{\text{čestica}}^{-1}$
Ekstrakt čaja	$2.01 \pm 0.02^{\text{a}}$	$0.57 \pm 0.08^{\text{b}}$	$8.60 \pm 0.05^{\text{c}}$	$16.59 \pm 1.06^{\text{d}}$
Alginatne čestice	2.04 ± 0.06	0.49 ± 0.07	8.02 ± 0.31	6.06 ± 0.36
Suve čestice	2.52 ± 0.09	2.09 ± 0.03	56.2 ± 9.12	44.06 ± 1.56
Liofilizovane čestice	4.15 ± 0.13	7.91 ± 0.15	108 ± 11.2	92.80 ± 6.98
Hidrogel čestice pripremljene apsorpcijom	1.67 ± 0.05	0.39 ± 0.02	10.36 ± 0.10	6.48 ± 0.72
Alginatne čestice sa inulinom	1.75 ± 0.06	0.45 ± 0.03	11.30 ± 0.65	8.34 ± 0.03
Suve čestice sa saharozom	2.21 ± 0.08	n.d.	63.99 ± 0.35	11.36 ± 0.08

^ajedinica je [$\text{mg}_{\text{GAE}} \text{ml}^{-1}$]

^bjedinica je [$\text{mg} \text{ml}^{-1}$]

^cjedinica je [$\mu\text{M}_{\text{Trolox}}$]

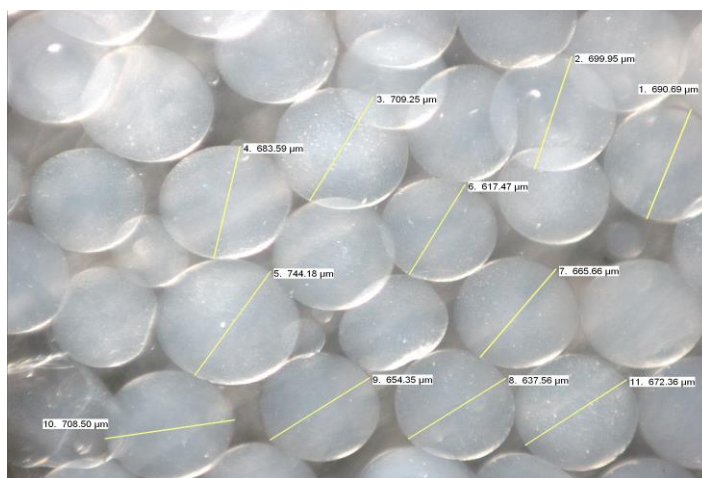
^djedinica je [$\mu\text{M}_{\text{Fe}^{2+}}$]

4.2. Karakterizacija alginatnih čestica

4.2.1. Određivanje veličine hidrogel čestica optičkim mikroskopom

Veličina hidrogel alginatnih čestica je ispitivana pomoću optičkog mikroskopa. Uzorci čestica su slikani i merene su veličine pojedinačnih čestica u uzorku. Dobijeni su sledeći rezultati:

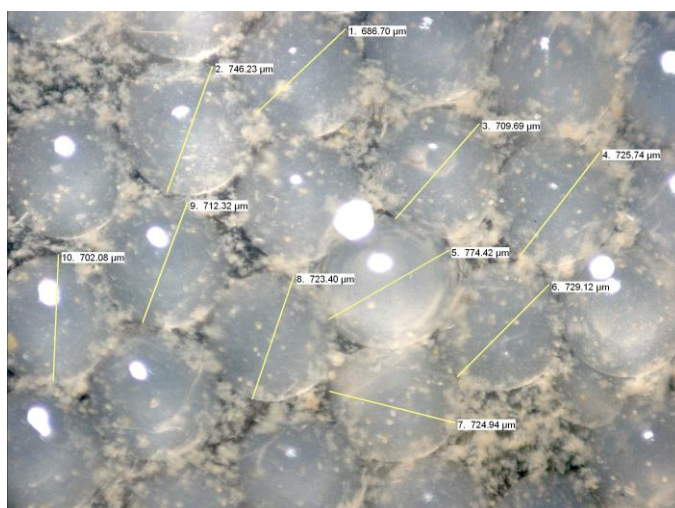
I Hidrogel čestice:



Slika 4.1. Hidrogel čestice

Srednja veličina hidrogel čestica iznosila je 651.02 µm (slika 4.1).

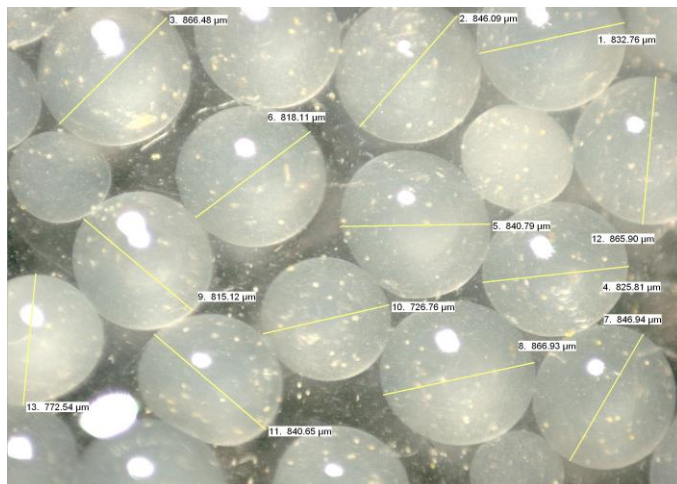
II Hidrogel čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja:



Slika 4.2. Hidrogel čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja

Srednja veličina hidrogel čestica sa inkapsuliranim ekstraktom čaja iznosila je 725.69 μm (slika 4.2).

III Čestice alginat – hitozan sa inkapsuliranim ekstraktom čaja:



Slika 4.3. Čestice alginat – hitozan sa inkapsuliranim ekstraktom čaja

Srednja veličina čestica alginat – hitozan, sa inkapsuliranim ekstraktom čaja iznosila je 827.25 μm (slika 4.3).

Određivanjem veličine mikročestica, njihovim posmatranjem i slikanjem optičkim mikroskopom, utvrđeno je da su hidrogel mikročestice najmanjeg prečnika. S druge strane, čestice alginat – hitozan, sa inkapsuliranim ekstraktom čaja imaju najveći prečnik, što je i bio očekivani rezultat.

Tabela 4.2. Veličina čestica i stepen inkapsulacije za različite vrste alginantih čestica

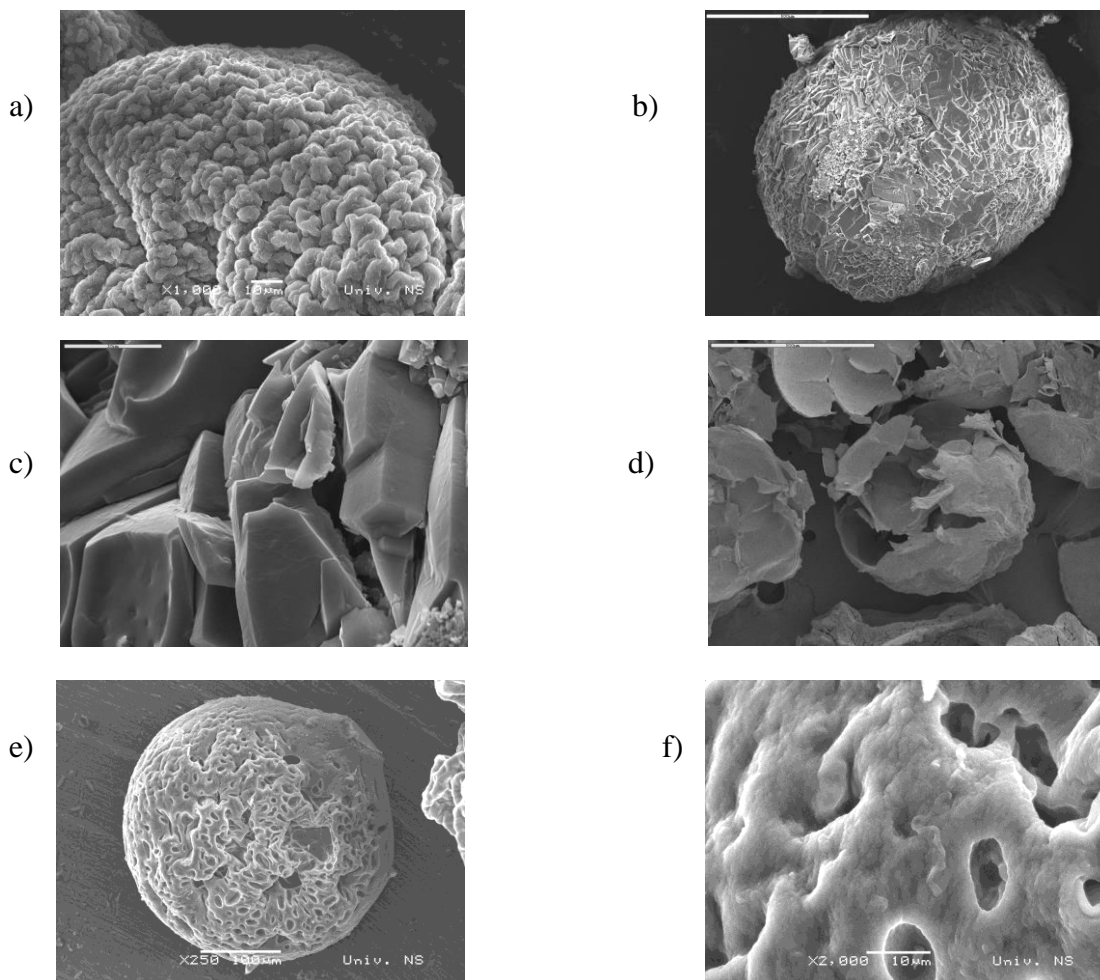
Vrsta čestica	Veličina čestica
Alginatne čestice	727 \pm 16
Suve čestice	630 \pm 22
Liofilizovane čestice	443 \pm 32
Alginatne čestice pripravljene apsorpcijom	710 \pm 25
Alginatne čestice sa inulinom	750 \pm 13
Suve čestice sa saharozom	660 \pm 15

Takođe, iz tabele 4.2 se može videti da liofilizovane čestice imaju za oko 40 % manji prečnik u odnosu na alginante hidrogel čestice. Posle termičkog sušenja, čestice dobro zadržavaju svoj prvobitni oblik u slučaju dodavanja inulina kao punioca (videti SEM analize), dok se prečnik čestica povećava za 5 % (tabela 4.2). Veličina alginatnih

čestica pripremljenih apsorpcijom je slična kao i veličina alginatnih čestica pripremljenih klasičnim ekstruzionim postupkom. Suve čestice (i alginatne i sa saharozom) imaju za oko 10% manji prečnik od hidrogel čestica (tabela 4.2).

4.2.2. SEM analiza alginatnih čestica

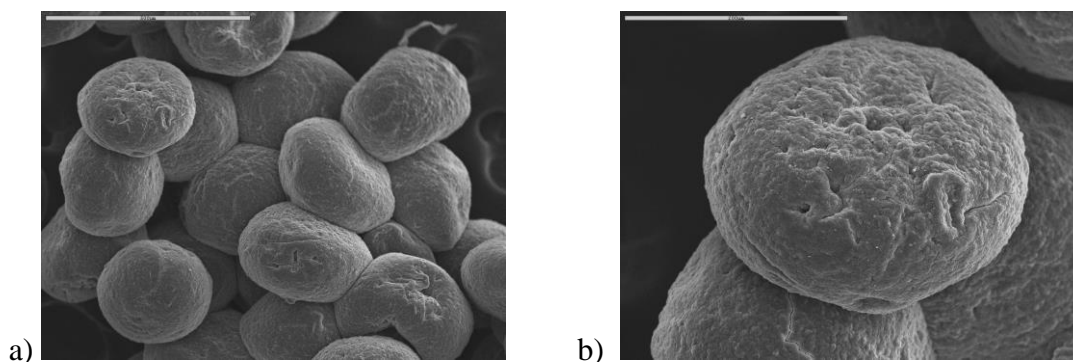
Površinska morfologija alginatnih i modificovanih alginatnih čestica je ispitana korišćenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa što je prikazano na slici 4.5.



Slika 4.4. SEM mikrograf Ca-alginat čestica: a) hidrogel čestica – veliko uvećanje; b) hidrogel čestica – malo uvećanje; c) čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja; d) sušene čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja – veliko uvećanje; e) sušene čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja – malo uvećanje; f) liofilisane čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja

Alginatne hidrogel čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja, posmatrane golim okom imaju sferičan oblik sa relativno glatkom površinom. Rezultati SEM analize

ukazuju na strukturu pčelinjeg saća, sa unutrašnjim porama prečnika veličine 5-20 μm , koje su nastale isparavanjem vode (slika 4.4. c). Površina alginatnih čestica sa inkapsuliranim ekstraktom čaja se sastoji od sistema tankih brazda. Tokom procesa sušenja, stvaraju se dodatne pukotine i površina postaje još više naborana, tako da izgleda kao da na njoj postoje krateri oivičeni izbočenim zidovima (slike 4.4. d i 4.4. e). Liofilizacijom čestica može da dođe do urušavanja bočnih zidova pora, što uzrokuje smanjenje čestica, tako da ne izgledaju sferične (slika 4.4. f).



Slika 4.5. SEM mikrograf sušenih čestica alginat-inulin sa inkapsuliranim ekstraktom čaja: a) malo uvećanje; b) veliko uvećanje

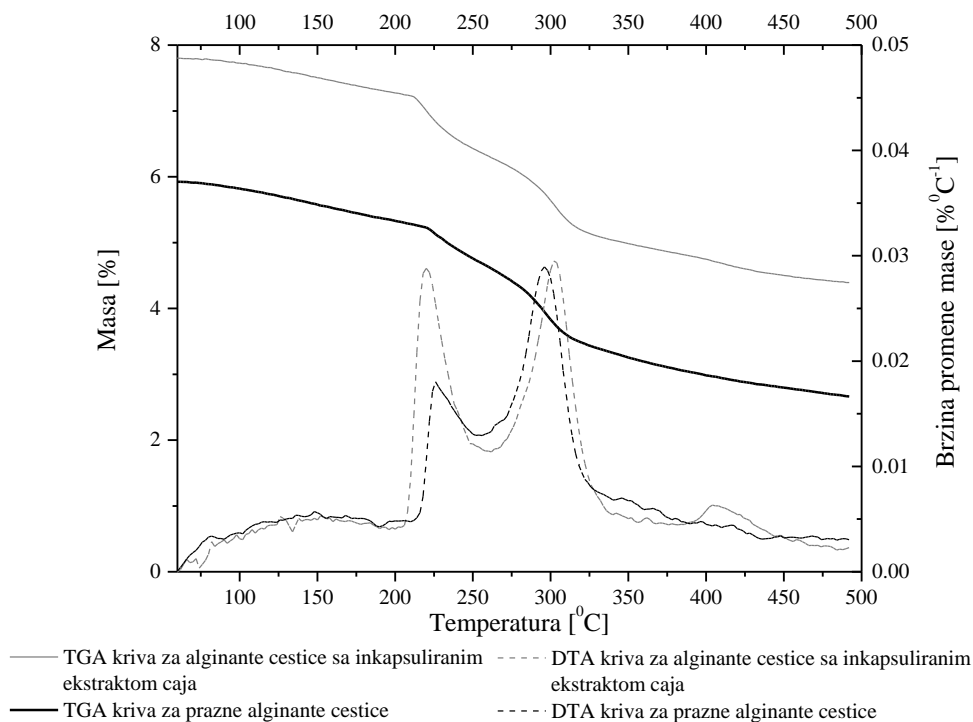
Inulin se koristi kao punilac i zato kod čestica alginat-inulin, sa inkapsuliranim ekstraktom čaja, dolazi do zadržavanja oblika čestice tokom procesa sušenja i liofilizacije. Kao što se vidi sa slike 4.5 čestice izgledaju sferično i imaju homogenu strukturu.

4.2.3. Termička analiza alginatnih čestica

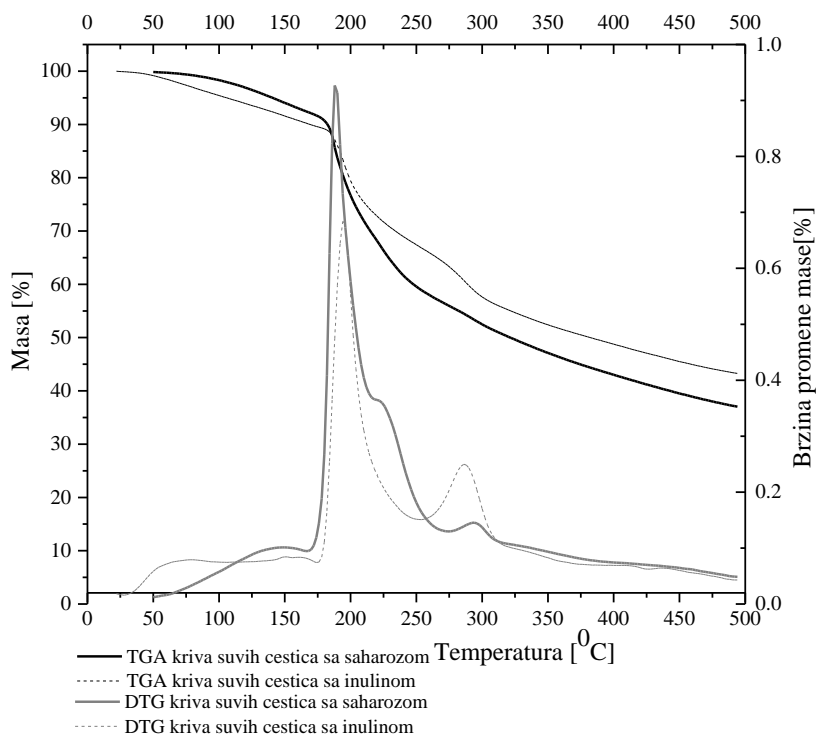
Termičko razlaganje polisaharida uključuje različite faze: desorpciju fizički apsorbovane vode, uklanjanje vode (reakcija dehidratacije), depolimerizaciju C-O i C-C lanaca, koja dovodi do nastajanja jedinjenja: CO, CO₂ i H₂O i formiranje polinuklearne aromatične i grafitne ugljenikove strukture (Parikh i Madamwar 2006).

Na slici 4.6 prikazane su TGA i DTA krive za prazne alginatne čestice i alginatne čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja u temperaturnom opsegu od 0 do 500 °C (slika 4.6). Prvi gubitak mase se javlja u opsegu od 50 do 150 °C, što se na osnovu termalne analize praznih alginatnih čestica može prepisati degradaciji polimerne mreže (Laurienzo i sar. 2005). Drugi gubitak mase nastaje od temperature 220 °C, pa na dalje i

predstavlja oslobađanje ekstrakta čaja majčine dušice. Uopšteno, glavni polifenoli prisutni u hidrofiličnim ekstraktima imaju tačke topljenja iznad 200 °C (na primer, kafeinska kiselina 224 °C, katehin 242 °C, epikatehin 254 °C, apigenin 350 °C) sa nekoliko izuzetaka (na primer, ruzmarinska kiselina 173 °C, eriocitrin 161-170 °C i neki fenolni glikozidi 130-240 °C).



Slika 4.6. TGA- DTA termogram za alginatne čestice



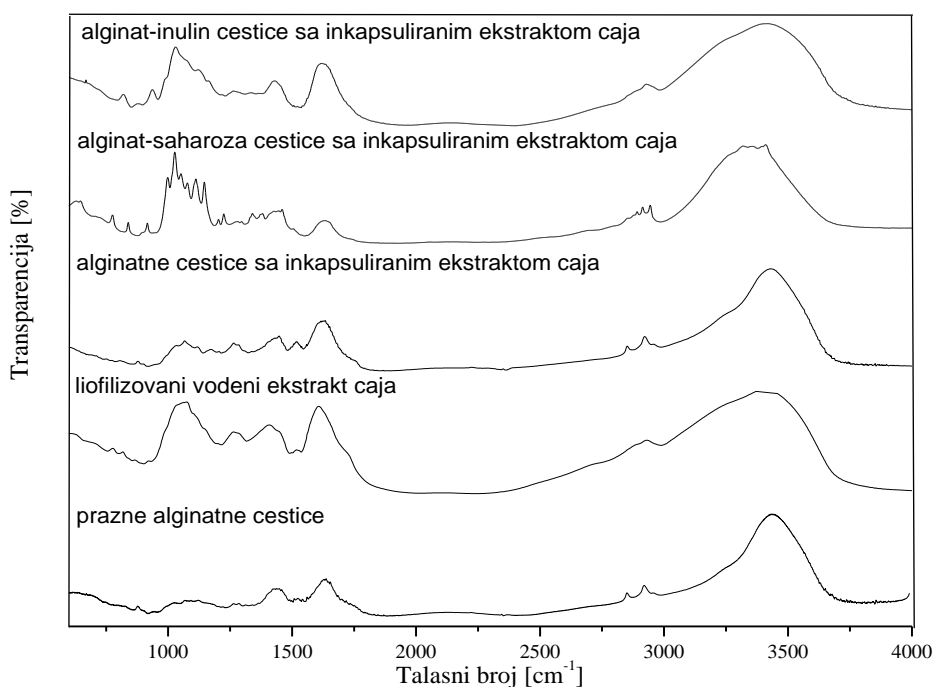
Slika 4.7. TGA- DTA termogram za suve alginatne čestice

Oslobađanje komponenti iz majčine dušice se javlja u širokom rasponu temperatura sa neuniformnom brzinom (slike 4.6 i 4.7). Postoji nekoliko DTA maksimuma u ovom temperaturnom opsegu sa glavnim pikom na oko 190 °C u slučaju sušenih čestica punjenih saharozom (slika 4.7) i on odgovara tački topljenja saharoze (Hurtt i sar. 2004). Druga dva maksimuma na DTA krivima alginantih čestica (slika 4.6) i alginat-saharozu (slika 4.7) ukazuju na to da se gubici mase javljaju na oko 225 °C i 300 °C. Ovi DTA maksimumi se dodeljuju degradaciji alginata (Singh i sar. 2010). U slučaju alginat-inulin čestica, drugi DTA maksimum leži na ~ 285 °C, što odgovara termičkoj degradaciji inulina (slika 4.7) (Cavalcanti i sar. 2004). Takođe, dosadašnja termička merenja (Manojlovic i sar. 2006) su pokazala da raspadanje nosača počinje na oko 155 °C i da se do 230 °C razgradi oko 20% matriksa. U slučaju liofilisanih čestica, oko 80 % mase je očuvano dok je preostala masa (65%) znatno niža za suve alginatne čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja (slika 4.7).

