

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Kata T. Trifković

**HIDROGELOVI NA BAZI HITOZANA ZA
KONTROLISANO OTPUŠTANJE POLIFENOLA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Kata T. Trifković

**CHITOSAN-BASED HYDROGELS FOR
CONTROLLED RELEASE OF POLYPHENOLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor:

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

Komisija:

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

Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

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

Dr Nikola Milašinović, docent
Kriminalističko-policijska akademija u Beogradu

Kandidat:

Kata T. Trifković, dipl.inž.tehnol.

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru projekta integralnih i interdisciplinarnih istraživanja III46010 pod nazivom „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije od 2011. godine.

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u laboratorijama Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, zatim Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a pojedini eksperimenti urađeni su u laboratorijama Instituta tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti, Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ i Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

Izjave zahvalnosti

Zahvaljujem se mentoru, profesoru dr Branku Bugarskom na prilici da radim doktorsku disertaciju pod njegovim vođstvom, na svim korisnim savetima i sugestijama prilikom izrade disertacije, ali i na ostalim pruženim prilikama u toku rada na projektu. Hvala Vam što ste me naučili kako se drži nastava, kako se vode i pišu projekti i što ste mi omogućili kontakt sa stručnjacima iz zemlje i inostranstva.

Zahvalnost dugujem i profesoru dr Viktoru Nedoviću, proenstveno što je učinio dostupnim laboratorije Poljoprivrednog fakulteta za izradu ove doktorske disertacije, ali i za pružene prilike za rad sa vrsnim inostranim naučnim institucijama.

Ogromnu zahvalnost dugujem višem naučnom saradniku dr Verici Đorđević, jer bez njene posvećenosti i zalaganja ove doktorske disertacije ne bi ni bilo. Verice, hvala što si bila uz mene i u eksperimentalnom radu, i u toku pisanja radova i disertacije. Hvala što si mi pružila uzor koji čvrsto stoji iza uverenja da je samo perfektno dovoljno dobro. Hvala što si mi svih ovih godina bila prijatelj.

Docentu dr Nikoli Milašinoviću veliko hvala što mi je bio podrška i saborac na naučnom bojnopolju, u laboratoriji, gde smo uspeli da izvojevamo brojne pobjede. Hvala na nepresušnoj motivaciji i entuzijazmu za zajednički rad. Hvala što si i mene podstakao da radim više.

Zahvalnost dugujem i profesorki dr Zorici Knežević-Jugović na pomoći i korisnim sugestijama, kako u pisanju radova, tako i u izradi i pisanju doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem koleginicama Bojani Balanč, Radoslavi Pravilović i Ivani Drovenci za podršku svih ovih godina izrade naših disertacija i rada na projektu. Hvala vam što ste učinile da rezultat rada na doktorskoj disertaciji ne bude samo ova „knjiga“, već i divno prijateljstvo. Takođe, veliko hvala i ostalim koleginicama i kolegama iz „ljubičaste“ i „žute“ laboratorije.

Na kraju, ogromnu zahvalnost dugujem mojoj porodici i prijateljima koji su sve ove godine verovali u mene i gurali me napred. Hvala vam za to.

HIDROGELOVI NA BAZI HITOZANA ZA KONTROLISANO OTPUŠTANJE POLIFENOLA

REZIME

U ovoj disertaciji prikazan je „*bottom-up*“ pristup u formulisanju sistema za kontrolisanu dostavu bioaktivnih komponenti, polazeći od frakcije vodorastvornih polifenola majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.) i njihove inkapsulacije u hidrogelove na bazi hitozana. Najpre je vršena karakterizacija polaznog ekstrakta majčine dušice, određivanjem ukupnog sadržaja polifenola (spektrofotomerijom u ultraljubičastoj oblasti), zatim određivanjem konkretnih polifenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktu (tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom), kao i određivanjem sadržaja minerala (metodom indukovano spregnute plazme sa masenom spektrometrijom). Na kraju, procenjen je antioksidativni kapacitet ekstrakta korišćenjem spektrofotometrijske metode (ABTS).

Za inkapsulaciju polifenola iz ekstrakta majčine dušice sintetisani su hidrogelovi na bazi hitozana korišćenjem različitih tehnika, i to (i) elektrostatičkom ekstruzijom, (ii) inverznom emulzionom polimerizacijom i (iii) sprej-sušenjem. Za umrežavanje hitozana korišćeni su različiti umrežavajući reagensi: (i) joni kalcijuma; (ii) glutaradehid; (iii) natrijum-tripolifosfat i (iv) genipin. Sam proces inkapsulacije polifenola izvođen je na dva načina: (i) postupkom „*in-situ*“ inkapsulacije, gde se formiranje mreže hidrogela i inkapsulacija polifenola simultano odvijaju, i (ii) tzv. „*post-loading*“ postupkom, gde se najpre vrši priprema hidrogelova (tzv. „*ready-made support*“), a potom inkapsulacija polifenola, bubrenjem hidrogelova u vodenom ekstraktu majčine dušice.

U trećem delu rada vršena je karakterizacija dobijenih sistema sa inkapsuliranim polifenolima u cilju određivanja profila bubrenja, zatim njihovog oblika (optička mikroskopija) i površinske morfologije (skenirajuća

elektronska mikroskopija), poroznosti (Brunauer-ova, Emmett-ova i Teller-ova metoda), veličine čestica i njihove raspodele veličina, kao i naelektrisanja na površini čestica (laserske difrakcione tehnike). Takođe, ispitivane su interakcije polimer-polimer i/ili polimer-umrežavajući reagens i/ili polimer-umrežavajući reagens-polifenoli (infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom), a procenjen je i uticaj umrežavanja i inkapsulacije polifenola na kristaličnost hitozana (rendgenska difrakciona analiza).

Hidrogelovi na bazi hitozana sa inkapsuliranim polifenolima su zatim testirani u smislu određivanja ukupnog sadržaja polifenola (spektrofotometrijskom metodom i tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom), kao i procenom zadržanog antioskidativnog kapaciteta inkapsuliranih polifenola (ABTS metoda). Na kraju, vršeno je ispitivanje potencijalne primene dobijenih hidrogelova za kontrolisano otpuštanje polifenola (spektrofotometrijski i tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom).

Poseban deo rada je posvećen proceni difuzionih karakteristika hidrogel sistema. Naime, bubrenje (odnosno apsorpcija vode) i otpuštanje (odnosno desorpcija) polifenola su ispitivani u različitim uslovima temperature i pH (simulirani uslovi gastro-intestinalnog trakta). Eksperimentalno dobijeni podaci su potom upoređeni sa nekoliko teorijskih, polu-empirijskih i empirijskih modela (Ritger-Peppas, Higuchi, Baker-Lonsdale, Berens-Hopfenberg, Burst effect, Peppas-Sahlin, Weibull i Peleg model), kako bi se predvidelo ponašanje hidrogelova pri bubrenju, odnosno otpuštanju polifenola i utvrdio mehanizam transporta.

Prikazane karakteristike dobijenih hidrogelova na bazi hitozana ilustruju njihov potencijal za primenu u prehrambenoj i/ili farmaceutskoj industriji, kao sistema za dostavu polifenola i njihovo produženo/kontrolisano otpuštanje na ciljanom mestu. Dobijeni rezultati podržavaju ideju formulisanja hidrogelova na bazi hitozana sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice koji će se potom koristiti kao funkcionalni aditivi hrani ili u farmaceutskoj industriji.

Ključne reči: inkapsulacija, polifenoli majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.), hidrogelovi, hitozan, umrežavanje, kontrolisano otpuštanje

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj: 544.773.432:547.995:547.56:665.7.038.5

CHITOSAN-BASED HYDROGELS FOR CONTROLLED RELEASE OF POLYPHENOLS

SUMMARY

Presented thesis addresses the bottom-up approach in design of functional food ingredients starting with aqueous thyme (*Thymus serpyllum* L.) extract and its encapsulation within the chitosan-based hydrogels. Firstly, characterization of thyme extract was performed, in terms of determining total phenolic content (ultraviolet-visible spectrophotometry), particular polyphenolic compounds (high pressure liquid chromatography), as well as mineral content (inductively coupled plasma with mass spectroscopy). Finally, the antioxidant capacity of thyme extract was estimated (ABTS spectrophotometric method).

Chitosan-based hydrogels were produced using different encapsulation techniques: (i) electrostatic extrusion; (ii) inverse emulsion polymerization and (iii) spray-drying. In order to obtain stabilized hydrogels, cross-linking of chitosan with different cross-linking agents was utilized: (i) calcium ions; (ii) glutaraldehyde; (iii) sodium-tripolyphosphate and (iv) genipin. The encapsulation procedure was conducted in two different ways: (i) “*in situ*” encapsulation, where the formation of the polymer network and encapsulation of the polyphenols occurred simultaneously, and (ii) so called “*post-loading*” of polyphenols, where the hydrogels (e.g. “*ready-made support*”) were primarily produced, while the loading of polyphenols was subsequently performed.

In the third part of the thesis synthesized hydrogels with encapsulated polyphenols were characterized in terms of swelling behavior, shape (optical microscopy) and surface morphology (Scanning Electron Microscopy), porosity (Brunauer, Emmett, Teller method), particle size and particle size distribution, as well as zeta-potential (Laser Diffraction Techniques). In addition, interactions polymer-polymer and/or polymer-crosslinking agent and/or polymer-crosslinking agent-polyphenols were studied (Fourier Transform Infrared

spectroscopy), as well as impact of cross-linking and encapsulation process on crystallinity of chitosan (X-Ray Diffraction).

Subsequent analyses were dedicated to the determination of total phenolic content in chitosan-based hydrogels (ultraviolet-visible spectrophotometry and high pressure liquid chromatography) and of preserved antioxidant capacity of encapsulated polyphenols (ABTS spectrophotometric method). Synthesized hydrogels showed good potential to be used as devices for controlled release of polyphenols (spectrophotometric methods and high pressure liquid chromatography).

The particular emphasis was rewarded to the diffusion characteristics of hydrogel systems; the swelling (e.g. water sorption) and release (e.g. desorption of polyphenols) profiles were monitored in different conditions of temperature and pH (simulated gastro-intestinal conditions). The experimentally obtained data were fitted to the number of theoretical, semi-empirical and empirical models (Ritger-Peppas, Higuchi, Baker-Lonsdale, Berens-Hopfenberg, Burst effect, Peppas-Sahlin, Weibull and Peleg model), in order to predict the swelling and release properties of hydrogels and to determine the type of transfer mechanism.

Overall, this study demonstrated the potential of chitosan-based hydrogels as devices for encapsulation of thyme polyphenols and their targeted prolonged/controlled delivery. The obtained results support the idea of formulating the chitosan hydrogels loaded with thyme polyphenols that could be utilized as functional food additive in the production of novel foods and/or in the pharmaceutical industry.

Keywords: Encapsulation, Thyme polyphenols (*Thymus serpyllum* L.), Hydrogels, Chitosan, Cross-linking, Controlled delivery

Scientific field: Technological engineering

Scientific discipline: Biochemical Engineering and Biotechnology

UDC number: 544.773.432:547.995:547.56:665.7.038.5

Sadržaj

UVOD.....	1
CILJ RADA	4
I TEORIJSKI DEO.....	6
1. Antioksidansi	7
1.1. Slobodni radikali i njihovo dejstvo na organizam	7
1.2. Dejstvo antioksidanasa na slobodne radikale.....	8
2. Polifenoli	10
2.1. Klasifikacija polifenolnih jedinjenja	10
2.2. Dejstvo polifenola na ljudsko zdravlje.....	12
2.1. Antioksidativno dejstvo polifenola.....	13
2.2. Ostala dejstva polifenola.....	13
2.2.1. Anti-bakterijsko i anti-viralno dejstvo polifenola	14
2.2.2. Anti-mutageno i anti-kancerogeno dejstvo polifenola.....	15
2.2.3. Anti-dijabetsko dejstvo polifenola.....	16
2.2.4. Kardioprotektivno dejstvo polifenola.....	16
2.2.5. Anti-kariogeno dejstvo polifenola.....	17
2.3. Bioraspoloživost biljnih polifenola.....	17
2.4. Polifenoli čaja majčine dušice (<i>Thymus serpyllum</i> L.)	19
3. Inkapsulacija.....	27
3.1. Ciljevi inkapsulacije.....	33
4. Tehnike inkapsulacije aktivnih supstanci	35
4.1. Ekstruzione tehnike i njihova primena za inkapsulaciju aktivnih supstanci. 35	
4.1.2. Elektrostatička ekstruzija.....	36
4.2. Tehnika emulziona polimerizacije i njena primena za inkapsulaciju aktivnih supstanci.....	39
4.2.1. Inverzna emulziona polimerizacija.....	41
4.2.2. Stabilnost i veličina čestica dobijenih inverznom emulzionom polimerizacijom	42
4.3. Tehnika sprej-sušenja i njena primena za inkapsulaciju aktivnih supstanci.. 44	
4.3.1. Emulgovanje kao pred-korak sprej-sušenju.....	45
4.3.2. Uticaj procesnih parametara na karakteristike prahova dobijenih tehnikom sprej-sušenja.....	46
5. Polimerni materijali za inkapsulaciju aktivnih supstanci	49

5.1. Hitozan kao nosač za inkapsulaciju aktivnih supstanci.....	49
5.1.1. Hemijska struktura hitozana.....	50
5.1.2. Karakteristike hidrogelova na bazi hitozana	51
5.1.2.1. Bikomatibilnost i biodegradabilnost.....	51
5.1.2.2. Mukoadhezivnost.....	51
5.1.2.3. Efekat olakšavanja permeacije.....	52
5.1.2.4. pH osetljivost	52
5.1.3. Umrežavanje hitozana glutaraldehydom.....	53
5.1.4. Umrežavanje hitozana natrijum-tripolifosfatom.....	54
5.1.5. Umrežavanje hitozana genipinom	55
5.2. Alginat kao nosač za inkapsulaciju aktivnih supstanci.....	57
5.2.1. Hemijska struktura alginata	57
5.2.2. Interakcije alginata sa katjonima i mehanizam formiranja gela.....	58
5.2.3. Karakteristike hidrogelova na bazi alginata	60
5.3. Alginat-hitozan nosači za inkapsulaciju aktivnih supstanci	61
5.3.1. Karakteristike hidrogelova alginat- hitozan	62
6. Kontrolisano otpuštanje.....	64
6.1. Mehanizam prenosa mase u sistemima za kontrolisano otpuštanje	66
6.2. Modeli za procenu mehanizma prenosa mase	68
II EKSPERIMENTALNI DEO	72
7.1. Materijali	71
7.2. Priprema ekstrakta majčine dušice.....	72
7.3. Karakterizacija dobijenog ekstrakta.....	72
7.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola.....	72
7.3.1.1. Izrada baždarnih krive za FC metodu	73
7.3.2. Analiza tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom	73
7.3.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti	74
7.3.3.1. Izrada baždarnih krive za ABTS metodu	75
7.3.4. Određivanje sadržaja minerala.....	76
7.4. Inkapsulacija polifenola majčine dušice u hidrogelove	77
7.5. Priprema mikročestica alginat-hitozan.....	77
7.6. Priprema mikročestica hitozana	79
7.6.1. Priprema mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom	79
7.6.2. Priprema mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom	80
7.6.3. Priprema mikročestica hitozana umreženih genipinom.....	82
7.7. Karakterizacija dobijenih mikroinkapsuliranih sistema	83

7.7.1. Bubrenje mikroinkapsuliranih sistema na bazi hitozana	83
7.7.2. Veličina i raspodela veličina mikročestica	84
7.7.3. Optička mikroskopija i sferičnost mikročestica	85
7.7.4. Poroznost mikročestica	86
7.7.5. Površinska morfologija mikroinkapsuliranih sistema na bazi hitozana – skenirajuća elektronska mikroskopija	86
7.7.6. Naelektrisanje na površini mikročestica.....	87
7.7.7. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom	88
7.7.8. Kristaličnost mikročestica – rendgenska difrakciona analiza.....	88
7.7.9. Određivanje mehaničkih karakteristika mikročestica	88
7.8. Efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola u mikroinkapsuliranim sistemima.....	89
7.9. Otpuštanje polifenola iz mikroinkapsuliranih sistema	90
7.9.1. Otpuštanje polifenola – FC metoda.....	91
7.9.2. Otpuštanje polifenola – HPLC metoda.....	91
7.10. Određivanje zadržanog antioksidativnog kapaciteta polifenola nakon inkapsulacije.....	91
7.11. Primena matematičkih modela na kinetiku bubrenja hidrogelova i otpuštanja polifenola	92
7.12. Statistička obrada eksperimentalnih podataka.....	92
III REZULTATI I DISKUSIJA.....	93
8. Karakterizacija ekstrakta majčine dušice.....	94
8.1. Sadržaj ukupnih polifenola	94
8.2. Analiza ekstrakta tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom.....	95
8.3. Antioksidativna aktivnost ekstrakta	97
8.4. Sadržaj minerala u ekstraktu.....	98
9. Karakterizacija dobijenih mikroinkapsuliranih sistema	102
9.1. Bubrenje mikroinkapsuliranih sistema na bazi hitozana.....	102
9.1.1. Bubrenje mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom	102
9.1.2. Modelovanje kinetike bubrenja mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom.....	107
9.2. FTIR analiza	110
9.2.1. FTIR analiza mikročestica alginat-hitozan	111
9.2.2. FTIR analiza mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom.....	112
9.2.3. FTIR analiza mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom	115
9.2.4. FTIR analiza mikročestica hitozana umreženih genipinom	117

9.3. Veličina mikroinkapsuliranih sistema	118
9.3.1. Veličina mikročestica alginat-hitozan.....	119
9.3.2. Veličina mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom.....	120
9.3.3. Veličina mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom	124
9.3.4. Veličina mikročestica hitozana umreženih genipinom	128
9.4. SEM analiza	128
9.4.1. SEM analiza mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom.....	129
9.4.2. SEM analiza mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom	131
9.4.3. SEM analiza mikročestica hitozana umreženih genipinom.....	134
9.5. Naelektrisanje na površini mikročestica.....	135
9.5.1. Naelektrisanje na površini mikročestica hitozana umreženih natrijum- tripolifosfatom	136
9.5.2. Naelektrisanje na površini mikročestica hitozana umreženih genipinom	137
9.6. Poroznost mikročestica hitozana.....	138
9.6.1. Poroznost mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom.....	138
9.6.2. Poroznost mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom.	139
9.6.3. Poroznost mikročestica hitozana umreženih genipinom.....	141
11.7. XRD analiza	142
11.7.1. XRD analiza mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom.....	142
9.8. Mehaničke karakteristike čestica alginat-hitozan	143
10. Efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola	146
10.1. Efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola u mikročesticama alginat-hitozan.....	146
10.2. Efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola u mikročesticama hitozana umreženih glutaraldehidom.....	147
10.3. Efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola u mikročesticama hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom	152
11. Otpuštanje polifenola iz hidrogelova na bazi hitozana.....	154
11.1. Otpuštanje polifenola iz mikročestica alginat-hitozan.....	154
11.2. Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom	156
11.3. Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih tri-polifosfatom	162
11.4. Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih genipinom	167
11.5. Modelovanje otpuštanja polifenola iz mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom.....	169

Hidrogelovi na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola

12. Antioksidativna aktivnost inkapsuliranih polifenola.....	173
13. Poređenje hidrogelova na bazi hitozana za inkapsulaciju polifenola	175
IV ZAKLJUČAK.....	180
V LITERATURA.....	189
Spisak slika	220
Spisak tabela	224
PRILOG	226
Biografija	230

UVOD

Sve veća svest potrošača o zdravom načinu života, koja podrazumeva konzumaciju hrane sa minimalnim udelom sintetskih sastojaka, kao i korišćenje kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda dobijenih od prirodnih sirovina i sa prirodnim aditivima, zahteva unapređenje postojećih i razvoj inovativnih proizvoda iz oblasti funkcionalne hrane i farmacije. Pri tome, posebna pažnja se poklanja održivosti samog procesa formulacije novih proizvoda/aditiva i uticaj koji se tom prilikom ispoljava na životnu okolinu. Upravo iz tog razloga aditivi prehrambenim/farmaceutskim proizvodima dobijeni iz obnovljivih prirodnih izvora, ili čak iz nus-produkata i otpada pojedinih industrijskih procesa, imaju sve veći značaj. Među njima, prirodni antioksidansi koji se dodaju kako zbog povećanja nutritivne i biološke vrednosti prehrambenih proizvoda, tako i u cilju zaštite osetljivih komponenti samog proizvoda, tj. kao alternativa sintetskim konzervansima, imaju sve veći značaj.

Polifenoli kao sekundarni metaboliti biljaka predstavljaju grupu jedinjenja sa izrazitim antioksidativnim dejstvom koje se ispoljava kroz neutralizaciju štetnog dejstva slobodnih radikala, na taj način obezbeđujući podršku imunom sistemu čoveka (Lobo i sar. 2010). U grupi od oko 8000 polifenolnih jedinjenja koja se strukturno veoma razlikuju, najveći udeo imaju fenolne kiseline, flavanoli, flavonoidi i dihidrokalkoni (Petti i Scully, 2009). Brojna naučna istraživanja pokazala su da polifenoli poseduju čitav niz farmakoloških dejstava, uključujući anti-oksidativno, anti-inflamatorno, anti-mutageno, anti-kancerogeno, anti-angiogeno, apoptičko, hipoholesterolemično, anti-bakterijsko i anti-viralno, zatim utiču na smanjenje gojaznosti, smanjuju rizik od nastanka dijabetesa i arteroskleroze i usporavaju starenje (Cushnie i Lamb, 2005; Ferrazzano i sar. 2009; Petti i Scully, 2009; Daglia, 2012; Anhe i sar. 2013). Od posebnog su značaja ekstrakti biljnog porekla, s obzirom da predstavljaju smešu različitih polifenolnih jedinjenja koja ispoljavaju sinergistički efekat, često jači

od efekta pojedinačnih komponenti (Siddiqui i sar. 2008; Dai i sar. 2008). Biljke iz roda *Thymus* (Lamiaceae) koje se tradicionalno koriste i kao začini i kao lekovita sredstva u različitim kulturama, izuzetno su bogate polifenolnim jedinjenjima i ispoljavaju niz bioloških efekata: anti-mikrobni (Hazzit i sar. 2009), anti-fugalni (Giordani i sar. 2008), anti-bakterijski (Essawi i Srour, 2000), kao i anti-oksidativni (Mkaddem i sar. 2011; Safaei-Ghomi i sar. 2009). Tako je za vodeni ekstrakt majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.) dokazano da ima izražen anti-oksidativni efekat, tj. izraženu sposobnost neutralisanja slobodnih radikala (Belščak-Cvitanović i sar. 2011; Stojanović i sar. 2012), kao i jako anti-hipertenzivno dejstvo koje je potvrđeno kod pacova sa spontanom hipertenzijom (Mihailovic-Stanojevic i sar. 2013).

Međutim, većina hidrofилnih polifenolnih jedinjenja osetljiva je na svetlost, prisustvo kiseonika i visoku temperaturu, kao i na varijacije pH u gastrointestinalnom traktu, te stoga često dolazi do gubitka njihove anti-oksidativne aktivnosti (Wollgast i Anklam, 2000; Record i Lane, 2001; Gramza i sar. 2005; Pedro i sar. 2016). Pored toga, zbog male biorasploživosti polifenola neophodna je njihova primena u velikim koncentracijama (Serra i sar. 2010; Czank i sar. 2013). Sa druge strane veliki sadržaj polifenolnih jedinjenja doprinosi gorkom i adstringentnom ukusu krajnjeg proizvoda, što utiče na njegovu prihvatljivost od strane potrošača (Bennick, 2002; Lesschaeve i Noble, 2005).

U cilju prevazilaženja navedenih poteškoća, u poslednje vreme se sve veća pažnja posvećuje različitim metodama inkapsulacije biljnih ekstrakata (Hu i sar. 2008; Deladino i sar. 2008; Chan i sar. 2009; Belščak-Cvitanović i sar. 2011; Stojanović i sar. 2012; Trifković i sar. 2014; Lupo i sar. 2015), uz korišćenje različitih vrsta polimernih nosača (Fang i Bhandari, 2010). Pored toga, inkapsulacijom se postiže konverzija aktivnih komponenti iz tečnog u čvrsto stanje, čime se omogućava lakše rukovanje, tj. prerada i skladištenje aktivnih komponenti, kao i njihovo lakše doziranje. Na kraju, inkapsulacija omogućava

kontrolisanje oslobađanja aktivne komponente na ciljanom mestu dejstva u gastro-intestinalnom traktu.