4.2.4. FTIR analiza alginatnih čestica

FTIR analiza je korišćena u cilju identifikacije funkcionalnih grupa i karakterisanja veza između matriksa gela i komponenti čajnog ekstrakta. Spektar prikazan na slici 4.8 prikazuje nekoliko relevantnih pikova u ispitivanim uzorcima. Veliki i širok apsorpcioni pik na 3430 cm^{-1} pokazuje prisustvo -OH valencione vibracije. Veliki asimetrični valencioni apsorpcioni pik na 1625 cm^{-1} i manji simetrični valencioni pik blizu 1450 cm^{-1} je dokaz prisustva karboksilatnog anjona COO^- (Vijaya i sar. 2008). Mali pik na 2920 cm^{-1} se pripisuje -CH_2 grupi. Valencioni pik na 1122 cm^{-1} je pripisan -C-O skeletu etarske grupe, a pik na 1065 cm^{-1} je pripisan -C-O skeletu alkoholnih grupa (Vijaya i sar. 2008).

Upoređivanjem FTIR spektra praznih alginatnih čestica i čestica sa inkapsuliranim čajnim ekstraktom, uočavaju se određene promene u intenzitetu pikova u oblasti $900\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ (slika 4.8). Ove promene označavaju deformaciju veza u ugljenohidratnoj oblasti. Male izbočine na 1170 cm^{-1} u spektru praznih alginatnih čestica postaju upečatljiv pik u spektru alginatnih čestica sa inkapsuliranim čajnim ekstraktom. Dalje, intenzitet pikova na 1260 , 1070 i 1515 cm^{-1} u spektru alginata povećavaju se u spektru alginata sa inkapsuliranim čajnim ekstraktom. Ovo je pripisano prisustvu jedinjenja iz ekstrakta čaja, koja pokazuju oštre pikove u FTIR spektru na gore nabrojanim talasnim dužinama, pri čemu se one objašnjavaju: vibracijama aromatičnog prstena na $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, C-O-C vibracijama estara na 1260 cm^{-1} , C-OH valencionim vibracijama sekundarnih cikličnih alkohola na 1070 cm^{-1} (Kets i sar. 2004). Ovo se ne menja ni posle formiranja čestica, što ukazuje na odsustvu hemijskih interakcija između jedinjenja iz ekstrakta čaja i alginata (Chan i sar. 2009).



Slika 4.8. FTIR spektar Ca-alginatnih čestica

Posmatrajući FTIR spektar alginat-saharoza čestica (slika 4.8), spektralna oblast između 1200 i 800 cm⁻¹ obuhvata niz preklapljenih pikova, koji su pretežno posledica C-O i C-C valencionih vibracija. Pik na 1340 cm⁻¹ je rezultat C-O valencione vibracije CH₂-OH grupe, dok je pik na 979 cm⁻¹ uglavnom povezan sa valencionim vibracija na C-C prstenu (Kets i sar. 2004). Prema literaturnim podacima, suva saharoza ima dominantan apsorpcioni pik na 3360 cm⁻¹ u O-H valencionom regionu (Kets i sar. 2004) koji se superponira sa širokim apsorpcionim pikom na 3430 cm⁻¹. Dva karakteristična pika za inulin na 2930 cm⁻¹ i 1030 cm⁻¹, koja se odnose na CH₂ vibracije i C-O-C savijanje respektivno (Fares i sar. 2011) su vidljiva na FTIR spektru alginat-inulin čestica (slika 4.8).

U nekim istraživanjima o interakcijama između alginata i polifenolnih jedinjenja (Fares i sar. 2011, Nadavala i sar. 2009) su se pojavili drugačiji rezultati. Naime, Nadavala i sar. u svojim istraživanjima tvrde da su karboksilne i hidrofilne grupe posebno aktivna mesta za vezivanje fenolnih jedinjenja. S druge strane, u nedavnim istraživanjima (Stojanović i sar. 2012) nisu pronađene hemijske interakcije između materijala biljnog porekla (koji sadrži brojna hemijska jedinjenja poput alkaloida, amida, steroida, karboksilne kiseline i sl.) i hidrogel matriksa na bazi alginata (Chan i

sar. 2009). Prema tim istraživanjima i rezultatima prikazanim u ovom radu, može se zaključiti da je Ca-alginatna matrica pogodan materijal za inkapsulaciju aktivnih komponenti ekstrahovanih iz biljaka.

4.2.5. Određivanje stepena inkapsulacije

Stepen inkapsulacije je određen za alginatne čestice, kao i za alginat-hitozan i alginat-inulin čestice.

Izmereno je da je apsorbanca rastvora natrijum-alginata u čaju iznosila 0.458, pa je na osnovu tog podatka i jednačine baždarne krive, određena početna koncentracija polifenola. Pošto je rastvor razblažen u odnosu 1:5 ovu koncentraciju pomnožimo sa 5 i podelimo sa ukupnom masom čestica koju smo u tom slučaju dobili. Masa čestica je bila 4.426 g, pa je početna koncentracija polifenola iznosila:

$$C_{\text{poč}} = 574.48 \text{ (mg/l)/g}_{\text{čestica}}$$

Isto se računa i koncentracija polifenola u rastvoru kalcijum-hlorida u čaju. Izmerena apsorbanca je iznosila 0.479, te je koncentracija polifenola u rastvoru bila:

$$C_1 = 601.24 \text{ (mg/l)/g}_{\text{čestica}}$$

Nakon završetka procesa elektrostatičke ekstruzije, izmerena je apsorbanca rastvora kalcijum-hlorida sa česticama u kojima su inkapsulirani polifenoli. Ona je iznosila 0.488, pa je ponovo istim postupkom dobijena vrednost koncentracije polifenola u rastvoru koja iznosi:

$$C_2 = 611.9 \text{ (mg/l)/g}_{\text{čestica}}$$

Razlika koncentracija C_2 i C_1 predstavlja koncentraciju polifenola koja je otpuštena iz alginatnih čestica u rastvor za geliranje. Kada od početne koncentracije polifenola oduzmemo ovu razliku i podelimo sa početnom koncentracijom polifenola dobijamo vrednost koja pomnožena sa 100 predstavlja stepen inkapsulacije:

$$\text{Stepen inkapsulacije} = [C_{\text{poč}} - (C_2 - C_1) / C_{\text{poč}}] \cdot 100$$

$$\text{Stepen inkapsulacije} = 98.1 \%$$

Dobijena je veoma velika vrednost za stepen inkapsulacije polifenola, iz čega se može zaključiti da su alginatne čestice pogodne za inkapsulaciju polifenola iz ekstrakta

čaja. Na isti način je izračunat i stepen inkapsulacije alginat-inulin čestica i rezultati su prikazani u tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Stepen inkapsulacije različitih alginatnih čestica

Vrsta čestice	Stepen inkapsulacije
alginat	98
alginat-hitozan	86
alginat-inulin	82

4.3. Kinetika otpuštanja polifenola

4.3.1. Kinetika otpuštanja polifenola iz alginatnih čestica u stakleni sud

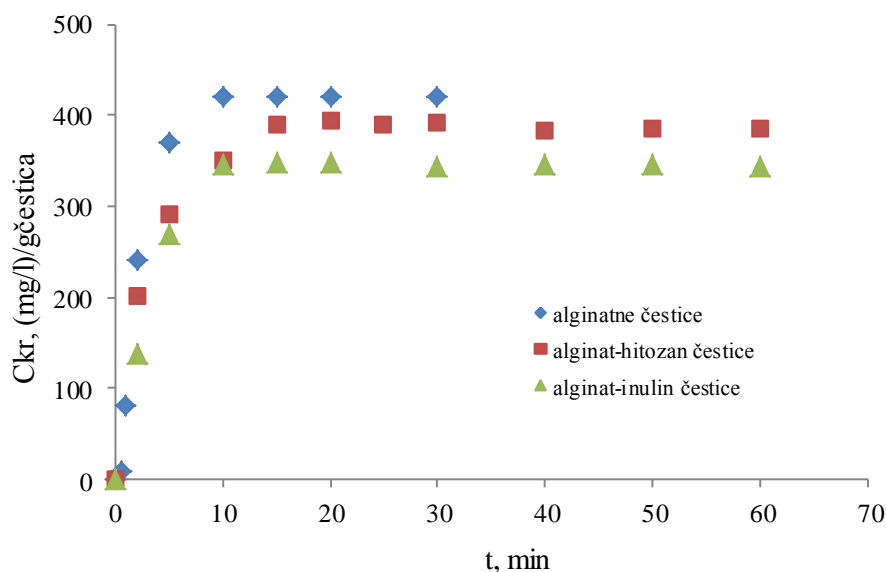
Kinetika difuzije polifenola iz čestica u okolni medijum praćena je preko promene koncentracije ukupnih polifenola u toku vremena. Koncentracija polifenola određivana je spektrofotometrijski - FC metoda.

Na slici 4.9. su prikazani eksperimentalni rezultati otpuštanja polifenola iz alginatnih čestica, alginat-hitozan i alginat-inulin čestica u staklenu čašu. Rezultati su dobijeni merenjem apsorbanci uzoraka u određenim vremenskim intervalima na talasnoj dužini od 765 nm. Koncentracije su izračunate iz jednačine baždarne prave. Masa čestica je iznosila 3.4 g, početna zapremina je bila 50 ml, a zapremina uzoraka po 2 ml.

Tačne vrednosti koncentracija po masi čestica su izračunate na osnovu jednačina:

$$C_v = C \cdot (V_{\text{poč}} - V_{\text{uz}}) / V_{\text{poč}} \quad (4.1)$$

$$C_{\text{kr}} = C_v / m_{\text{č}} \quad (4.2)$$



Slika 4.9. Poređenje krivih otpuštanja iz alginatnih čestica, alginat-hitozan i alginat-inulin čestica

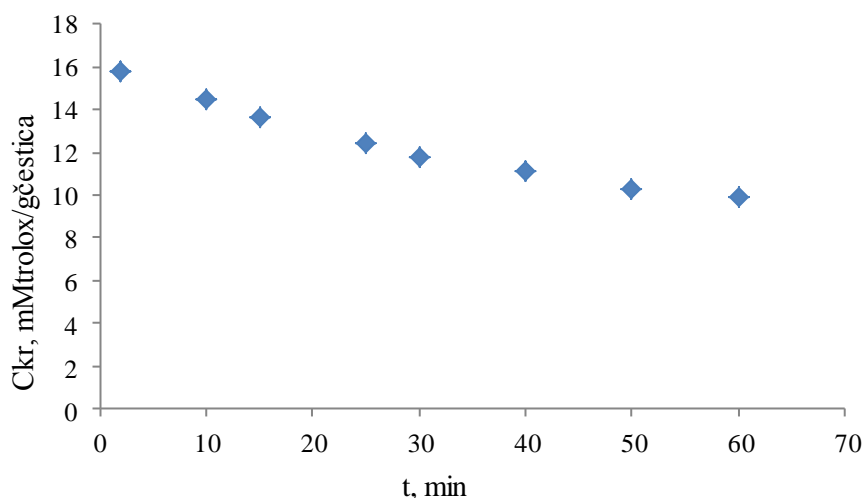
Sa slike 4.9. se vidi da postoji sličan trend otpuštanje polifenola za sve tri vrste alginatnih čestica. Otpuštanje polifenola iz alginatnih čestica se dešava u kratkom vremenskom intervalu. Polifenoli su otpušteni iz čestica u prvih 10-ak minuta, što je bilo i očekivano. Ovakav rezultat potiče od velikog gradijenta koncentracije između unutrašnjosti alginatnih čestica i okolnog medijuma. Ovaj gradijent predstavlja pogonsku silu za difuziju polifenola kroz alginatnu matricu. Nakon 10 minuta, koncentracija polifenola u sudu za otpuštanje postaje konstantna.

Cilj ovog istraživanja bio je produženje vremena otpuštanja polifenola iz čestica. U tu svrhu su u sistem alginat – ekstrakt čaja uvedeni hitozan i inulin. Sa slike 4.9. se vidi da se polifenoli iz čestica alginat-hitozan sa inkapsuliranim ekstraktom čaja, otpuštaju u prvih 15-20 min. Znači, vreme otpuštanja polifenola je neznatno produženo u odnosu na hidrogel čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja. Ovakav rezultat potiče od činjenice da hitozan „obavija“ alginatnu česticu, formirajući na taj način dodatni sloj koji predstavlja prepreku za difuziju polifenola iz unutrašnjosti matrice u okolni medijum. Nakon 20 min, koncentracija polifenola u okolnom medijumu postaje konstantna. Takođe, sa slike 4.9. se može primetiti da se polifenoli iz čestica alginat-inulin otpuštaju u istom vremenskom intervalu. Vreme otpuštanja polifenola nije značajno produženo.

Prema dobijenim rezultatima možemo da zaključimo da jedinjenja niske molekulske težine (kao što je inulin) ne mogu da spreče gubitak aktivnih supstanci iz porozne matrice alginata (Murata i sar. 1993).

4.3.2. Kinetika otpuštanja polifenola – ABTS metoda

Dobijeni rezultati praćenja kinetike otpuštanja polifenola iz alginatnih čestica prikazani su na slici 4.10.



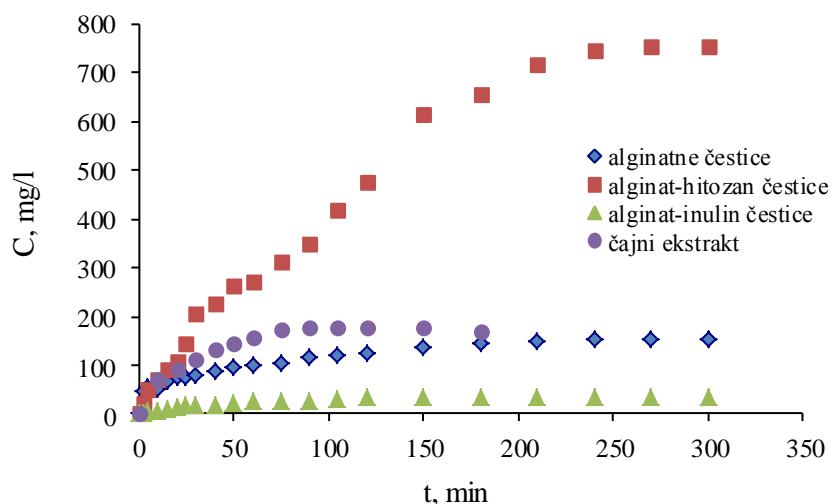
Slika 4.10. Kriva ABTS metode za alginatne čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja

Koncentracija otpuštenih polifenola u okolnom medijumu je najmanja na samom početku eksperimenta, tj. u početnom trenutku uzorkovanja. Tada je obezbojenje ABTS reagensa najmanje, a samim tim i apsorbanca ispitivanih uzoraka najveća, kao i iz nje preračunata koncentracija. To objašnjava maksimum krive na samom početku procesa (slika 4.10). S vremenom, koncentracija polifenola u okolnom medijumu raste, dolazi do intenzivnijeg obezbojenja ABTS reagensa i smanjenja apsorbanca, čime se objašnjava konstantan pad krive na grafiku.

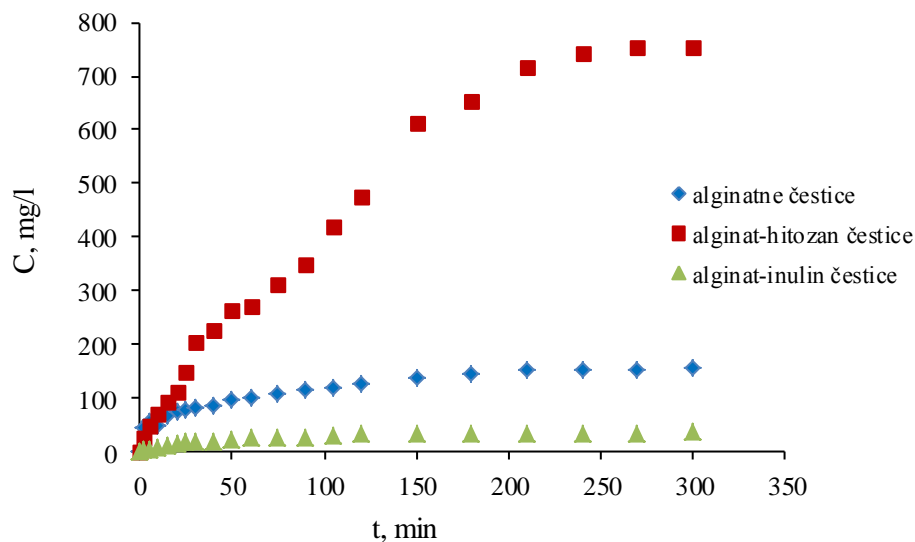
Čestice alginat-hitozan i alginat-inulin sa inkapsuliranim ekstraktom čaja pokazuju iste rezultate ABTS metode kao i alginatne čestice (grafici nisu prikazani).

4.3.3. Kinetika otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta i alginatnih čestica – Franz-ova ćelija

Krive otpuštanja polifenola (slike 4.11 i 4.12) predstavljaju promenu koncentracije polifenola u receptorskom delu Franz-ove ćelije u funkciji vremena. Koncentracija polifenola određivana je spektrofotometrijski - FC metoda. Krive otpuštanja pružaju kvalitativnu sliku o brzini difuzije polifenola iz posmatranih sistema.



Slika 4.11. Krive otpuštanja polifenola iz različitih alginatnih čestica i ekstrakta čaja



Slika 4.12. Krive otpuštanja polifenola iz alginatnih čestica, alginat-hitozan i alginat-inulin čestica

Krive otpuštanja polifenola iz različitih vrsta alginatnih čestica daju delimično pogrešnu sliku. Posmatrajući samo krive otpuštanja moglo bi se zaključiti da čestice alginat-hitozan najbrže oslobađaju polifenole, jer su koncentracije u receptorskom delu veće i od koncentracija tokom difuzije polifenola iz rastvora. Međutim, zbog načina pripreme ovih čestica je koncentracija polifenola nekoliko puta veća od koncentracije polifenola u drugim sistemima, pa je samim tim veća pogonska sila za difuziju i brži porast koncentracije u receptorskom delu difuzione ćelije. Gradijent koncentracije predstavlja pogonsku silu za difuziju polifenola kroz alginatnu matricu. Nakon određenog vremena, koncentracija polifenola u receptorskom delu Franz-ove ćelije postaje konstantna.

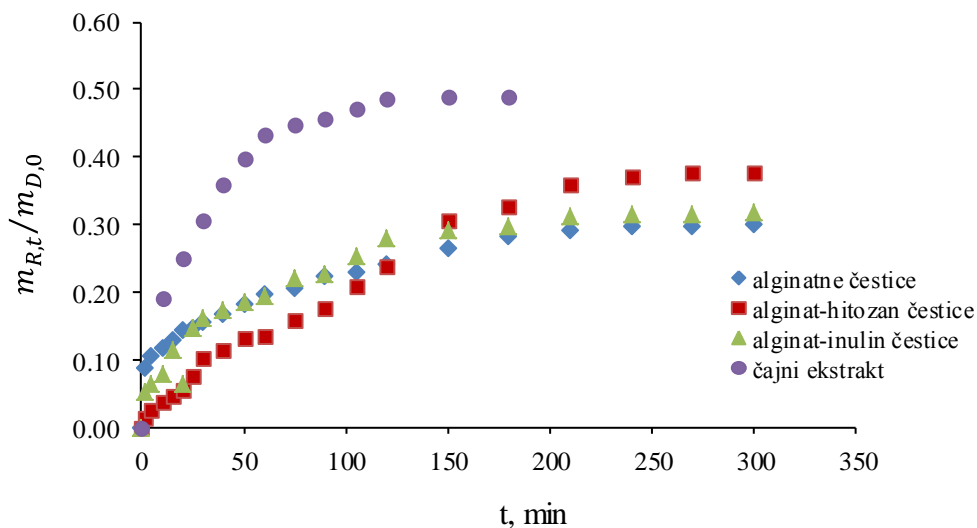
Vreme otpuštanja polifenola iz čestica alginat-hitozan i alginat-inulin treba da bude produženo u odnosu na alginatne čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja. Ovakav rezultat se očekuje s obzirom da hitozan „obavija“ alginatnu česticu, formirajući na taj način dodatni sloj koji predstavlja prepreku za difuziju polifenola iz unutrašnjosti matrice u okolni medium, dok se inulin ugrađuje u membranu alginatne čestice.

Na slici 4.12. može se videti da je period otpuštanja polifenola za alginatne čestice 150 min, nakon čega sistem prelazi u stacionarno stanje. Za čestice alginat-hitozan i alginat-inulin ovo vreme iznosi 240 min, odnosno 150 min, nakon čega koncentracija polifenola postaje konstantna. Vreme potrebno da koncentracija polifenola u čajnom ekstraktu postane konstantna iznosi 60 min.

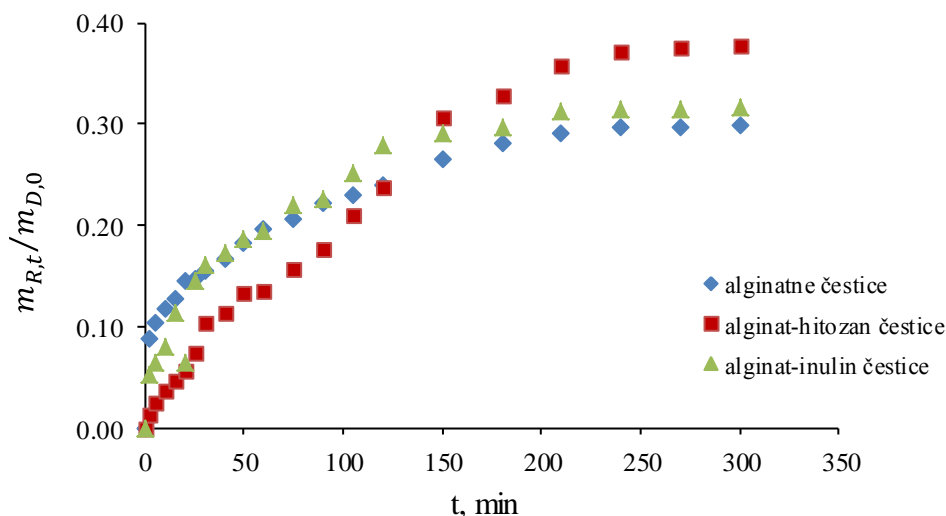
Krive zavisnosti koncentracije polifenola od vremena ne mogu se međusobno porediti, jer uslovi pod kojima su ove čestice napravljene nisu bili identični:

- Za svaki eksperiment pravljnjen je poseban čajni ekstrakt, što znači da postoje i razlike u koncentraciji polifenola između njih.
- Mase čestica koje se nanose na donorski deo razlikuju se u svakom od eksperimenata.
- Početna količina polifenola u donorskom delu nije ista kod svih čestica (ova masa naročito se razlikuje kod čestica koje su obavijene hitozanom. Sama njihova priprema traje duže od ostalih).

Na osnovu krivih otpuštanja nije moguće zaključiti da li se obavljanjem alginatnih čestica dodatnim slojem značajno usporava difuzija polifenola. Da bi se krive otpuštanja polifenola iz ovih čestica mogle upoređivati, neophodna je njihova relativizacija. Jedan od načina jeste da se na ordinatu, umesto vrednosti koncentracija polifenola u receptorskom delu ćelije, nanesu odnosi mase polifenola u receptorskom delu ćelije u određenom trenutku i ukupne mase polifenola koja je uneta u donorski deo ($\frac{m_{R,t}}{m_{D,0}}$), čime se dobija udeo oslobođene komponente (polifenola). Udeli oslobođenih polifenola su na ovaj način potpuno nezavisni od početne količine polifenola u donorskom delu ćelije (slike 4.13 i 4.14).



Slika 4.13. Udeo oslobođenih polifenola iz različitih alginatnih čestica i ekstrakta čaja



Slika 4.14. Udeo oslobođenih polifenola iz alginatnih čestica, alginat-hitozan i alginat-inulin čestica

Upoređivanjem krivih kojima je prikazana zavisnost oslobođene količine polifenola od vremena kod alginatnih čestica, može se zaključiti da se oblaganjem dodatnim slojem ovih čestica, otpuštanje polifenola dodatno usporava u odnosu na otpuštanje iz čistih alginatnih čestica. Da bi se precizno utvrdilo u kojoj meri je difuzija polifenola iz modifikovanih čestica sporija, svi sistemi se moraju kvantitativno opisati određivanjem i upoređivanjem koeficijenta difuzije i difuzionih otpora.

4.4. Izračunavanje koeficijenta difuzije

Difuzija iz rastvora u Franz-ovoj difuzionoj ćeliji se opisuje pomoću jednačine 4.3:

$$D = \frac{1}{\beta t} \ln \left(\frac{C_D^0 - C_R^0}{C_D - C_R} \right) \quad (4.3)$$

Na osnovu podataka dobijenih iz difuzionih eksperimenata, moguće je odrediti vrednosti svih veličina koje figurišu u jednačini (4.3). Transformacijom jednačine (4.3) dobija se sledeći oblik:

$$\ln \left(\frac{C_D^0 - C_R^0}{C_D - C_R} \right) = D \cdot \beta \cdot t \quad (4.4)$$

Ukoliko je eksperimentalno dobijena zavisnost $\ln\left(\frac{C_D^0 - C_R^0}{C_D - C_R}\right)$ od vremena t linearna, moguće je odrediti koeficijent pravca ($D \cdot \beta$), a iz njega vrednost koeficijenta difuzije (D). β je geometrijska konstanta koja za korišćenu Franz–ovu difuzionu ćeliju i celulozno-acetatnu membranu ima vrednost $\beta = 2.49 \cdot 10^4 \text{ m}^{-2}$.

Difuzija polifenola iz čajnog ekstrakta

- Početna koncentracija polifenola u receptorskom delu (C_R^0) jednaka je nuli, jer je u tom trenutku bio prisutan samo receptorski rastvor – destilovana voda.
- Početna koncentracija polifenola u donorskom delu (C_D^0) jednaka je njihovoj koncentraciji u čajnom ekstraktu i iznosi 3524.0 mg/l.
- Koncentracije polifenola u receptorskom delu (C_R) su određene spektrofotometrijski.

Koncentracije polifenola u donorskom delu (C_D) se računaju na osnovu početne koncentracije polifenola u donorskom delu i koncentracije polifenola u receptorskom delu, na osnovu sledeće jednačine:

$$C_{D,t} = \frac{C_D^0 \cdot V_0 - m_t}{(m_0 - m_t) / \rho} \quad (4.5)$$

gde je:

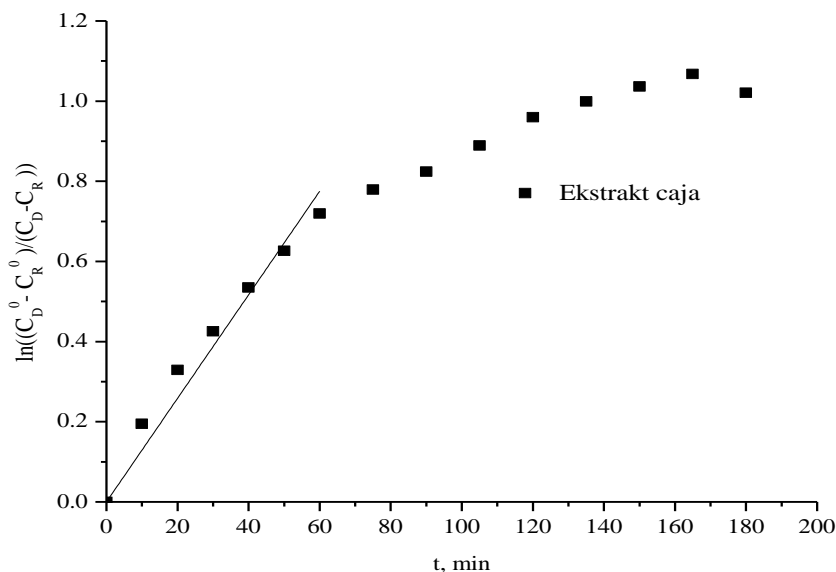
$C_{D,t}$ – koncentracija polifenola u donorskom delu ćelije u trenutku t ,

m_0 – masa uzorka unetog u donorski deo ćelije,

V_0 – zapremina uzorka unetog u donorski deo ćelije,

m_t – masa polifenola koja je prodifundovala iz donorskog u receptorski deo ćelije do trenutka t (određuje se na osnovu izmerenih koncentracija polifenola u receptorskom delu),

ρ – gustina uzorka u donorskom delu ćelije (pretpostavlja se da je konstantna vrednost zbog male promene mase polifenola u donorskom delu, usled difuzije).



Slika 4.15. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz ekstrakta čaja

Na osnovu vrednosti nagiba od 0.0131 min^{-1} (Slika 4.15) i koeficijenta β , izračunava se koeficijent difuzije polifenola iz čajnog ekstrakta: $D = 8.77 \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$.

Difuzija polifenola iz alginatnih čestica

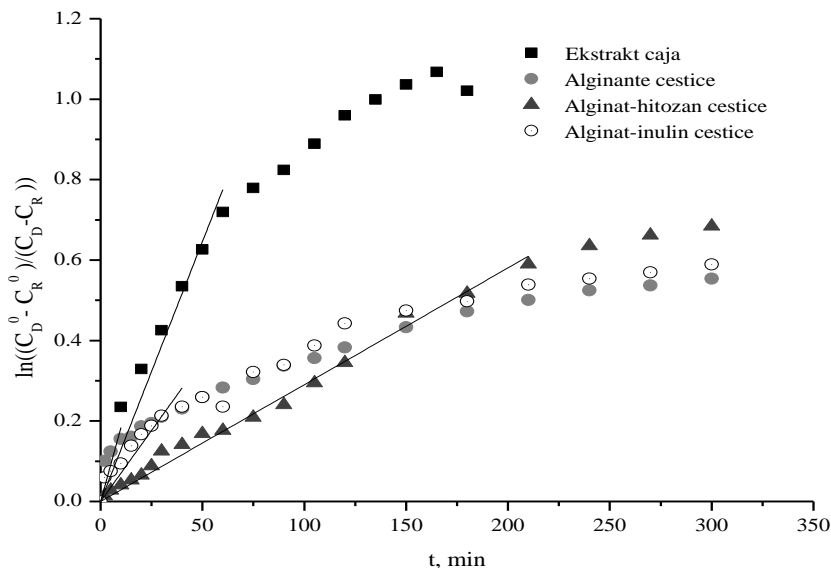
Početna koncentracija polifenola u receptorskom delu (C_R^0) jednaka je nuli.

Početna koncentracija polifenola u donorskom delu (C_D^0) je određena na osnovu izmerenih vrednosti apsorbanaci u citratnom rastvoru alginatnih čestica koje su korišćene za otpuštanje.

- u slučaju alginatnih čestica $C_D^0 = 4806,3 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$
- u slučaju alginat-hitozan čestica $C_D^0 = 18957,2 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$
- u slučaju alginat-inulin čestica $C_D^0 = 2132,6 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$

Koncentracije polifenola u receptorskom delu (C_R) su određene spektrofotometrijski.

Na slici 4.16 je prikazano određivanje koeficijenta difuzije polifenola za sve vrste alginatnih čestica.



Slika 4.16. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz alginatnih i modifikovanih alginatnih čestica

Na osnovu vrednosti nagiba krivih (slika 4.17) i koeficijenta β , izračunavaju se koeficijenti difuzije polifenola iz alginatnih čestica, kao i alginat-hitozan i alginat-inulin čestica (tabela 4.4).

Tabela 4.4. Koeficijenti difuzije za ekstrakt čaja i alginatne i modifikovane alginatne čestice

Vrsta čestica	Nagib krive [min^{-1}]	$D \cdot 10^9$ [m^2/s]
Ekstrakt čaja	0.0131	8.77
Alginatne čestice	0.0184	12.31
Alginat-hitozan čestice	0.0029	2.94
Alginat-inulin čestice	0.0079	5.29

Vrednost koeficijenta difuzije iz alginatnih čestica nije potpuno pouzdan s obzirom da su za određivanje koeficijenta korišćeni samo eksperimentalni rezultati u prvih 10 minuta. Da ovako određena vrednost koeficijenta difuzije nije odgovarajuća govori i činjenica da bi, prema dobijenim rezultatima, difuzija polifenola iz alginatnih čestica

bila brža od difuzije iz rastvora, što je u suprotnosti sa eksperimentalno određenim profilima otpuštanja (slika 4.16). Ovo upućuje na zaključak da kod otpuštanja iz alginatnih čestica brzinu ne određuje difuzija već relaksacija polimera.

Vrednost koeficijenta difuzije čestica alginat-hitozan je oko 3 puta manja od koeficijenta difuzije ekstrakta čaja, što znači da se difuzija polifenola iz ovih čestica značajno usporava. Uzimajući u obzir da je najznačajnija osobina hitozana koja ima uticaj na formiranje i svojstva polielektrolitnog kompleksa alginat-hitozan, njegov stepen deacetilovanja koji je srazmeran broju $-NH_2$ grupa hitozana, posebno je potrebno obratiti pažnju na vrstu hitozana koja se koristi u eksperimentu. Neka istraživanja pokazuju da se smanjenjem molekulske mase oba polimera značajno smanjuje veličina nastalih kompleksnih čestica, ali je uticaj molekulske mase hitozana na veličinu kompleksnih čestica alginat-hitozan veći nego uticaj molekulske mase alginata. Ovo je moguće objasniti lakoćom kojom manji molekuli hitozana prodiru dublje u unutrašnjost kompleksa formirajući manje, homogenije čestice, dok se veliki molekuli zadržavaju uglavnom na površini, gde formiraju polielektrolitnu membranu povećavajući veličinu čestica, tako da optimizacija tehnike inkapsulacije polifenola u ovu vrstu čestica može ići i u pravcu odabira alginata i hitozana sa karakterističnim molekulskim masama. U ovom radu korišćen je hitozan molekulske mase 100-300 kDa, što spada u hitozane srednje molekulske mase.

Koeficijent difuzije dobijen za čestice alginat-inulin je manji od koeficijenta difuzije iz alginata. Ipak, krive otpuštanja pokazuju da je brzina oslobađanja iz ovih čestica približno ista kao brzina oslobađanja iz alginatnih čestica, ali u ovom slučaju difuzija određuje brzinu otpuštanja, dok je kod alginatnih čestica oslobađanje polifenola najverovatnije određeno relaksacijom polimera.

4.5. Difuzioni otpori

Otpor difuziji se definiše kao:

$$R = \frac{\delta}{D} \quad (4.6)$$

gde je δ debljina sloja u kome se odvija difuzija, a D koeficijent difuzije.

Na osnovu vrednosti difuzionih otpora moguće je utvrditi u kojoj meri inkapsulacija aktivne komponente, u različite čestice, doprinosi usporavanju prenosa mase.

Difuzioni otpori alginatnih i modifikovanih alginatnih čestica

Kako su eksperimenti izvođeni u Franz-ovoj difuzionoj ćeliji, difuzioni otpor se može posmatrati kao zbir pojedinačnih otpora. U slučaju alginatnih i modifikovanih alginatnih čestica, ukupni difuzioni otpor je zbir pojedinačnih otpora:

- otpora membrane i
- otpora alginatnih čestica

Otpor membrane ćelije određuje se iz podataka za difuziju iz ekstrakta čaja. Budući da je praćena difuzija polifenola iz razlićitih vrsta čestica, razlika otpora između ovih sistema predstavlja doprinos otporu koji određeni tip membrana alginatnih čestica pruža difuziji polifenolnih molekula.

Debljina sloja u kome se odvija difuzija se izraćunava na osnovu mase uzorka koji se nalazio u donorskom delu difuzione ćelije.

U tabeli 4.5 su prikazani koeficijenti difuzije i difuzioni otpori za čajni ekstrakt i različite tipove alginatnih čestica.

Tabela 4.5. Ukupni difuzioni otpori alginatnih i modifikovanih alginatnih čestica

Vrsta čestica	m_D , g	δ , mm	$D \cdot 10^9$, m^2/s	$R \cdot 10^{-6}$, s/m
Ekstrakt čaja (R_m)	2.081	0.1	8.63	0.013
Alginatne čestice (II)	2.150	4.3	12.31	0.355
Alginat-hitozan čestice (III)	2.105	4.2	2.94	1.459
Alginat-inulin čestice (IV)	2.157	4.3	5.29	0.829

Kao što je rećeno, na osnovu podataka za difuziju iz ekstrakta čaja određuje se otpor membrane ćelije difuziji polifenola iz ekstrakta čaja. Otpori difuziji pojedinih čestica određuju se kao: $R_{alginatničestica} = R_u - R_m$. Vrednosti otpora za sve vrste alginatnih čestica prikazane su u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Difuzioni otpori za različite vrste alginatnih čestica

Vrsta čestica	$R \cdot 10^{-6}$, s/m
Alginatne čestice	0.342
Alginat-hitozan čestice	1.446
Alginat-inulin čestice	0.816

Dobijene vrednosti koeficijenta difuzije i difuzionih otpora ukazuju na to da se inkapsulacijom polifenola u alginatne čestice njihova difuzija usporava, zbog prisustva membrane alginata koja pruža dodatni otpor difuziji. Ovaj otpor je veći od otpora difuziji polifenola koji pruža membrana difuzione ćelije. Vrednost otpora iz alginatnih čestica nije potpuno tačna jer je, kao što je prethodno rečeno, koeficijent difuzije polifenola iz ovih čestica nemoguće pouzdano odrediti.

Takođe, na osnovu vrednosti difuzionih otpora (tabela 4.6), možemo zaključiti da se oblaganjem alginatnih čestica hitozanom postiže manja permeabilnost membrane, odnosno povećava otpor difuziji polifenola. Dodatni otpor dobijen interakcijom molekula inulina i alginata u odnosu na čist alginat, može se smatrati zanemarljivim.

4.6. Karakterizacija fosfolipidnih čestica

4.6.1. Dobijena veličina fosfolipidnih čestica

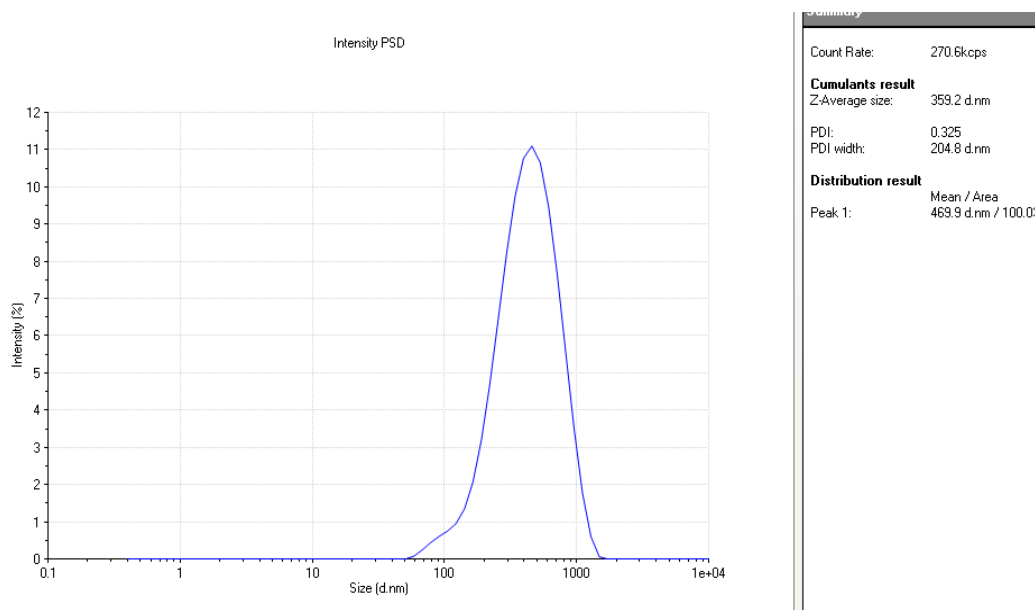
U tabeli 4.7 su prikazani srednji prečnik čestica, zeta potencijal, opseg veličina čestica, kao i pikovi koji predstavljaju veličinu čestica čiji je udeo najveći u analiziranoj disperziji.