Među različitim materijalima koji se mogu koristiti kao nosači aktivnih komponenti, hitozan se pokazao kao pogodan za kontrolisano otpuštanje bioaktivnih jedinjenja i lekova u gastro-intestinalnom traktu, i to u različitim formulacijama za primenu u prehrambenoj, poljoprivrednoj i farmaceutskoj industriji (Shukla i sar. 2013). Hitozan poseduje jedinstvene karakteristike, kao što su biodegradabilnost i biokompatibilnost, mukoadhezivnost, netoksičnost prema ljudskim i životinjskim ćelijama, kao i mogućnost formiranja širokog spektra različitih ekonomski isplativih sistema za dostavu aktivnih supstanci sa karakterističnim biološkim svojstvima (Knežević-Jugović i sar. 2010).

U ovoj disertaciji prikazan je „*bottom-up*“ pristup u formulisanju sistema za kontrolisanu dostavu bioaktivnih komponenti, polazeći od frakcije vodorastvornih polifenola majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.) i njihove inkapsulacije u hidrogelove na bazi hitozana, što se postiže različitim tehnikama inkapsulacije (elektrostatička ekstruzija, inverzna emulziona polimerizacija i sprej-sušenje) i korišćenjem različitih umreživača (joni kalcijuma, glutaraldehyd, natrijum-tripolifosfat i genipin). Proces inkapsulacije izvođen je na dva različita načina: (i) postupkom „*in-situ*“ inkapsulacije, gde se formiranje mreže hidrogela i inkapsulacija polifenola simultano odvijaju, i (ii) tzv. „*post-loading*“ postupkom, gde se najpre vrši priprema hidrogelova (tzv. „*ready-made support*“), a potom inkapsulacija polifenola. Prikazane karakteristike dobijenih hidrogelova na bazi hitozana ilustruju njihov potencijal kao nosača za polifenole majčine dušice i njihovo produženo/kontrolisano otpuštanje na ciljanom mestu.

CILJ RADA

Cilj predložene disertacije jeste formulacija novih funkcionalnih aditiva prehrambenim i farmaceutskim proizvodima na bazi polifenola majčine dušice inkapsuliranih u hitozanske hidrogelove. Za inkapsulaciju polifenola primenjivaće se različite metode. Mikročestice alginat-hitozan biće pripremane metodom elektrostatičke ekstruzije, dok će se mikročestice hitozana pripremati metodama emulziona polimerizacije i sprej-sušenja. Stabilizacija hidrogelova se raditi umrežavanjem hitozana, najpre upotrebom glutaraldehida kao umreživača. U cilju što adekvatnijeg formulisanja hidrogelova za primenu u prehrambenoj industriji, koristiće se i savremeni („*food-grade*“) umreživači natrijum-tripolifosfat i genipin, čija upotreba je dozvoljena u prehrambenoj industriji. Proces inkapsulacije polifenola će se vršiti ili u toku samog postupka sinteze hidrogelova (tzv. „*in situ*“ inkapsulacija) ili metodom bubrenja već pripremljenih hidrogelova (tzv. „*post-loading*“ inkapsulacija). Dobijeni hidrogelovi sa inkapsuliranim polifenolima prvenstveno će biti karakterisani sa aspekta bubrenja, kako u vodi, tako i u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta (pH i temperature). Dalja karakterizacija dobijenih hidrogelova biće izvršena određivanjem: veličine dobijenih mikročestica i raspodele veličina, njihovog oblika i površinske morfologije, poroznosti, naelektrisanja na površini, prisustva veza koje se ostvaruju između različitih komponenata nosača (različitih polimera i/ili polimera i umrežavajućih reagenasa) i između nosača i polifenola, kao i procenom uticaja procesa umrežavanja i inkapsulacije na kristaličnost hitozana. Zatim, biće određena efikasnost inkapsulacije i sačuvana antioksidativna aktivnost inkapsuliranih polifenola. Poseban deo rada biće posvećen detaljnoj analizi apsorpcije vode, odnosno otpuštanja inkapsuliranih polifenola, kako bi se odredili mehanizmi apsorpcije/difuzije, i uporedili sa teorijskim i eksperimentalnim modelima korišćenim u literaturi.

Inkapsulacija polifenola u navedene sisteme ima za cilj da zaštiti polifenole od neželjenih dejstava okoline, kao i da omogući očuvanje njihove

antioksidativne aktivnosti. Takođe, cilj je i da se inkapsulacijom postigne produženo/kontrolisano otpuštanje polifenola. Na ovaj način će se razviti sistemi sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice koji će imati veliki potencijal za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, umesto veštačkih konzervanasa i aditiva. Karakteristike koje takvi sistemi treba da poseduju su sledeće: da u njihov sastav ulaze prirodne, netoksične i biokompatibilne komponente; da ispoljavaju visoku efikasnost inkapsulacije, kao i visok stepen očuvanja antioksidativne aktivnosti polifenola; da su stabilni u realnim uslovima koje zahteva prehrambena industrija ali i nakon konzumacije; da pokazuju produženo/kontrolisano otpuštanje; da se razvijeni sistemi potencijalno mogu koristiti i za inkapsulaciju drugih bioaktivnih supstanci. Postizanje navedenih svojstava sistema upravo i jeste cilj predložene disertacije.



I TEORIJSKI DEO



1. Antioksidansi

Moderna istraživanja u oblasti prehrambene tehnologije, medicine i funkcionalne hrane sve više ukazuju na značaj antioksidanasa u svakodnevnoj ishrani. U cilju borbe protiv oksidativnog stresa i prevencije različitih bolesti, preporučuje se povećan unos antioksidativnih jedinjenja. Šta su to antioksidansi? Moćne prirodne supstance koje usporavaju (u nekim slučajevima čak i sprečavaju) oksidaciju drugih molekula u ljudskom organizmu, na taj način sprečavajući nastanak mnogih hroničnih bolesti. Jedna od zvaničnih definicija antioksidanasa jeste sledeća (Percival, 1998; Young i Woodside, 2001; Atoui i sar. 2005):

„Antioksidansom se može smatrati bilo koja supstanca koja čak i kada je prisutna u znatno nižoj koncentraciji u poređenju sa oksidirajućim supstratom značajno usporava ili sprečava oksidaciju tog supstrata.“

Ljudsko telo poseduje prirodni mehanizam proizvodnje antioksidansa, čiji je zadatak neutralizacija produkovanih slobodnih radikala, uspostavljajući na taj način balans u organizmu. Međutim, broj slobodnih radikala prisutnih u organizmu čoveka najčešće nadmašuje broj proizvedenih antioksidanasa. Kako bi se održala ravnoteža, neophodno je konstantno unositi antioksidanse iz spoljašnjih izvora, tj. kroz hranu, a neki od najbogatijih prirodnih izvora antioksidanasa su sveže voće i povrće, čajevi, čokolada (kakao) i vina (uglavnom crno) (Fang i Bhandari, 2010).

1.1. Slobodni radikali i njihovo dejstvo na organizam

Slobodni radikali predstavljaju hemijske vrste (jone, atome ili molecule) koji u svojoj strukturi sadrže nesparene elektrone (jedan ili više), što ih čini nestabilnim i vrlo reaktivnim supstancama (Percival, 1998; Belščak-Cvitanović, 2013). U ćeliji, slobodni radikali reaguju sa ćelijskim makromolekulima, tj.

lipidima i proteinima ćelijske membrane, kao i molekulima dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). Usled produžene izloženosti organizma dejstvu slobodnih radikala, može doći do oštećenja lipida i proteina ćelijske membrane ili mutacije DNK, što za posledicu ima razvoj velikog broja različitih oboljenja (Valko, 2004). Slobodni radikali nastaju u toku normalnih fizioloških procesa u organizmu, ali u stanjima povećanog stresa, imunoloških reakcija organizma i izloženosti različitim vrstama zračenja njihova proizvodnja je povećana.

Najzastupljeniji slobodni radikali su reaktivna jedinjenja kiseonika (Reactive Oxygen Species - ROS), u koje spadaju superoksid anjon ($O_2^{\bullet-}$), peroksil (ROO^{\bullet}), alkoksil (RO^{\bullet}), hidroksil (HO^{\bullet}) radikal, kao i radikal azot-oksida (NO^{\bullet}); pored ovih, u organizmu su prisutni i ROS jedinjenja koja nisu radikali, kao što su kiseonik (O_2), vodonik-peroksid (H_2O_2) i hipohlorasta kiselina (HOCl). Osim što imaju biološku funkciju u organizmu (posreduju u energetskim procesima, fagocitozi, regulaciji ćelijskog rasta i međućelijskoj signalizaciji) (Halliwell, 1997), ROS i ostali radikali učestvuju i u procesima razvoja mnogih hroničnih bolesti (Diplock, 1994; Sies, 1997), uključujući i dve najrasprostranjenije moderne bolesti razvijenih zemalja – aterosklerozu i rak.

1.2. Dejstvo antioksidanasa na slobodne radikale

Lipidna peroksidacija, kao jedan od procesa koji se odvija u organizmu pod dejstvom slobodnih radikala, predstavlja paradoks anaerobnog života, utičući istovremeno na zdravlje čoveka i kvalitet modernog života (Davies, 1995; Dorman i sar. 2003). S obzirom da su biološki sistemi bogati lipidima podložni auto-oksidaciji/oksidaciji, neophodno je obezbediti njihovu adekvatnu zaštitu, u smislu neutralizacije slobodnih radikala, a u cilju prevencije različitih bolesti (Dorman i sar. 2003). Antioksidansi u procesu lipidne peroksidacije reaguju kroz nekoliko različitih mehanizama, i to tako što: (i) smanjuju lokalnu koncentraciju kiseonika; (ii) sprečavaju inicijaciju radikalskog lanca

neutralisanjem početnih radikala; (iii) vezuju katalizatore, kao što su joni metala, u cilju sprečavanja iniciranja nastanka slobodnih radikala; (iv) razlažu perokside, na taj način sprečavajući ih da reaguju kao slobodni radikali; i (v) razaraju radikalski lanac, kako bi se sprečila reakcija slobodnih radikala sa vodonikom (Dorman i sar. 2003). Među prirodnim jedinjenjima, polifenoli izolovani iz biljaka se izdvajaju kao jedinjenja sa izrazitim antioksidativnim dejstvom.

2. Polifenoli

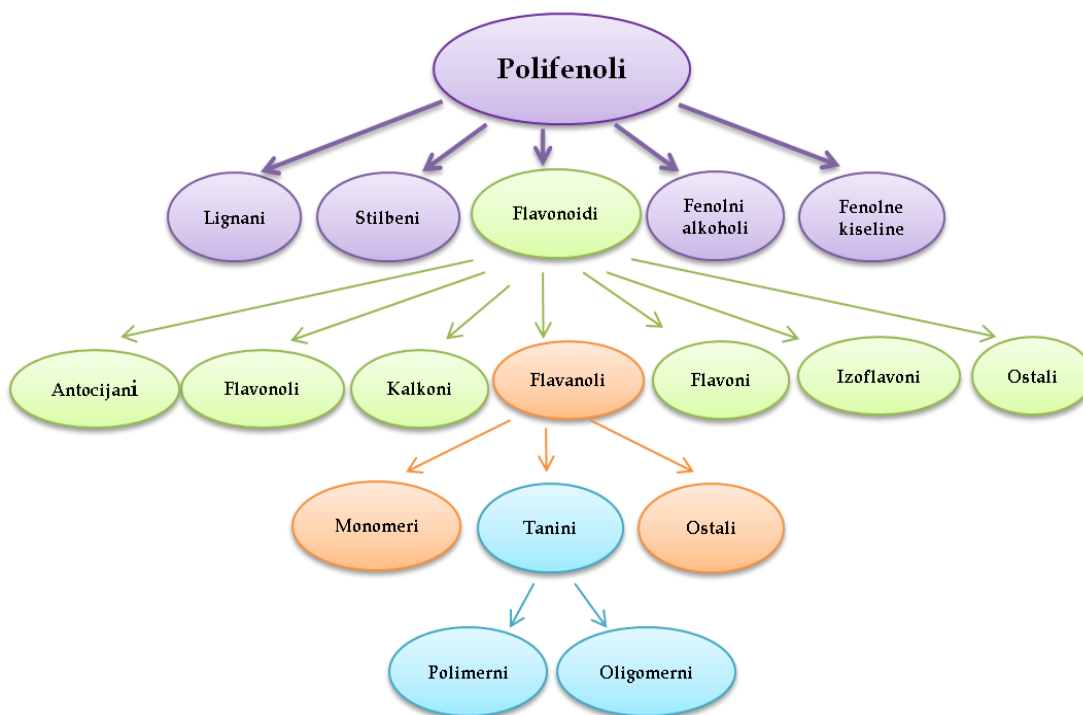
Polifenoli predstavljaju jednu od najbrojnijih i najrasprostranjenijih grupa biljnih metabolita, i kao takvi su sastavni deo ishrane ljudi i životinja. Njihova osnovna funkcija u biljkama jeste zaštita od ultraljubičastog zračenja i dejstva patogenih organizama (Beckman, 2000). S obzirom da se polifenoli javljaju u širokom opsegu molekulskih masa, od jednostavnih polifenolnih molekula do visoko polimerizovanih jedinjenja sa molekulskim masama većim od 30 kDa, njihovo prisustvo u biljkama je veoma promenljivo. Međutim, uprkos velikoj zastupljenosti polifenola u biljnom materijalu, njihovi efekti na ljudsko zdravlje su postali fokus nutricionističkih istraživanja relativno skoro. Do sredine devedesetih godina XX veka, najznačajnijim jedinjenjima sa antioksidativnim dejstvom smatrani su vitamini, karotenoidi i minerali. Istraživanja antioksidativnog potencijala flavonoida i ostalih polifenolnih jedinjenja, kao i njihova uloga u prevenciji različitih oboljenja su suštinski započeta tek nakon 1995 godine (Scalbert i sar. 2005). Glavni razlog jeste upravo velika raznovrsnost polifenolnih jedinjenja, kao i njihova kompleksna hemijska struktura.

2.1. Klasifikacija polifenolnih jedinjenja

Empirijska klasifikacija biljnih polifenola kao molekula koji se mogu koristiti u svrhe štavljena kože (eng. „tanning“) dovela je do toga da se u ranim literaturnim podacima polifenoli nazivaju „taninima iz povrća“ (eng. „vegetable tannins“) (Ferrazzano i sar. 2011). Haslam i sar. (1992) predložili su prvu sveobuhvatnu definiciju pojma „polifenoli“:

„Polifenolnim jedinjenjima smatraju se isključivo vodo-rastvorna jedinjenja molekulske mase između 500 i 3000 - 4000 Da, koji poseduju između 12 i 16 fenolnih hidrosilnih grupa, kao i između 5 i 7 aromatičnih prstenova na svakih 1000 Da.“

Početa definicija polifenola je značajno proširena u toku godina, na taj način obuhvatajući i mnoge jednostavnije fenolne strukture, što je prikazano na *Slici 1.1*. Polifenoli obuhvataju nekoliko klasa strukturno veoma različitih entiteta, koji su u suštini svi nastali kroz ili šikimat/fenilpropanoid ili „poliketide“ acetatno/malonatni sekundarni metabolički proces (Cutillo i sar. 2006), ili kroz oba pomenuta procesa.



Slika 1.1. Klasifikacija polifenola.

Uopšteno, polifenoli se mogu klasifikovati u nekoliko kategorija prvenstveno na osnovu broja fenolnih prstenova u njihovoj strukturi, kao i prisustva strukturnih elemenata koji povezuju prstenove jedan za drugi (Pietta i sar. 2003; Bahadoran i sar. 2013). Fenolne kiseline predstavljaju skoro trećinu polifenolnih jedinjenja koja su zastupljena u ljudskoj ishrani, uključujući dve osnovne klase fenolnih kiselina: derivate hidroksibenzojeve kiseline (protokatehinska kiselina, galna kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina) i derivate hidrocimetne kiseline (kafeinska kiselina, hlorogenična kiselina,

kumarinska kiselina, ferulna kiselina, sinapinska kiselina); hrana poput bobičastog voća, kivija, trešanja, jabuke, kruške, cikorije i kafe sadrži visok procenat navedenih fenolnih kiselina (Manach i sar. 2004). Lignani, difenolna jedinjenja sa fitoestrogenskim dejstvom, su u većim koncentracijama zastupljeni u lanenom semenu i drugom zrnelju i žitaricama. Stilbeni su kao grupa jedinjenja zastupljeni u niskim koncentracijama u ljudskoj ishrani; resveratrol, najpoznatiji predstavnik ove grupe polifenola se nalazi u velikim koncentracijama u grožđu i crvenom vinu (Manach i sar. 2004; Adlercrentz, 2007; Pandey i sar. 2009).

Flavonoidi predstavljaju najzastupljenije polifenole u ishrani ljudi, sa preko 4000 identifikovanih jedinjenja. Postoji nekoliko podklasa flavonoida, i to: antocijani, flavonoli, kalkoni, flavanoli, flavoni i izoflavoni (Bahadoran i sar. 2013). Antocijani (cijanidin, pelargonidin, delfinidin, malvidin) su najzastupljeniji u bobičastom voću, crvenom vinu, crvenom kupusu, trešnjama, crnom grožđu i jagodama. Flavonoli, uključujući kvercetin, kanferol i mirecetin, uglavnom se nalaze u crnom luku, lisnatom kelju, praziluku, brokoliju i borovnicama. Izoflavoni, kao drugi po značaju iz grupe flavonoida, uključuju daidzein, genistein i glicetin, a namirnice koje se najbogatije ovim jedinjenima koja su po svojoj hemijskoj strukturi slična estrogenu su soja i proizvodi od soje.

2.2. Dejstvo polifenola na ljudsko zdravlje

Iako su do skoro polifenoli tradicionalno smatrani anti-nutrijentima, zbog antagonističkog dejstva jedne grupe polifenola (tanina) na svarljivost proteina (Bravo, 1998), moderna istraživanja su pokazala niz njihovih pozitivnih efekata na ljudsko zdravlje: anti-mikrobno (Hazzit i sar. 2009), anti-fungalno (Giordani i sar. 2008), anti-bakterijsko (Safaei-Ghomi i sar. 2009; Mkaddem i sar. 2011), pri čemu se posebno naglašava njihovo antioksidativno dejstvo (Safaei-Ghomi i sar. 2009; Mkaddem i sar. 2011; Zhang i Tsao, 2016).

2.1. Antioksidativno dejstvo polifenola

Potencijal prirodnih polifenolnih jedinjenja da reaguju kao antioksidansi ispoljava se kroz sprečavanje oksidacije lipoproteina niske gustine (LDL) i agregacije trombocita, kao i kroz redukciju oštećenja crvenih krvnih zrnaca prouzrokovanih dejstvom slobodnih radikala (Cheynier, 2005; Gharras, 2009). Biljnim polifenolima se pripisuje multifunkcionalno antioksidativno dejstvo (Shahidi i Wanasundara, 1992), pri čemu je poznato da mogu reagovati na nekoliko nivoa u sprečavanju procesa oksidacije:

- (1) Biljni polifenoli poseduju sposobnost neutralisanja ROS, što vodi smanjenju lokalne koncentracije kiseonika (Beutner i sar. 2001; Luiz i sar. 2002).
- (2) Sprečavanjem procesa heliranja metala, polifenoli onemogućavaju nastanak slobodnih radikala (Rice-Evans i sar. 1997; Brown i sar. 1998; Chen i Ahn, 1998; Ruf, 1999; Tedesco i sar. 2000).
- (3) Biljni polifenoli ispoljavaju sposobnost „gašenja” različitih vrsta radikala koji iniciraju oksidaciju, kako u vodenoj (Yen i Duh 1994; Rice-Evans i sar. 1996), tako i u lipidnoj fazi (Sawa i sar. 1999; Dugas i sar. 2000).
- (4) Polifenolima se pripisuje mogućnost regenerisanja endogenog α -tokoferola u fosfolipidnom dvosloju lipoproteina do njegovog aktivnog antioksidativnog oblika (De Whalley i sar. 1990; Rice-Evans i Miller, 1996; Viana i sar. 1996).
- (5) Takođe, poznato je da biljni polifenoli mogu da reaguju kao inhibitori različitih tipova oksidujućih enzima (Laughton i sar. 1991; Cos i sar. 1998)

2.2. Ostala dejstva polifenola

Pored toga što ispoljavaju antioksidativno dejstvo, polifenoli poseduju i dodatne biološke aktivnosti sa pozitivnim efektom na ljudsko zdravlje, kao što su anti-alergijsko i anti-inflamatorno dejstvo (Bahadoran i sar. 2013), ponašaju se kao anti-mutageni i anti-kancerogeni agensi (Malaveille i sar. 1998; Arimoto-Kobayashi i sar. 1999), kao i anti-mikrobni i anti-viralni agensi (Nychas i sar. 2003). Pored toga, biljni polifenoli učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa i

procesa apoptoze, kao i indukciji antioksidativnih enzima (Bahadoran i sar. 2013). Pokazano je i da polifenoli mogu da utiču na neke od važnih ćelijskih prekursora u signalizacionim putevima, kao što su jedarni faktor kappa-B (NF- κ B), protein-1 aktivator DNK vezivanja (AP-1), ekstracelularni enzim protein-kinaze koji ima funkciju u regulaciji ćelijskih signala (ERK), zatim fosfoinositid 3 (PI3) kinaza/protein kinaza B (Akt), kao i mitogeni aktivirani protein kinaza (MAPK) i jedarni faktor eritroid 2 koji se odnosi na faktor 2 (Nrf2) (Han i Loa, 2007). Takođe, polifenolima se pripisuje i značajna uloga u sprečavanju nastanka zubnog karijesa, dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti, kao i u usporavanju ćelijskog starenja.

2.2.1. Anti-bakterijsko i anti-viralno dejstvo polifenola

Brojne studije pokazale su da biljni polifenoli ispoljavaju anti-mikrobnu aktivnost. Poseban značaj se pripisuje biljnim ekstraktima, tj. smeši polifenolnih jedinjenja, ali i epigalokatehin galatu (EGCG): (i) inhibicija rasta *Helicobacter pylori* (Shin i sar. 2005); (ii) povećanje *in vitro* otpornosti alveolarnih makrofaga na infekciju *Legionella pneumophila*, kroz imuno-modulatorni efekat na formiranje citokina (Yamamoto i sar. 2004); (iii) bakteriocidni efekat na stafilokoke i *Yersinia enterocolitica*, i to pri koncentracijama manjim od „šolje čaja“ (Yam i sar. 1997); (iv) bakteriostatski efekat na *Mycoplasma pneumoniae* i *Mycoplasma orale* (Chosa i sar. 1992); (v) profilaktsko dejstvo na infekciju sojem *Bordetella pertussis* (Horiuchi i sar. 1992); (vi) inhibitorni efekat na 21 soj fitopatogenih bakterija (Fukai i sar. 1991), kao i na *Staphylococcus aureus* i *Vibrio cholera* (Toda i sar. 1990).

Biljni polifenoli ispoljavaju i izraženo anti-viralno dejstvo, pri čemu je dokazano i dejstvo protiv virusa side (HIV) (Nakane i Ono 1989; Gupta i sar. 2002). Naime, epikatehin i ECGC iz čaja inhibiraju neke od RNA-transkriptaza, koje igraju ključnu ulogu u replikaciji HIV virusa; pri tome, bitno je naglasiti da kada se koriste čiste supstance efekat na RNA-transkriptazu nije primećen.

2.2.2. Anti-mutageno i anti-kancerogeno dejstvo polifenola

Intracelularna bio-antimutageneza biljnih polifenola se ogleda u modulaciji metabolizma promutagenih supstanci, bilo njihovim blokiranjem ili ublažavanjem njihovog dejstva, kao i sprečavanjem modulacije DNK (Kuroda i Hara, 1999; Gramza i sar. 2005). Pojedina polifenolna jedinjenja mogu direktno reagovati sa promutagenima ili inhibirati njihovo dejstvo u toku procesa bioaktivacije citohroma P-450 (Gramza i sar. 2005); primer za to je kompetitivna inhibicija katehina i NADPH-citohrom c reduktaze (Steele i sar. 1985). Takođe biljni polifenoli su se pokazali kao efikasni u sprečavanju spontanih mutacija koje nastaju kao rezultat izmenjene DNK-polimeraze III. Dodatno, pojedini katehini ispoljavaju sposobnost redukovanja mutacija nastalih dejstvom ultraljubičastog (UV) zračenja (Shimoi i sar. 1986).

Anti-kancerogeno dejstvo polifenola se pripisuje flavonoidima iz grupe katehina, posebno EGCG. (Ahmad i sar. 1997; Katiyar i Mukhtar, 1997; Mukhtar i Ahmad, 1999; Gramza i sar. 2005). Poznato je da 1/3 incidence kancera je prouzrokovana neadekvatnom ishranom, pa stoga adekvatne promene ishrane mogu biti važan korak u suzbijanju i prevenciji kancera (Gramza i sar. 2005). Anti-kancerogeno dejstvo polifenola se ispoljava kroz različite mehanizme, i to: inhibicijom mutageneze i kancerogeneze, kako ekstracelularno (desmutageneza), tako i intracelularno (bio-antimutageneza), zatim inhibicijom iniciranim i/ili meoplastičnih ćelija; inhibicijom invazija i metastaza, kao i indukcijom apoptoze (Gramza i sar. 2005). Takođe, poznato je da EGCG ispoljava jako inhibitorno dejstvo na angiogenu aktivnost urokinaze (Jankun i sar. 1997, Swiercz i sar. 1999); urokinaza olakšava angiogenezu – formiranje krvnih sudova oko tumora i širenje ćelija kancera po celom telu. Dodatno, EGCG u velikoj meri sprečava rast ćelija tumora i replikaciju njihove DNK, što uzrokuje njihovu apoptozu (Smith i Dou, 2001).

2.2.3. Anti-dijabetsko dejstvo polifenola

Narušen metabolizam ugljenih hidrata i razvoj insulinske rezistencije su osnovni metabolički poremećaji u insulinski nezavisnom *Diabetes mellitus*-u (šećerna bolest), što vodi do nastanka hiper-glikemije. Među poznatim prirodnim bioaktivnim supstancama i fitohemikalijama koji se mogu koristiti za prevenciju hiper-glikemije, sve više pažnje se poklanja biljnim polifenolima zbog njihovog anti-hiperglikemijskog efekta, kao i činjenice da ne ispoljavaju prateće efekte (Bahadoran i sar. 2013). Potencijal biljnih polifenola u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata i homeostazi glukoze ispitan je kako u *in vitro* studijama, tako i u životinjskim modelima i kroz klinička ispitivanja (Hanhineva i sar. 2010).

Hipoglikemijski efekat biljnih polifenola uglavnom se pripisuje (i) smanjenju intestinalne apsorpcije ugljenih hidrata; (ii) modulaciji enzima uključenih u metabolizam glukoze (α -glukozidaze i α -amilaze); (iii) unapređenju funkcije β -ćelija i efekta insulina; (iv) stimulisanju lučenja insulina; kao i (v) njihovim antioksidativnim i anti-inflamatornim dejstvima (Iwai i sar. 2006; Cabrera i sar. 2006; Iwai, 2008).

2.2.4. Kardioprotektivno dejstvo polifenola

Uloga biljnih polifenola u sprečavanju nastanka kardiovaskularnih oboljenja ogleda se kroz regulaciju metabolizma lipida, zatim regulaciju krvnog pritiska i koagulacije krvi, što sve ukupno vodi pospešivanju vaskularne funkcije (Bahadoran i sar. 2013). Moderna istraživanja sve više dokazuju da konzumiranje hrane bogate polifenolima, kao i suplemenata na bazi polifenola, može imati značajnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, posebno onih nastalih kao posledica dijabetesa. Mehanizmi po kojima se odvija protektivna funkcija polifenola uključuju prvenstveno (i) regulaciju metabolizma lipida, i to smanjivanjem digestije i apsorpcije lipida, kao i inhibicijom lipaze pankreasa i smanjivanjem apsorpcije triglicerida (Sugiyama i

sar. 2007); zatim (ii) ublažavanje negativnih efekata oksidativnog stresa i neutralisanje slobodnih radikala; (iii) poboljšanje endotelijalne funkcije i vaskularnog tona, (iv) povećanje proizvodnje faktora vazodilatacije, kao što je azot(II)-oksid, ali i (v) inhibiciju sinteze vazokonstriktora (npr. endotelin-1 u endotelijalnim ćelijama) (Stoclet i sar. 2004; Schini-Kerth i sar. 2010; Lecour i Lamont, 2011).

2.2.5. Anti-kariogeno dejstvo polifenola

Brojne novije studije pokazale su da biljni polifenoli imaju značajnu ulogu u sprečavanju nastanka karijesa, i uopšte u održavanju higijene i zdravlja zuba i usne duplje, i to kroz nekoliko mehanizama, najpre: (1) direktnim anti-mikrobnim dejstvom na *Streptococcus mutans*; (2) kroz interakciju sa membranskim proteinima mikroorganizama, na taj način sprečavajući adheziju bakterijskih ćelija na površinu zuba; i (3) kroz inhibiciju enzima glukozil-transferaze i α -amilaze (Ferrazzano i sar. 2011).

2.3. Bioraspoloživost biljnih polifenola

Prosečan dnevni unos polifenola u ljudskoj ishrani je 1 gram (Chun i sar. 2007; Ovaskainen i sar. 2008). Međutim, bioraspoloživost unetih polifenola u velikoj meri zavisi od procesa pripreme hrane, gastrointestinalne digestije, zatim njihove apsorpcije i metabolizma (Scalbert i Williamson, 2000). U poslednjih nekoliko godina postignut je veliki napredak u razumevanju apsorpcije u metabolizma polifenola (Scalbert i Williamson, 2000; Rowland i sar. 2003; Day i Williamson, 2001; Manach i sar. 2005) i očigledno je da se većina polifenolnih jedinjenja apsorbuje u koncentraciji dovoljnoj za ispoljavanje bioloških efekata. Na primer, koncentracije kvercetina nakon jela koje sadrži crni luk, katehina nakon konzumiranja crvenog vina, ili izoflavona nakon konzumiranja soje dostižu mikromolarne vrednosti u krvi (Hollman i sar. 1997;

Donovan i sar. 1999; Scalbert i Williamson, 2000; Setchell i sar. 2001; Rowland i sar. 2003). Ova istraživanja dokazuju da polifenoli uspešno prolaze intestinalnu barijeru i dostižu koncentraciju u krvotoku koja je neophodna za postizanje bioloških efekata u *in vitro* uslovima, pri čemu se maksimum koncentracije polifenola detektuje nakon 2 do 3 sata od konzumiranja (Manach i sar. 2004).

Međutim, uprkos velikom broju studija koje se bave proučavanje digestije polifenola i njihovih bioloških efekata u *in vitro* uslovima, neophodno je u razmatranje uvrstiti i bioraspoloživost polifenola i njihov metabolizam u organizmu, jer nije nužno da se pozitivni efekti koje polifenoli ispoljavaju u *in vitro* uslovima detektuju i u *in vivo* uslovima. Iako se većina polifenolnih jedinjenja dobro apsorbuje, ipak je stepen apsorpcije zavisao od konkretnog polifenolnog jedinjenja. Opseg koncentracija neophodnih za ispoljavanje bioloških efekata u *in vitro* uslovima varira od $<0,1 \mu\text{mol/l}$ do $>100 \mu\text{mol/l}$. Kada se uzme u obzir da fiziološke koncentracije ne prelaze $10 \mu\text{mol/l}$, efekti koje polifenoli ispoljavaju u *in vitro* uslovima pri koncentracijama od $>10 \mu\text{mol/l}$ u principu nisu adekvatni (Williamson i Manach, 2005).

Naime, u toku procesa apsorpcije, polifenoli podležu procesu hidrolize pod dejstvom intestinalnih enzima i/ili mikroflora debelog creva, nakon čega dolazi do njihove konjugacije u ćelijama intestinalnog trakta, a potom i u jetri, i to procesima metilacije, sumporizacije i glukuronidacije (Scalbert i sar. 2002). Stoga, polifenoli koji se pojavljuju u krvotoku su obično drugačije forme od polaznih polifenolnih jedinjenja koja su uneta hranom. Sve ovo ukazuje na činjenicu da *in vitro* eksperimenti sa polifenolnim jedinjenjima u onoj formi koja se može naći u hrani (aglikonska forma), nisu nužno relevantni i merodavni kada se govori o *in vivo* uslovima, prvenstveno zbog problema njihove bioraspoloživosti (Williamson, 2003).

2.4. Polifenoli čaja majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.)

Iako ne toliko popularna u naučnim istraživanjima poput zelenog ili crnog čaja, majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) (Slika 1.2) ispoljava širok spektar pozitivnih dejstava na ljudsko zdravlje. Pored toga, majčina dušica predstavlja jednu od najčešće korišćenih biljaka u narodnoj medicini u Srbiji; koristi se za lečenje simptoma iritacije gastrointestinalnog trakta, problema sa disajnim organima, povišene telesne temperature, kao i kod zapaljenskih procesa jetre i bubrega. Takođe, majčina dušica je bogat izvor gvožđa – samo dve kašičice majčine dušice predstavljaju 20% dnevnih potreba organizma, a odličan je izvor i mangana, koji je neophodan za funkcionisanje mozga, kao i za zdravlje kostiju i kože, a potpomaže i formiranje hrskavice. Upotreba čaja od majčine dušice se preporučuje i kod osoba koji pate od epilepsije, dok se kupka spravljena od majčine dušice koristi za smirivanje nervozne dece, kao i odraslih koji pate od depresije i razdražljivosti (Pravilović, 2016).



Slika 1.2. Biljka majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.).

Majčina dušica poseduje širok spektar polifenolnih jedinjenja (Boros i sar. 2010; Jabri-Karoui i sar. 2012). Vodeni ekstrakt majčine dušice bogat je fenolnim

kiselinama, od kojih su najzastupljenije kafeinska, ruzmarinska, kumarinska, hlorogena i ferulna kiselina, zatim katehin i epikatehin, di-hidro-kvercetin i kvercetin, apigenin-7-glukozid, kao i naringenin, hesperitin i apigenin (Boros i sar. 2010) (*Tabela 1*). S druge strane, u eteričnom ulju majčine dušice mogu se naći polifenolne komponente poput timola i karvakrola (Raal i sar. 2004), dva polifenolna jedinjenja koja majčinoj dušici daju karakterističan miris. Takođe, ekstrakti dobijeni uz upotrebu organskih rastvarača u određenoj meri sadrže i esencijalna ulja, tj. derivate monoterpena (Peltoketo i sar. 2001).

Tabela 1.1. Najzastupljenija polifenolna jedinjenja u vodenom ekstraktu majčine dušice, njihovi nazivi po IUPAC-u, formule, molekulske mase i mase prisutne u uzorku.

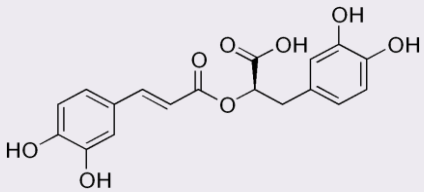
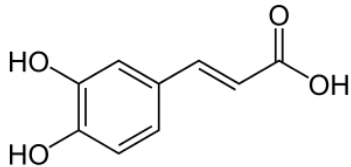
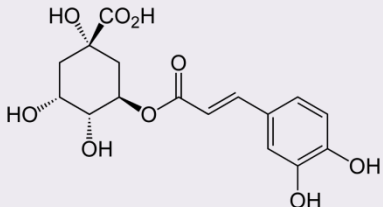
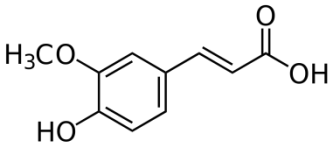
Naziv jedinjenja	Naziv po IUPAC-u	Hemijska formula	Strukturna formula	Molekulska masa (g/mol)	Masa u uzorku (µg/g) ^a
Ruzmarinkska kiselina	(2R)-2-[[[(2"E")-3-(3,4-Dihidroksifenil)-1-okso-2-propenil]]oksi]-3-(3,4-dihidroksifenil)propionska kiselina	C ₁₈ H ₁₆ O ₈		360,32	1121,31 - 1372,76
Kafeinska kiselina	3-(3,4-Dihidroksifenil)-2-propenska kiselina	C ₉ H ₈ O ₄		180,16	61,08 - 109,59
Hlorogena kiselina	(1S,3R,4R,5R)-3-[[[(2E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksi]-1,4,5-trihidroksicikloheksan-karboksilna kiselina	C ₁₆ H ₁₈ O ₉		354,31	13,03 - 26,98
Ferulna kiselina	(E)-3-(4-hidroksi-3-metoksi-fenil)-2-propenska kiselina	C ₁₀ H ₁₀ O ₄		194,18	2,10 - 3,64

Tabela 1.1. (nastavak)

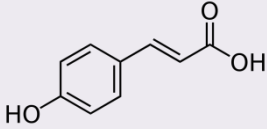
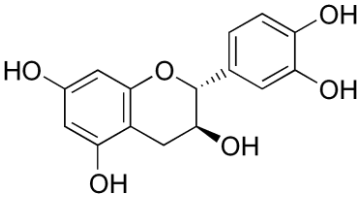
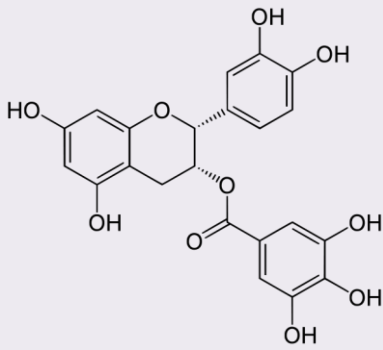
Naziv jedinjenja	Naziv po IUPAC-u	Hemijska formula	Strukturna formula	Molekulska masa (g/mol)	Masa u uzorku ($\mu\text{g/g}$) ^a
p-kumarinska kiselina	(E)-3-(4-hidroksifenil)-2-propenska kiselina	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$		164,16	0,94 - 1,60
Katehin	(2R,3S)-2-(3,4-dihidroksifenil)-3,4-dihidro-2H-hromen-3,5,7-triol	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$		290,27	0,06 - 2,18
Epikatehin	[(2R,3R)-2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3,4-dihidro-2H-hromen-3-il] 3,4,5-trihidroksibenzoat	$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$		442,37	do 0,13

Tabela 1.1. (nastavak)

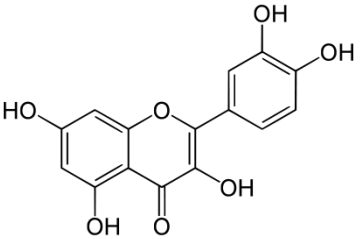
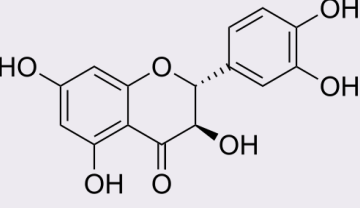
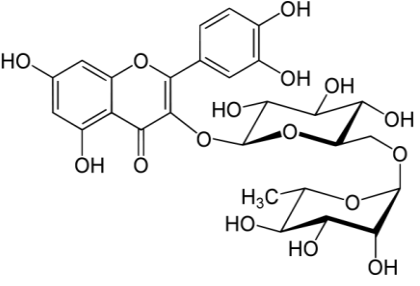
Naziv jedinjenja	Naziv po IUPAC-u	Hemijska formula	Strukturna formula	Molekulska masa (g/mol)	Masa u uzorku ($\mu\text{g/g}$) ^a
Kvercetin	2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-hromen-4-on	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$		302,236	1,29 – 6,58
Di-hidro-kvercetin	(2R,3R)-2-(3,4-Dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-2,3-dihidrohromen-4-on	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7$		304,25	2,70 – 88,57
Rutin	2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(((2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi)metil)oksan-2-il]oksi)-4H-hromen-4-on	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$		610,52	3,84-6,70

Tabela 1.1. (nastavak)

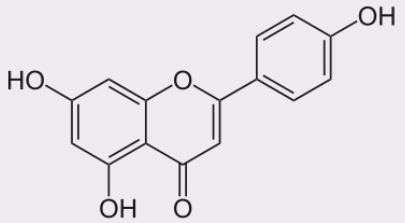
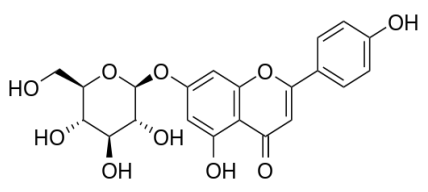
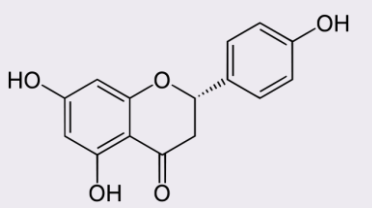
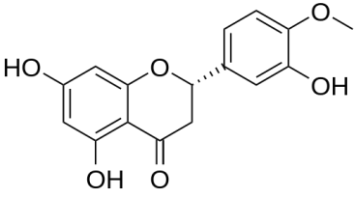
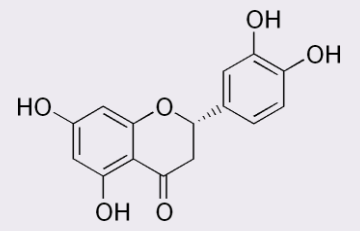
Naziv jedinjenja	Naziv po IUPAC-u	Hemijska formula	Strukturna formula	Molekulska masa (g/mol)	Masa u uzorku ($\mu\text{g/g}$) ^a
Apigenin	5,7-Dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$		270,24	30,42-124,44
Apigenin-7-glikozid	5-Hidroksi-2-(4-hidroksifenil)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksihromen-4-on	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$		432,38	do 3,90
Naringenin	5,7-Dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)hroman-4-on	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$		272,26	3,08-13,48

Tabela 1.1. (nastavak)

Naziv jedinjenja	Naziv po IUPAC-u	Hemijska formula	Strukturna formula	Molekulska masa (g/mol)	Masa u uzorku (µg/g) ^a
Hesperetin	(S)-2,3-Dihidroksi-5,7-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksihenil)-4H-1-benzopiran-4-on	C ₁₆ H ₁₄ O ₆		302,28	do 0,092
Eriodoktiol	(2S)-2-(3,4-Dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-4-hromanon	C ₁₅ H ₁₂ O ₆		288,25	0,48-31,13

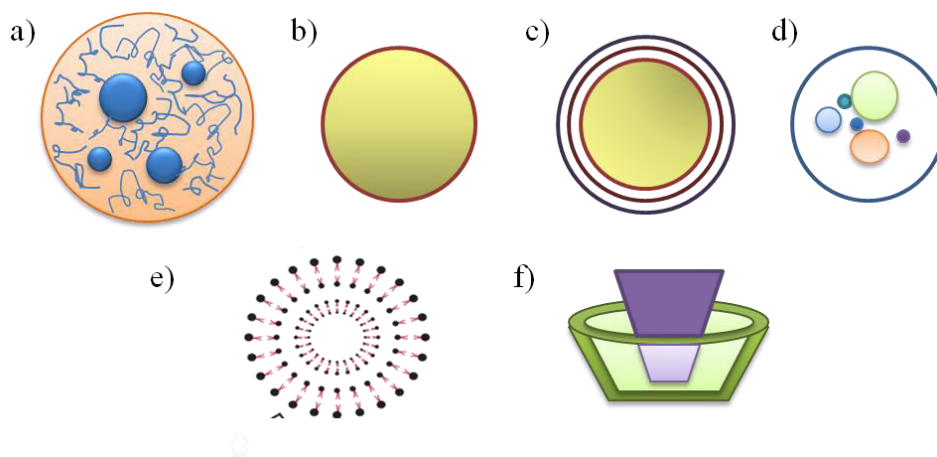
^a Prikazana masa polifenolnog jedinjenja po gramu suve droge uzorka je literaturni podatak (Boros i sar. 2010)

Kada se govori o biološkoj aktivnosti polifenola majčine dušice, dokazano je da oni poseduju izrazit antioksidativni efekat pri neutralisanju slobodnih radikala u *in vitro* uslovima (Dapkevicius i sar. 1998; Dorman i sar. 2003; Kulišić i sar. 2005; Wojdyło i sar. 2007; Stojanović i sar. 2012; Jabri-Karoui i sar. 2012; Roby i sar. 2013), što ukazuje na njihov potencijal za upotrebu kao funkcionalnih prirodnih aditiva prehrambenim i farmaceutskim proizvodima. Pored toga, ekstrakti majčine dušice ispoljavaju i niz drugih dejstava, kao što su antikancerogeno, antimikrobno, antifungalno i antibakterijsko (Ateeq-ur-Rehman i sar. 2009). Takođe, polifenolima majčine dušice se pripisuje i izrazit anti-hipertenzivni efekat, što je pokazano na pacovima sa spontanom hipertenzijom; naime primena majčine dušice kod ovih pacova dovela je do značajnog smanjenja sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska (Mihajlovic-Stanojevic i sar. 2013). Bitno je naglasiti da je sinergistički efekat polifenola iz vodenog ekstrakta majčine dušice delotvorniji u poređenju sa efektom pojedinačnih polifenolnih komponenti.

3. Inkapsulacija

Inkapsulacija, tehnologija razvijena '50-tih godina prošlog veka, podrazumeva smeštanje čvrstih, tečnih ili gasovitih supstanci u male, zatvorene kapsule, koje imaju sposobnost otpuštanja inkapsuliranog materijala na kontrolisan način i pri specifičnim uslovima (Desai i Park, 2005d). Inkapsulirani materijal može biti čista supstanca ili smeša različitih jedinjenja, i naziva se još i obloženi materijal, jezgro, aktivna supstanca, punjenje, unutrašnja faza i sl. Sa druge strane, materijal koji se koristi za pakovanje, tj. inkapsulaciju se naziva materijal za oblaganje, „zid“, kapsula, membrana, nosač ili ljuska, a po hemijskom sastavu može biti sastavljen od ugljenih hidrata, prirodnih guma, proteina, prirodnih ili modifikovanih polisaharida, lipida ili sintetskih polimera (Gibbs i sar. 1999; Mozafari, 2006; Fang i Bhandari, 2010).

Mikrokapsule su male vezikule odnosno čestice, opsega veličina od sub-mikrona do nekoliko milimetara (Fang i Bhandari, 2010). Proizvedene mikrokapsule mogu imati različitu morfologiju, ali se mogu svrstati u nekoliko osnovnih tipova (*Slika 1.3*): (a) čestice tipa matrice; (b) čestice tipa rezervoara koje imaju jezgro obavijeno omotačem; (c) multi-membranske čestice (obavijene sa više opni); (d) čestice tipa multi-jezgro; (e) čestice sa fosfolipidnim dovoslojem i (f) kapsule nastale procesom molekularne inkluzije (Đorđević i sar. 2015). Specifičan oblik kapsula u različitim sistemima je uslovljen procesom inkapsulacije, kao i tipom supstance koja se inkapsulira i materijala koji se koristi kao nosač.