Tabela 4.7. Veličina fosfolipidnih mikročestica

Uzorak	d_p - srednji prečnik (nm)	PDI	z-potencijal \pm SD	Opseg veličine čestica od-do (nm)
1 (konvencionalni lipozomi)	359.2	0.325	-32.9 \pm 3.5	40-2000
2 (Tween 20)	505.4	0.379	-35.2 \pm 1.4	150-3000
3 (Tween 60)	583.5	0.462	-28.7 \pm 3.6	60-4000
4 (Span 20)	897.5	0.306	-32.2 \pm 1.6	100-6500
5 (Span 40)	781.2	0.271	-35.5 \pm 1.9	150-6000

Iz tabele 4.7. se može videti da su najsitnije čestice konvencionalnih lipozoma, a da su najkrupnije čestice one čija je membrana modifikovana *Span*-om 20. Z-potencijal za čestice prikazane u tabeli je negativan i približno je iste vrednosti za sve posmatrane vrste čestica, odakle se može zaključiti da dodatak površinski aktivnih materija nije značajno promenilo naelektrisanje čestica.

Uzorak 1: konvencionalni lipozomi

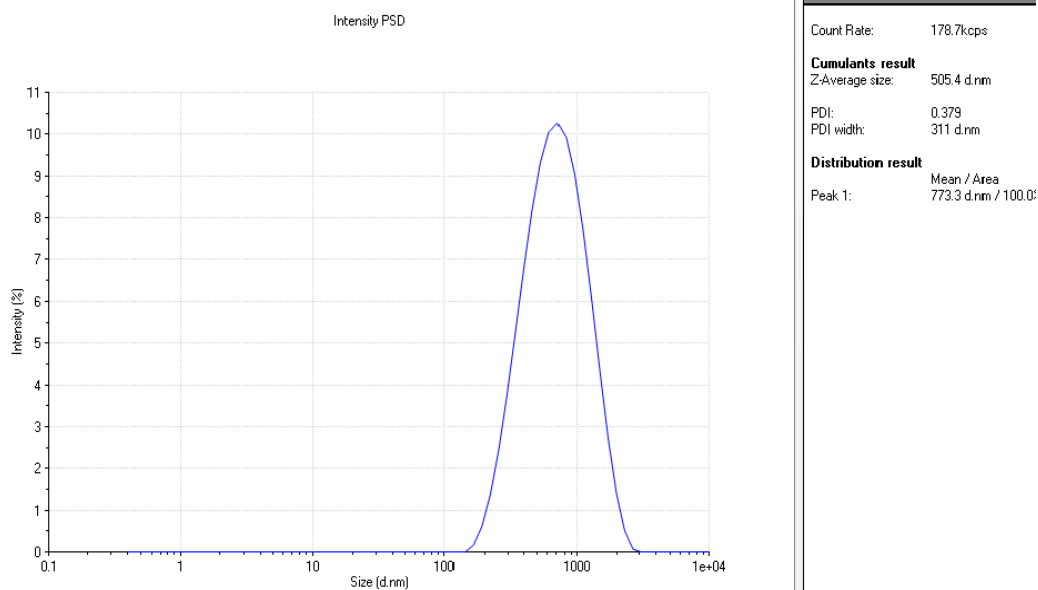


Slika 4.17. Raspodela čestica u uzorku sa konvencionalnim lipozomima

Sa slike 4.17, koja predstavlja krivu raspodele čestica u uzorku konvencionalnih lipozoma, postoji klasična Gausova raspodela, pravilna oko srednjeg prečnika. Najveći udeo čestica, oko 11%, je sa srednjim prečnikom od 469.9 nm.

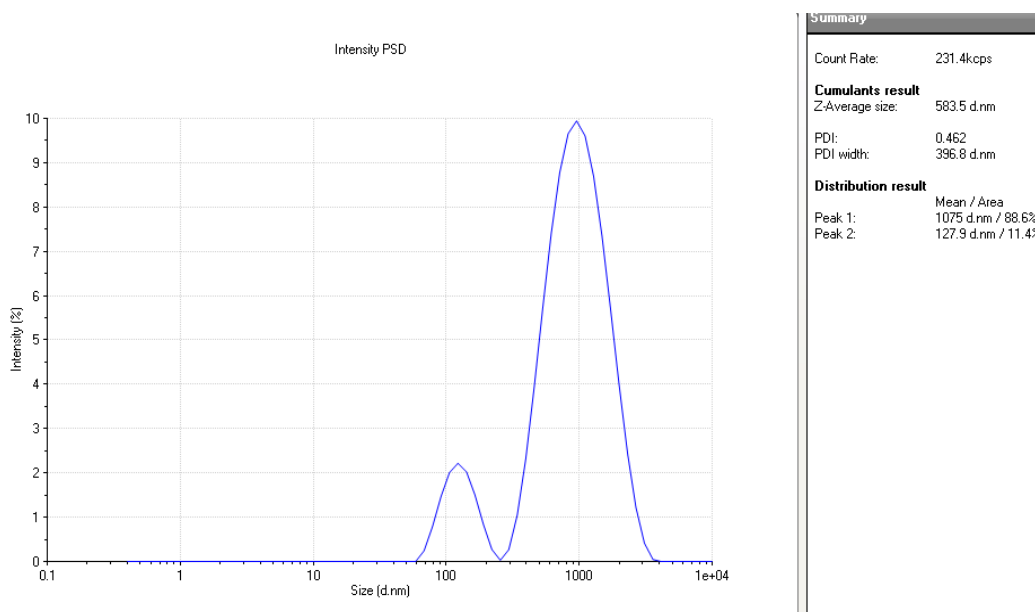
Uzorak 2: lipozomi modifikovani Tween-om 20

Na slici 4.18 koja prikazuje krivu raspodele čestica u uzorku lipozoma čija je membrana modifikovana *Tween*-om 20, primećuje se, takođe, pravilna Gausova raspodela čestica. Najveći udeo čestica, oko 10%, je za srednji prečnik 773.3 nm.



Slika 4.18. Raspodela čestica u uzorku sa lipozomima čija je membrana modifikovana *Tween*-om 20

Uzorak 3: lipozomi modifikovani *Tween*-om 60

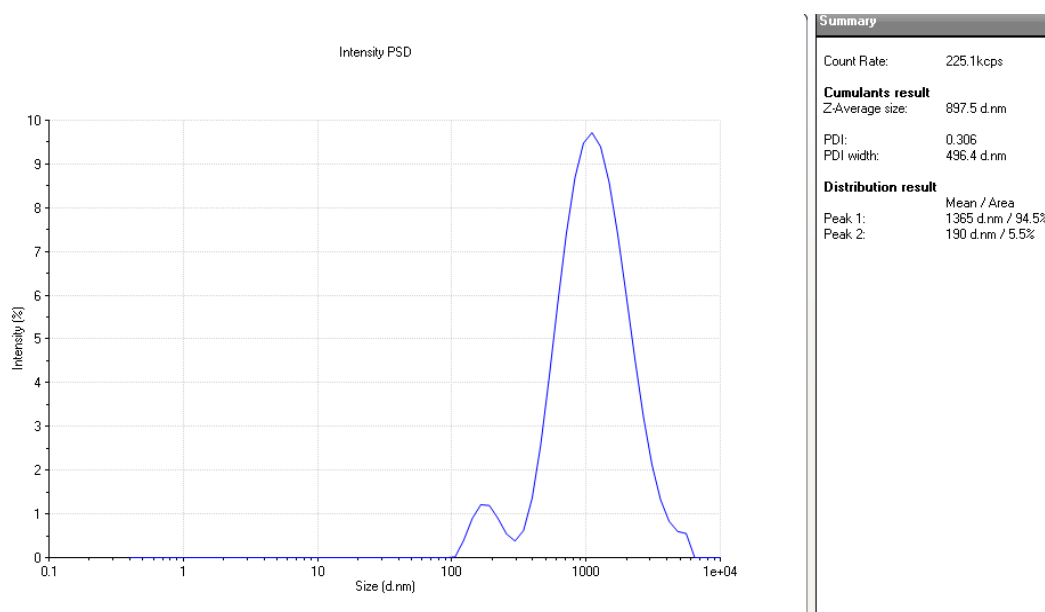


Slika 4.19. Raspodela čestica u uzorku sa lipozomima čija je membrana modifikovana *Tween*-om 60

Slika 4.19 prikazuje krivu raspodele čestica u uzorku lipozoma čija je membrana modifikovana *Tween*-om 60, i ono što je neočekivano ovde, je da se pojavljuju dva maksimuma, pri čemu su obe krive pravilne Gausove raspodele. Pri ovoj bimodalnoj

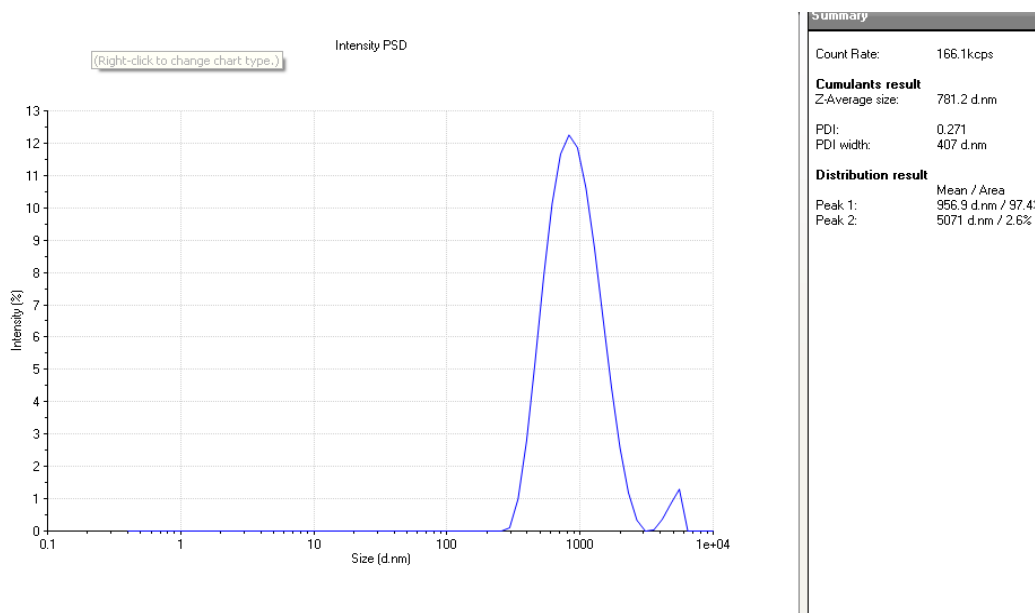
raspodeli veličine čestica, prvi pik pokazuje da manji udeo čestica (od oko 2.2%) ima srednji prečnik od 127.9 nm, a drugi veći pik (sa udelom čestica od oko 10%) ima srednji prečnik od 1075 nm. Veličine ukazuju da prvi pik može da predstavlja unilamelarne čestice, dok su kod drugog pika klasične multilamelarne čestice koje su se već ranije i javile.

Uzorak 4: lipozomi modifikovani *Span-om 20*



Slika 4.20. Raspodela čestica u uzorku sa lipozomima čija je membrana modifikovana *Span-om 20*

Na slici 4.20 je prikazana kriva raspodele čestica u uzorku lipozoma čija je membrana modifikovana *Span-om 20*. I ovde se pojavljuje bimodalna raspodela, ali ovog puta primećujemo da bimodalna kriva nije klasična, već izgleda kao da je kontinualna raspodela sa dva pika, pri čemu je prvi pik sa udelom čestica od oko 1.2% za srednji prečnik čestica od 190 nm, a drugi sa udelom čestica od oko 9.8% za srednji prečnik čestica od 1365 nm, tako da se može reći da postoje frakcije sitnijih čestica.

Uzorak 5: lipozomi modifikovani *Span*-om 40

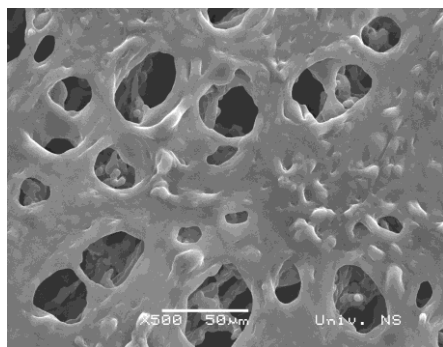
Slika 4.21. Raspodela čestica u uzorku sa lipozomima čija je membrana modifikovana *Span*-om 40

Na slici 4.21 se nalazi kriva raspodele čestica u uzorku lipozoma čija je membrana modifikovana *Span*-om 40. Može se videti da postoji normalna Gausova raspodela čestica, gde je najveći udeo čestica (od oko 12.2%) sa srednjim prečnikom od 956.9 nm, ali pored toga postoji i frakcija krupnih čestica koja se ne može lako objasniti i pre se može protumačiti kao statistička greška, gde je udeo čestica od oko 1.2% sa srednjim prečnikom od 5071 nm.

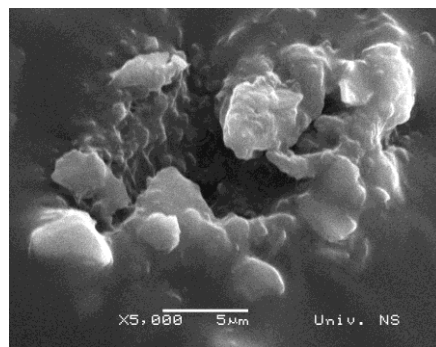
4.6.2. Dobijeni SEM snimci disperzije lipozoma

Pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM-a) napravljen je pokušaj objašnjenja pikova i prisustva bimodalne raspodele veličine čestica, odnosno pokušaj detaljnijeg karakterisanja lipozoma.

Na slikama od 4.22 do 4.24 su prikazani skenirajući elektronski snimci uzoraka lipozoma u disperziji, međutim, rezultati snimanja čestica metodom koja je ranije opisana nisu dali zadovoljavajuće rezultate. Pri samom izvođenju snimanja, snop elektrona razara čestice, a samim tim je onemogućeno povećanje uveličanja i ne dobija se odgovarajuća slika.



Slika 4.22. SEM mikrograf disperzije konvencionalnih lipozoma

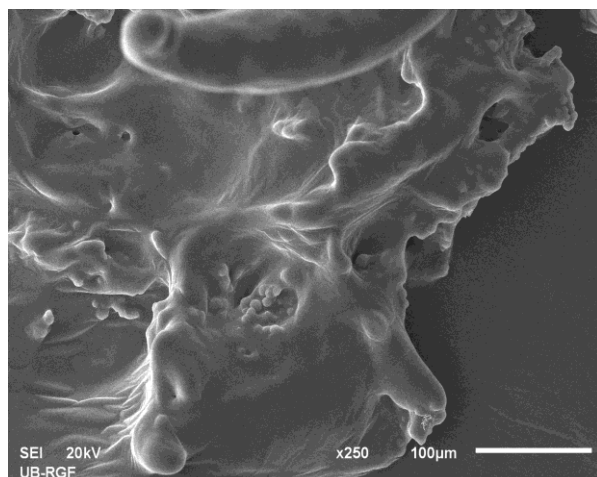


Slika 4.23. SEM mikrograf disperzije lipozoma sa *Tween*-om 20



Slika 4.24. SEM mikrograf disperzije lipozoma sa *Span*-om 40

4.6.3. Dobijeni SEM snimci liofilizovanih lipozoma

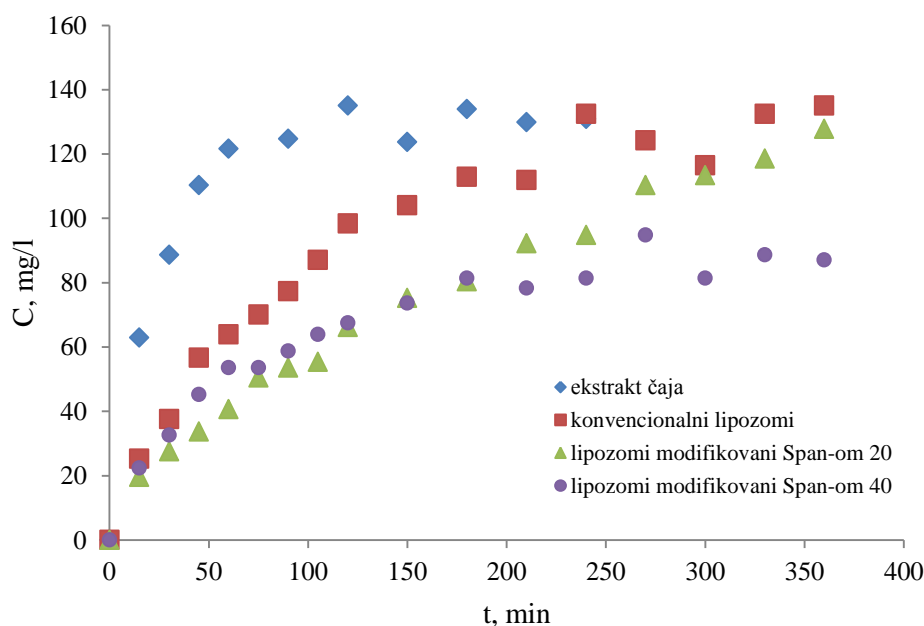


Slika 4.25. SEM mikrograf liofilizovanih lipozoma modificovanih *Span*-om 20

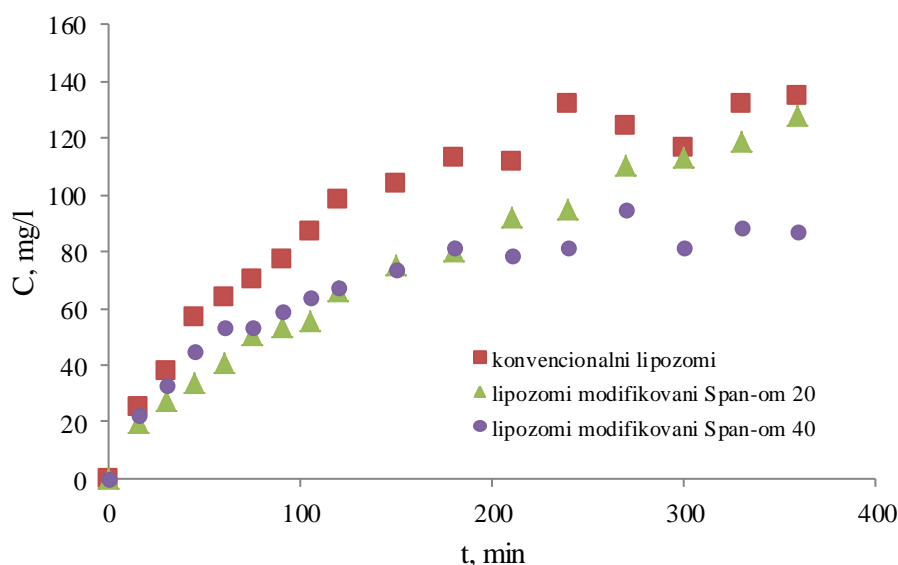
Kod liofilizovanih uzoraka lipozoma takođe nije moguće postići dovoljno uvećanje, čestice se samo naziru pri uvećanju od 250 puta, ali ne dobija se odgovarajući kvalitet slike. Na osnovu dobijenih rezultata sa SEM-a, može se zaključiti da ovo nije pogodna metoda za ispitivanje ovakve vrste čestica (slika 4.25).

4.7. Kinetika otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta i lipozomnih disperzija – Franz – ova ćelija

Spektrorometrijskim merenjima dobijene su vrednosti apsorbanaci koje predstavljaju srednju vrednost dva merenja. Zatim su izračunate koncentracije polifenola na osnovu dobijenih vrednosti apsorbanaci za svaki uzorak. Krive otpuštanja predstavljaju zavisnost prodifundovale količine aktivne supstance sa vremenom. Na slici 4.26. je prikazana kinetika otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta, iz konvencionalnih lipozoma i iz lipozoma modifikovanih *Span-om 20* i *Span-om 40*.



Slika 4.26. Krive otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta i lipozomnih disperzija



Slika 4.27. Krive otpuštanja polifenola iz lipozomnih disperzija

Na osnovu grafika (slika 4.27) na kome se vidi kako se otpuštaju polifenoli iz lipozoma, modifikovanih mikročestica *Span-om 20* i *Span-om 40* i čajnog ekstrakta, mogu se doneti zaključci o brzini otpuštanja polifenola. Kriva otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta pokazuje brz porast koncentracije polifenola u receptorskom delu ćelije u toku prvog sata. Kod krive otpuštanja polifenola iz lipozoma vidimo da koncentracija polifenola nakon 3 sata ulazi u stacionarno stanje, dok kod lipozoma čija je membrana modifikovana *Span-om 20* nakon 3.5 h koncentracija polifenola dostiže stacionarno stanje. Kod mikročestica čija je membrana modifikovana *Span-om 40* koncentracija polifenola nakon 3 sata ulazi u stacionarno stanje. Na osnovu toga može se zaključiti da modifikacija membrana mikročestica usporava difuziju polifenola iz istih i da inkapsulacija aktivne komponente (u ovom slučaju polifenoli) u lipozome usporava otpuštanje.