Slika 1.3. Šematski prikaz različitih morfologija inkapsulata: (a) matrica; (b) jezgro/ljuska (rezervoar); (c) multi-membrana; (d) multi-jezgro; (e) fosfolipidni dvosloj i (f) molekularna inkluzija. (Đorđević i sar. 2015)

Za inkapsulaciju se mogu koristiti različite tehnike. Uopšteno, postoje tri uslova koje je neophodno ispuniti da bi inkapsulacija aktivnih jedinjenja bila uspešna: (1) formiranje membrane oko bioaktivne supstance(i); (2) sprečavanje neželjenog „curenja“ aktivne komponente; i (3) zadržavanje neželjenih supstanci van kapsule (Gibbs i sar. 1999; Mozafari i sar. 2008). Inkapsulacione tehnike uključuju sprej-sušenje, sprej-hlađenje, ekstruziju, koacervaciju, inkapsulaciju u liposome, inkapsulaciju molekularnom inkluzijom, liofilizaciju, ko-kristalizaciju, emulgovanje, itd. (Desai i Park 2005d; Augustin i Hemar 2009; Đorđević i sar. 2015). Pregled osnovnih tehnika inkapsulacije i njihovih karakteristika dat je u *Tabeli 1.2.*

Tabela 1.2. Pregled najčešćih tehnika inkapsulacije (Đorđević i sar. 2015)

Tehnika	Najčešće inkapsulirane aktivne supstance	Karakteristike tehnike	Veličina čestica	Tip morfologije inkapsulata	Karakteristike dobijenih inkapsulata
Sprej-sušenje	Hidrofobna jedinjenja Liofilizovani proteini	Jednostavna za rukovanje Niski operacioni troškovi Velika produktivnost Reproduktivnost Širok opseg nosača Efikasnost inkapsulacije 10-90% Komplikovana kontrola veličine čestica Neadekvatna za termoosetljive aktivne supstance Umereni prinosi u malim šaržama	Prahovi (10-300 μm) ili Aglomerati čestica (2-3 mm)	Matrica	Sferične čestice (prahovi) Dobra stabilnost inkapsulata Čestice ne-uniformne veličine Čestice imaju tendenciju agregacije
Sprej-hlađenje	Hidrofobna jedinjenja	Manji operativni troškovi u poređenju sa sprej-sušenjem Adekvatna za termoosetljiva jedinjenja Efikasnost inkapsulacije 10-100% Komplikovana kontrola veličine čestica Umereni prinosi u malim šaržama	20-200 μm	Matrica	Mikročestice su nerastovrne u vodi Brzo otpuštanje aktivne komponente Neophodni specijalni uslovi skladištenja
Oblaganje u fluidizovanom sloju	Supstance koje formiraju čvrsto jezgro	Ekonomičan proces Moguća kontrola raspodele veličine čestica Može se koristiti za formiranje dodatne membrane oko prethodno dobijenih inkapsulata Efikasnost inkapsulacije 5-50% Može doći do degradacije termoosetljivih jedinjenja	5-5000 μm	Rezervoar Multi-membrana Multi-jezgro	Sporo otpuštanje aktivne supstance

Tabela 1.2. (nastavak)

Tehnika		Najčešće inkapsulirane aktivne supstance	Karakteristike tehnike	Veličina čestica	Tip morfologije inkapsulata	Karakteristike dobijenih inkapsulata
Inkapsulacija u mikrogelove	Ekstruzija	Ćelije Jedinjenja iz biljaka Enzimi Proteini	Isplativa metoda Neinvazivna/bez organskih rastvarača i ekstremnih uslova temperature i/ili pH Može da se izvodi i u aerobnim i u anaerobnim uslovima Tehnike na bazi višestrukih nozli, rotirajućeg diska i presecanja mlaza imaju veći kapacitet proizvodnje Efikasnost inkapsulacije 20-50% „Scale up“ procesa je tesko izvesti Veoma viskozni polimeri se teško procesuiraju Mikrogel čestice se moraju odvojiti od rastvora za geliranje	50 – 2000 μm	Matrica Rezervoar Multi-membrana Multi-jezgro	Sferične čestice Veoma brzo inicijalno otpuštanje aktivne komponente iz inkapsulata tipa matrice
	Emulgovanje	Hidrofilne i hidrofobne/lipofilne komponente	Jednostavniji „scale-up“ u poređenju sa procesom ekstruzije Mikrogel čestice se moraju odvojiti od rastvora za geliranje Skuplji proces u poređenju sa ekstruzijom Teška kontrola procesa	50 – 2000 μm	Matrica Rezervoar Multi-membrana Multi-jezgro	Sferične čestice Veoma brzo inicijalno otpuštanje aktivne komponente iz inkapsulata tipa matriksa
Kompleksna-koacervacija		Hidrofobna jedinjenja Arome Esencijalna ulja	Visoka cena procesa Kompleksan mehanizam Metoda osetljiva na uslove okruženja Može se koristiti za termoosetljive supstance Efikasnost inkapsulacije 40-90% Upotreba organskih rastvarača	1-500 μm	Rezervoar Multi-membrana	Sferične čestice sa nekoliko jezgara Otporne na visoke temperature Kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci Dobra stabilnost u toku skladištenja

Tabela 1.2. (nastavak)

Tehnika	Najčešće inkapsulirane aktivne supstance	Karakteristike tehnike	Veličina čestica	Tip morfologije inkapsulata	Karakteristike dobijenih inkapsulata
Emulzione tehnike	Hidrofilne i hidrofobne/lipofilne komponente	<p><i>Nisko-energetske tehnike:</i> Niska cena Adekvatne za termolabilne supstance <i>Visoko-energetske tehnike:</i> Mogućnost „scale-up“ procesa Male kapljice (0.3-1 μm)</p> <p>Širok opseg veličina i oblika čestica Efikasnost inkapsulacije do 100%</p> <p>Visoki operacioni troškovi/niska energetska efikasnost Mogućnost polimerizacije u toku formiranja čestica Ograničen broj „food grade“ emulgatora</p>	<p>(Makro) Emulzije > 200 nm</p> <p>5 nm < Mikro emulzije < 100 nm</p> <p>20 nm < Nanoemulzije < 200 nm</p>	Rezervoar Multi-jezgro Multi-membrana	<p>Sferične čestice Mogu biti polidisperzne Konvencionalne emulzije su nestabilne u toku procesuiranja prehrambenog proizvoda Više-slojne emulzije su stabilne Kontrolisano otpuštanje aktivnih komponenata iz više-slojnih emulzija</p>
Inkapsulacija u lipozome	Hidrofilne i hidrofobne/lipofilne komponente Enzimi	<p>Efikasnost inkapsulacije 5-50%</p> <p>Visoka cena „scale-up“ procesa</p>	10-1000 μm	Fosfolipidni dvosloj	Kontrolisano otpuštanje aktivnih komponenata
Inkapsulacija u ciklodekstrine	Apolarni molekuli Arome	<p>Efikasnost inkluzije 30-100%</p> <p>Visoka cena ciklodekstrina Ograničena na jedinjenja male molekulske mase</p>	Od nano- (~1 nm) do mikro-veličina (~1000 nm)	Molekularna inkluzija	<p>Povećana rastvorljivost hidrofobnih molekula Kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci Čestice (β-ciklodekstrina) imaju tendenciju aglomeracije</p>

Tabela 1.2. (nastavak)

Tehnika	Najčešće inkapsulirane aktivne supstance	Karakteristike tehnike	Veličina čestica	Tip morfologije inkapsulata	Karakteristike dobijenih inkapsulata
Inkapsulacija na bazi superkritičnih fluida	Hidrofilne i hidrofobne/lipofilne komponente Enzimi	Izbjegava se upotreba organskih rastvarača, posuda, visokih temperatura i mehaničkog stresa Efikasnost inkapsulacije 20-100% Teška kontrola procesa	10-400 μm	Matrica Rezervoar	Čestice imaju tendenciju aglomeracije
Inkapsulacija u ćelije kvasca	Arome Antioksidansi	Jednostavan proces Ekonomičan proces	~5 μm	Rezervoar	Inkapsulati termostabilni do 250 °C Postepeno otpuštanje aktivnih komponenata Specifična dostava aktivnih komponenata u usta („in mouth“)

3.1. Ciljevi inkapsulacije

Glavni cilj inkapsulacije jeste zaštita aktivnih komponenti od štetnih dejstava okoline, kao što su neželjeni efekti svetlosti, vlage, kiseonika, promena pH i temperature; na taj način dolazi do produženja roka trajanja proizvoda, kao i obezbeđivanja produženog/kontrolisanog otpuštanja inkapsulirane supstance (Shahidi i Han, 1993; Fang i Bhandari, 2010). Neki od osnovnih razloga za inkapsulaciju u prehrambenoj industriji su sledeći: (i) zaštita biaktivnih supstanci od degradacije, smanjivanjem njihove reaktivnosti prema spoljašnjem okruženju; (ii) smanjenje isparavanja odnosno brzine prenosa inkapsulirane supstance u spoljašnje okruženje; (iii) modifikacija fizičkih karakteristika biaktivnih supstanci u cilju omogućavanja lakše manipulacije (npr. prevođenje aktivnih komponenata iz tečnog u čvrsto stanje); (iv) projektovanje otpuštanja aktivne komponente postupno, tj. produženo/kontrolisano u toku vremena, ili u određenom trenutku i na određenom mestu; (v) maskiranje neželjenih aroma ili ukusa bioaktivnih supstanci; (vi) smanjenje koncentracije aktivne komponente, u slučajevima kada su potrebne male količine, pri čemu se održava uniformna disperzija u nosaču; (vii) omogućavanje razdvajanja komponenti smeše koje bi u suprotnom slučaju reagovale jedna sa drugom (Desai i Park, 2005d; Fang i Bhandari, 2010).

Iako su dokazana brojna pozitivna dejstva polifenolnih jedinjenja na ljudsko zdravlje, ipak se pri njihovoj primeni nailazi na niz poteškoća. Prva od njih jeste problem postizanja efektivnih koncentracija u *in vivo* uslovima, koje su najčešće za red veličina veće od efektivnih koncentracija u *in vitro* uslovima. Dalje, efikasnost bioaktivnih supstanci unetih u organizam zavisi i od njihove bioraspoloživosti, o čemu je već bilo reči (odjeljak 2.3). Sve navedeno predstavlja veliki izazov za primenu polifenola kao biaktivnih supstanci, posebno kada se ima na umu da samo mali deo molekula preostaje dostupan nakon oralne administracije, i to zbog nedovoljnog vremena provedenog u gastrointestinalnom traktu, loše propustljivosti i/ili rastvorljivosti u želucu, kao i

usled njihove nestabilnosti pri uslovima prerade i skladištenja hrane (temperature, kiseonik, svetlost) ili u uslovima gastro-intestinalnog trakta (pH, enzimi, prisustvo drugih nutrijenata); sve navedeno ograničava aktivnost i ispoljavanje pozitivnih efekata polifenola (Bell, 2001). Stoga, primena polifenola zahteva formulisanje zaštitnih mehanizama koji će održati aktivnost supstance u toku određenog perioda i isporučiti aktivnu formu do ciljanog fiziološkog mesta delovanja u organizmu (Chen i sar. 2006). Dodatno, polifenoli poseduju još jednu neželjenu karakteristiku, a to je neprijatan ukus, koji se često opisuje kao astrigentan i gorak, pa ga je stoga neophodno maskirati kako bi se polifenoli mogli uneti u organizam u koncentraciji neophodnoj za postizanje biološke aktivnosti (Haslam i Lilley, 1988).

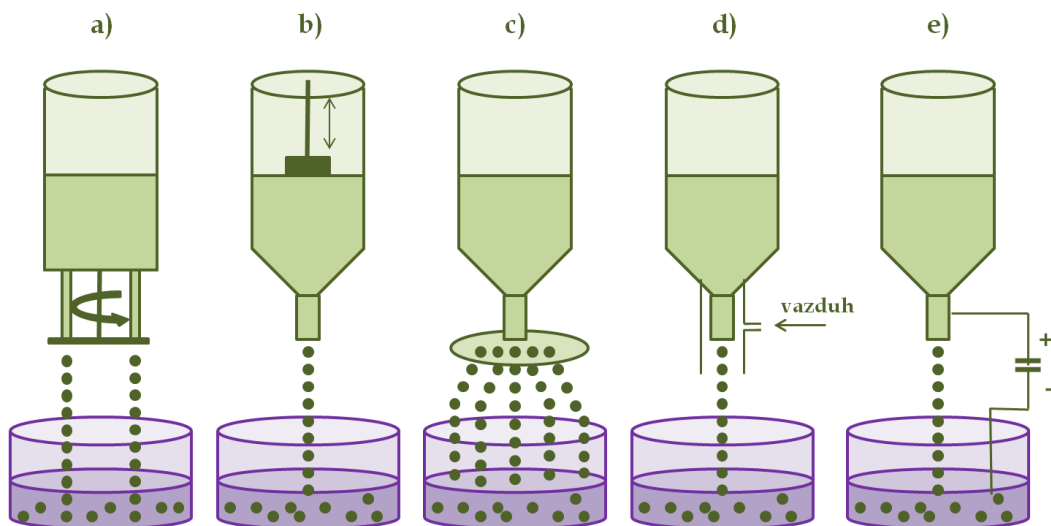
Inkapsulacija polifenola i upotreba ovih sistema umesto slobodnih polifenola, doprinosi prevazilaženju navedenih nedostataka vezanih za njihovu nestabilnost, zatim ublažavanju neprijatnog ukusa polifenola, kao i unapređenju njihove biorasploživosti i polu-života u *in vivo* i *in vitro* uslovima.

4. Tehnike inkapsulacije aktivnih supstanci

Postoji veliki broj tehnika kojima se može postići inkapsulacija aktivnih supstanci u određene nosače. Opis inkapsulacionih tehnika korišćenih u ovoj doktorskoj disertaciji dat je u poglavljima koja slede.

4.1. Ekstruzione tehnike i njihova primena za inkapsulaciju aktivnih supstanci

Uopšteno, tehnike ekstruzije se zasnivaju na ukapavanju vodenog rastvora polimera (najčešće je to natrijum-alginat koncentracije 0,6–4,0 mas.%) i aktivne supstance u rastvor za geliranje (u slučaju natrijum-alginata najčešće se koristi rastvor kalcijum-hlorida, i to 0,05–2,0 M) (Krasaekoopt i sar. 2003; Gouin, 2004). Ukapavanje se može izvoditi na različite načine, jednostavno korišćenjem pipete, šprica, vibrirajućeg raspršivača, presecanjem mlaza, rotirajućeg diska, uz dejstvo koaksijalnog, tj. sekundarnog toka vazduha, ili uz primenu električnog potencijala (*Slika 1.4*) (Zuidam i Shimoni, 2010).



Slika 1.4. Šematski prikaz ekstruzionih tehnika za dobijanje polimernih mikročestica: a) tehnika presecanja mlaza; b) tehnika vibrirajućeg raspršivača; c) tehnika raspršivanja uz pomoć rotirajućeg diska; d) tehnika ukapavanja uz dejstvo koaksijalnog toka vazduha; e) tehnika elektrostatičke ekstruzije.

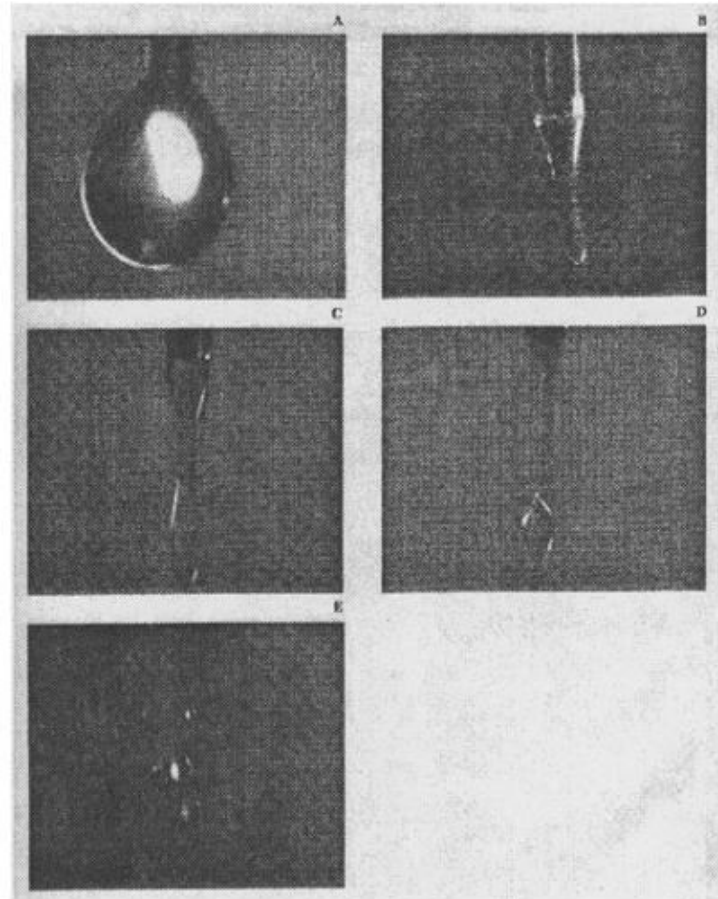
Mikročestice dobijene metodama ekstruzije su sastavljene od mreže biopolimera koji inkapsulira/imobilize aktivnu komponentu, pa se stoga obično pripremaju u prisustvu aktivne komponente, mada je i naknadna inkapsulacija aktivne komponente u prazne mikročestice moguća (Zuidam i Shimoni, 2010). Gel kalcijum-alginata se najčešće koristi kao matrica za inkapsulaciju širokog spektra bioaktivnih jedinjenja, kao što su uljane kapljice koje sadrže arome, ćelije, probiotici, kvasci, ili enzimi. Ove aktivne supstance su relativno velike veličine, budući da bi prilikom inkapsulacije molekula manjih veličina došlo do neželjenog „curenja“ aktivne komponente kroz veoma poroznu polimernu mrežu. Za inkapsulaciju takvih jedinjenja, kao nosač se koriste sistemi na bazi alginata i nekih drugih polimera, npr. inulina, saharoze, hitozana i sl. (Belščak-Cvitanović i sar. 2011; Stojanović i sar. 2012). Geliranje alginata u prisustvu dvovalentnih katjona je proces koji se lako može kontrolisati, i koji ne zahteva zagrevanje poput procesa geliranja drugih biopolimera, npr. agaroze, agara ili karagenana.

4.1.2. Elektrostatička ekstruzija

Tehnika elektrostatičke ekstruzije spada u novije tehnike. Prednost elektrostatičke ekstruzije nad ostalim ekstruzionim tehnikama jeste što se može koristiti za dobijanje mikročestica manjih od 300 μm , sa uskom raspodelom veličina, i sa mogućnošću izvođenja eksperimentalne procedure u sterilnim uslovima (Bugarski i sar. 2004). Takođe, modifikacijom geometrije eksperimentalnog sistema, u smislu korišćenja sistema igala, moguće je uspostaviti kontinualnu proizvodnju uniformnih mikročestica, uz veći kapacitet proizvodnje.

Ova metoda se zasniva na ekstruziji suspenzije kroz iglu primenom elektrostatičkog polja i u sakupljanju kapljica u rastvoru za geliranje. Između elektroda se javlja elektrostatički potencijal koji indukuje određeno naelektrisanje na površini rastvora polimera. Indukovano naelektrisanje

smanjuje površinski napon rastvora polimera i dovodi do značajnog smanjenja velične kapljica na vrhu igle u odnosu na njihovu veličinu dobijenu ukapavanjem bez primene električnog polja.



Slika 1.5. Mehanizam formiranja kapljica na vrhu igle pri ekstruziji rastvora Na-alginata koncentracije 1,5 mas.% a) bez primene elektrostatičkog polja i sa primenom elektrostatičkog potencijala od 4 do 5 kV: b) formiranje meniska; c) formiranje vlakna polimera; d) izduživanje vlakna polimera; e) otkidanje kapljica. (Bugarski i sar. 1994)

Kada ekstruder nije priključen na generator napona, kapljica koja nastaje na vrhu igle raste sve do trenutka kada njena težina postaje veća do ukupne vertikalne komponente sile površinskog napona (*Slika 1.5a*). U tom trenutku kapljica se odvajava i pada u rastvor za geliranje. Zato su ovako nastale čestice

većih dimenzija. Pri primeni električnog potencijala dolazi do promene oblika meniska na vrhu igle koji prelazi iz oblika sfere u oblik razvučene obrnute kupe.

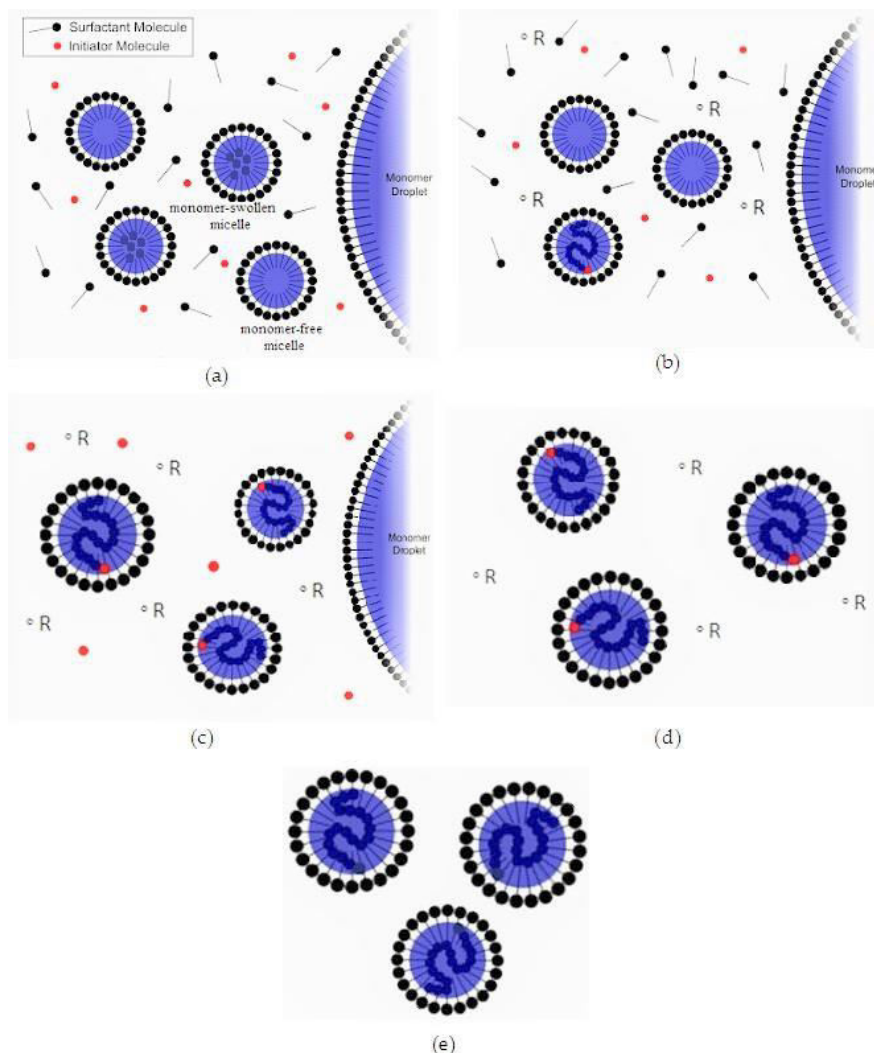
Ispitivanje nastajanja kapljica primenom elektrostaticke sile (*Slika 1.5b, c, d, e*) je pokazalo da se rastom meniska formira izduženi konus. Veliko naelektrisanje na vrhu obrnute kupe smanjuje površinski napon rastvora alginata što dovodi do stvaranja suženja u obliku vlakna (odnosno „vrata“). Otkidanje polimera i generisanje većeg broja manjih kapljica dešava se na mestu gde je „vrat“ najtanji (veći je kod viskoznijih polimera). Dok glavni deo vlakna tečnosti brzo formira novu kapljicu, izduženo tečno vlakno se razbija u veliki broj manjih kapi. Na ovaj način nastaju jedna veća kap i veći broj manjih kapljica (Manojlović i sar. 2006; Manojlović 2008).

Veličina dobijenih čestica zavisi od fizičkih karakteristika suspenzije, unutrašnjeg prečnika igle, rastojanja između elektroda i primenjenog napona. Što je viskoznost rastvora veća, to je veći udeo kapljica malih dimenzija u ukupnoj raspodeli veličina kapljica, pa su dobijene čestice neuniformnije. Primenom većih napona (iznad 6 kV) obrazuje se više manjih (satelitskih) kapljica, jer je u ovom slučaju izraženije izduženje „vrata“ - koje prethodi otkidanju kapljica. 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.

4.2. Tehnika emulzione polimerizacije i njena primena za inkapsulaciju aktivnih supstanci

Za dobijanje hidrogel čestica, mikro- i nano-dimenzija za inkapsulaciju aktivnih supstanci, može da se koristi i metoda polimerizacije u emulziji, disperziji ili suspenziji. Emulziona polimerizacija je kompleksan proces u kome se adiciona polimerizacija preko slobodnih radikala odvija u heterogenom sistemu. Uobičajeni proces započinje emulgovanjem relativno hidrofobnog monomera u vodi, korišćenjem emulgatora tipa ulje-u-vodi, koji je praćen reakcijom inicijacije slobodnog radikala rastvornog u vodenoj ili uljanoj fazi, a kao krajnji rezultat nastaje tzv. „lateks“, koji se definiše kao „koloidna disperzija polimernih čestica u vodenom medijumu“. Prečnici sintetisanih čestica su u opsegu 10-1000 nm, i imaju visok stepen sferičnosti. (Urban i Takamura, 2002; Yamak, 2013).

Standardna procedura emulzione polimerizacije podrazumeva četiri osnovne komponente: 1) monomer, 2) disperzioni medijum, 3) emulgator i 4) inicijator polimerizacije, ali se mogu koristiti i neke dodatne komponente, poput agenasa za transfer na lanac, pufera, kiselina, baza, agenasa protiv starenja, biocida, ali i umrežavajućih reagenasa. Proces emulzione polimerizacije (*Slika 1.6*) preko slobodnih radikala se odigrava u tri faze: 1) inicijacija, 2) propagacija, 3) terminacija.



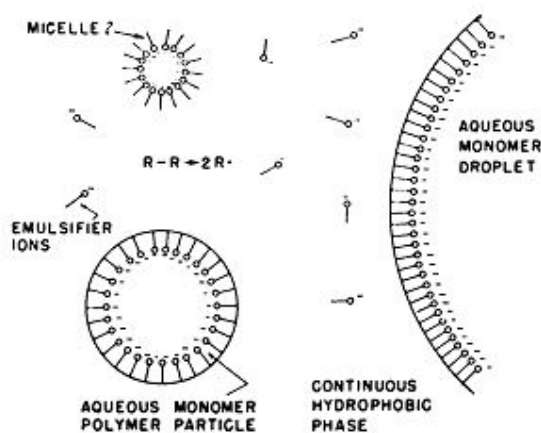
Slika 1.6. Mehanizam procesa emulzione polimerizacije. (Yamak, 2013)

Na samom početku faze inicijacije, u reakcionoj smeši postoje tri osnovne komponente - vodena faza, kapi monomera dispergovane u vodenoj fazi i micelle emulgatora koje sadrže rastvoreni monomer. Takođe, moguće je prisustvo i malog udela rastvorenog emulgatora i micela bez monomera (*Slika 1.6a*). U toku faze inicijacije, a nakon dodatka inicijatora, dolazi do difuzije slobodnih radikala u nabubrele čestice monomera. Upravo ove micelle predstavljaju glavno mesto nastanka polimernih čestica, u kontaktu hidrofobnog monomera i vodorastvornog inicijatora. Kako faza rasta polimernih čestica napreduje, micelle emulgatora počinju da nestaju (*Slika 1.6b*). Faza propagacije polimernih čestica se odvija difuzijom molekula monomera iz

kapi monomera, sve do njihove potpune potrošnje (*Slika 1.6c* i *1.6d*). Proces polimerizacije se završava (faza terminacije) nakon što sav monomer proreaguje (konverzija 100%). Polimerizaciona smeša se u ovoj fazi sastoji od malih čestica polimera stabilisanih molekulima emulgatora (*Slika 1.6e*) (Yamak, 2013).

4.2.1. Inverzna emulziona polimerizacija

Nasuprot emulzijama ulje-u-vodi, proces emulzione polimerizacije se može izvoditi i u inverznoj emulziji. Inverzna (voda-u-ulju) emulziona polimerizacija podrazumeva dispergovanje vodenog rastvora hidrofilnog monomera u hidrofobnoj uljanoj fazi, uz pomoć emulgatora tipa voda-u-ulju. Za inicijaciju polimerizacije može se koristiti i hidrofilan (rastvorljiv u vodenoj fazi) i hidrofoban (rastvorljiv u uljanoj fazi) inicijator, kada se dobija sistem identičan onom koji nastaje metodom konvencionalne emulzione polimerizacije. Krajnji polimerni sistem se sastoji od submikronskih nabubrelih čestica vodorastvornog polimera dispergovanih u ulju. Na *Slici 1.7*. šematski je prikazan proces inverzne emulzione polimerizacije.



Slika 1.7. Proces inverzne emulzione polimerizacije. (Vanderhoff i sar. 1962)

Ukoliko se koristi emulgator amfifilne prirode, hidrofilni deo molekula emulgatora se orijentiše prema dispergovanoj hidrofilnoj fazi, dok se hidrofobni

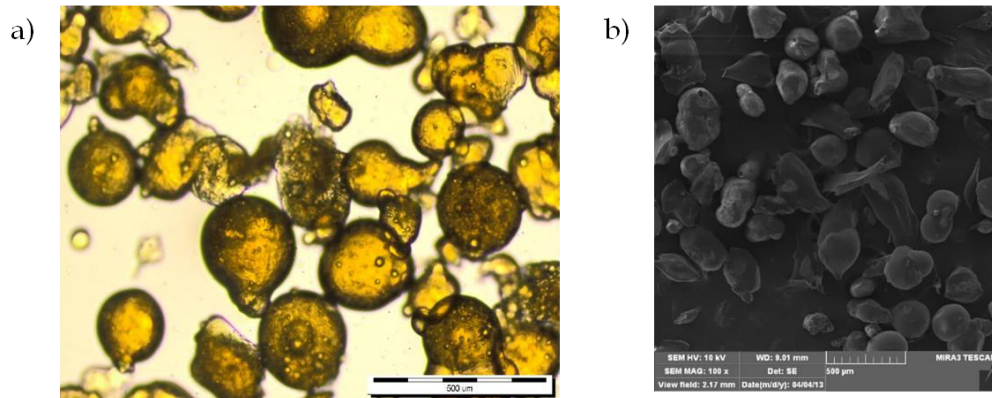
deo molekula orijetiše prema hidrofobnoj kontinualnoj fazi. Faza inicijacije procesa polimerizacije se odvija prema mehanizmu koji je analogan onom u klasičnoj emulzionoj polimerizaciji, pri čemu nastaju submikronske čestice vodorastvornog hidrofilnog polimera u kontinualnoj uljanoj fazi (Vanderhoff i sar. 1962).

4.2.2. Stabilnost i veličina čestica dobijenih inverznom emulzionom polimerizacijom

U konvencionalnim procesima emulzione polimerizacije, stabilnost koloidnih čestica je vezana za odnos elektrostatičkih sila odbijanja (između jona emulgatora adsorbovanih na površinu hidrofobnog polimera i suprotno naelektrisanih jona vodene faze) i London-van der-Waal's-ovih sila privlačenja (pri čemu su ove sile jače što je rastojanje između čestica manje). Čestice emulzija se međusobno odbijaju do trenutka kada London-van der-Waal's-ove sile postanu dominante, te stoga ne dolazi do flokulacije ili agregacije čestica, pa su konvencionalne emulzije stabilne. Za inverznu emulzionu polimerizaciju, ove elektrostatičke sile se znatno razlikuju. Tako su Albers i Overbeek (1959) pokazali da u emulzijama tipa voda-u-ulju dolazi do flokulacije čak i usled gravitacije, pa se može zaključiti da su sistemi dobijeni inverznom emulzionom polimerizacijom manje stabilni u poređenju sa sistemima dobijenim klasičnom polimerizacijom.

Veličina čestica dobijenih tehnikom emulzione polimerizacije nije direktno vezana za veličinu inicijalno formiranih kapi monomera ili micela, posebno u slučaju kada kapi odnosno micide, ne sadrže molekule inicijatora polimerizacije. U tom slučaju, udeo polimera rastvorenog u vodi, tj. medijumu za polimerizaciju ima ključnu ulogu u kontroli veličine finalno dobijenih polimernih čestica (Arshady, 1992). Takođe, istraživanja su pokazala da na veličinu čestica dobijenih emulzionom polimerizacijom mogu uticati faktori poput koncentracije emulgatora i temperature na kojoj se proces emulgovanja

odigrava (Arshady, 1992), pri čemu često sa povećanjem temperature dolazi do smanjenja veličine dobijenih polimernih čestica (Bagchi i sar. 1979).

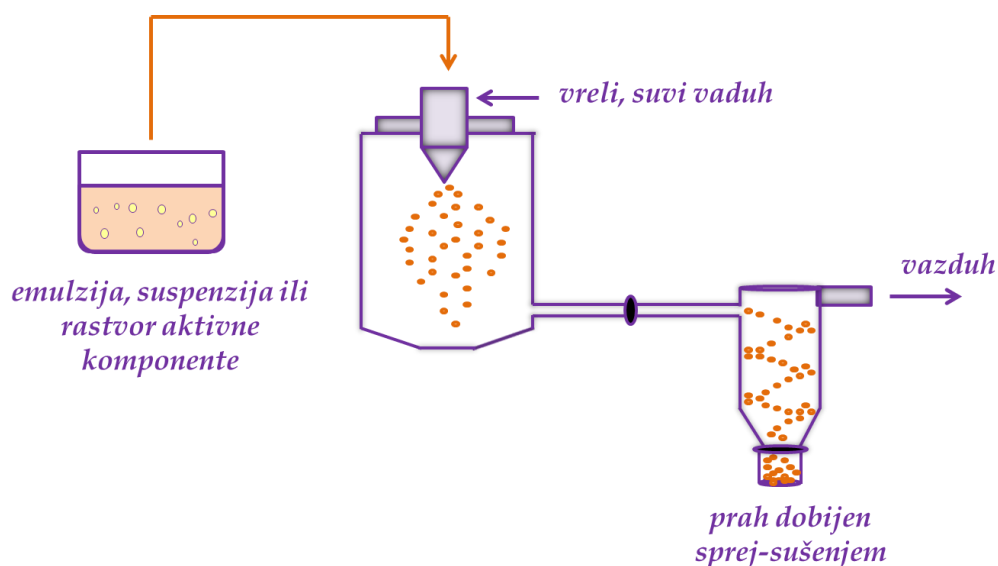


Slika 1.8. Izgled mikročestica hitozana dobijenih inverznom emulzionom polimerizacijom pod: a) optičkim mikroskopom u stanju relaksacije i b) SEM mikroskopom nakon rehidratacije i dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja u vodi 25°C („bar“ 500 μm). (Milašinović i sar., rad u pripremi)

Inverznom emulzionom polimerizacijom moguće je dobiti čestice polimera visokih molekulskih masa koje bubre u vodenim rastvorima (*Slika 1.8*). Dostupni literaturni podaci ukazuju na činjenicu da je inverzna emulziona polimerizacija rađena kako bi se dobile čestice sintetskih polimera (Lim i sar. 2002; Ochi i sar. 2015), dok je mogućnost primene ove tehnike za sintezu mikročestica na bazi prirodnih polimera skromno istražena (Trifković i sar. 2014; Vidović i sar. 2016).

4.3. Tehnika sprej-sušenja i njena primena za inkapsulaciju aktivnih supstanci

Sprej-sušenje predstavlja široko korišćenu tehniku za inkapsulaciju različitih aktivnih supstanci, poput aroma, antioksidanasa, vitamina, minerala, prehrambenih boja, masnih kiselina i esencijalnih ulja, u cilju obezbeđivanja zaštite ovih osetljivih jedinjenja, kao i produžavanja roka trajanja proizvoda u toku skladištenja (Pillai i sar. 2012, Trifković i sar. 2016). Proces inkapsulacije aktivnih komponenti sprej-sušenjem ima niz prednosti, posebno ako se govori o inkapsulaciji namenjenoj prehrambenoj industriji. Dostupnost opreme, niska cena procesa, raznovrsnost dostupnih materijala koji se mogu koristiti kao nosači za inkapsulaciju, stabilnost dobijenog proizvoda, zadržavanje isparljivih jedinjenja, kao i mogućnost kontinualne proizvodnje na industrijskom nivou samo su neke od tih prednosti (Desobry i Debeaufort, 2011).



Slika 1.9. Šematski prikaz sprej-sušača.

Inkapsulacija sprej-sušenjem se postiže kroz dva koraka - prvi podrazumeva rastvaranje, emulgovanje ili dispergovanje aktivne komponente u vodeni rastvor nosača (tj. pripremu emulzije), dok drugi korak podrazumeva atomizaciju i raspršivanje smeše aktivna komponenta/nosač u vreloj komori

(Zuidam i Shimoni, 2010) (*Slika 1.9*). Kao rezultat procesa sprej-sušenja, dobijaju se sferične čestice, najčešće u mikro-opsegu veličina (10-100 μm) (Madene i sar. 2006). Kako je veličina čestica u polaznim rastvorima koji se koriste sa sprej-sušenjem u nano-opsegu veličina (nano-suspenzije i nano-emulzije), sprej-sušenje se može smatrati i tehnikom kojom se postiže nanoinkapsulacija (Jafari i sar. 2007; Jafari i sar. 2008). S tim u vezi, prvobitno primenjena tehnika (nano)inkapsulacije, tj. (nano)emulgovanje, ima ključan uticaj na potonji proces sprej-sušenja u smislu finalno dobijene veličine čestica i ostvarene efikasnosti inkapsulacije. S druge strane, moguće je u određenoj meri kontrolisati veličinu čestica prahova dobijenim sprej-sušenjem i optimizacijom procesnih parametara sprej-sušenja (Anandharamakrishnan i sar. 2007; Anandharamakrishnan i sar. 2008).

4.3.1. Emulgovanje kao pred-korak sprej-sušenju

Priprema emulzija igra veoma važnu ulogu u procesu inkapsulacije sprej-sušenjem, te je stoga poznavanje njihovih karakteristika neophodno za razumevanje samog procesa sprej-sušenja. Prvenstveni uticaj ima veličina kapljica emulzije. Ukoliko se u procesu emulgovanja koriste visoke koncentracije nosača, dobiće se emulzije u mikro-opsegu veličina kapljica. Međutim, mikro-emulzije nisu atraktivne za primenu u prehrambenoj industriji, ne samo zbog velike veličine čestica, već i zbog njihove slabe stabilnosti (Jafari i sar. 2007). Sa druge strane, emulzije kod kojih je veličina kapljica u nano-opsegu imaju bolju efikasnost inkapsulacije i smanjen gubitak isparljivih jedinjenja (Reineccius 2001; Desai i Park 2005d; Madene i sar. 2006).

Efikasnost inkapsulacije i sadržaj inkapsulirane aktivne komponente predstavljaju najznačajnije parametre procesa, a u vezi su sa stepenom neinkapsulirane aktivne komponente prisutne na površini sprej-sušenih čestica, kao i sa koncentracijom direktno inkapsulirane aktivne komponente (Baranauskiene i sar. 2007). Literaturni podaci ukazuju na to da uređaji

korišćeni u procesu emulgovanja imaju uticaj na dobijene veličine čestica, ali ne emulzija već finalnih sprej-sušenih prahova (Jafari i sar. 2007). Takođe, koncentracija ne-inkapsulirane aktivne komponente na površini čestica, tj. ukupna efikasnost inkapsulacije, zavisi od veličine sprej-sušenih čestica; što su dobijene čestice većeg prečnika, manja je koncentracija ne-inkapsulirane aktivne komponente na površini, odnosno veća je efikasnost inkapsulacije (Fang i sar. 2005).

Pored navedenog, na postizanje visokog stepena inkapsulacije očigledan je uticaj karakteristika pripremljenih emulzija, i to prvenstveno veličine kapljica emulzije. Naime, do poboljšanja efikasnosti inkapsulacije, tj. ukupnog sadržaja inkapsulirane komponente, dolazi nakon smanjenja veličine kapljica emulzije (Liu i sar. 2001; Soottitantawat i sar. 2005; Baranauskiene i sar. 2007; Penbunditkul i sar. 2011). Pri tome, uticaj smanjenja veličine kapljica emulzije na veličinu sprej-sušenih čestica je zanemarljiv (Soottitantawat i sar. 2005). Ovaj efekat se može pripisati i viskoznosti emulzija: sa povećanjem viskoznosti emulzije, veličina kapljica se smanjuje, što prouzrokuje povećanje efikasnosti inkapsulacije (McClements, 2005; Penbunditkul i sar. 2011; Tonon i sar. 2011).

4.3.2. Uticaj procesnih parametara na karakteristike prahova dobijenih tehnikom sprej-sušenja

Parametri procesa sprej-sušenja u značajnoj meri utiču na finalne karakteristike sprej-sušenih prahova, pri čemu se najznačajniji uticaj pripisuje ulaznoj temperaturi vazduha. Naime, sa povećanjem ulazne temperature vazduha dolazi do smanjenja sadržaja vlage sprej-sušenih prahova (Finney i sar. 2002; Ersus i Yurdagel, 2007; Fernandes i sar. 2013). Slično, povećanje ulazne temperature vazduha u toku procesa sprej-sušenja rezultira česticama sa smanjenim sadržajem aktivne komponente po površini, odnosno povećanom efikasnošću inkapsulacije (Penbunditkul i sar. 2012). Viša ulazna temperatura vazduha omogućava brže sušenje emulzije, što doprinosi bržem formiranju

čestice, a samim tim i boljem zadržavanju bioaktivne supstance. S druge strane, previsoke ulazne temperature vazduha mogu imati štetan efekat na temperaturno osetljive i isparljive aktivne komponente, pa se mora voditi računa o visini ulazne temperature vazduha kada se radi inkapsulacija ovakvih jedinjenja.

Fizičke karakteristike sprej-sušenih čestica sa inkapsuliranom aktivnom komponentom, poput njihove higroskopnosti, specifične gustine i gustine pakovanja, kao i gustine čestica, takođe su zavisne od ulazne temperature vazduha. Higroskopnost prahova i njihovo ponašanje u kontaktu sa vodom predstavljaju veoma važne karakteristike sa aspekta njihove primene. Vreme koje je neophodno da sprej-sušeni prahovi postanu vlažni je veće ukoliko su prahovi dobijeni uz višu ulaznu temperaturu vazduha (Fernandes i sar. 2013). Nasuprot tome, sa povećanjem ulazne temperature vazduha, dolazi do smanjenja specifične gustine prahova (Goula i Adamopoulos, 2008; Souza i sar. 2009; Botrel i sar. 2012), što je i očekivano budući da povećanje temperature vazduha ubrzava isparavanje rastvarača i podstiče formiranje pora, samim tim doprinoseći smanjenju specifične gustine (Fernandes i sar. 2013). Gustina pakovanja prahova predstavlja veoma važnu karakteristiku sa aspekta pakovanja finalnog proizvoda, jer proizvodi velike gustine pakovanja zahtevaju manje ambalažne posude (Quispe-Condori i sar. 2011). Stoga, visoka ulazna temperatura vazduha nije poželjna, pošto sa povećanjem temperature dolazi do povećanja brzine sušenja, što dalje dovodi do formiranja većih kapljica i posledičnog smanjenja gustine pakovanja sprej-sušenih prahova (Walton, 2000; Finney i sar. 2002; Chegini i Ghobadian 2007; Bae i Lee 2008). Slično je i sa gustinom čestica sprej-sušenih prahova (Fernandes i sar. 2013).

Pored ulazne temperature vazduha, i drugi parametri procesa sprej-sušenja utiču na krajnje karakteristike dobijenih prahova. Tako, povećanje ulazne brzine emulzije doprinosi povećanju efikasnosti inkapsulacije (Penbuditkul i sar. 2012). Takođe, povećanje ulazne brzine emulzije doprinosi povećanom sadržaju vlage u prahovima (Fernandes i sar. 2013), što je posledica velikih zapremina

emulzije koje treba osušiti u skraćenom vremenu kontakta sa vrelim vazduhom. Prateći efekat je i smanjena higroskopnost prahova dobijenih pri ovakvim uslovima.

5. Polimerni materijali za inkapsulaciju aktivnih supstanci

Postoji veliki broj materijala koji se mogu koristiti za inkapsulaciju biološki aktivnih supstanci. Međutim, samo mali broj njih je dozvoljeno koristiti u prehrambenoj industriji, a to su oni materijali koji su od strane odgovarajućih stručnih tela (kao što je Američka uprava za hranu i lekove (eng. Food and Drug Administration - FDA) proglašeni za sigurne, tj. „GRAS“ materijale (eng. Generally Recognized As Safe - GRAS). Takođe, bitno je napomenuti da su regulative koje propisuju dozvoljene prehrambene aditive znatno strožije od onih koje se tiču farmaceutske ili kozmetičke industrije, kao i da propisi mogu varirati u zavisnosti od kontinenta do kontinenta, pa i od države do države. Stoga je izbor adekvatnog materijala za inkapsulaciju veoma važan. Prednost se uvek daje materijalima prirodnog porekla, koji ispoljavaju svojstva netoksičnosti, biokompatibilnosti i biodegradabilnosti.

5.1. Hitozan kao nosač za inkapsulaciju aktivnih supstanci

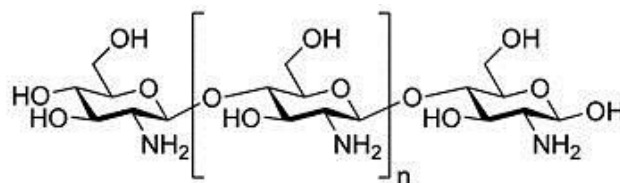
Hitozan, katjonski polimer, je drugi najzastupljeniji polimer u prirodi, posle celuloze (Roberts, 1992). Hitozan se komercijalno proizvodi deacetilovanjem hitina, koji je strukturni element egzoskeletona ljuskara (kraba, račića, itd.) (Roberts, 1992; Shepherd i sar. 1997). U procesu proizvodnje hitozana, smrvljene ljuštore ljuskara se deprotonuju i demineralizuju naizmeničnim tretmanom bazom i kiselinom, nakon čega se ekstrahovani hitin deacetiluje do hitozana procesom alkalne hidrolize pri visokim temperaturama. Proces proizvodnje hitozana iz navedenih izvora je ekonomičan i jednostavan, pa je stoga i osnovni način za njegovu komercijalnu proizvodnju. Hitozan kao takav je veoma redak u prirodi, jedino se može naći u nekim gljivama. Poslednjih godina, dobijanje hitozana iz gljiva, korišćenjem različitih metoda fermentacije takođe dobija na značaju (Ghosh Ray i Ghangrekar, 2015).

Hitozan je atraktivan za primenu u procesima inkapsulacije biološki aktivnih jedinjenja zbog svojih jedinstvenih karakteristika kao što su

biokompatibilnost i biodegradabilnost, zatim mukoadhezivnost i netoksičnost, kao i mogućnost primene u sistemima za kontrolisano otpuštanje aktivnih supstanci sa izraženim biološkim karakteristikama (Knežević-Jugović i sar. 2010). Takođe, poznato je da hitozan ispoljava i anti-mikrobno dejstvo (No i sar. 2002; Zheng i Zhu 2003). Do sada, hitozan je korišćen za inkapsulaciju probiotika i prebiotika (Chavarri i sar. 2010), aromatičnih jedinjenja (Higuera-Ciagara i sar. 2003), enzima (Žuža i sar. 2011), antioksidanasa (Belščak-Cvitanović i sar. 2011; Goncalves da Rosa i sar. 2013; Trifković i sar. 2012; 2014; 2015).

5.1.1. Hemijska struktura hitozana

Hitozan je linearni kopolimer polisaharidne prirode, koji se sastoji od β [1 \rightarrow 4] povezanih ostataka 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoze (D-glukozamina) i 2-acetamido-2-deoksi-D-glukopiranoze (*N*-acetil-D-glukozamina) (Slika 1.10). (George i Abraham 2006).



Slika 1.10. Hemijska struktura hitozana.

Uopšteno, termin hitozan se odnosi na seriju polimera različitog stepena deacetilovanja, koji je određen brojem primarnih amino-grupa u osnovnom lancu hitozana, i različitih molekulskih masa (Roberts, 1992). Stepenu deacetilovanja tipičnih komercijalnih hitozana je u opsegu između 70% i 95%, dok se molekulske mase kreću u opsegu od 10 do 1000 kDa. Karakteristike hitozana, poput njegove biodegradabilnosti i biološke uloge su najčešće zavisne od karakteristika *N*-acetil-D-glukozaminskih i *D*-glukozaminskih ostataka (George i Abraham, 2006).

5.1.2. Karakteristike hidrogelova na bazi hitozana

Kao što je već rečeno, hitozan je veoma atraktivan za primenu u sistemima sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne komponente, zbog kombinacije jedinstvenih karakteristika kao što su biokompatibilnost i biodegradabilnost, zatim mukoadhezivnost i netoksičnost, kao i anti-mikrobno dejstvo i sposobnosti poboljšanja permeacije aktivne komponente.

5.1.2.1. Biokompatibilnost i biodegradabilnost

Hitozan se u velikoj meri koristi u prehrambenoj industriji, a takođe i u dijetetskim suplementima, posebno onim za mršavljenje i snižavanje holesterola u krvi, gde ima ulogu u vezivanju masti (Shahidi i sar. 1999). Naime, hitozan zahvaljujući svojoj katjonskoj prirodi ima sposobnost vezivanja lipida u crevima (Kanauchi i sar. 1995; Wuolijoki i sar. 1999). Istraživanja u oblasti biomedicine pokazala su da je hitozan izrazito biokompatibilan polimer (Muzzarelli i sar. 1988). Takođe, budući da određeni enzimi (npr. lizozim) u ljudskom organizmu imaju sposobnost razlaganja hitozana, smatra se i biodegradabilnim materijalom (Muzzarelli, 1997; Koga, 1998).

5.1.2.2. Mukoadhezivnost

Sposobnost hitozana da se adhezijom vezuje za mukozna tkiva u organizmu (Gåserød i sar. 1998), dovela je do njegove sve šire upotrebe u sistemima za ciljanu dostavu lekova/aktivnih supstanci, i to u želucu (Gåserød i sar. 1998; López i sar. 2000), tankom crevu (He i sar. 1988; Shimoda i sar. 2001) ili bukalnoj sluznici (Miyazaki i sar. 1995; López i sar. 1998). Vezivanje hitozana za mukozna tkiva odigrava se po nekoliko mehanizama: (i) elektrostatičkim privlačenjem (Lehr i sar. 1992); zatim (ii) hidratacijom hitozana, kao i (iii) formiranjem vodoničnih veza i (iv) jonskim interakcijama između pozitivno naelektrisane amino grupe hitozana i negativno naelektrisanih mukoznih tkiva

(He i sar. 1988; Deacon i sar. 2000). Takođe, interakcije hitozana i mukoznih tkiva su jače u kiseloj sredini (He i sar. 1988), a zavise i od molekulske mase hitozana (pri čemu sa povećanjem molekulske mase dolazi do jačeg vezivanja) (Lehr i sar. 1992), kao i od stepena deacetilovanja hitozana (jače vezivanje ostvaruju hitozani sa većim stepenom deacetilovanja) (Schnürch i sar. 1998; Genta i sar. 1999). Kod umreženih hitozanskih hidrogelova, vezivanje za mukoadhezivni sloj je jače ukoliko je umreženje slabije, tj. ukoliko je veći broj slobodnih amino grupa (He i sar. 1988).

5.1.2.3. Efekat olakšavanja permeacije

Hitozan kao material za inkapsulaciju je veoma atraktivan za dostavu aktivnih supstanci na bazi peptida, jer olakšava njihovu apsorpciju kroz mukozni epitel (Illum i sar. 1994; Lueßen i sar. 1996; Kotze i sar. 1997). Naime, pozitivno naelektrisanje hitozana ostvaruje reakcije sa ćelijskim membranama i na taj način dovodi do reorganizacije strukturnih proteina i slabljenja njihovih međusobnih interakcija (Schipper i sar. 1997). Takođe, u kombinaciji sa mukoadhezivnim svojstvima hitozana, koje omogućavaju duže zadržavanje bioaktivnih supstanci na ciljanom mestu delovanja, permeabilnost peptida se dodatno povećava (Lehr, 1996).