Kao i kod difuzije polifenola iz alginatnih čestica, tako i kod difuzije polifenola iz lipozoma ne mogu se doneti tačni zaključci o tome da li je difuzija polifenola sporija iz disperzije konvencionalnih ili modifikovanih lipozoma. Razlozi za ovo su sledeći:

- za pripremu različitih lipozomnih disperzija pripremani su posebni ekstrakti čaja, pa postoje i male razlike u koncentraciji polifenola između njih,

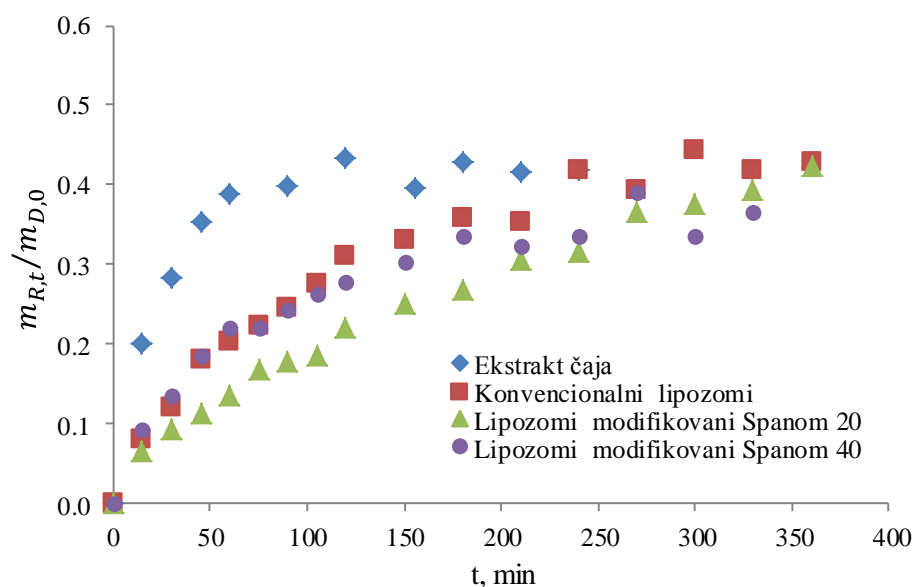
- masa lipozomnih disperzija koja se unosi u donorski deo ćelije nije identična kod svih eksperimenata,
- udeo čaja u lipozomnoj disperziji nije isti kod konvencionalnih i modifikovanih lipozoma.

Ovo znači da masa polifenola koja je unesena u donorski deo ćelije nije bila ista u difuzionim eksperimentima. Zbog bliskih vrednosti koncentracija (slika 4.27) ove razlike, iako male, ne mogu se zanemariti.

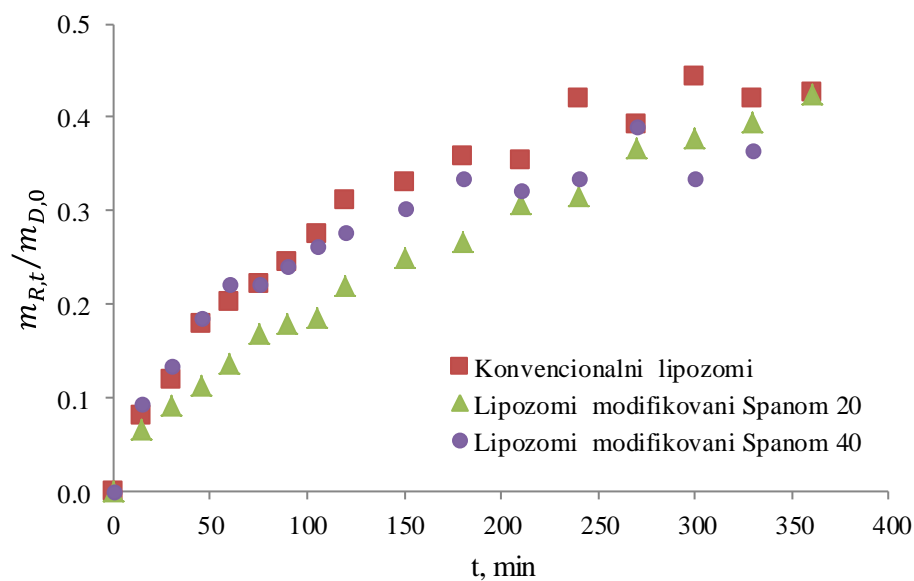
Da bi se krive otpuštanja polifenola iz lipozomnih disperzija mogle upoređivati, neophodna je njihova relativizacija. Zato se na ordinatu, umesto vrednosti koncentracija polifenola u receptorskom delu ćelije, nanose odnosi mase polifenola u receptorskom delu ćelije u određenom trenutku i ukupne mase polifenola koja je uneta u donorski deo

$(\frac{m_{R,t}}{m_{D,0}})$, čime se dobija udeo oslobođene komponente (polifenola). Udeli oslobođenih

polifenola su na ovaj način potpuno nezavisni od početne količine polifenola u donorskom delu ćelije i na ordinati se nalazi bezdimenziona veličina, što je prikazano na slikama 4.28 i 4.29.

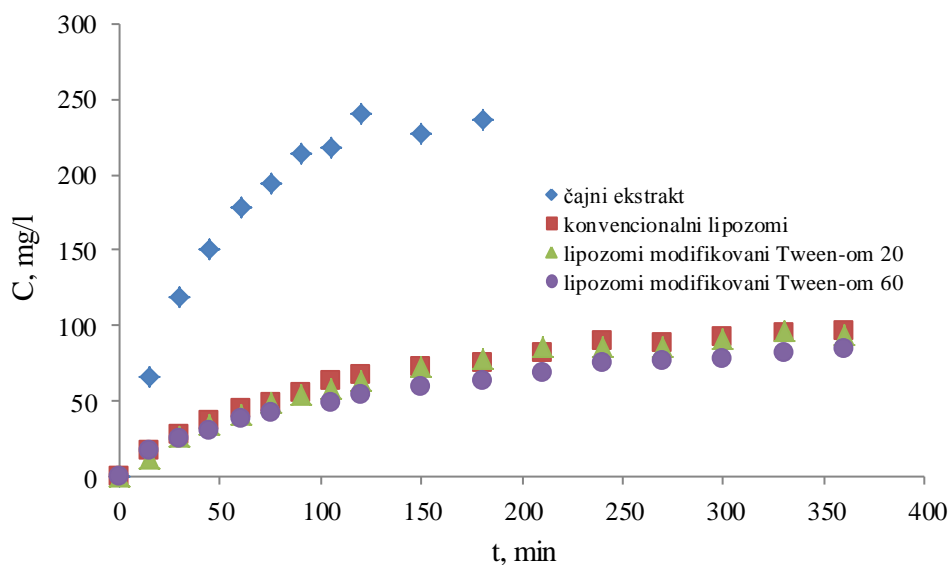


Slika 4.28. Zavisnost udela oslobođenih polifenola od vremena u svim ispitivanim sistemima

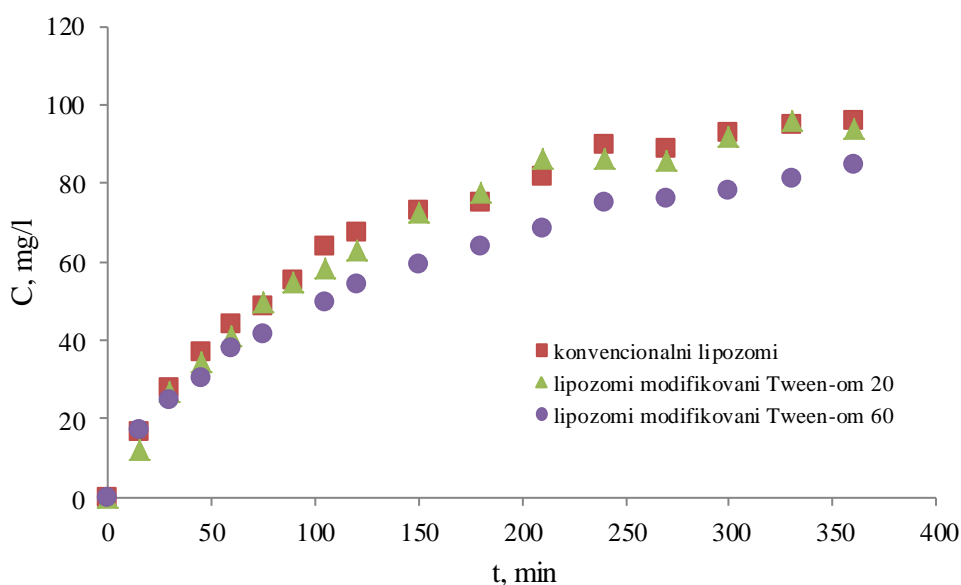


Slika 4.29. Zavisnost udela oslobođenih polifenola od vremena kod lipozomnih disperzija

Zatim su izvedena još četiri difuziona eksperimenta, u kojima je praćena difuzija polifenola iz: čajnog ekstrakta majčine dušice, disperzije konvencionalnih lipozoma, lipozoma koji su modificirani *Tween*-om 20 i lipozoma koji su modificirani *Tween*-om 60. Na osnovu podataka dobijenih spektrofotometrijskim merenjima (apsorbance uzoraka) i jednačine baždarne prave, izračunate su vrednosti koncentracije polifenola u svakom od uzoraka. Dobijene vrednosti koncentracija se koriste za konstruisanje krivih otpuštanja, koje predstavljaju promenu koncentracije polifenola u receptorskom delu ćelije sa vremenom. Krive otpuštanja su prikazane na slikama 4.30 i 4.31.



Slika 4.30. Krive otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta i lipozomnih disperzija



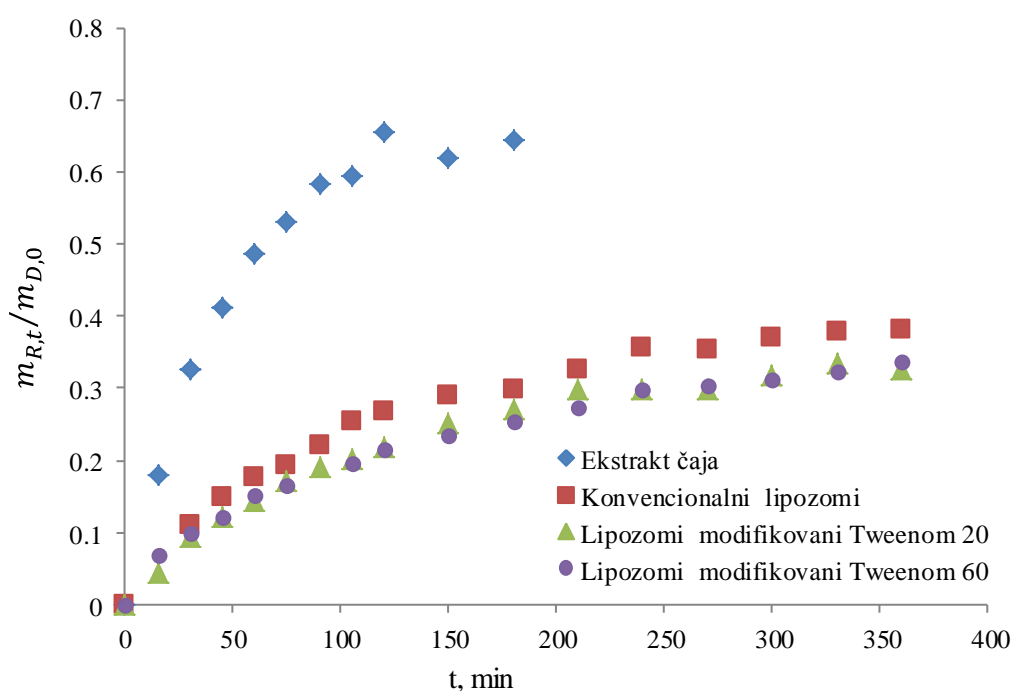
Slika 4.31. Krive otpuštanja polifenola iz lipozomnih disperzija

Krive otpuštanja pružaju uvid u to kako su se difuzioni eksperimenti odvijali tokom vremena i nakon kog vremenskog perioda se difuzija usporava u sistemu.

Na osnovu slike 4.30. se može zaključiti da kriva otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta pokazuje brzi porast koncentracije polifenola u receptorskom delu ćelije u toku 1.5 h od početka izvođenja eksperimenta, dok za krivu otpuštanja polifenola iz

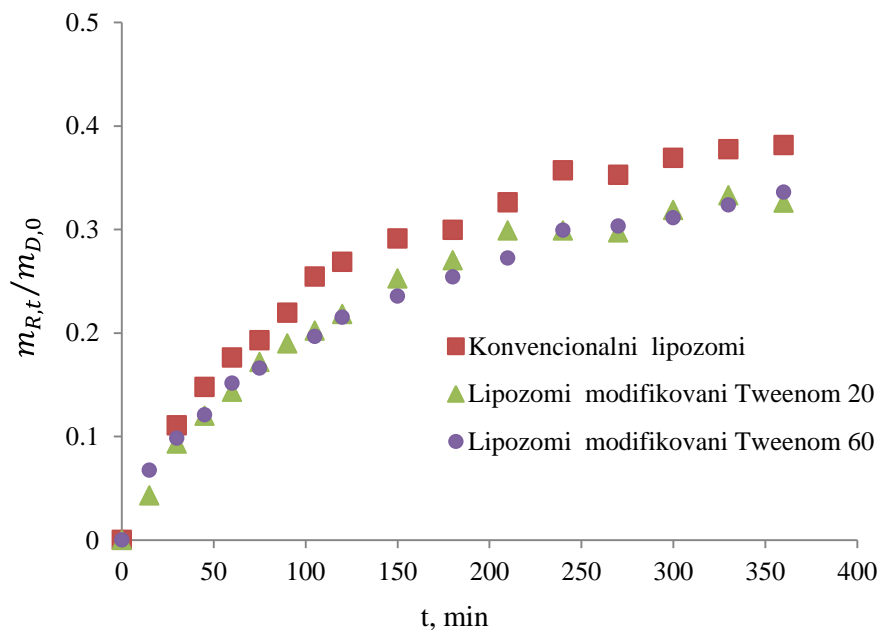
konvencionalnih lipozoma ovaj period iznosi 2.5 h, nakon čega se difuzija usporava. Za lipozome modifikovane *Tween*-om 20 usporavanje difuzije počinje nakon 3.5 h, a za lipozome modifikovane *Tween*-om 60 – 4 h. Nakon navedenih perioda sistemi se polako približavaju stanju ravnoteže.

Kao i u prethodnim primerima, i u ovom slučaju je izvršena relativizacija podataka. Udeli oslobođenih polifenola su potpuno nezavisni od početne količine polifenola u donorskom delu ćelije i na ordinati se nalazi bezdimenziona veličina, što je prikazano na slikama 4.32 i 4.33.



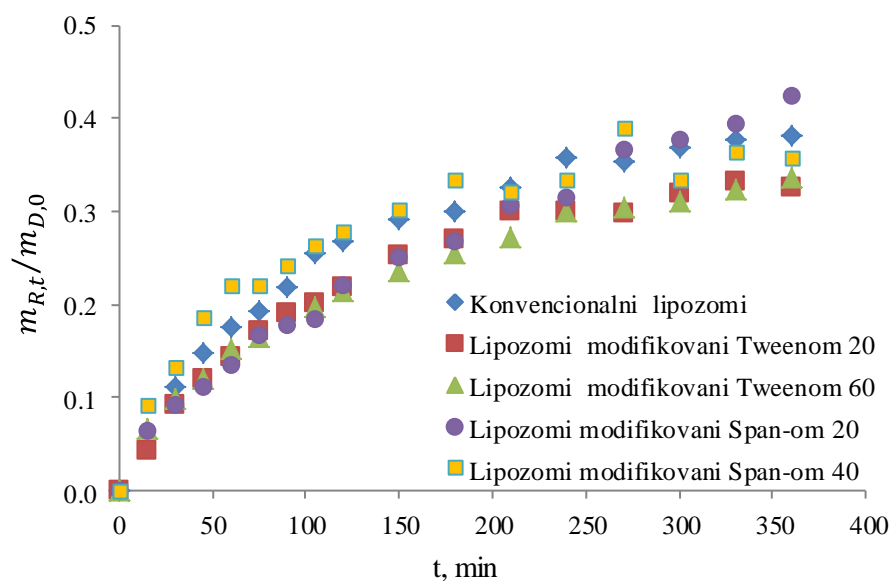
Slika 4.32. Zavisnost udela oslobođenih polifenola od vremena u svim ispitivanim sistemima

Kada je u pitanju poređenje krivih otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta i različitih lipozomnih disperzija, tu se prethodno navedene razlike mogu zanemariti zbog značajno veće brzine otpuštanja iz čajnog ekstrakta, što je dokazano i krivom na slici 4.32. Rezultati ukazuju na to da je inkapsulacijom polifenola u lipozome i modifikovane lipozome njihova difuzija značajno usporena.



Slika 4.33. Zavisnost udela oslobođenih polifenola od vremena kod lipozomnih disperzija

Upoređivanjem krivih kojima je prikazana zavisnost oslobođene količine polifenola od vremena kod lipozomnih disperzija (slika 4.33) može se zaključiti da se modifikacijom lipozomne membrane *Tween*-om 20 i *Tween*-om 60 otpuštanje polifenola dodatno usporava u odnosu na otpuštanje iz konvencionalnih lipozoma. Da bi se precizno utvrdilo u kojoj meri je difuzija polifenola iz modifikovanih lipozoma sporija, svi sistemi se moraju kvantitativno opisati određivanjem i upoređivanjem koeficijenata difuzije i difuzionih otpora.



Slika 4.34. Zavisnost udela oslobođenih polifenola od vremena kod lipozomnih disperzija

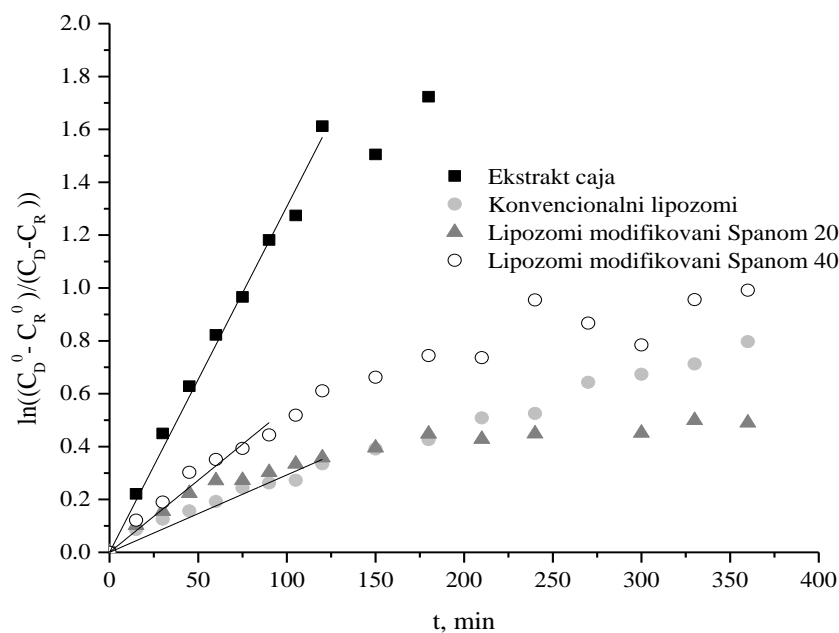
Na prethodnom grafiku su prikazane sve krive zavisnosti udela oslobođenih polifenola iz konvencionalnih lipozoma, kao i iz lipozoma modifikovanih polisorbata. Da bi se tačnije komentarisala brzina difuzije polifenolnih jedinjenja, neophodna je, kao što je već rečeno, kvantitavna analiza svih ispitivanih sistema, tj. određivanje koeficijenta difuzije i difuzionih otpora.

4.8. Izračunavanje koeficijenta difuzije polifenola iz lipozomnih disperzija

- Početna koncentracija polifenola u receptorskom delu (C_R^0) jednaka je nuli, jer je u tom trenutku kod svih eksperimenata bio prisutan samo receptorski rastvor – destilovana voda.
- Početna koncentracija polifenola u donorskom delu (C_D^0) je određena na osnovu sastava lipozomnih disperzija, te je:
 - u slučaju konvencionalnih lipozoma $C_D^0 = 2385 \frac{mg}{l}$.
 - u slučaju lipozoma modifikovanih *Span-om 20* $C_D^0 = 2136 \frac{mg}{l}$

- u slučaju lipozoma modificovanih *Span*-om 40 $C_D^0 = 2136 \frac{mg}{l}$
- u slučaju lipozoma modificovanih *Tween*-om 20 $C_D^0 = 2776 \frac{mg}{l}$
- u slučaju lipozoma modificovanih *Tween*-om 60 $C_D^0 = 2396 \frac{mg}{l}$
- Koncentracije polifenola u receptorskom delu (C_R) su određene spektrofotometrijski.
- Koncentracije polifenola u donorskom delu (C_D) se računaju na isti način kao što je prethodno objašnjeno za slučaj difuzije polifenola iz čajnog ekstrakta.

Na slici 4.35 je prikazano određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz konvencionalnih lipozoma i lipozoma modificovanih *Span*-om 20 i *Span*-om 40.