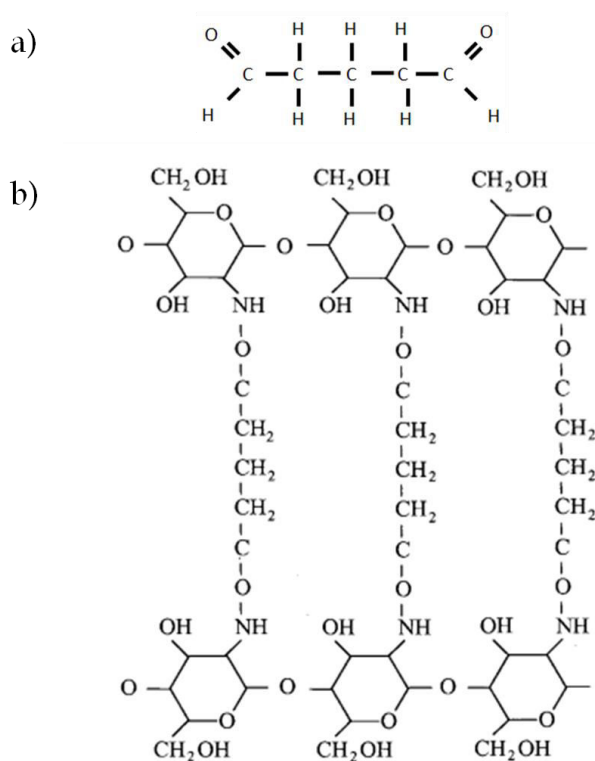
5.1.2.4. pH osetljivost

pH osetljivost hitozana počiva na velikom broju amino grupa u njegovom polimernom lancu. Naime, mehanizam pH-zavisnog bubrenja hitozana je posledica protonovanja amino grupa pri niskim pH vrednostima u okruženju; nakon protonovanja, dolazi do elektrostatickog odbijanja polimernih lanaca, difuzije protona i jona zajedno sa molekulima vode u unutrašnjost gela na bazi hitozana, kao i do disocijacije sekundarnih veza u polimernom lancu (Yao i sar. 1994). Na osnovu toga, hitozan je veoma atraktivan materijal za dostavu

aktivnih supstanci u želucu; ukoliko je ciljano mesto delovanja aktivne supstance tanko crevo, neophodne su modifikacije hitozana, npr. njegovo umrežavanje.

5.1.3. Umrežavanje hitozana glutaraldehidom

U cilju dobijanja hidrogelova hitozana sa modifikovanim/unapređenim karaktersitikama vrši se njegovo umrežavanje, koje u zavisnosti od korišćenog reagensa može biti hemijsko ili fizičko umrežavanje. Neki od najčešće korišćenih reagenasa za umrežavanje hitozana su jedinjenja iz grupe dialdehida, a posebno glutaraldehid (*Slika 1.11a*). Proces umrežavanja hitozana glutaradehidom podrazumeva kovalentno vezivanje aldehidnih grupa glutaraldehida za amino grupe hitozana (*Slika 1.11b*), pri čemu se ostvaruje hemijsko umreženje (Dini i sar. 2003).

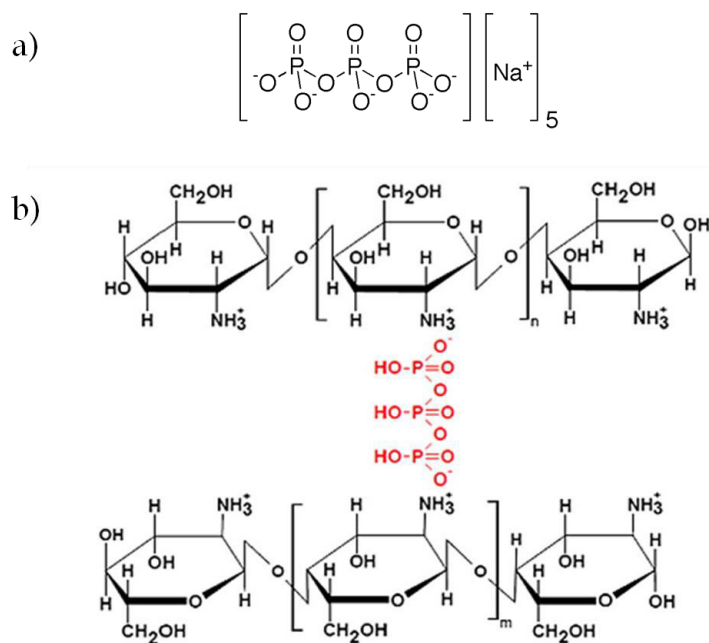


Slika 1.11. a) Hemijska struktura glutaradehida; b) Proces umrežavanja hitozana glutaraldehidom. (Gonçalves i sar. 2005).

Osnovni parametar kovalentno umreženih hidrogelova jeste stepen umreženja, od koga zavise karakteristike hidrogelova, poput mehaničke čvrstoće, bubrenja i otpuštanja inkapsulirane aktivne supstance. Obično, ovakvi hidrogelovi ispoljavaju pH zavisno bubrenje i otpuštanje aktivne supstance, procesom difuzije kroz poroznu strukturu hidrogela (Kanapczyk, 1994). Stoga se kovalentno umreženi hidrogelovi hitozana glutaraldehydom smatraju dobrim kandidatima za oralnu dostavu bioaktivnih supstanci (Basan i sar. 2002).

5.1.4. Umrežavanje hitozana natrijum-tripolifosfatom

Zahvaljujući prisustvu slobodnih amino grupa u lancu hitozana, koje u kiseloj sredini podležu protonovanju, hitozan ima sposobnost reagovanja sa dvo- ili više- valentnim anjonima (Sinha i sar. 2004). Natrijum-tripolifosfat (TPP) (*Slika 1.12a*) je jedan od anjona koji može da reaguje sa hitozanom, pri čemu nastaju jonski, tj. fizički umreženi hidrogelovi hitozana (*Slika 1.12b*).

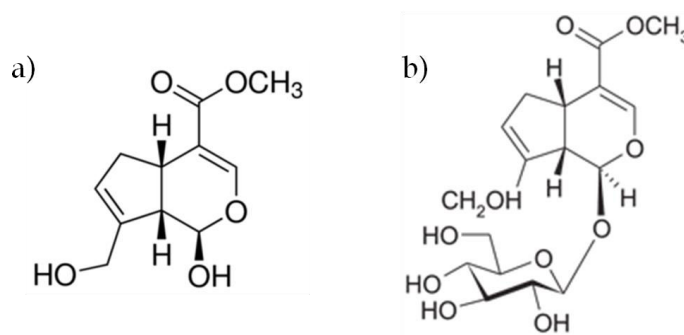


Slika 1.12. a) Hemijska struktura TPP-a; b) Proces umrežavanja hitozana TPP-om. (Kašpar i sar. 2013).

TPP je netoksičan multi-valentan anjon koji formira gel sa hitozanom, pri čemu se ostvaruju jonske interakcije između pozitivno naelektrisanih amino grupa hitozana i višestruko-negativno naelektrisanih TPP molekula (Mi i sar. 1999; Shu i Zhu, 2000). Mikročestice hitozana umrežene TPP-om ispoljavaju veću stabilnost i obezbeđuju sporije otpuštanje inkapsulirane aktivne komponente u odnosu na neumrežene mikročestice hitozana (Anal i sar. 2006).

5.1.5. Umrežavanje hitozana genipinom

Genipin se dobija iz genipozida, enzimskom hidrolizom uz korišćenje enzima glukozidaze. Hemijske strukture genipina i genipozida prikazane se na *Slici 1.13*. Glavni prirodni izvor genipozida su voćne vrste *Genipa americana* i *Gardenia jasminoides* Ellis. *Genipa Americana* raste u predelima tropske Amerike, od Meksika i Kariba do Argentine, gde se dosta uzgaja kako zbog hladovine koju krošnja drveta pruža, tako i zbog jestivih plodova, koji imaju ukus sličan ukusu dunja. *Gardenia jasminoides* se gaji na Dalekom Istoku, i već decenijama se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini (Butler i sar. 2003).

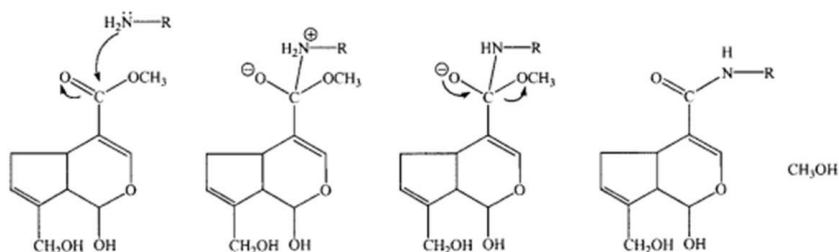


Slika 1.13. Hemijska struktura a) genipina i b) genipozida.

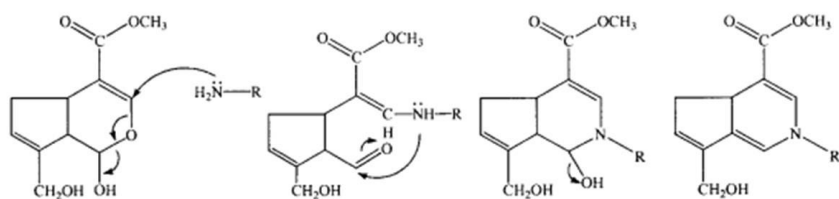
Umrežavanje hitozana genipinom se odvija preko dve reakcije koje uključuju dva različita mesta u molekulu genipina (Mi i sar. 2000; Butler i sar. 2003), što je prikazano na *Slici 1.14*. Reakciona šema 1 predstavlja reakciju S_N2 nukleofilne

supstitucije, koja podrazumeva zamenu estarske grupe genipina sekundarnom amidnom vezom sa primarnim amino grupama hitozana (Mi i sar. 2001).

Reakciona šema 1



Reakciona šema 2



Slika 1.14. Reakcije umrežavanja koje uključuju genipin (Butler i sar. 2003).

Drugi mehanizam po kome se odigrava umrežavanje hitozana (Reakciona šema 2, *Slika 1.14*) započinje nukleofilnim napadom C3-ugljenika u molekulu genipina od strane primarne amino grupe, pri čemu nastaje intermedijarna aldehidna grupa. Zatim, dolazi do otvaranja di-hidro-piranskog prstena, koje je praćeno napadom formiranog sekundarnog amina (iz prvog stupnja reakcije) na aldehidnu grupu (Butler i sar. 2003). Pretpostavka je da se prilikom procesa umrežavanja hitozana genipinom najpre odigrava reakcija po Reakcionoj šemi 2, a potom reakcija predstavljena Reakcionom šemom 1.

Hidrogelovi dobijeni umrežavanjem hitozana genipinom imaju superiorne karakteristike u odnosu na neumrežene hidrogelove hitozana: usporavaju degradaciju matrice i omogućavaju produženo otpuštanje inkapsulirane aktivne supstance, pri čemu genipin nije citotoksičan poput glutaraldehida (Jin i sar. 2004; Mi i sar. 2001; 2006).

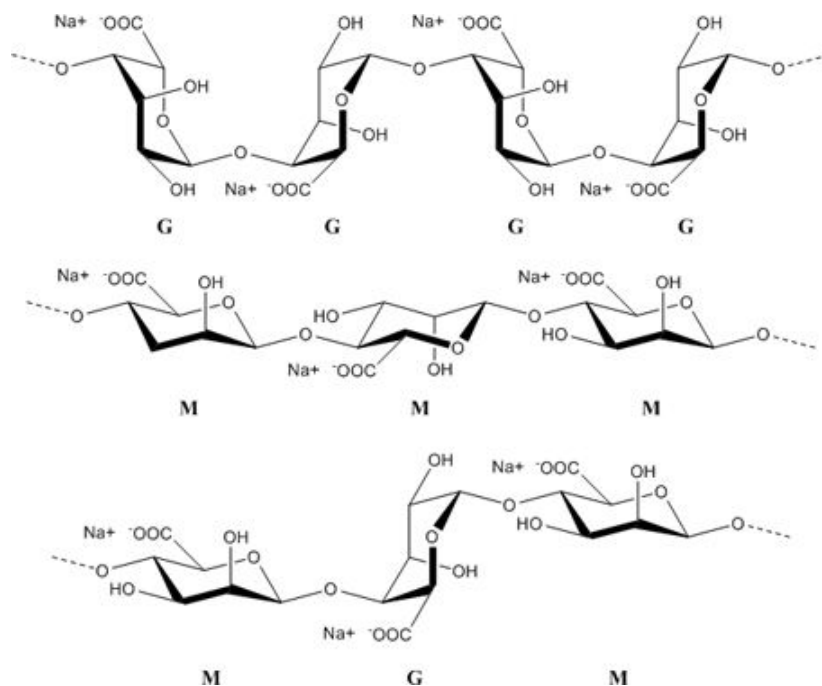
5.2. Alginat kao nosač za inkapsulaciju aktivnih supstanci

Najzastupljeniji alginat u prirodi je polisaharid iz smeđih morskih algi. 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 negrascens* i *Sargassum sp.* Alginat se nalazi u intercelularnom matriksu u obliku gela koji sadrži jone natrijuma, kalcijuma, magnezijuma, stroncijuma i barijuma. Osnovna funkcija alginata jeste da daje čvrstinu i savitljivost algama koja je neophodna za njihov rast u moru. Alginat (kao polisaharid) mogu sintetisati i *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas putida* gajeni u kontinualnim kulturama na glukozi i fruktozi kao izvorima ugljenika. Značajne količine alginata dobijene su i kontinualnim gajenjem imobilisane kulture *Azotobacter vinelandi* (Manojlović, 2008).

Alginat se kao materijal za inkapsulaciju koristi prvenstveno zbog svojih svojstava biokompatibilnosti, ali i zbog činjenice da povećava bioraspoloživost inkapsuliranih molekula zahvaljujući pre svega svojstvu mukoadhezivnosti (George i Abraham, 2006). Takođe, niska cena alginata čini ga primamljivim za industrijske aplikacije.

5.2.1. Hemijska struktura alginata

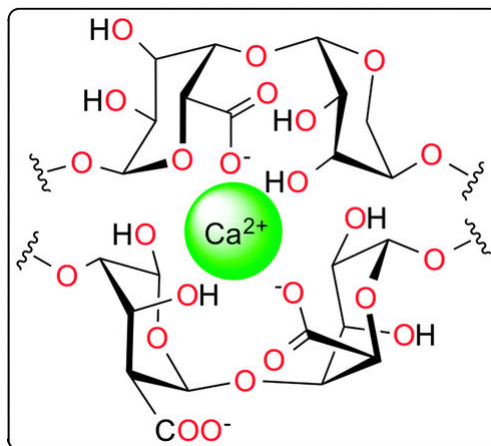
Alginati su linearni polisaharidi rastvorni u vodi i sastoje se od ostataka β -D-manuronske (M) i α -L-guluronske kiseline (G), koji su međusobno povezani 1,4'-glikozidnim vezama (Slika 1.15). U strukturi polimera postoje blokovi alternirajućih kopolimera (GMGMGM) i homopolimera (GGGGG i MMMMM) (Slika 1.15) (Manojlović i sar. 2005; Manojlović i sar. 2006; Pasparakis i Bouropoulos 2006).



Slika 1.15. Struktura natrijum alginata (G – guluronska kiselina; M – manuronska kiselina).

5.2.2. 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: $Pb^{2+} > Cu^{2+} = Ba^{2+} > Sr^{2+} > Cd^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$. Divalentni katjoni kao što su Ca^{2+} , Sr^{2+} i Ba^{2+} se u najvećoj meri vezuju za GG segmente, pogotovo za one u kojima je prisutno više od dvadeset monomera guluronske kiseline. Međusobno povezani ostaci guluronske kiseline obrazuju šupljinu u koju se smešta katjon. Na ovaj način nastaje polimerna mreža (*Slika 1.16*).



Slika 1.16. Vezivanje jona kalcijuma za ostatke guluronske kiseline međusobno povezane 1,4-glikozidnom vezom, tzv. „egg-box“ model.

Mikročestice se mogu dobiti ako se rastvor natrijum-alginata sa aktivnom komponentom, dodaje kap po kap u rastvor dvovalentnog jona metala. 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“). Po ovom modelu se dva ili više poliuronatnih lanaca međusobno vezuju stvarajući šupljine poput onih u kutiji za jaja za smeštanje dvovalentnih katjona (*Slika 1.16*).

Kalcijum reaguje sa α -L-guluronskim blokovima i umreženi blok može biti sastavljen od više od 20 monomernih ostataka. Gelovi na bazi alginata 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 (Manojlović 2008).

Alginati mogu da se talože ili formiraju gelove u kiseloj sredini. Vrednosti pK_a za manuronsku i guluronsku kiselinu su 3,38 i 3,65, redom, što kao rezultat daje da su alginati polianjoni pri neutralnoj pH vrednosti.

5.2.3. Karakteristike hidrogelova na bazi alginata

Difuzione karakteristike alginatnih čestica, veličina pora gela i njihova raspodela su važna karakteristika čestica sa aspekta njihove primene 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 (Martinsen i sar. 1989). Njihova veličina zavisi od koncentracije alginata, hemijske strukture gela i kinetike formiranja gela. Supstanca se kroz medijum i kroz spoljašnji film tečnosti koji okružuje česticu prenosi mehanizmima difuzije i konvekcije. Odavde se dalje prenosi mehanizmom difuzije kroz granični film tečnosti i površinu između tečne i čvrste faze, i konačno, kroz čvrstu fazu čestice gela. Koeficijent difuzije molekula kroz matricu gela opada sa porastom koncentracije alginata. Ako je struktura alginata sačinjena pretežno od G segmenata molekuli najbrže difunduju kroz matricu (Manojlović, 2008).

Karakteristike hidrogelova na bazi alginata, poput njihove biokompatibilnosti, su veoma važne sa aspekta primene. Poznato je da oralna administracija formulacija na bazi alginata ne izaziva nikakav imunološki odgovor organizma, pa se stoga smatra ne-toksičnim i biodegradabilnim pri oralnoj primeni (Espevik i sar. 1993). Takođe, formulacije na bazi alginata pogodne su i za intravenoznu primenu, imajući u vidu da alginat poseduje odgovarajuću hemokompatibilnost, a kako je hidrofilan, ne dolazi do brze razgradnje od strane mononuklearnih sistema fagocita nakon intravenozne administracije (Sebastian i sar. 2012); svakako dodatno prečišćavanje alginata, npr. procesima elektroforeze je preporučljivo (Mumper i sar. 1994). Alginat, kao

anjonski polimer sa karboksilnim grupama na krajevima lanca, ispoljava dobre bioadhezivne karakteristike (Kwok i sar. 1989; 1991), te stoga omogućava duže zadržavanje aktivne komponente na ciljanom mestu delovanja, što može doprineti boljoj apsorpciji aktivne komponente.

Sa aspekta otpuštanja aktivnih supstanci, hidrogelovi na bazi alginata zahvaljujući karakteristikama pH osetljivosti omogućavaju postizanje produženog/kontrolisanog otpuštanja aktivne supstance na ciljanom mestu delovanja. Naime, otpuštanje aktivnih supstanci pri niskim vrednostima pH je značajno smanjeno, što je prednost pri formulaciji oralnih sistema za dostavu aktivnih supstanci (Kim i Lee 1992; Sugawara i sar. 1994). Teorijski, hidrogelovi alginata se skupljaju pri niskim vrednostima pH (tj. u želucu), pri čemu ne dolazi do otpuštanja inkapsulirane aktivne komponente (Chen i sar. 2004). U želudačnom fluidu, hidratizani natrijum-alginat se prevodi u poroznu, nerastvornu alginsku kiselinu. Nakon prolaska kroz intestinalni deo GI trakta, sa višim vrednostima pH, alginska kiselina se prevodi u rastvorno, viskozno jedinjenje. Upravo ovo pH zavisno ponašanje alginata se može iskoristiti za projektovanje željenog profila otpuštanja aktivne supstance. Problem koji je neophodno pri tome prevazići jeste brzo raspadanje alginata pri većim pH vrednostima, što može dovesti do brzog inicijalnog otpuštanja aktivne komponente. To se najčešće postiže modifikacijama alginatne matrice, ili korišćenjem alginata u kombinaciji sa još nekim polimerom (George i Abraham, 2006).

5.3. Alginat-hitozan nosači za inkapsulaciju aktivnih supstanci

Hidrogelovi alginata kao nosači aktivnih komponenti imaju određene nedostatke. Jedan od njih jeste smanjena hemijska stabilnost alginata u prisustvu jedinjenja koja dovode do obrazovanja helatnih kompleksa. Tako je gel Ca-alginata osetljiv i hemijski nestabilan u prisustvu fosfata, citrata i laktata, kao i u prisustvu katjona Na^+ i Mg^{2+} . Dalje, problemi koji se vezuju za gelove na

bazi alginata ogledaju se u (i) „curenju“ aktivne komponente u toku procesa formiranja čestica (Won i sar. 2005) i (ii) brzom inicijalnom otpuštanju aktivne komponente (George i Abraham, 2006). Ove neželjene karakteristike hidrogela alginata posledica su velike veličine pora (Gombotz i Wee, 2012). Stoga se stabilizacija gela alginata i smanjenje njegove poroznosti postiže oblaganjem čestica alginata membranom drugog polimera; za te svrhe se mogu koristiti sintetski polimeri, polipeptidi ili organski polikatjoni, kao što je npr. hitozan. Čestice koje su obavijene membranom su otpornije u primeni *in vivo*, a imaju i izmenjene difuzione karakteristike s obzirom da je smanjena poroznost gela (Huguet i Dellacherie, 1996; Pasparakis i Bouropoulos, 2006; Yu i Yin, 2009).

5.3.1. Karakteristike hidrogelova alginat- hitozan

Nakon mešanja alginata i hitozana, karboksilne grupe alginata ostvaruju jonske veze sa amino grupama hitozana, formirajući na taj način polielektrolitni kompleks. Ovako dobijeni kompleksni hidrogelovi imaju smanjenu poroznost u poređenju sa hidrogelom alginata, a ispoljavaju i smanjeno neželjeno „curenje“ inkapsulirane aktivne komponente (George i Abraham, 2006). Različiti faktori utiču na karakteristike hidrogelova alginat-hitozan. Molekulska masa i stepen deacetilovanja hitozana, kao i sastav alginata su neki od njih (Polk i sar. 1994; Gåserød i sar. 1998; Kim i sar. 1999). Tako, međusobno vezivanje alginata i hitozana je bolje ukoliko je molekulska masa hitozana ispod 20000 Da, a poroznost hidrogela alginata veća (Gåserød i sar. 1998). Takođe, jači polielektrolitni kompleksni hidrogel se dobija pri manjem udelu *N*-acetilovane frakcije u hitozanskom lancu, i pri pH vrednostima između 4 i 6.

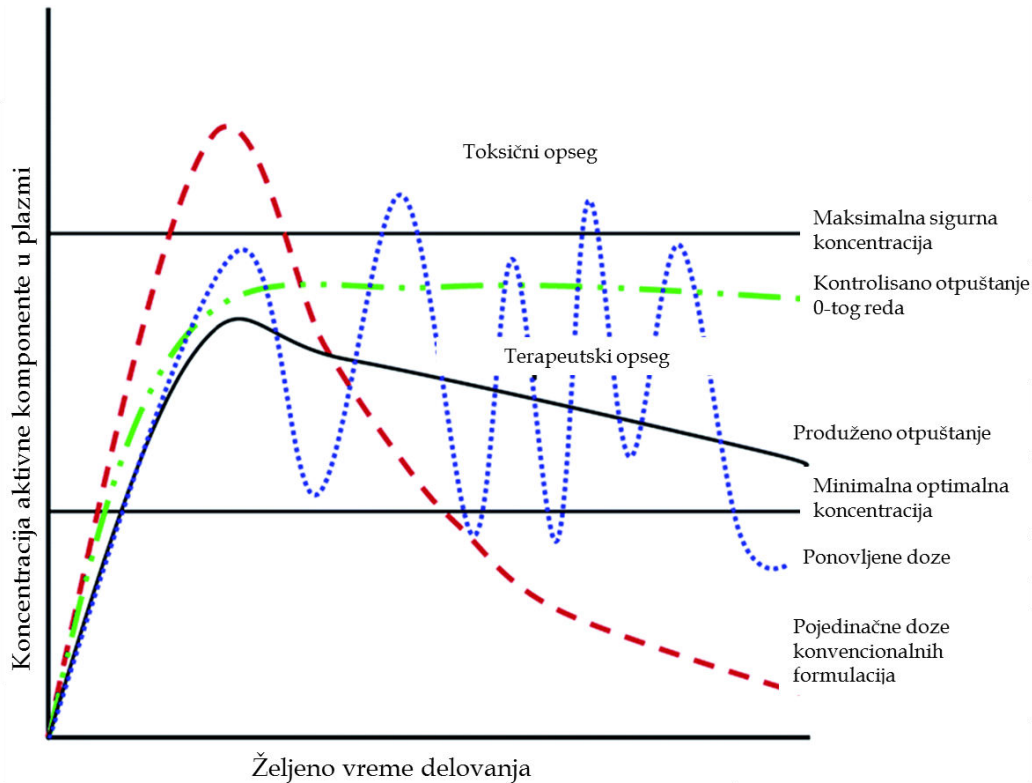
Hidrogel kompleksi na bazi alginata i hitozana se sve više koriste u sistemima za kontrolisano otpuštanje (Ramadas i sar. 2000; Vandenberg i sar. 2001; Mi i sar. 2002; Belščak-Cvitanović i sar. 2011; Trifković i sar. 2012). Kako ispoljavaju pH-osetljivo ponašanje, hidrogelovi alginat-hitozan su pogodni za oralnu administraciju aktivnih supstanci (Hari i sar. 1996). Hidrogelovi na bazi

aginata imaju sposobnost skupljanja pri niskim vrednostima pH, dok se pri visokim vrednostima pH rastvaraju; sa druge strane, hidrogelovi na bazi hitozana su nestabilni pri niskim vrednostima pH, dok su u uslovima visokih pH vrednosti nerastvorni (George i Abraham, 2006). Stoga, imajući na umu ograničenja pojedinačnih hidrogelova na bazi alginata i hitozana, njihova kombinacija pruža niz prednosti: alginatna mreža sprečava rastvaranje hitozana pri niskim vrednostima pH, dok pri višim pH vrednostima hitozan sprečava rastvaranje alginata.

6. Kontrolisano otpuštanje

Sistemi za kontrolisano otpuštanje aktivne komponente prvenstveno su razvijani u oblasti medicine, sa ciljem dostave aktivne forme leka u koncentraciji neophodnoj za postizanje farmakološkog dejstva (Shilpa i sar. 2003). Naime, upotrebom klasičnih formi lekova, poput kapsula, pilula, tableta, injekcija ili krema, može doći do pojave neželjenih efekata u organizmu izazvanih prekoračenjem dozvoljene koncentracije leka. Sa druge strane, u nekim slučajevima dolazi do izostanka farmakološkog dejstva leka usled njegove nedovoljne koncentracije na ciljanom mestu dejstva. Zbog svega navedenog, pojavila se potreba za razvojem sistema koji će prvenstveno omogućiti optimalnu koncentraciju leka, a zatim i njegovu dostavu u adekvatnoj koncentraciji na ciljanom mestu dejstva.

Danas, termin kontrolisano otpuštanje se ne vezuje isključivo za medicinu i dostavu lekova, već se sve češće sa ovim pojmom susrećemo i u formulaciji preparata namenjenih kozmetičkoj, ali i prehrambenoj industriji. Kontrolisano otpuštanje je termin pod kojim se podrazumeva u jednom slučaju ciljano otpuštanje aktivne komponente u tačno definisanom tkivu ili organu, a u drugom kontrola brzine otpuštanja te aktivne komponente. Ovakvi sistemi za dostavu aktivnih supstanci nude niz prednosti u poređenju sa konvencionalnim sistemima, i to: poboljšana efikasnost dostave aktivne supstance, smanjenja potencijalna toksičnost aktivne supstance, kao i poboljšana prihvatljivost od strane konzumenta/pacijenata, s obzirom da se jednom dozom sistema sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne komponente može zameniti nekoliko doza klasičnih farmaceutskih formi (Shilpa i sar. 2003) (*Slika 1.17*).



Slika 1.17. Profili otpuštanja aktivne komponente korišćenjem konvencionalnih sistema i sistema za kontrolisano otpuštanje.

Dosadašnjim istraživanjima razvijeno je nekoliko različitih sistema za otpuštanje aktivne komponente, i to (Pjanović, 2010):

1. *Sistemi sa unapred programiranom brzinom otpuštanja aktivne komponente.*
U ovakvim sistemima otpuštanje aktivne komponente je definisano njenom difuzijom iz sistema, odnosno izborom sistema koji kontroliše difuziju aktivne komponente, kao što je npr. geometrija sistema, debljina nosača ili njegov sastav. U ovakvim sistemima, difuzija se najčešće odvija po Fick-ovim zakonima. Poznato je da postoje četiri podgrupe sistema sa unapred programiranom brzinom otpuštanja aktivne komponente:
 - ~ sistemi kod kojih je otpuštanje aktivne komponente kontrolisano difuzijom kroz polimernu membranu,
 - ~ sistemi tipa poroznog matriksa,

- ~ hibridni sistemi (kombinacija prethodna dva sistema),
- ~ sistemi tipa mikrozervoara – inkapsulacija aktivne komponente u mikro- i nanočestice.

2. *Aktivaciono modulirani sistemi.*

U ovim sistemima oslobađanje aktivne komponente je aktivirano nekim spoljašnjim stimulansom, kao što je adekvatan fizički, hemijski ili biohemijski proces (na primer osmotski pritisak, promena pH vrednosti, enzimski aktivacija i sl), pri čemu se brzina otpuštanja aktivne komponente reguliše upravo primenjenim procesom.

3. *Sistemi regulisani mehanizmom povratne informacije*

Za ove sisteme je karakteristično da određeni biomolekuli predstavljaju neku vrstu „okidača“ koji inicira oslobađanje aktivne komponente, pri čemu je količina oslobođene aktivne komponente regulisana mehanizmom povratne informacije. U sastavu ovih sistema postoje senzori koji detektuju koncentraciju prisutnog biomolekula, pa se na osnovu te koncentracije reguliše i količina aktivne supstance koja će biti otpuštena.

4. *Sistemi sa tačno definisanim mestom dejstva (određeni organ ili tkivo)*

U principu, ovakvi sistemi se sastoje od aktivne komponente, nosača (tj. polimera) i dela koji će obezbediti vezivanje za željeno mesto dejstva, bilo da je reč o tkivima ili organima (antitela, protein, hormoni i sl.). Ovi sistemi su najslabiji od svih nabrojanih, te je njihova formulacija najkomplikovanija.

6.1. *Mehanizam prenosa mase u sistemima za kontrolisano otpuštanje*

Da bi aktivna komponenta koja je inkapsulirana u sistemima za kontrolisano otpuštanje ispoljila svoje pozitivno dejstvo na mestu delovanja, najpre mora doći do njenog prenosa iz unutrašnjosti sistema u organizam. Prvo dolazi do prenosa mase molekula aktivne supstance kroz polimerni nosač, tj. membranu čestice a zatim i kroz medijum u kom se odigrava otpuštanje aktivne komponente. Prenos mase aktivne supstance u uslovima kontrolisanog

otpuštanja se najčešće odvija mehanizmom molekulske difuzije. Ovakav prenos mase aktivne komponente teorijski se može okarakterisati kao proces stacionarne difuzije i opisati Prvim Fick-ovim zakonom:

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial z} \quad (1)$$

gde je C koncentracija aktivne komponente koja difunduje, a z je rastojanje u pravcu prenosa mase. D je koeficijent difuzije i predstavlja karakteristiku sistema u kome se odvija difuzija. Znak minus u jednačini pokazuje da se difuzija odvija u smeru opadanja koncentracije.

Međutim, u realnim sistemima sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne komponente mehanizam prenosa mase se najčešće odvija procesom nestacionarne difuzije, koja je se opisuje Drugim Fick-ovim zakonom:

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

Kako bi se sistemi za kontrolisano otpuštanje što adekvatnije formulisali, neophodno je poznavati kinetiku otpuštanja aktivne komponente. U idealnom slučaju, otpuštanje aktivne komponente iz ovih sistema bi se odvijalo kinetikom nultog reda, što podrazumeva konstantno otpuštanje aktivne komponente u toku određenog vremenskog perioda. Ipak, u većini sistema za kontrolisano otpuštanje difuzija aktivne komponente u početnom periodu (do 60% oslobođene aktivne komponente) proporcionalna je kvadratnom korenu vremena - \sqrt{t} , pri čemu je ova zavisnost karakteristika molekulske difuzije u homogenim, čvrstim sistemima (Crank 1975; Peppas 1985). Ukoliko je nosač aktivne komponente polimer može doći do apsorpcije vode i povećanja njegove zapremine, što za posledicu ima promenu strukture i poroznosti polimera, a samim tim i promenu brzine difuzije. U ovakvim slučajevima dolazi do relaksacije polimera pa je difuzija aktivne komponente iz polimera znatno brža.

Ekstremni slučaj otpuštanja aktivne komponente jeste kada je brzina difuzije duplo brža od difuzije po Fick-ovom zakonu, i ovakav vid prenosa mase naziva se „Case II” mehanizam otpuštanja (Peppas 1985; Ritger i Peppas, 1987a; 1987b). Pri tome, Peppas (1985) je ukazao na činjenicu da se mehanizam prenosa, tj. brzina difuzije (prema koeficijentu n iz jednačine (3)) razlikuje bitno ukoliko je reč o različitim geometrijama sistema za kontrolisano otpuštanje (Tabela 1.3). Slučajevi između Fick-ove difuzije i „Case II” transporta nazivaju se anomalnom (ne-Fick-ovom) difuzijom (Peppas i Sahlin, 1989).

Tabela 1.3. Eksponent n (jednačina (3)) i različiti mehanizmi difuzije. (Ritger i Peppas, 1987b) .

Eksponent difuzije, n			Mehanizam
Film	Cilindar	Sfera	
0,5	0,45	0,43	molekulska difuzija
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	anomalna difuzija
1	0,89	0,85	„Case II” (relaksacija)

6.2. Modeli za procenu mehanizma prenosa mase

Postoji veliki broj modela koji se mogu koristiti za procenu eksperimentalno dobijenih profila otpuštanja/bubrenja. Deo krive apsorpcije vode (odnosno krive otpuštanja polifenola) sa frakcionalnom apsorpcijom vode (odnosno desorpcijom polifenola) (M_t/M_∞) manjim od 0,6 se može analizirati Ritger-Pepass-ovom jednačinom stepenovanja (Ritger and Peppas, 1987a;b):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n \quad (3)$$

gde je M_t masa vode (polifenola) apsorbovana (otpuštena) u trenutku t , M_∞ je masa vode (polifenola) apsorbovana (otpuštena) u ravnotežnom stanju, k_1 je

konstanta karakteristična za hidrogel a n je karakteristični eksponent koji opisuje mehanizam prenosa.

Proporcionalnost između frakcione apsorpcije vode/otpuštanja polifenola i kvadratnog korena vremena apsorpcije/otpuštanja data je Higuchi-jevom jednačinom za vrednosti $M_t/M_\infty < 0.6$ (Higuchi, 1961):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_2 \sqrt{t} \quad (4)$$

gde je k_2 konstanta koja opisuje parametre sistema.

Jednačina otpuštanja za matriks sfernog oblika koji sadrži dispergovanu aktivnu komponentu izvedena je iz Higuchi-jevog modela od strane grupe autora (Baker i Lonsdale, 1974). Ovaj model podrazumeva dve pretpostavke: (1) da je aktivna komponenta uniformno dispergovana u matriksu, i (2) da je koncentracija aktivne komponente u matriksu veća od njene rastvorljivosti u istom matriksu:

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = k_3 t \quad (5)$$

Nakon što apsorpcija vode/otpuštanje aktivne komponente nadmaši 60%, može se pretpostaviti da je za duge vremenske periode proces apsorpcije/otpuštanja najvećim delom određen relaksacijom polimerne mreže, kao i da je to proces koji se odvija po mehanizmu reakcije prvog reda. U tom slučaju može biti primenjena Berens-Hopfenberg-ova diferencijalna jednačina za proces relaksacije (Berens i Hopfenberg, 1978):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - A \exp(-k_4 t) \quad (6)$$

gde je A konstanta modela, a k_4 je konstanta brzine relaksacije.

Za modelovanje celokupnog opsega eksperimentalnih podataka korišćen je model koji pretpostavlja brz inicijalni transport komonenata, koji je praćen vremenski-zavisnim procesom difuzije. Ovaj tzv. „burst model“ je dat sledećom jednačinom (Huang and Brazel, 2001):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_5 t^n + B \quad (7)$$

gde je k_5 pred-eksponencijalni faktor, n je eksponent koji se odnosi na transport, dok je B konstanta koja je uvedena u jednačinu kako bi se fitovali eksponencijalni podaci koji podrazumevaju brzo povećanje apsorpcije/otpuštanja na početku procesa.

Peppas i Sahlin (1989) su razvili model za slučaj anomalnog transporta, koji se odnosi na združene efekte Fick-ove difuzije i „Case II“ transporta. Ovaj model u literaturi je poznat kao Peppas-Sahlin-ova jednačina:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_6 t^m + k_7 t^{2m} \quad (8)$$

Prvi deo ove jednačine odnosi se na udeo Fick-ove difuzije, dok se drugi deo jednačine odnosi na udeo relaksacije makromolekulskih lanaca u ukupnom mehanizmu apsorpcije/otpuštanja.

Sledeći model se takođe zasniva na Peppas-Sahlin-ovoj jednačini, pri čemu eksponent m ima definisanu vrednost 0,5:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_8 t + k_9 t^{1/2} \quad (9)$$

Ova jednačina opisuje brzinu apsorpcije/otpuštanja, i to kao proces kontrolisan relaksacijom polimera - $k_8 t$ i proces kontrolisan difuzijom - $k_9 t^{1/2}$ (Peppas i Sahlin, 1989).

Weibull-ov model predstavlja alternativnu empirijsku jednačinu koja može biti korišćena da se opiše celokupan set eksperimentalnih podataka. Tro-parametarski Weibull-ov model je dat sledećom jednačinom (Karewicz et al. 2010):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = c(1 - \exp(-(k_{10}t)^d)) \quad (10)$$

gde su vrednosti parametra d indikatori mehanizma prenosa.

Na kraju, za procenu dobijenih eksperimentalnih podataka može se koristiti i Peleg-ov model, koji se generalno najviše koristi za opisivanje procesa apsorpcije u realnim uzorcima hrane. Jednačina koja sledi predstavlja jednačinu Peleg-ovog modela (Peleg, 1988):

$$\frac{M_t}{M_{dry\ gel}} = M_0 + \frac{t}{k_{11} + k_{12}t} \quad (11)$$

gde je M_0 sadržaj vode u trenutku $t=0$ ($g_{water}/g_{dry\ gel}$), $M_t/M_{dry\ gel}$ je sadržaj vode u bilo kom trenutku t ($g_{water}/g_{dry\ gel}$), t je vreme apsorpcije, k_{11} je kinetička konstanta modela ($\min \times g_{water}/g_{dry\ gel}$) a k_{12} je karakteristična konstanta modela ($g_{water}/g_{dry\ gel}$).



II EKSPERIMENTALNI DEO



7.1. Materijali

Kao izvor polifenola u ovom radu korišćena je herba majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.) (SERPYLII HERBA kontrolni broj: 08140315, Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd). Kao polimeri za inkapsulaciju korišćeni su natrijum-alginat srednje viskoznosti (Medium viscosity alginic acid sodium salt from brown algae, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i hitozan molekulske mase 100000-300000 Da (Acros Organic, SAD), dok su kao umreživači korišćeni su glutaraldehid (Sigma Aldrich Steinheim, Nemačka), zatim natrijum-tripolifosfat i genipin (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD). Kalcijum-hlorid di-hidrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Acros organics, SAD) korišćen je kao izvor jona Ca^{2+} u rastvoru za geliranje za tehniku elektrostatičke ekstruzije. Hemikalije neophodne za sintezu mikročestica postupkom emulziona polimerizacije su bile sledeće: itakonska kiselina (Fluka, Belgija), parafinsko ulje (Centrohem, Srbija) i Tween 80 (polioksietilen (20) sorbitan monooleat) (Riedel-de Haën, Nemačka). Za podešavanje pH vrednosti rastvora hitozana za pripremu sprej-sušenih čestica korišćena je glacijalna sirćetna kiselina (Zorka, Srbija). Folin-Ciocalteu reagens, 2,2'- azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-katjon) i 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), kao i rastvarači HPLC čistoće - metanol, acetonitril i mravlja kiselina su proizvodi kompanije Sigma Aldrich (St. Louis, SAD). Natrijum-dihidrogen fosfat di-hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), dinatrijum-hidrogen fosfat dodeka-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) (Lach- Ner, s.r.o., Češka), kalijum-hlorid (KCl) i hlorovodonična kiselina (HCl) su proizvodi kompanije Fluka (Nemačka) i korišćeni su za pripremu rastvora različite pH vrednosti za simulaciju uslova gastro-intestinalnog trakta. Veštačka pljuvačka je proizvod Apotekarske ustanove Beograd. Kalijum-persulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) i natrijum-karbonat (Na_2CO_3) su nabavljeni od Kemike (Zagreb, Hrvatska).

7.2. Priprema ekstrakta majčine dušice

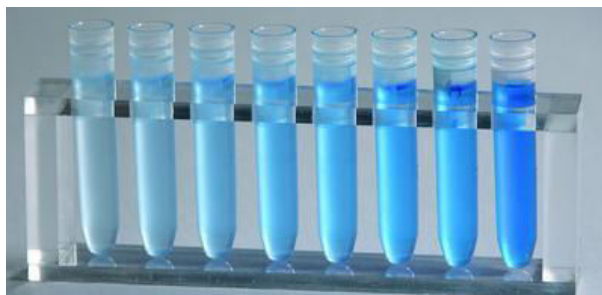
Ekstrakt majčine dušice pripremljen je metodom klasične vodene ekstrakcije. Masa od 10 g osušene i samlevene biljke prelivena je sa 200 ml ključale destilovane vode. Proces ekstrakcije izvođen je na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta, uz povremeno mešanje. Nakon toga, dobijeni ekstrakt je proceđen kroz medicinsku gazu.

7.3. Karakterizacija dobijenog ekstrakta

Kako bi se dobijeni ekstrakt što detaljnije okarakterisao, a u cilju što efikasnije inkapsulacije polifenolnih jedinjenja ekstrakta, kao i praćenja njihove stabilnosti nakon inkapsulacije, primenjeno je nekoliko metoda koje su opisane u nastavku teze.

7.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola (eng. Total Phenol Content, TPC) u ekstraktu majčine dušice određen je korišćenjem FC reagensa (eng. Folin-Cicalteu's, FC), prema modifikovanoj metodi Lachman-a i saradnika (1998). Naime, 0,1 ml uzorka je pipetirano u volumetrijski sud koji sadrži 6 ml destilovane vode. Nakon toga dodato je 0,5 ml FC reagensa, 1,5 ml natrijum-karbonata (20 mas.%) i zapremina je dopunjena do 10 ml dodavanjem 1,9 ml destilovane vode. Ovako pripremljen uzorak se čuva na tamnom mestu 2 h, a nakon toga se podvrgava spektrofotometrijskoj analizi. Absorbancije nastalog plavičastog obojenja (*Slika 2.1*) se očitavaju na talasnoj dužini od 765 nm, a kao slepa proba koristi se destilovana voda.



Slika 2. 1. Reakcija polifenola s Folin-Ciocalteu reagensom.

Sva spektrofotometrijska merenja su vršena na spektrofotometru (UV-Vis 1800, Shimadzu). Kao standard za konstruisanje kalibracione krive koristi se galna kiselina, a dobijeni rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (eng. Gallic Acid Equivalents, GAE) po litru ispitivanog uzorka. Sva merenja su ponovljena tri puta.

7.3.1.1. Izrada baždarne krive za FC metodu

Za izradu baždarne krive pripremljen je osnovni rastvor standardne galne kiseline u vodi, koncentracije 1000 mg/l, iz kog su zatim napravljena razblaženja rastvora galne kiseline u koncentracijama od 100, 200, 400, 600 i 800 mg/l. Zatim su korišćenjem dobijenih rastvorima galne kiseline pripremljeni uzorci prema proceduri opisanoj u odeljku 9.3.1 i nakon 2 h merena je njihova apsorbanca. Dobijene vrednosti apsorbanca su potom korišćene za konstruisanje kalibracione krive.

7.3.2. Analiza tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom

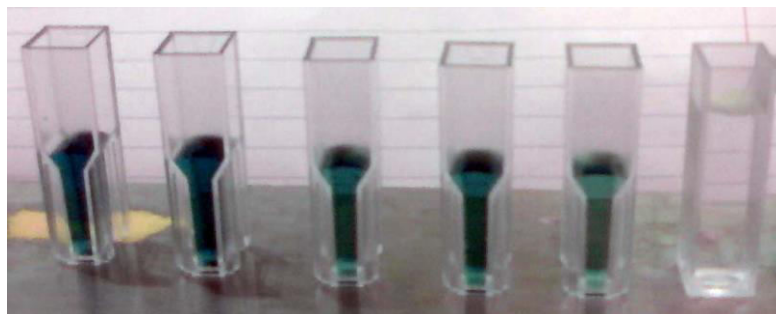
Ekstrakt majčine dušice podvrgnut je analizi tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) u cilju njegove kvalitativne karakterizacije, ali i kvantitativnog određivanja sadržaja pojedinih polifenolnih jedinjenja i grupa jedinjenja. Konkretno, HPLC-om je određen sadržaj kafeinske kiseline (eng. Caffeic Acid, CA), ruzmarinske kiseline

(eng. Rosmarinic Acid, RA), ukupnih flavonoida (eng. Total Flavonoids, TF), kao i ukupnih fenolnih kiselina (eng. Total Phenolic Acids, TPA). Za analizu je korišćen HPLC uređaj (Agilent series 1200 RR, Agilent, SAD) opremljen DAD detektorom (eng. Diode Array Detector), i reverznom analitičkom kolonom (250 × 4 mm² i 5 μm veličina čestica) (Lichrospher RP-18, Agilent, SAD). Mobilna faza sastojala se od rastvarača A (0,2% rastvor mravlje kiseline u vodi) i rastvarača B (acetonitril). Ekstrakti su kroz kolonu propuštani postepeno, prema sledećoj proceduri: 0-2 min 5-20% B, 2-20 min 20-55% B, 20-25 min 80% B, 25-27 min 80-100% B. Ubrizgavana je zapremina uzorka od 40 μl, pri protoku od 0,8 ml/min i talasnoj dužini od 280 i 330 nm. Identifikacija CA i RA bila je zasnovana na poređenju vremena zadržavanja u koloni i UV spektara sa odgovarajućim standardima, dok su TF identifikovani prema karakterističnim UV spektrima. Kvantifikacija CA i RA urađena je korišćenjem kalibracionih krivih odgovarajućih standarda. Detektovani TF su kvantifikovani kao ekvivalenti luteolin 7-glukozida. Sve analize su odrađene u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao mg/ml ekstrakta.

7.3.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativni kapacitet ekstrakta majčine dušice izražen je kao antioksidativni kapacitet ekvivalentan Trolox-u (eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC). TEAC je procenjen na osnovu testa obezbojavanja ABTS katjenskog radikala (Re i sar. 1999). Test je baziran na „gašenju“ stabilnog plavo-zelenog ABTS katjenskog radikala (ABTS^{•+}), koji nastaje kao proizvod hemijske oksidacije ABTS-a. Količina neutralisanog ABTS katjenskog radikala se prati merenjem smanjenja apsorbance. Ukratko, u cilju oksidacije ABTS-a u ABTS^{•+} 5 ml osnovnog rastvora ABTS-a (7 mM) je pomešano sa 88 μl kalijum-persulfata (140 mM), i skladišteno u mraku 12 do 16 h i na sobnoj temperaturi. Neposredno pred analizu, ABTS^{•+} rastvor se

razblažuje etanolom kako bi se postigla vrednost apsorbancije 0,700 (\pm 0,02), mereno na 734 nm.



Slika 2.2. Reakcija ABTS reagensa sa polifenolima.

Uzorak od 100 μ l ekstrakta majčine dušice se dodaje u 2 ml pripremljenog ABTS \bullet^+ rastvora. Tako pripremljen uzorak se drži na tamnom 6 min, kako bi došlo do neutralisanja ABTS radikalskog katjona, i usled toga smanjenja obojenja polaznog ABTS \bullet^+ rastvora (*Slika 2.2*). Apsorbanca novo-nastalog obojenja se meri spektrofotometrijski na 734 nm, nakon tačno 6 min. Dobijene vrednosti apsorbance se porede sa apsorbancom slepe probe koja se priprema dodatkom 100 μ l etanola u 2 ml ABTS \bullet^+ rastvora. Rezultati dobijeni iz tri merenja se izražavaju kao mmol Trolox/l ekstrakta.

7.3.3.1. Izrada baždarne krive za ABTS metodu

Za izradu baždarne krive pripremljen je osnovni rastvor Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-askorbinska kiselina), koncentracije 1 mM u etanolu. Iz pripremljenog osnovnog rastvora napravljeni su razblaženi rastvori Troloxa, koncentracija 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM i 0,8 mM. Nakon reakcije standardnih rastvora sa ABTS radikalom (100 μ l pripremljenog Trolox rastvora i 2 ml ABTS \bullet^+ rastvora) u trajanju od 6 min merene su vrednosti apsorbance, koje su zatim korišćene za konstruisanje kalibracione krive.