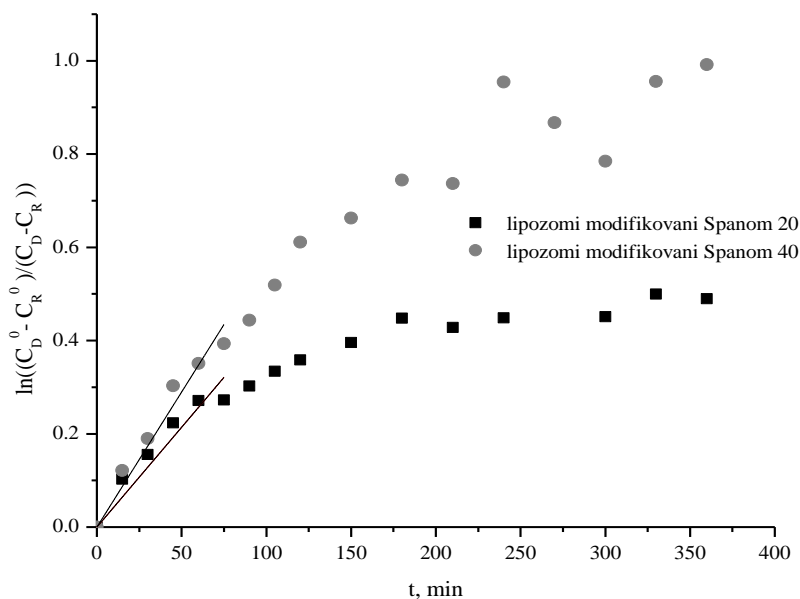
Slika 4.35. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz disperzije konvencionalnih lipozoma i lipozoma modificovanih *Span*-om 20 i *Span*-om 40

Na osnovu vrednosti nagiba krivih (slika 4.35) i koeficijenta β , izračunati su koeficijenti difuzije polifenola iz disperzije konvencionalnih lipozoma i lipozoma modifikovanih *Span*-om 20 i *Span*-om 40 (tabela 4.8).

Tabela 4.8. Koeficijenti difuzije za konvencionalne i modifikovane lipozome

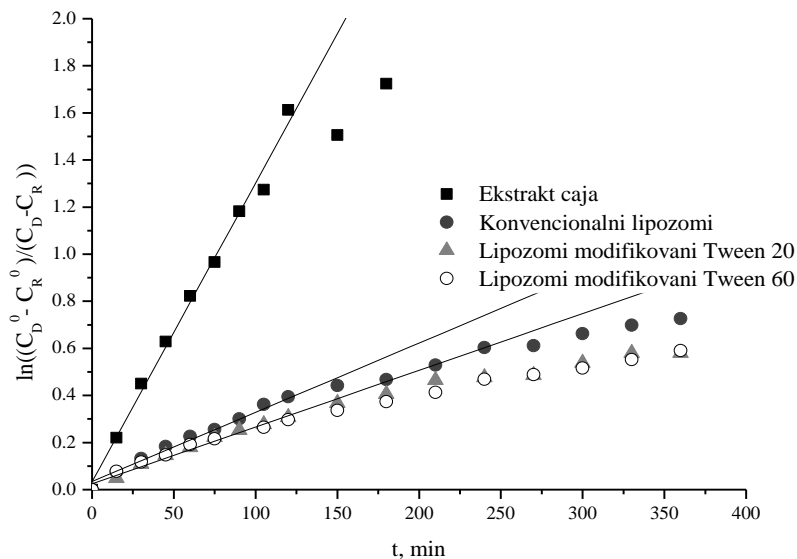
Vrsta čestica	Nagib krive [min^{-1}]	$D \cdot 10^9$ [m^2/s]
Konvencionalni lipozomi	0.00345	2.31
Lipozomi modifikovani <i>Span</i> -om 20	0.0026	1.74
Lipozomi modifikovani <i>Span</i> -om 40	0.0048	3.213

Zbog nemogućnosti jasnog očitavanja koeficijenta difuzije iz lipozoma modifikovanih *Span*-ovima, na slici 4.36 posebno je prikazano njihovo određivanje.

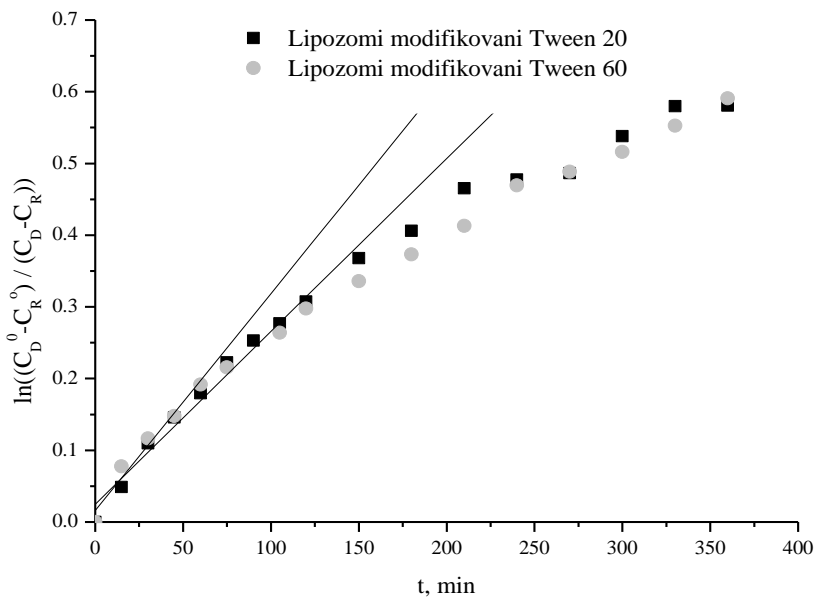


Slika 4.36. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz disperzije lipozoma modifikovanih *Span*-om 20 i *Span*-om 40

Na slikama 4.37 i 4.38 je prikazano određivanje koeficijenata difuzije polifenola iz konvencionalnih lipozoma i lipozoma modifikovanih *Tween*-om 20 i *Tween*-om 60.



Slika 4.37. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz disperzije konvencionalnih lipozoma i lipozoma modifikovanih *Tween*-om 20 i *Tween*-om 60



Slika 4.38. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz disperzije lipozoma modifikovanih *Tween*-om 20 i *Tween*-om 60

Na osnovu vrednosti nagiba krivih (slike 4.37 i 4.38) i koeficijenta β , izračunati su koeficijenti difuzije polifenola iz disperzije konvencionalnih lipozoma i lipozoma modifikovanih *Tween*-om 20 i *Tween*-om 60 (tabela 4.9).

Tabela 4.9. Koeficijenti difuzije za konvencionalne i modifikovane lipozome

Vrsta čestica	Nagib krive [min^{-1}]	$D \cdot 10^9$ [m^2/s]
Konvencionalni lipozomi	0.00345	2.31
Lipozomi modifikovani <i>Tween</i> -om 20	0.00266	1.78
Lipozomi modifikovani <i>Tween</i> -om 60	0.00338	2.26

4.9. Izračunavanje difuzionih otpora konvencionalnih i modifikovanih lipozoma

Kao što je već rečeno, ukupni difuzioni otpor se može posmatrati kao zbir pojedinačnih otpora:

- otpora membrane,
- otpora lipozomnih čestica.

Budući da je praćena:

- difuzija polifenola iz čajnog ekstrakta i
- difuzija polifenola iz lipozoma (konvencionalnih i modifikovanih),

razlika otpora između ova dva sistema predstavlja otpor koji određeni tip lipozoma pruža difuziji polifenolnih molekula.

Prvi set eksperimenata je rađen sa konvencionalnim lipozomima i lipozomima modifikovanim *Span*-om 20 i *Span*-om 40 i rezultati su prikazani u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Određivanje difuzionih otpora konvencionalnih i modifikovanih lipozoma

	m_D , g	δ , mm	$D \cdot 10^9$, m^2/s	$R \cdot 10^{-6}$, s/m
Ekstrakt čaja (I)	2.066	4.21	10.31	0.4083
Konvencionalni lipozomi (II)	2.3	4.68	3.481	1.344
Lipozomi modifikovani <i>Span</i> -om 20 (III)	2.5	5.1	1.740	2.931
Lipozomi modifikovani <i>Span</i> -om 40 (IV)	2.412	4.91	3.213	1.528

Na osnovu otpora koje smo izračunali (tabela 4.10) sledi:

$$R_{\text{lipozoma}} = R_{\text{II}} - R_{\text{I}}$$

$$R_{\text{lipozoma}} = 9.357 \cdot 10^5 \text{ s/m}$$

Iz vrednosti otpora vidimo da postoji otpor lipozoma difuziji polifenola i da je doprinos lipozoma značajan.

Na isti način se računaju i otpori modifikovanih lipozoma ($R_{\text{III}} - R_{\text{I}}$ i $R_{\text{IV}} - R_{\text{I}}$).

U tabeli 4.11. su prikazani otpori konvencionalnih i modifikovanih lipozoma.

Tabela 4.11. Upoređivanje difuzionih otpora

Tip lipozoma	$R \cdot 10^{-6}$, s/m
Konvencionalni lipozomi	0.936
Lipozomi modifikovani <i>Span-om 20</i>	2.523
Lipozomi modifikovani <i>Span-om 40</i>	1.120

Iz dobijenih vrednosti difuzionih otpora može se zaključiti da postoji dodatni otpor difuziji polifenola kod modifikovanih membrana mikročestica.

Interesantno je da je otpor difuziji polifenola veći kod membrane modifikovane *Span-om 20*, nego *Span-om 40*, iako je sorbitan mono-laurat manji molekul od sorbitan mono-palmitata. Moguće objašnjenje za ovo je da se molekuli sorbitan mono-palmitata pravilnije „pakuju“ sa fosfolipidima u membrani lipozoma, pa neznatno usporavaju difuziju u odnosu na čiste fosfolipide.

Sledeći set eksperimenata je izveden sa konvencionalnim lipozomima i lipozomima modifikovanim *Tween-om 20* i *Tween-om 60*. Rezultati su prikazani u tabeli 4.12.

Tabela 4.12. Određivanje difuzionih otpora konvencionalnih i modifikovanih lipozoma

	m_D , g	δ , mm	$D \cdot 10^9$, m^2/s	$R \cdot 10^{-6}$, s/m
Ekstrakt čaja (I)	2.081	4.24	8.77	0.483
Konvencionalni lipozomi (II)	2.107	4.29	2.31	1.86
Lipozomi modifikovani <i>Tween-om 20</i> (III)	2.074	4.22	1.78	2.37
Lipozomi modifikovani <i>Tween-om 60</i> (IV)	2.1	4.28	2.26	1.89

Na osnovu izračunatih ukupnih otpora (tabela 4.12) dobijaju se otpori konvencionalnih i modifikovanih lipozoma ($R_{II} - R_I$, $R_{III} - R_I$ i $R_{IV} - R_I$) koji su prikazani u tabeli 4.13.

Tabela 4.13. Difuzioni otpori za različite vrste lipozoma

Tip lipozoma	$R \cdot 10^{-6}$, s/m
Konvencionalni lipozomi	1.38
Lipozomi modifikovani <i>Tween</i> -om 20	1.89
Lipozomi modifikovani <i>Tween</i> -om 60	1.41

Dobijene vrednosti koeficijenta difuzije i difuzionih otpora ukazuju na to da se inkapsulacijom polifenola u konvencionalne lipozome njihova difuzija značajno usporava (3.8 puta) u odnosu na ekstrakt čaja, zbog prisustva membrane lipozoma koja pruža dodatni otpor difuziji. Ovaj otpor je mnogo veći od otpora koje pružaju čajni ekstrakt i membrana difuzione ćelije.

Lipozomi koji su modifikovani *Tween*-om 20 pružaju još veći otpor difuziji polifenola (tabela 4.13), te se ona sporije odvija. U odnosu na sistem sa neinkapsuliranim polifenolima, modifikovana membrana obezbeđuje 4.93 puta sporiju difuziju. Ovaj rezultat pokazuje da se modifikacijom membrane *Tween*-om 20 može postići dodatno usporavanje difuzije polifenola i u poređenju sa konvencionalnim lipozomima. Lipozomna membrana koja u svojoj strukturi ima ugrađene molekule *Tween*-a 20, ispoljava drugačija svojstva od membrane koja je izgrađena samo od fosfolipida, što za rezultat daje manju permeabilnost, odnosno veći otpor.

Kada su u pitanju lipozomi modifikovani *Tween*-om 60, dobijeni rezultati nisu u skladu sa očekivanim vrednostima. Umesto dodatnog usporavanja difuzije u odnosu na lipozome modifikovane *Tween*-om 20, izračunata vrednost koeficijenta difuzije pokazuje suprotno. Difuzija je usporena 3.88 puta u odnosu na sistem sa neinkapsuliranim polifenolima, što znači da je brzina difuzije veća od vrednosti koja se postiže u sistemu sa lipozomima modifikovanim *Tween*-om 20 i da je bliska vrednosti koja je postignuta sa konvencionalnim lipozomima.

Pri izračunavanju koeficijenta difuzije može se uočiti nepravilnost koja se ne može primetiti na krivoj otpuštanja (slike 4.32 i 4.33). Difuzija polifenola iz lipozoma modifikovanih *Tween*-om 60 se odvija tako da nakon prvih 60 min dolazi do naglog,

značajnog usporavanja difuzije. U prvom periodu vrednosti koncentracija polifenola u receptorskom delu ćelije su bliske onima kod konvencionalnih lipozoma, dok su u drugom periodu vrednosti koncentracija niže nego kod svih ostalih ispitivanih sistema (slike 4.32 i 4.33). Ovim, kao da je kriva otpuštanja podeljena na dva nezavisna dela. Ovakvo ponašanje dovodi do toga da se pri obradi eksperimentalnih rezultata i izračunavanju koeficijenta difuzije može posmatrati samo prvi period (slike 4.32 i 4.33), čime se ne obuhvata naknadno usporavanje difuzije u sistemu.

Moguće objašnjenje za ovakvo ponašanje lipozoma modifikovanih *Tween*-om 60 leži u činjenici da je molekul *Tween*-a 60 veći od molekula *Tween*-a 20, pa je i njegova integracija u fosfolipidnu membranu slabija, tj. postoji mogućnost da dolazi do relaksacije ovih molekula, što izaziva veću permeabilnost lipozomne membrane i veći koeficijent difuzije. Međutim, može se desiti i da je stepen inkapsulacije kod lipozoma modifikovanih *Tween*-om 60 mali i da je zato difuzija na početku brža – dolazi i do brzog difundovanja veće količine neinkapsuliranih polifenola, koji ne nailaze na otpor lipozoma. Oba objašnjenja su posledica strukture i veličine molekula *Tween*-a 60 i načina njegovog „pakovanja“ u lipozomnu membranu, pa se za izvođenje verodostojnih zaključaka moraju sprovesti dodatna istraživanja.

Takođe, treba naglasiti da su oba molekula i *Tween* 20 i *Tween* 60 polioksietilen (20) derivati polisorbata, sorbitan monolaurata i sorbitan monostearata, respektivno. Broj 20, koji se nalazi posle naziva polioksietilen, se odnosi na ukupan broj oksietilen grupa $-(CH_2-CH_2O)-$ koje se nalaze u molekulu. Broj koji sledi iza tipa polisorbata (20 ili 60) se odnosi na vrstu masne kiseline koja je povezana sa polioksietilen delom molekula. Monolaurat je označen sa 20, a monostearat sa 60. Iz eksperimentalnih podataka se može zaključiti da na difuziju polifenola iz lipozoma ne utiče dužina lanca masne kiseline, već da uglavnom zavisi od broja oksietilen grupa i zato su difuzioni otpori iz modifikovanih lipozoma slični.

Poređenjem difuzionih otpora lipozoma modifikovanih različitim polisorbitima (tabela 4.14), može se zaključiti da je otpor difuziji polifenola najveći kod membrane modifikovane *Span*-om 20, a da najmanji otpor difuziji pružaju lipozomi modifikovani *Span*-om 40. Za detaljnija objašnjenja je potrebno izvesti dodatna ispitivanja i analize.

Tabela 4.14. Difuzioni otpori za različite vrste lipozoma

Tip lipozoma	$R \cdot 10^{-6}$, s/m
Lipozomi modificovani <i>Span</i> -om 20	2.52
Lipozomi modificovani <i>Span</i> -om 40	1.12
Lipozomi modificovani <i>Tween</i> -om 20	1.89
Lipozomi modificovani <i>Tween</i> -om 60	1.41

4.10. Uticaj veličine čestica na difuziju polifenola iz lipozoma

U prethodnim radovima (Pravić i sar. 2015) određivani su koeficijenti difuzije iz konvencionalnih lipozoma i lipozoma čija je membrana modificovana *Tween*-om 20, *Tween*-om 60, *Span*-om 20 i *Span*-om 40, korišćenjem *Franz-ove* difuzione ćelije, na temperaturi 25 °C. Dobljene vrednosti koeficijenata difuzije prikazane su u tabeli 4.15.

Tabela 4.15. Koeficijenti difuzije čestica lipozoma i srednji prečnik

Vrsta čestica	Koeficijent difuzije, $D \cdot 10^9$, m ² /s	d_p - srednji prečnik (nm)
Konvencionalni lipozomi	2.31	359.2
Lipozomi modificovani <i>Tween</i> -om 20	1.78	505.4
Lipozomi modificovani <i>Tween</i> -om 60	2.26	583.5
Lipozomi modificovani <i>Span</i> -om 20	1.74	897.5
Lipozomi modificovani <i>Span</i> -om 40	3.21	781.2

Raspodela veličine čestica modificovanih *Tween*-om 20 je slična raspodeli veličine čestica konvencionalnih lipozoma, s tim što su modificovane čestice većeg prečnika. Veličina i jednih i drugih čestica ukazuje da se radi o multilameranim vezikulama, pri čemu je, verovatno, broj fosfolipidnih membrana veći kod modificovanih čestica, što dovodi i do većeg otpora difuziji, pa je koeficijent difuzije manji kod lipozoma modificovanih *Tween*-om 20. Ovo znači da modifikacija membrane lipozoma *Tween*-om 20 produžava oslobađanje aktivne komponente u poređenju sa konvencionalnim lipozomima.

Kod čestica modificovanih *Tween*-om 60 postoje 2 pika na dijagramu raspodele veličine čestica (slika 4.27). Veći pik (1075 nm) gotovo sigurno ukazuje na multilamelarne lipozome, dok manji pik mogu biti unilamelarni lipozomi, ali i posebna

vrsta vezikula obrazovana u prisustvu površinski aktivne materije. Na žalost, mikroskopska analiza nije razjasnila ovo pitanje. U svakom slučaju, očigledno je da se polifenoli brže oslobađaju iz sitnijih čestica, pa je efektivni koeficijent difuzije iz lipozoma modificovanih *Tween*-om 60 veći od koeficijenta difuzije lipozoma modificovanih *Tween*-om 20.

Čestice modificovane *Span*-om 20 imaju srednji prečnik veći od konvencionalnih lipozoma, što ukazuje da se radi o multilamelarnim lipozomima, kod kojih je broj fosfolipidnih dvoslojeva u membrani veći u odnosu na klasične lipozome, pa je veći i difuzioni otpor, a samim tim je sporije otpuštanje polifenola i manji koeficijent difuzije.

Prema raspodeli veličine čestica kod lipozoma modificovanih *Span*-om 40 očekivano bi bilo da je difuzija nešto sporija od difuzije polifenola iz konvencionalnih lipozoma i brža od difuzije iz lipozoma modificovanih *Span*-om 20. Eksperimentalni podaci, međutim, pokazuju da je difuzija brža. Jedino moguće objašnjenje ovoga je struktura same membrane, odnosno da se ugradnjom *Span*-a 40 u membranu povećava njena poroznost i ubrzava difuzija polifenola.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je prikazan postupak inkapsulacije polifenola iz ekstrakta čaja majčine dušice u alginatne i lipidne mikročestice, kao i difuzija polifenolnih jedinjenja iz istih.

Prvi deo eksperimenata je rađen sa alginatnim česticama, alginat-hitozan i alginat-inulin česticama, dok je drugi deo posvećen inkapsulaciji polifenola u konvencionalne liposome i mikročestice modifikovane površinski aktivnim materijama.

Alginatne čestice su napravljene u 1.5%-tnom rastvoru kalcijum-hlorida pomoću elektrostatičke ekstruzije. Dobijene su različite vrste čestica, i to: hidrogel čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja, čestice alginat – hitozan sa inkapsuliranim ekstraktom čaja, kao i čestice alginat – inulin sa inkapsuliranim ekstraktom čaja. Takođe, dobijene su i liofilizovane i suve forme čestica. Ispitan je stepen inkapsulacije polifenola u tako dobijenim česticama i dobijena je relativno visoka vrednost stepena inkapsulacije (za alginatne čestice 98%, čestice alginat-hitozan 86 % i čestice alginat-inulin 82%). Visok stepen inkapsulacije pokazuje da su alginatne čestice pogodne za inkapsulaciju polifenola iz ekstrakta čaja.

Takođe, u ovom radu je ispitana i veličina dobijenih alginatnih čestica, korišćenjem optičkog mikroskopa. Dobijeni rezultati predstavljaju potvrdu početnih očekivanja, tj. čestice obložene membranom (alginat-hitozan sa inkapsuliranim ekstraktom čaja) imaju najveći srednji prečnik, 827.25 μm , dok su hidrogel alginatne čestice najmanje, srednjeg prečnika 651.02 μm . U cilju dalje karakterizacije čestica, izvršena je njihova SEM i FTIR analiza.

U ovoj tezi, antioksidativna aktivnost je određena na dva načina: pomoću ABTS metode i FRAP metode. Prema dobijenim rezultatima antioksidativna aktivnost liofilizovanih čestica je 15 puta (ABTS metoda) ili 13 puta (FRAP metoda) veća od antioksidativne aktivnosti hidrogel čestica. Takođe, liofilizovane čestice pokazuju veću antioksidativnu aktivnost od suvih čestica (oko dva puta), što ukazuje na to da liofilizacija čuva antioksidativnost polifenolnih jedinjenja bolje nego proces sušenja. Visoka temperatura dovodi do degradacije i gubitka polifenolnih jedinjenja, tako da je sušenje zamrzavanjem (liofilizacija) efikasniji proces od klasičnog sušenja na povišenoj temperaturi za proizvodnju suvih formi čestica.

Nakon praćenja otpuštanja polifenola iz alginatnih čestica u sud sa destilovanom vodom, može se zaključiti da se najveći deo polifenola otpusti u prvih pola sata od potapanja čestica. Ovo je i očekivan rezultat zbog velikog gradijenta koncentracije koji se javlja između alginatnih čestica, koje sadrže visok procenat polifenola i okolnog medijuma u kome se vrši otpuštanje (destilovana voda). Poređenjem alginatnih čestica, čestica alginat-hitozan i čestica alginat-inulin zaključuje se da pokazuju istu kinetiku otpuštanja polifenola, što je posledica činjenice da mali molekul polifenola relativno brzo difunduje iz alginatnih čestica koje karakteriše struktura velikih pora. Ipak, kod čestica alginat-hitozan postignuto je povećanje vremena otpuštanja polifenola, reda veličina 10-20 min, u odnosu na alginatne hidrogel čestice. Ovo predstavlja potvrdu novog pravca istraživanja, koji je zasnovan na oblaganju čestica membranom. Čestice koje obavija membrana su otpornije u primeni *in vivo*, a materijali koji su korišćeni za omotač su primenjeni sa ciljem da smanje poroznost gela, što je dovelo do sporijeg otpuštanja aktivnih komponenti iz čestica. Takođe, inkapsulacijom su polifenoli zaštićeni od oksidacije.

Ispitivanjem difuzije polifenola iz alginantih i modifikovanih alginantih čestica u Franz-ovoj difuzionoju ćeliji, možemo izvesti sledeće zaključke:

- Brzina otpuštanja iz alginatnih čestica verovatno je kontrolisana relaksacijom polimera, dok je otpuštanje iz alginat-inulin i alginat-hitozan čestica kontrolisano molekulskom difuzijom.
- Kod čestica alginat-hitozan postiže se značajno produženo vreme otpuštanja polifenola u poređenju sa alginatnim česticama. Ovaj rezultat pokazuje da je moguće usporiti difuziju polifenola oblaganjem alginatnih čestica hitozanskom membranom, koja predstavlja dodatni otpor difuziji.
- Inulin se koristi kao punilac alginatne membrane, pa je očekivano da ovaj sistem pruži dodatni otpor difuziji. Eksperimentalni podaci pokazali su da su kinetike oslobađanja polifenola iz alginatnih i alginat-inulin čestica veoma slične, što znači da se dodatkom inulina alginatu ne postiže željeni efekat produženja vremena otpuštanja polifenola.

Da bi se produžilo vreme otpuštanja polifenola, izvršena je njihova inkapsulacija u konvencionalne lipozome, kao i lipozome sa modifikovanom membranom. Sve vrste lipozoma su pripremljene modifikovanom prolipozomnom metodom.

Na osnovu rezultata difuzionih eksperimenata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Polifenoli se mogu uspešno inkapsulirati u konvencionalne lipozome, kao i u lipozome čija je membrana modifikovana polisorbitima *Span 20*, *Span 40*, *Tween 20* i *Tween 60*.

- Najmanji srednji prečnik imaju konvencionalni lipozomi čija je membrana izgrađena od fosfolipida, uglavnom fosfatidilholina. Lipozomi modifikovani *Span*-om 20 i *Span*-om 40 imaju dva puta veći prečnik od konvencionalnih lipozoma. Modifikacija membrane *Tween*-om 20 povećava srednji prečnik lipozoma i usporava difuziju aktivne komponente. Modifikacija membrane *Tween*-om 60 dovodi do povećanja srednjeg prečnika lipozoma, ali se difuzija aktivne komponente ne usporava zbog postojanja frakcije sitnijih čestica. Lipozomne disperzije modifikovane *Tween*-om 60 i *Span*-ovima imaju bimodalne raspodele veličine čestica, sa jednim manjim i jednim većim pikom. Zeta potencijal lipozoma ne menja se značajno modifikacijom lipozomne membrane.

- Elektronska mikroskopija zahteva posebnu pripremu uzoraka lipozomnih disperzija. Klasičnom pripremom uzoraka i lipozomnih disperzija i liofilizovanih čestica ne dobijaju se snimci zadovoljavajućeg kvaliteta.

- Difuzija polifenola iz čajnog ekstrakta je brz proces i nakon 1 h dolazi do uspostavljanja ravnoteže.

- Konvencionalni lipozomi usporavaju difuziju polifenola u velikoj meri, jer membrana lipozoma pruža dodatni otpor difuziji polifenola. Difuzija je 3.8 puta sporija u odnosu na difuziju polifenola iz čajnog ekstrakta. Difuzija je najbrža u toku prvih 2 h, a zatim dolazi do uspostavljanja stacionarnog stanja.

- Modifikacija membrane lipozoma polisorbitima utiče na smanjenje brzine difuzije. U kojoj meri će difuzija biti usporena, zavisi od prirode molekula kojim se modifikacija vrši.

- Profil otpuštanja polifenola iz mikročestica modificovanih *Span*-om 20 pokazuje usporavanje difuzije u odnosu na klasične liposome. Difuzija u ovom sistemu je najbrža u toku prvih 3.5 h, nakon čega dolazi da uspostavljanja stacionarnog stanja. Vrednosti koeficijenta difuzije ukazuju na usporavanje difuzije iz mikročestica modificovanih *Span*-om 20. Difuzija iz ovog sistema je 5.9 puta sporija u odnosu na difuziju polifenola iz čajnog ekstrakta, dok je vrednost otpora koji pruža modificovana membrana difuziji polifenola $2.523 \cdot 10^6$ s/m, što je značajno više i od otpora lipozoma.

- Koeficijent difuzije iz mikročestica modificovanih *Span*-om 40 blizak je koeficijentu difuzije iz klasičnih lipozoma. I u slučaju *Span*-a 40 difuzija je sporija u odnosu na klasične liposome, ali je efekat značajno manji u poređenju sa *Span*-om 20.

- Modifikacija liposomne membrane *Tween*-om 20 uslovljava značajno usporavanje difuzije polifenola u odnosu na konvencionalne liposome, jer je difuzioni otpor koji ovakva membrana pruža veći od otpora nemodifikovane membrane. Difuzija polifenola iz ovih modificovanih lipozoma je 4.93 puta sporija nego difuzija iz čajnog ekstrakta. Efekat usporavanja difuzije je značajno veći u poređenju sa konvencionalnim lipozomima (1.3 puta sporija difuzija).

- Lipozomi modificovani *Tween*-om 60 ispoljavaju specifično ponašanje koje zahteva dodatna istraživanja. Izračunat koeficijent difuzije ne ukazuje na značajno usporavanje difuzije u odnosu na konvencionalne liposome.

- Inkapsulacija polifenola u konvencionalne i modificovane liposome uslovljava značajno usporavanje difuzije, pa se može postići efekat produženog otpuštanja. Poznavanje vrednosti koeficijenta difuzije i difuzionih otpora ovih sistema, pruža mogućnost za opisivanje i projektovanje sistema za kontrolisano otpuštanje.

Navedeni rezultati nalaze primenu u poboljšanju kvaliteta i biološke vrednosti konditorskih i farmaceutskih proizvoda. Naime, u konditorske proizvode mogu da se implementiraju polifenoli u inkapsuliranom obliku. Tako se omogućuje stabilnost i očuvanost polifenola. Osim toga, polifenolna jedinjenja su gorkog ukusa te se svakodnevnom ishranom unose u mnogo manjim dozama od preporučenih. Zbog toga se javila potreba za čvrstim inkapsulatima polifenola kojima će se maskirati njihov ukus, a koji se mogu koristiti kao aditivi za proizvodnju funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Takođe, inkapsulacija smanjuje količinu polifenola koja se dodaje po

jednici proizvoda kako bi se ostvario isti antioksidativni efekat u odnosu na neinkapsulirani oblik doziranja. Takvi proizvodi postaju neophodni u svakodnevnom životu kod ljudi čiji moderan način života ne dozvoljava dovoljan unos antioksidanasa u organizam. Osim toga, za primenu polifenola kao lekovitih supstanci u farmaceutskoj industriji, potrebne su formulacije koje će omogućiti kontrolisano otpuštanje u gastrointestinalnom traktu. Naime, slobodni polifenoli nakon oralne upotrebe imaju kratko vreme boravka u gastro traktu, bivaju slabo apsorbirani i brzo degradirani dejstvom kiselina i enzima u stomaku. Rezultati ove disertacije pokazuju kontrolisano i produženo otpuštanje polifenola inkapsuliranih u liposome, što može da bude značajno za farmaceutsku primenu.

LITERATURA

- Arts ICW, Hollman PCH. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**:317-325.
- Aruoma OI. (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mut. Res.* **523-524**:9-20.
- Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. (2004) Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol. In Vitro*, **18**:555-561.
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**:238-252.
- Baur A, Sinclair D. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**:493-506.
- Beckman CH. (2000) Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **57**:101-110.
- Belščak-Cvitanović A, Stojanović R, Manojlović V, Komes D, Juranović Cindrić I, Nedović V, Bugarski B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44**:1094-1101.
- Benzie IF, Strain JJ. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**:70-76.
- Berend S, Grbarić Z. (2008) Flow-Injection Method in Determining Food Polyphenol, Professional Paper, Zagreb.
- Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A. (1998) Flavonols, Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic disease. *Ernahrungswiss*, **37**:147-163.
- Bonina FP, Montenegro L, Scrofani N, Esposito E, Cortesi R, Menegatti E. (2005) Effects of phospholipid based formulations on *in vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of methyl nicotinate. *J. Controll. Release* **34**:53-63.
- Bouayed J, Bohn T. (2010) Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**:228-237.
- Božin B, Mimica-Đukić N, Samojlik I, Jovin E. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rosmery and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia pfficialis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food. Chem.* **55**:7879-7885.
- Bravo L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, *Nutr. Rev.* **56(11)**:317 - 333.
- Bugarski B, Smith J, Wu J, Goosen MFA. (1993) Methods for animal cell immobilization using electrostatic droplet generation. *Biotechnol. Tech.* **7(9)**:677-682.

Bugarski B, Obradovic B, Nedovic V, Goosen MFA. (2006) Electrostatic droplet generation technique for cell immobilization, in *Finely dispersed system*, ed by Shu JP and Spasic A. Boca Raton FL, CRC Press, str. 869-886.

Cavalcanti OA, Petenuci B, Bedin AC, Pineda EAG, Hechenleitner AAW. (2004) Characterisation of ethylcellulose films containing natural polysaccharides by thermal analysis and FTIR spectroscopy. *Acta Far. Bonaerense* **23**(1):53-57.

Chan Z-H E-S, Yim S-H, Phan R, Mansa F, Ravindra P. (2009) Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with Ca-alginate hydrogel beads. *Food Bioprod. Process.* **88**:195-201.

Clifford MN. (2000) Chlorogenic acids and other cinnamates. Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* **80**:1033-1043.

Dapkevicius A, van Beek TA, Lelyveld GP, van Veldhuizen A, de Groot A, Linsen JPH. (2002) Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *J. Nat. Prod.* **65**:892-896.

Decker E. (1997) Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr. Rev.* **55**:396-398.

Degroot AR, Neufeld RJ. (2001) Encapsulation of urease in alginate beads and protection from α -chymotrypsin with chitosan membranes. *Enzyme Microb. Tech.* **29**:321-327.

Deladino L, Anbinder PS, Navarro AS, Martino MN. (2008) Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydr. Polym.* **71**:126-134.

Deo N, Somasundaran P. (2003) Disintegration of Liposomes by Surfactants: Mechanism of Protein and Cholesterol Effects. *Langmuir* **19**:2007-2012.

Diplock AT. (1994) Antioxidants and disease prevention, U: Molecular Aspects of Medicine, (Baum, H., ured.), Pergamon Press, Oxford, New York, SAD, str. 295-376.

Diplock AT, Aggott PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid MB. (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br. J. Nutr.* **81**:1-27.

Donati I, Paoletti S. (2009) Material Properties of Alginates, Alginates: Biology and Applications, Rehm, H.A.B. (Eds.), Springer-Verlag Berlin, 1-54.

Doshi A, Mehta A. Liposomes, lecture, <http://pharmaxchange.info/notes/ceutics/liposomes.pdf>.

Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. (2006) Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. *Int. J. Pharmaceut.* **322**:60-66.

Fadda AM, Baroli BM, Maccioni AM, Sinico C, Valenti D, Alhaique F. (1998) Phospholipid-detergent systems: effects of polysorbates on the release of liposomal caffeine. *Farmaco* **53**:650-654.

Fang Z and Bhandari B. (2010) Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci. Tech.* **21**:510-523.

Fares M, Salem MS, Khanfar M. (2011) Inulin and poly(acrylic acid) grafted inulin for dissolution enhancement and preliminary controlled release of poorly water-soluble Irbesartan drug. *Int. J. Pharm.* **410**:206-2011.

Fiore A, Troise DA, Mogol AB, Roullier V, Gourdon A, El Mafadi Jian S, Hamzaloğlu AB, Gökmen V, Fogliano V. (2012) Controlling the Maillard Reaction by Reactant Encapsulation: Sodium Chloride in Cookies. *J. Agr. Food Chem.* **60**:10808-10814.

Fletcher RS, Slimmon T, McAuley CY, Kott LS. (2005) Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L). *J. Sci. Food Agr.* **85**:2429–2436.

Galati G, O'Brien P. (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:287-303.

George M, Abraham TE. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *J. Control.Release*, **114**:1–14.

Goh MK, Mahadi MN, Hassan O, Rahman ARZNR, Ilias MR. (2009) A predominant β -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **57**:270-277.

Gombotz WR, Wee SF (2012) Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **64**:194–205.

Gouin S. (2004) Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Tech.* **15**:330–347.

Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. (1979) Biological Interactions Between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg Box Model. *FEBS Lett.* **32**(1):195-198.

Groot H, Rauen U. (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **3**:249-255.

Gülçin İ. (2010) Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* **11**:210-218.

Gusman J, Malonne H, Atassi G. (2001) A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis* **22**:1111–1117.

Helenius A, McCaslin DR, Fries E, Tanford C. (1979) Properties of detergents. *Method. Enzymol.* **56**:734-749.

Henning SM, Niu Y, Liu Y, Lee NH, Hara Y, Thames GD. (2005) Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. *J. Nutr. Biochem.* **16**:610-616.

Hu Q, Pan B, Xu J, Sheng J, Shi Y. (2007) Effects of supercritical carbon dioxide extraction conditions on yields and antioxidant activity of *Chlorella pyrenoidosa* extracts. *J. Food Eng.* **80**:997–1001.

Huang D, Ou B, Prior RL. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal J. Agric. Food. Chem.* **53**:1841-1856.

Huguet ML, Dellacherie E. (1996) Calcium alginate Beads Coated with Chitosan: Effect of the Structure of Encapsulated Materials on Their Release. *Process Biochem.* **31(8)**:745-751.

Hurtta M, Pitkanen I, Knuutinen J. (2004) Melting behaviour of D-sucrose, D-glucose and D-fructose. *Carbohydr Res.* **339**:2267-2273.

Immordino M L, Dosio F, Cattel L. (2006) Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomed.* **1(3)**:297-315.

Isailović B, Kostić I, Zvonar A, Đorđević V, Gašperlin M, Nedović V, Bugarski B. (2013a) Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* **19**:181-189.

Ita KB, Du Preez J, Lane ME, Hadgraft J, du Plessis J. (2007) Dermal delivery of selected hydrophilic drugs from elastic liposomes: effect of phospholipid formulation and surfactants. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**:1215-1222.

James LP, Mayeux PR, Hinson JA. (2003) Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* **31**:1499-1506.

Katsube T, Tsurunaga Y, Sugiyama M, Furuno T, Yamasaki Y. (2009) Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chem.* **113**:964-969.

Kerdudo A, Dingas A, Fernandez X, Faure C. (2014) Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food Chem.* **159**:12-19.

Keshavartz T, Ramsden G, Phillips P, Mussenden P, Bucke C. (1992) Application of electric field for production of immobilized biocatalysts. *Biotechnol. Tech.* **6**:445-50.

Kets EPV, Ijpelaar PJ, Hoekstra FA, Vromans H. (2004) Citrate increases glass transition temperature of vitrified sucrose preparations. *Cryobiology* **48**:46-54.

Kosaraju SL, Dath L, Lawrence A. (2006) Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydr. Polym.* **64**:163-167.

Kostić TI, Isailović DB, Đorđević BV, Lević MS, Nedović AV, Bugarski MB. (2012) Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i biološki aktivnih supstanci. *Hem. Ind.* **66**:505-517.

Kulkarni AR, Soppimath KS, Aminabhavi TM, Dave AM, Mehta MH. (2000) Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *J. Control. Release* **63**:97-105.

Kwak NS, Jukes DJ. (2001a) Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. *Food Control.* **12**:99-107.

Lachman J, Hosnedl V, Pivec V, Orsak M. (1998) Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition, in *Proceedings of the Conference Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*, str. 118-125.

Lambert J, Elias R. (2010) The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Arch. Biochem. Biophys.* **501**:65-72.

Langley-Evans SC. (2000) Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **51**:181–188.

Lasic D.D. (1993) Liposomes: from physics to application, Elsevier Science B. V.

Laurienzo P, Malinconico M, Motta A, Vicinanza A. (2005) Synthesis and characterization of a novel alginate-poly (ethylene glycol) graft polymer. *Carbohydr. Polym.* **62**:274–282.

Lee SE, Hyun JH, Ha J-S, Jeong HS and Kim JH. (2003) Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci.* **73**:167–179.

Liebenberg W, Engelbrecht E, Wessels A, Devarakonda B, Yang W, De Villiers MM. (2004) A Comparative study of the release of active ingredients from semisolid cosmeceuticals measured with Franz, enhancer or flow-through cell diffusion apparatus. *J. Food Drug Anal.* **12**:19-28.

Lindahl M, Tagesson C. (1997) Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation*, **21**:347-356.

Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S. (2005) Flavour encapsulation and controlled release – a review. *Int. J. Food Sci. Techn.* **41**:1-21.

Manojlovic V, Djonlagic J, Obradovic B, Nedovic V, Bugarski B. (2006) Investigations of cell immobilization in alginate: rheological and electrostatic extrusion studies, *J. Chem. Technol. Biot.* **81(4)**:505-510.

Manojlovic V, Rajic N, Đonlagic J, Obradovic B, Nedovic V, Bugarski B. (2008) Application of Electrostatic Extrusion – Flavor Encapsulation and Controlled Release. *Sensors* **8**:1488-1496.

Manojlović V. (2008) Imobilizacija biološki aktivnih supstanci i ćelija u mikro- i nano- čestičnim sistemima, Doktorska teza, TMF Beograd.

Martinsen A, Skjak-Braek G, Smidsrod O. (1989) Alginate as Immobilization Material; I. Correlation between Chemical and Physical Properties of Alginate Gel Beads. *Biotechnol. Bioeng.* **33**:79-89.

Marzio LD, Marianecib C, Petronea M, Rinaldib F, Carafab M. (2011) Novel pH-sensitive non-ionic surfactant vesicles: comparison between Tween 21 and Tween 20. *Colloid. Surface. B* **82**:18–24.

Melvik JE, Dornish M. (2004) Alginate as a carrier for cell immobilization. In: Nedovic V, Willaert RG, editors. Focus on biotechnology. Vol 8a: Fundamentals of cell immobilisation biotechnology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, str. 33–51.

Mennen LI, Walker R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A. (2005) Risks and safety of polyphenol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**:326–329.

Mihailovic-Stanojevic N, Belščak-Cvitanović A, Grujić Milanović J, Ivanov M, Jovović Đ, Bugarski D, Miloradović Z. (2013) Antioxidant and Antihypertensive Activity of Extract from Thymus Serpyllum L. in Experimental Hypertension. *Plant Food. Hum. Nutr.* **68(3)**:235-240.

Moses LR, Dileep KJ, Sharma CP. (2000) Beta-cyclodextrin-insulin-encapsulated chitosan-alginate matrix: oral delivery system. *J. App. Polym. Sci.* **75**:1089-1096.

Mourtas S, Fotopoulou S, Duraj S, Sfika V, Tsakiroglou C, Antimisiaris SG. (2007) Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. *Colloid. Surface. B* **55**:212–221.

Mukhtar H, Ahmad N. (2000) Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**:1698S-1702S

Murata Y, Nakada K, Miyamoto E, Kawashima S, Seo S-H. (1993) Influence of erosion of calcium-induced alginate gel matrix on the release of brilliant blue. *J Control. Release* **23**:21-26.

Nadavala SK, Swayampakula K, Boddu VM, Abburi K. (2009) Biosorption of phenol and *o*-chlorophenol from aqueous solution on to chitosan-calcium alginate blended beads. *J. Hazard Mater.* **162**:482-489.

Nedović V. (1999) Imobilisani ćelijski sistemi u fermentaciji piva. Zadužbina Andrejević, Beograd, 19-31, 32-37.

Nedović VA, Obradović B, Leskošek-Čukalović I, Trifunović O, Pešić R, Bugarski B. (2001) Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast. *Process Biochem.* **37**:17-22.

Nussinovitch A, Gershon Z. (1996) A rapid method for determining sphericity of hydrocolloid beads. *Food Hydrocolloid.* **10**(2):263-266

Ough CS, Amerine MA. (1988) Methods for analysis of musts and wine, 2. izd. John Wiley & Sons, New York, SAD.

Pandey KB, Rizvi SI. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2**:270-278.

Parikh A, Madamwar D. (2006) Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Biores Technol.* **97**:1822–1827.

Pavelic Z, Skalko-Basnet N, Schubert R. (2001) Liposomal gels for vaginal drug delivery. *Int. J. Pharm.* **219**:139–149.

Peake PW, Pussell BA, Martyn P, Timermans V, Charlesworth JA. (1991) The Inhibitory Effect of Rosmarinic Acid on Complement Involves the C5 Convertase. *Int. J. Immunopharmacol.* **13**:853-857.

Peng H, Li W, Ning F, Yao L, Luo M, Zhu X, Zhao Q, Xiong H. (2014) Amphiphilic chitosan derivatives-based liposomes: synthesis, development, and properties as a carrier for sustained release of salidroside. *J. Agric. Food. Chem.* **62**:626–633.

Percival M. (1998) Antioxidants. *Clin. Nutr. Insight* **31**:1-4.

Perrett S, Golding M, Williams WP. (1991) A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: Characterization of the liposomes. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**:154-161.

Pichandy M, Mishra M, Kanaiyan S, Rao S, Anbu J. (2010) Formulation and psychopharmacological evaluation of surfactant modified liposome for parkinsonism disease. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **3**:46-54.

Pjanovic R, Boskovic-Vragolovic N, Veljkovic-Giga J, Garic-Grulovic R, Pejanovic S, Bugarski B. (2010) Diffusion of drugs from hydrogels and liposomes as drug carriers. *J. Chem. Technol. Biot.* **85**:693-698.

Pjanović R. (2010) Prenos mase aktivne komponente u heterogenim sistemima sa mikročesticama, Doktorska disertacija, Beograd.

Poncellet D, Babak V, Neufeld RJ, Goosen M, Bugarski B. (1999) Theory of electrostatic dispersion of polymer solution in the production of microgel beds containing biocatalyst. *Adv. Colloid Interfac.* **79**:213–228.

Pravić RN, Radunović VS, Bošković-Vragolović NM, Bugarski BM, Pjanović RV. (2015) The influence of membrane composition on the release of polyphenols from liposomes. *Hem. Ind.* **69**:347-353.

Puglia C, Powell S. (1984) Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. *Environ. Health Perspect.* **57**:307-311.

Rashidinejad A, Birch EJ, Sun-Waterhouse D, Everett DW. (2014) Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chem.* **156**:176–183.

Rassis DK, Saguy IS, Nussinovitch A. (2002) Collapse, shrinkage and structural changes in dried alginate gels containing fillers. *Food Hydrocolloid.* **16**:139-151.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:1231-1237.

Rusak G, Komes D, Belščak A, Kovacevic Ganic K, Ivekovic D, Karlovic D. (2008) The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusion, *Food Chem.* **115**:441-448.

Rusak G, Komes D, Likic S, Horzic D, Kovac M. (2008) Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent. *Food Chem.* **110**:852-858.

Scalbert A, Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **130**:2073–2085.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**:287-306.

Sies H. (1997) Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy, Academic Press, London, UK.

Simpol LR, Otsuka H, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K. (1994) Nitril glucosides and rosmarinic acid, the histamine inhibitor from *Ehretia philippinensis*. *Phytochemistry* **36**:91–95.

Singh B, Sharma DK, Kumar R, Gupta A. (2010) Development of a new controlled pesticide delivery system based on neem leaf powder. *J. Hazard Mater.* **177**:290-299.

Singh R, Vyas SP. (1996) Topical liposomal system for localized and controlled drug delivery. *J. Dermatol. Sci.* **13**:107–111.

Singleton VL, Rossi JA. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**:144-158.

Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM. (1999a) Flavanoids and other polyphenols. *Methods Enzymol.* **299**:152.

Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM. (1999b) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**:1179.

Smidsrod O, Skjak Braek G. (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* **8**:71-78.

Stojanović R, Belščak-Cvitanović ., Manojlović V, Komes D, Nedović V, Bugarski B. (2012) Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *J. Sci. Food Agr.* **92(3)**:685-696.

Stojanović S, Sprinz H, Berde O. (2001) Efficiency and mechanism of the antioxidant action of *trans*-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **391**:79-89.

Storm G, Crommelin DJA. (1998) Liposomes: quo vadis? *Pharmaceut. Sci. Technol. Today*, **1**:19-31.

Sudheesh S, Sandhya C, Sarah Koshy A, Vijayalakshmi NR. (1999) Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother. Res.* **13**:393-396.

Szente L, Szejtli J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Tech.* **15**:137-142.

Tasi L-M, Chen W-Y. (2003) Microcalorimetric investigation of the interaction of polysorbate surfactants with unilamellar phosphatidylcholines liposomes. *Colloid. Surface. A* **213**:7-14.

Thies C. (2005) Microencapsulation. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, (4 izdanje) **16**:317-327.

Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smisrod O, Soon-Shiong P, Skjak-Break G. (1996a) Alginate polycation microcapsules. 1. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials* **17**:1031-1040.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C.J, Telser J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* **266**:37-56.

Vijaya Y, Popouri SR, Boddu V, Krishnaiah M. (2008) Modified chitosan and calcium alginate biosorbents for removal of nickel (II) through absorption. *Carbohydr. Polym.* **72**:261-271.

Watjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, Tran-Thi Q, Proksch P, Kahl R. (2005) Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J. Nutr.* **135**:525-531.

Wenk MR, Seelig J. (1997) Interaction of octyl-beta-thioglucopyranoside with lipid membranes. *Biophys. J.* **73**:2565-2574.

Willaert RG, Baron GV, De Backer L. (1996) Immobilised living cell systems modelling and experimental methods, Chichester, England: J. Wiley & Sons.

Williamson G, Holst B. (2008) Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *Brit. J. Nutr.* **99**:55-58.

Won K, Kim S, Kim KJ, Park HW, Moon SJ (2005) Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem.* **40**:2149–2154.

Yu LX, Amidon GL. (2000) Analytical solutions to mass transfer. *In: Amidon G.L., Lee P.I., Topp E.M. (Eds.), Transport Processes in Pharmaceutical Systems. Inc, New York, str. 23-54.*

Zohar-Perez C, Chet I, Nussinovitch A. (2004) Irregular textural features of dried-alginate-filler beads. *Food Hydrocolloid.* **18**:249-258.

Zuidam NJ and Heinrich J (2010) Encapsulation of aroma, in *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*, ed by Zuidam NJ and Nedovic VA. Springer, Dordrecht, The Netherlands, str. 127-160.

Zuidam NJ, Shimoni E. (2010) Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. Zuidam, NJ. i. Nedovic, VA (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing* Dordrecht, Springer, 3-29.

Sadržaj slika

Slika 1.1. Reakcija polifenola i <i>Folin-Ciocalteu</i> reagensa – obojenost zavisi od koncentracije polifenola u uzorku.....	14
Slika 1.2. Biljka majčine dušice	17
Slika 1.3. Struktura natrijum alginata (G – guluronska kiselina; M – manuronska kiselina).....	18
Slika 1.4. Blokovi homopolimera (a,b) i alternirajućih kopolimera (c).....	19
Slika 1.5. <i>Egg-box</i> model. Crni krugovi predstavljaju Ca^{2+} jone smeštene između susednih ostataka guluronske kiseline (konture u V obliku), dok su susedni ostaci manuronske kiseline prikazani kao krive na krajevima <i>egg-box</i> -a.....	20
Slika 1.6. <i>Pandalus borealis</i>	25
Slika 1.7. Strukturna formula hitozana.....	25
Slika 1.8. Strukturna formula inulina.....	27
Slika 1.9. Metode imobilizacije ćelija.....	29
Slika 1.10. Ekstruzione metode za dobijanje polimernih čestica sa imobilisanim biokatalizatorom.....	32
Slika 1.11. Elektrostatički ekstruder	33
Slika 1.12. Struktura molekula fosfolipida.....	36
Slika 1.13. Fosfolipidni dvosloj	36
Slika 1.14. Struktura fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina i fosfatidilholina	37
Slika 1.15. Hidrofobne (A) i hidrofилne (B) aktivne supstance inkapsulirane u lipozomu	41
Slika 1.16. Strukturne formule polioksietilena (levo) i sorbitana (desno)	43
Slika 1.17. Struktura Polisorbata 20 (<i>Tween</i> 20).....	44
Slika 1.18. Struktura Polisorbata 60 (<i>Tween</i> 60).....	44
Slika 1.19. Struktura niozoma	45
Slika 1.20. Struktura Sorbitan monolaurata (<i>Span</i> 20).....	46
Slika 1.21. Struktura Sorbitan monostearata (<i>Span</i> 40)	46
Slika 1.22. (I) Micela, (II) mešana micela; gde je A – molekul površinski aktivne supstance, B – molekul lekovite supstance, C – molekul fosfolipida	47
Slika 1.23. Profili otpuštanja leka (a) tradicionalni sistemi, (b) sistemi sa kontrolisanim otpuštanjem	49

<i>Slika 1.24.</i> Šematski prikaz jednodimenzionalne difuzije kroz film.....	53
<i>Slika 1.25.</i> Šematski prikaz jednodimenzionalne difuzije kroz membranu	54
<i>Slika 1.26.</i> Izgled Franz-ove difuzione ćelije.....	55
<i>Slika 1.27.</i> Uticaj eksperimentalnih uslova na oslobađanje aktivne supstance.....	56
<i>Slika 1.28.</i> Ćelija sa dijafragmom	57
<i>Slika 3.1.</i> UV spektrofotometar.....	63
<i>Slika 3.2.</i> Formiranje ABTS radikal katjona.....	66
<i>Slika 3.3.</i> Redukcija bezbojnog kompleksa u fero formu plave boje.....	67
<i>Slika 3.4.</i> Šematski prikaz eksperimentalne aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije	69
<i>Slika 3.5.</i> DSC-TGA uređaj: šema spoljašnjosti uređaja	71
<i>Slika 3.6.</i> Franz-ova statička difuziona ćelija.....	73
<i>Slika 3.7.</i> Zetasizer Nano ZS.....	76
<i>Slika 4.1.</i> Hidrogel čestice.....	82
<i>Slika 4.2.</i> Hidrogel čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja	82
<i>Slika 4.3.</i> Čestice alginat – hitozan sa inkapsuliranim ekstraktom čaja.....	83
<i>Slika 4.4.</i> SEM mikrograf Ca-alginat čestica: a) hidrogel čestica – veliko uvećanje; b) hidrogel čestica –malo uvećanje; c) čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja; d) sušene čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja – veliko uvećanje; e) sušene čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja – malo uvećanje; f) liofilisane čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja	84
<i>Slika 4.5.</i> SEM mikrograf sušenih čestica alginat-inulin sa inkapsuliranim ekstraktom čaja: a) malo uvećanje; b) veliko uvećanje	85
<i>Slika 4.6</i> TGA- DTA termogram za alginatne čestice.....	86
<i>Slika 4.7.</i> TGA- DTA termogram za suve alginatne čestice	87
<i>Slika 4.8.</i> FTIR spektar Ca-alginatnih čestica.....	89
<i>Slika 4.9.</i> Poređenje krivih otpuštanja iz alginatnih čestica, alginat-hitozan i alginat-inulin čestica	92
<i>Slika 4.10.</i> Kriva ABTS metode za alginatne čestice sa inkapsuliranim ekstraktom čaja	93
<i>Slika 4.11.</i> Krive otpuštanja polifenola iz različitih alginatnih čestica i ekstrakta čaja	94

Slika 4.12. Krive otpuštanja polifenola iz alginatnih čestica, alginat-hitozan i alginat-inulin čestica	94
Slika 4.13. Udeo oslobođenih polifenola iz različitih alginatnih čestica i ekstrakta čaja	96
Slika 4.14. Udeo oslobođenih polifenola iz alginatnih čestica, alginat-hitozan i alginat-inulin čestica.....	97
Slika 4.15. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz ekstrakta čaja	97
Slika 4.16. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz alginatnih i modifikovanih alginatnih čestica	100
Slika 4.17. Raspodela čestica u uzorku sa konvencionalnim lipozomima.....	104
Slika 4.18. Raspodela čestica u uzorku sa lipozomima čija je membrana modifikovana <i>Tween</i> -om 20.....	105
Slika 4.19. Raspodela čestica u uzorku sa lipozomima čija je membrana modifikovana <i>Tween</i> -om 60	105
Slika 4.20. Raspodela čestica u uzorku sa lipozomima čija je membrana modifikovana <i>Span</i> -om 20.....	106
Slika 4.21. Raspodela čestica u uzorku sa lipozomima čija je membrana modifikovana <i>Span</i> -om 40	107
Slika 4.22. SEM mikrograf disperzije konvencionalnih lipozoma	108
Slika 4.23. SEM mikrograf disperzije lipozoma sa <i>Tween</i> -om 20.....	108
Slika 4.24. SEM mikrograf disperzije lipozoma sa <i>Span</i> -om 40	108
Slika 4.25. SEM mikrograf liofilizovanih lipozoma modifikovanih <i>Span</i> -om 20	108
Slika 4.26. Krive otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta i lipozomnih disperzija.....	109
Slika 4.27. Krive otpuštanja polifenola iz lipozomnih disperzija	110
Slika 4.28. Zavisnost udela oslobođenih polifenola od vremena u svim ispitivanim sistemima	111
Slika 4.29. Zavisnost udela oslobođenih polifenola od vremena kod lipozomnih disperzija	112
Slika 4.30. Krive otpuštanja polifenola iz čajnog ekstrakta i lipozomnih disperzija	113
Slika 4.31. Krive otpuštanja polifenola iz lipozomnih disperzija	113

Slika 4.32. Zavisnost udela oslobođenih polifenola od vremena u svim ispitivanim sistemima	114
Slika 4.33. Zavisnost udela oslobođenih polifenola od vremena kod lipozomnih disperzija	115
Slika 4.34. Zavisnost udela oslobođenih polifenola od vremena kod lipozomnih disperzija	116
Slika 4.35. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz disperzije konvencionalnih lipozoma i lipozoma modifikovanih <i>Span</i> -om 20 i <i>Span</i> -om 40	117
Slika 4.36. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz disperzije lipozoma modifikovanih <i>Span</i> -om 20 i <i>Span</i> -om 40	118
Slika 4.37. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz disperzije konvencionalnih lipozoma i lipozoma modifikovanih <i>Tween</i> -om 20 i <i>Tween</i> -om 60	119
Slika 4.38. Određivanje koeficijenta difuzije polifenola iz disperzije lipozoma modifikovanih <i>Tween</i> -om 20 i <i>Tween</i> -om 60	119

Sadržaj tabela

Tabela 3.1. Gradijent rastvarača za HPLC analizu spojeva prisutnih u ekstraktima	65
Tabela 3.2. Masa disperzije lipozoma u donorskom delu za različite vrste čestica.....	77
Tabela 4.1. Sadržaj ukupnih polifenola, sadržaj ruzmarinske kiseline i antioksidativni kapacitet čajnog ekstrakta i alginatnih čestica.....	81
Tabela 4.2. Veličina čestica i stepen inkapsulacije za različite vrste alginantnih čestica.	83
Tabela 4.3. Stepen inkapsulacije različitih alginatnih čestica.....	91
Tabela 4.4. Koeficijenti difuzije za ekstrakt čaja i alginatne i modifikovane alginatne čestice.....	100
Tabela 4.5. Ukupni difuzioni otpori alginantnih i modifikovanih alginantnih čestica ...	102
Tabela 4.6. Difuzioni otpori za različite vrste alginatnih čestica	103
Tabela 4.7. Veličina fosfolipidnih mikročestica	103
Tabela 4.8. Koeficijenti difuzije za konvencionalne i modifikovane lipozome	118
Tabela 4.9. Koeficijenti difuzije za konvencionalne i modifikovane lipozome	120
Tabela 4.10. Određivanje difuzionih otpora konvencionalnih i modifikovanih lipozoma.....	120
Tabela 4.11. Upoređivanje difuzionih otpora.....	121
Tabela 4.12. Određivanje difuzionih otpora konvencionalnih i modifikovanih lipozoma	121
Tabela 4.13. Difuzioni otpori za različite vrste lipozoma.....	122
Tabela 4.14. Difuzioni otpori za različite vrste lipozoma.....	124
Tabela 4.15. Koeficijenti difuzije čestica lipozoma i srednji prečnik.....	124

Biografija

Radoslava N. Pravić (rođ. Stojanović), diplomirani inženjer tehnologije, rođena je 17.03.1982. godine u Smederevu. Osnovnu školu „Dr Jovan Cvijić“ završila je u Smederevu, kao i Gimnaziju, a za uspehe tokom školovanja nagrađena je Vukovom diplomom. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu započela je školske 2001/2002. godine, a diplomirala je na smeru Hemijsko inženjerstvo 2006. godine sa prosečnom ocenom 9.22. Diplomski rad pod nazivom “Određivanje otpora prenosu mase pri difuziji lidokain-hidrohlorida iz mikročestica” odbranila je sa ocenom 10.00.

Školske 2006/2007. godine upisala je doktorske studije na smeru Biohemijsko inženjerstvo pod mentorstvom dr Branka Bugarskog, red. prof, i položila sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 10.00, uključujući i završni ispit.

Od januara 2007. do februara 2011. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije u okviru projekta osnovnih istraživanja pod nazivom “Interakcija imobilisanih ćelija, tkiva i biološki aktivnih molekula u bioreaktorskim sistemima“ (broj projekta 142075). Od 01.02.2011. godine je zaposlena na Tehnološko-metalurškom fakultetu, kao istraživač-pripravnik, a od februara 2012. godine prelazi u zvanje istraživač-saradnik. Angažovana je na projektu integralnih i interdisciplinarnih istraživanja pod nazivom „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“ Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (broj projekta III46010). Pored ovoga, učestvovala je i na dva međunarodna Eureka projekta (sa Republikom Slovenijom, broj projekata E!4486 i E!6750).

Angažovana je u nastavi u izvođenju računskih vežbi iz predmeta „Osnovi automatskog upravljanja (procesima)“ počev od školske 2007/2008.god, pa do danas, „Automatsko upravljanje procesima“ 2008/2009.god, „Modelovanje i simulacija procesa“ 2010/2011, 2013/2014. i 2015/2016.god, kao i u izvođenju eksperimentalnih vežbi iz predmeta „Tehnološke operacije“ 2008/2009. i

2009/2010.god. i iz predmeta „HI laboratorija“ 2013/2014.god. pri katedri za Hemijsko inženjerstvo TMF-a.

Radoslava Prilović je do sada bila autor ili koautor 16 radova štampanih u celini i to: dva (2) rada publikovana u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jedan (1) rad publikovan u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), tri (3) rada publikovana u međunarodnim časopisima (M23), deset (10) saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u celini (M33) i jedno (1) saopštenje sa nacionalnog skupa štampano u celini (M63). Objavila je i sedam (7) radova sa domaćih i međunarodnih skupova štampanih u izvodu, od čega četiri (4) rada na međunarodnim skupovima (M34) i tri (3) rada na skupu nacionalnog značaja (M64).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a **Radoslava (Novica) Pravić**

broj indeksa **DS-13/06**

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom

„Difuzija polifenolnih jedinjenja iz mikročestica dobijenih različitim tehnikama inkapsulacije“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 23. 5. 2016.

Radoslava Pravić

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora Radoslava (Novica) Pravić

Broj indeksa DS-13/06

Studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Naslov rada „Difuzija polifenolnih jedinjenja iz mikročestica dobijenih različitim tehnikama inkapsulacije“

Mentor prof.dr Branko Bugarski

Potpisani/a Radoslava (Novica) Pravić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 23.5. 2016.

Radoslava Pravić

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Difuzija polifenolnih jedinjenja iz mikročestica dobijenih različitim tehnikama inkapsulacije“

Koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 23.5.2016.

Regociaba Debnobut