7.3.4. Određivanje sadržaja minerala

Koncentracije mineralnih elemenata u ekstraktu majčine dušice su određene korišćenjem metode indukovano spregnute plazme sa masenom spektrometrijom (eng. Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry). Za analizu je upotrebljen ICP-MS uređaj Agilent 7500ce sa oktopolnom reakcionom ćelijom (eng. Octopole Reaction System - ORS), a merenja su vršena u modu za merenje tačnih koncentracija elemenata (eng. FullQuant mode). Kalibracija ICP-MS instrumenta je urađena korišćenjem Fluka Multielement Standard Solution IV, sa 6 standardnih rastvora. Standardni rastvori i slepe probe su pripremljeni sa 2 vol.% HNO₃. U zavisnosti od merenja koncentracije pojedinih elemenata u uzorku i kalibracije instrumenta, uzorak je takođe razblaživan sa 2 vol.% HNO₃. Granice detekcije za elemente Al, As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr, V, Zn su 0,040; 0,015; 0,012; 0,002; 0,015; 0,001; 0,005; 4,100; 0,098; 0,022; 0,005; 0,163; 0,001; 0,200 µg/l, redom. Referentni materijal NIST 1643e (Trace elements in water - National Institute of Standards and Technology) je korišćen za određivanje preciznosti merenja koncentracija elemenata u uzorcima. Dobijena su dobra poklapanja između referentnih i eksperimentalno određenih vrednosti koncentracija (90-110 %).

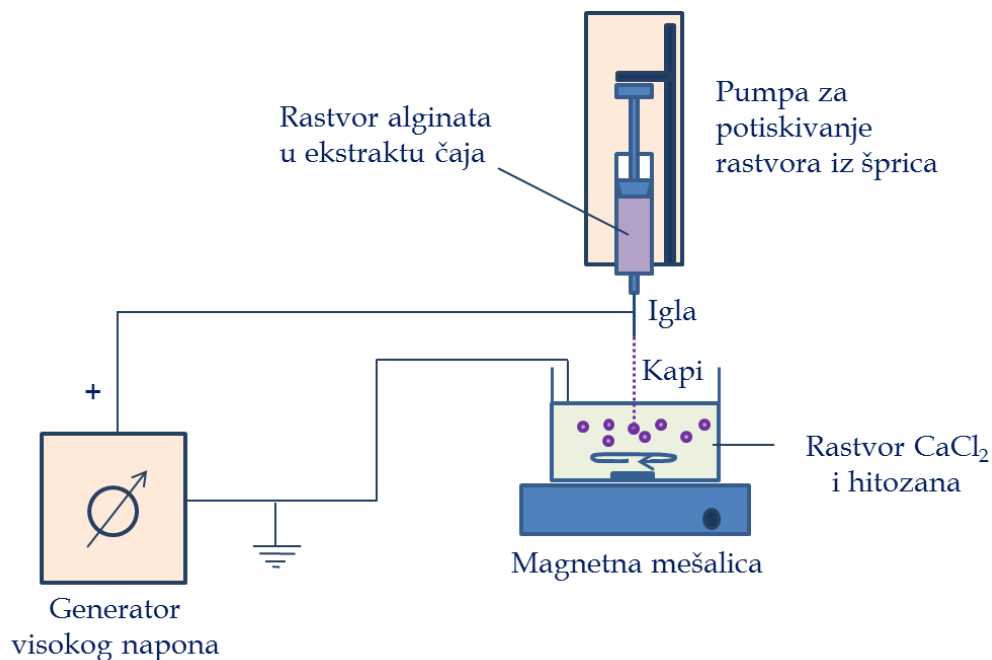
Neposredno pred merenje, ekstrakt majčine dušice je filtriran na filteru poroznosti 0,45 µm, kako bi se odstranile eventualno prisutne nečistoće, koje bi mogle dovesti do začepjenja cevčica na sistemu za unošenje uzoraka u instrument. Takođe, izvršena je i provera pH vrednosti uzoraka, sa ciljem da se pH vrednost ekstrakta podesi ispod pH vrednosti 2.

7.4. Inkapsulacija polifenola majčine dušice u hidrogelove

Inkapsulacija polifenola majčine dušice u hidrogelove na bazi hitozana urađena je na dva načina. Prvi način, tzv. „*in situ*” inkapsulacija podrazumeva istovremenu pripremu hidrogelova i inkapsulaciju polifenola. To se postiže direktnim rastvaranjem polimera u ekstraktu čaja, a zatim se tako dobijeni rastvor podvrgava daljem procesuiranju, odnosno pripremi hidrogelova. Drugi način, tzv. „*post-loading*” podrazumeva pripremu praznih hidrogelova i naknadnu inkapsulaciju polifenola. U ovom slučaju, prazni hidrogelovi – tzv. „*ready-made support*” se potapaju u ekstrakt majčine dušice određeni vremenski period (obično 24 h). U toku tog vremena polifenoli bivaju absorbovani od strane hidrogela. Ovaj način inkapsulacije poznat kao inkapsulacija bubrenjem.

7.5. Priprema mikročestica alginat-hitozan

Mikročestice alginat-hitozan dobijene su metodom elektrostatičke ekstruzije (*Slika 2.3*). Rastvor alginata (1,5 mas.%) je pripremljen rastvaranjem natrijum-alginata srednje viskoznosti u prethodno pripremljenom ekstraktu majčine dušice, na sobnoj temperaturi i uz mešanje preko noći. Dobro homogenizovana smeša se uzima špricom od 10 ml, sa metalnom iglom tupog vrha i prečnika 23 G. Špric se postavlja u infuzionu pumpu (Razel, Scientific Instruments, Stamford, SAD), a igla šprica se povezuje sa generatorom visokog napona (Model 30R, Bertan Associates, Inc., Njujork, SAD) preko pozitivne elektrode. Nakon povezivanja uzemljenja sa rastvorom za geliranje, primenjuje se visoki napon, u cilju stvaranja razlike potencijala između vrha igle i rastvora za geliranje (rastojanje između vrha igle i rastvora za geliranje je bilo 3 cm).



Slika 2. 3. Šematski prikaz eksperimentalne aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije.

Rastvor alginata u ekstraktu majčine dušice protisnut je kroz špic protokom od 39.3 ml/h i pri naponu od 6 kV, a dobijene kapljice su prikupljane u rastvoru za geliranje, prema metodi opisanoj u literaturi (Gonzalez-Rodriguez i sar. 2002). Kao rastvor za geliranje korišćen je 2 mas.% kalcijum-hlorid i 0,5 mas.% hitozan, rastvoreni u prethodno pripremljenom ekstraktu majčine dušice, koji je sadržao 2 mas.% askorbinske kiseline (regulator kiselosti). Dobijene mikročestice alginat-hitozan (Alg/Ch) su mešane u rastvoru za geliranje dodatnih 15 min kako bi očvrstnule, a nakon toga skladištene u rastvoru za geliranje, na temperaturi od 4°C i na tamnom mestu.

7.6. Priprema mikročestica hitozana

Mikročestice hitozana različitog sastava dobijane su uz pomoć nekoliko metoda.

7.6.1. Priprema mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom

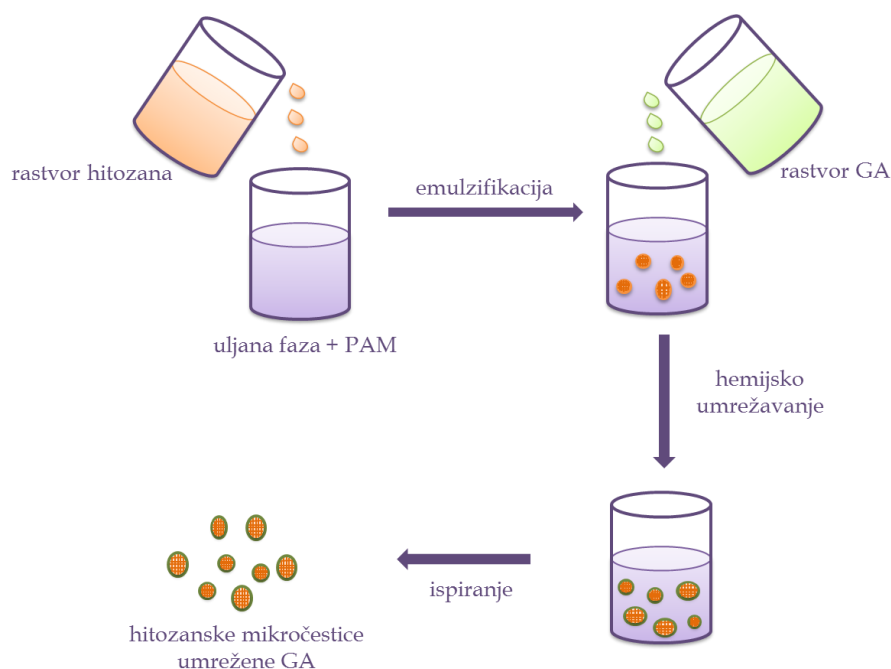
Mikročestice hitozana umrežene glutaraldehydom (GA) sintetisane su metodom inverzne emulzije polimerizacije. Vodena faza emulzije pripremljena je dodatkom hitozana (1,5 -3 mas.%) u 5 ml rastvora itakonske kiseline (7,5 mas.%), dok se uljana faza sastojala od 50 ml parafinskog ulja u kome je rastvoren Tween 80 (2 vol.%) kao emulgator. Vodena faza je ukapavana u uljanu fazu u odnosu 1:10. Nakon homogenizacije, dodat je rastvor GA (0,1-0,4 zap.%) kap po kap, a mešanje je nastavljeno u naredna 24 h. U zavisnosti od sadržaja hitozana i GA dobijene su mikročestice različitog sastava, što je prikazano u *Tabeli 2.1.*

Tabela 2.1. Mikročestice hitozana umrežene GA – skraćenice i sastav.

Uzorak	Ch (mas.%)	GA (vol.%)	GA/Ch (maseni odnos)
M _{GA1}	1,5	0,2	0,60
M _{GA2}		0,4	1,20
M _{GA3}	2,0	0,1	0,23
M _{GA4}		0,2	0,45
M _{GA5}		0,4	0,90
M _{GA6}	3,0	0,1	0,15
M _{GA7}		0,2	0,30
M _{GA8}		0,4	0,60

Kako bi se uklonili neproreagovali monomeri i površinski aktivne materije, dobijene mikročestice su ispirane velikom zapreminom vode, a potom i takođe velikom zapreminom destilovane vode, etanola i petrol-etra, redom. Nakon ispiranja, mikročestice su sušene u sušnici na 37°C u toku 48 h, a zatim

skladištene u eksikatorima na 25°C. Skica metode inverzne emulzione polimerizacije kojom su dobijene mikročestice hitozana umrežene GA data je na *Slici 2.4.*



Slika 2.4. Dobijanje mikročestica hitozana umreženih GA metodom inverzne emulzione polimerizacije.

7.6.2. Priprema mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom

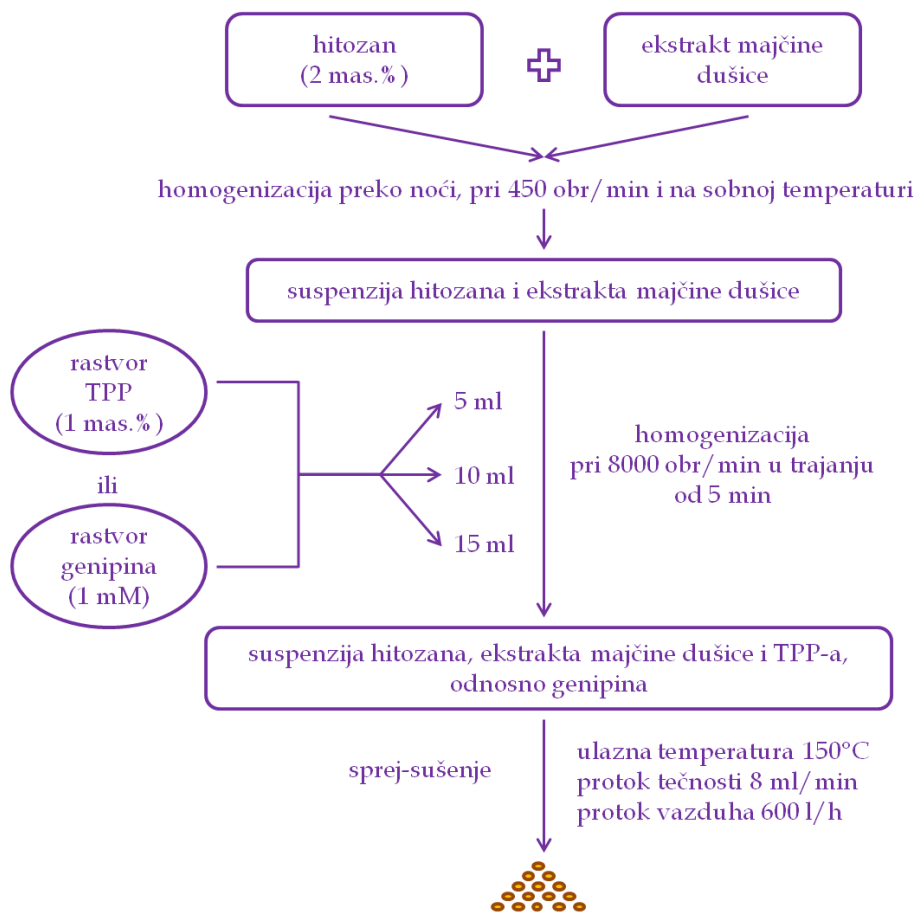
Mikročestice hitozana umrežene TPP-om dobijene su metodom sprej-sušenja. Rastvor hitozana (2 mas.%) pripremljen je rastvaranjem hitozana u 200 ml vode (za pripremu praznih mikročestica hitozana), odnosno u 200 ml prethodno pripremljenog ekstrakta majčine dušice (za pripremu mikročestica hitozana sa inkapsuliranim polifenolima), mešanjem preko noći, pri 450 obr/min i na sobnoj temperaturi. pH pripremljenih rastvora hitozana regulisana je dodavanjem sirćetne kiseline (1 vol.%). Kao umreživač korišćen je 1 mas.% rastvor TPP-a. Različite zapremine rastvora TPP-a (5, 10 i 15 ml) dodavane su rastvoru hitozana, uz konstantno mešanje u trajanju od 5 min i pri

brzini od 8000 obrt/min, korišćenjem *Ultraturrax* mešalice (T25, Ika Instruments, Nemačka). Nakon homogenizacije, hitozan-TPP odnosno hitozan-TPP-polifenolna suspenzija je podvrgnuta sprej-sušenju, kako bi se dobile mikročestice hitozana umrežene TPP-om, prazne ili sa inkapsuliranim polifenolima. U *Tabli 2.2* dat je prikaz svih uzoraka mikročestica hitozana umreženih TPP-om.

Tabela 2.2. Mikročestice hitozana umrežene TPP – skraćenice i sastav.

Uzorak	Inkapsulacija	Ch (mas.%)	1 mas% TPP (ml)
M _{TPP1a}			5
M _{TPP2a}	„ <i>In-situ</i> “	2	10
M _{TPP3a}			15
M _{TPP1b}			5
M _{TPP2b}	„ <i>Post-loading</i> “	2	10
M _{TPP3b}			15

Sprej-sušenje je izvedeno korišćenjem Buchi sprej-sušača (Büchi mini B-290, Büchi Labortechnik AG, Švajcarska), sa mlaznicom prečnika 0,7 mm. Uslovi sprej-sušenja su bili sledeći: ulazna i izlazna temperatura $150 \pm 3^{\circ}\text{C}$ i $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$, redom, zatim protok rastvora 8 ml/min, protok vazduha 600 l/h i pritisak atomizacije 0,55 bar. Nakon dopremanja rastvora do mlaznice korišćenjem peristaltičke pumpe, dolazi do procesa atomizacije i „kidanja“ mlaza tečnosti u male kapi, kao posledica dejstva komprimovanog vazduha. Novonastale kapi, zajedno sa vrućim vazduhom se prenose u komoru gde dolazi do isparavanja rastvarača iz kapljica i njegovog izvođenja iz sistema preko izduvne cevi. Osušene mikročestice se potom prikupljaju u posebnoj posudi. *Slika 2.5* prikazuje postupak dobijanja mikročestica sa inkapsuliranim ekstraktom polifenola procesom sprej-sušenja.



Mikročestice hitozana umrežene TPP-om (genipinom) sa inkapsuliranim polifenolima

Slika 2.5. Proces dobijanja mikročestica hitozana metodom sprej-sušenja.

7.6.3. Priprema mikročestica hitozana umreženih genipinom

Mikročestice hitozana umrežene genipinom sa inkapsuliranim polifenolima se takođe dobijaju metodom sprej-sušenja. Postupak je isti kao što je opisano u prethodnom odeljku, s tim što se kao umreživač koristi 1 mM rastvor genipina, i to 5, 10 i 15 ml. U *Tabeli 2.3* dat je tačan sastav mikročestica hitozana umreženih genipinom.

Tabela 2.3. Mikročestice hitozana umrežene genipinom – skraćenice i sastav.

Uzorak	Ch (mas.%)	1 mM Genipin (ml)
M _{GPN1}		5
M _{GPN2}	2	10
M _{GPN3}		15

7.7. Karakterizacija dobijenih mikroinkapsuliranih sistema

Pripremljeni hidrogelovi na bazi hitozana sa inkapsuliranim polifenolima su pre podvrgavanja pojedinim metodama karakterizacije najpre liofilizovani. Proces liofilizacije izvođen je korišćenjem liofilizatora *Freeze-Dryer*, BETA 2-8 LDplus, Martin CHRIST, i to prema sledećoj šemi: uzorci su prvo zamrzavani na niskim temperaturama (-80°C) u zamrzivaču sa dubokim zamrzavanjem (Elcold, Denmark), zatim je sledio postupak glavnog sušenja (tzv. „*main drying*“) na temperaturi od -60°C i pritisku od 0,011 mbar u trajanju od 24 h (u toku kog se iz uzorka uklanja slobodna voda) i na kraju su uzorci podvrgavani finalnom sušenja (tzv. „*final drying*“) na temperaturi od -75°C i pritisku od 0,0012 mbar, a u trajanju od 1 h (da bi se iz uzorka uklonila vezana i kapilarna voda). Detalji pojedinačnih metoda karakterizacije opisani su u nastavku rada.

7.7.1. Bubrenje mikroinkapsuliranih sistema na bazi hitozana

Bubrenje hidrogelova na bazi hitozana ispitivano je gravimetrijski, u različitim uslovima: (1) u simuliranim gastro-intestinalnim (GI) uslovima i (2) u vodi.

(1) Kako bi se simulirali uslovi temperature i pH u GI traktu, kao i prosečno vreme koje uneta hrana provodi u njemu, bubrenje hidrogelova je ispitivano na temperaturi od 37°C, potapanjem suvih hidrogelova u pufer pH vrednosti $2,20 \pm 0,01$ (HCl/KCl) u toku 2 h, da bi se odmah nakon toga uzorci hidrogelova prebacili u pufer pH vrednosti $6,80 \pm 0,01$ ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), naredna 22 h. U toku izvođenja eksperimenata,

uzorci u medijumu za bubrenje su blago mešani (150 obr/min), kako bi se simulirali pokreti gastro-intestinalnog trakta.

(2) Eksperimenti bubrenja uzoraka u vodi, rađeni su na 25°C u toku 2 h, takođe uz mešanje (150 obr/min), kako bi se pospešila difuzija.

U toku eksperimenata, masa uzoraka hidrogelova je merena u unapred određenim vremenskim intervalima, a sva merenja su vršena tri puta. Stepen bubrenja računat je prema jednačini:

$$q = \frac{w_t}{w_0} \quad (12)$$

dok je procenat bubrenja računat prema jednačini

$$S_w = \frac{(w_t - w_0)}{w_0} \times 100 \quad (13)$$

gde je w_t masa nabubrelog hidrogela u trenutku t , a w_0 masa suvog hidrogela (kserogel).

7.7.2. Veličina i raspodela veličina mikročestica

Veličina dobijenih mikročestica, kao i njihova raspodela veličina, određena je korišćenjem uređaja čiji se rad zasniva na difrakciji laserskih zraka, *Mastersizer 2000* (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), koji poseduje disperzionu jedinicu *Hydro 2000S*. Kao podaci za veličinu hitozanskih mikročestica dobijaju se njihovi prečnici, i to: D_{10} (prečnik mikročestica koji poseduje manje od 10% ukupnog broja čestica), D_{50} (prečnik mikročestica koji poseduje manje od 50% ukupnog broja čestica), D_{90} (prečnik mikročestica koji poseduje manje od 90% ukupnog broja čestica), zatim srednji prečnik čestica prema njihovoj zapremini (tzv. DeBroukere-ov srednji prečnik) i srednji prečnik čestica prema njihovoj površini (tzv. Sauter-ov srednji prečnik).

Raspodela veličina mikročestica okarakterisana je tzv. span faktorom, koji se računa prema sledećoj jednačini:

$$Span = \frac{(D_{90}-D_{10})}{D_{50}} \quad (14)$$

gde su D_{90} , D_{10} i već definisane veličine.

Izuzetno, veličina mikročestica alginat- hitozan određena je korišćenjem optičkog mikroskopa (Olympus UC 30, SAD). Srednji prečnici mikročestica (po zapremini) određeni su za čestice u vodi, pri čemu su mereni prečnici minimum deset čestica (Pham i sar. 2002). Softver *Image J* (National Institutes of Health, SAD) je korišćen za obradu dobijenih mikrografija. Veličina čestica je izražena kao srednji zapreminski prečnik (μm) \pm STDEV.

7.7.3. Optička mikroskopija i sferičnost mikročestica

Makroskopska struktura hidrogelova ispitivana je korišćenjem optičkog mikroskopa *Olympus CX41RF*, koji poseduje softver za analizu dobijenih mikrografija „*CellA*” (Olympus, Tokyo, Japan). Hidrogelovi su pod optičkim mikroskopom analizirani odmah nakon dobijanja (polimerni lanci u relaksiranom stanju) – prazni hidrogelovi, zatim u suvom obliku i na kraju u rehidratisanom obliku (suvi hidrogelovi potopljeni u pufer pH vrednosti $2,20 \pm 0,01$ do postizanja ravnotežnog stepena bubrenja).

Dobijene mikrografije korišćene su za računanje sferičnosti praznih mikročestica u hidrogel obliku, zatim suvih i rehidratiranih mikročestica prema jednačini iz literature (Chan, 2011):

$$Faktor\ sferičnosti\ (SF) = \frac{D_{max}-D_{per}}{D_{max}+D_{per}} \quad (15)$$

gde je D_{\max} najveći prečnik mikročestica, dok D_{per} predstavlja prečnik mikročestice normalan na D_{\max} .

Uticao procesa sušenja na sferičnost mikročestica je izražena kroz proračun smanjenja veličine čestica nakon sušenja, tj. računanjem faktora skupljanja (Chan i sar. 2011):

$$\text{Faktor skupljanja } (k_{SF}) = \frac{D_h - D_o}{D_h} \quad (16)$$

gde je D_h srednji prečnik mikročestica u nativnom obliku, a D_o srednji prečnik mikročestica posle sušenja.

7.7.4. Poroznost mikročestica

Poroznost mikročestica hitozana proučavana je određivanjem adsorpciono-desorpcionih izoterma azota pomoću uređaja *Micromeritics ASAP 2020* (Micromeritics Instrument Corporation, SAD). Uzorci hidrogelova su degasirani na 105°C u trajanju od 10 h i pri sniženom pritisku. Specifična površina uzoraka je računata prema metodi Brunauer-a, Emmett-a i Teller-aa (eng. Brunauer, Emmett, Teller - BET), iz lineranog dela adsorpcione izoterme azota. Ukupna zapremina pora je data pri $p/p_0 = 0,998$. Zapremina mezopora je računata prema metodi Barrett-a, Joyner-a i Halend-a, iz desorpcionog dela izoterme.

7.7.5. Površinska morfologija mikroinkapsuliranih sistema na bazi hitozana – skenirajuća elektronska mikroskopija

Površinska morfologija mikročestica ispitivana je pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (eng. Scanning Electron Microscopy, SEM) (*Tescan Mira3 XMU*, Cranberry Township, SAD). Uzorci hidrogelova su analizirani u tri oblika: kao prazni hidrogelovi, zatim u suvom i rehidratisanom obliku.

Neposredno pred SEM analizu, uzorci su napareni legurom zlata i platine (u odnosu 15:85, redom) u uslovima vakuuma, korišćenjem uređaja *Polaron SC502*.

Kako bi se analizirao poprečni presek mikročestica, razvijena je jednostavna metoda pravljenja alginatnog filma kao „nosača” mikročestica. Naime, suve mikročestice su pomešane sa 1,73 mas.% rastvorom natrijum-alginata, a zatim je smeša izlivena u petri šolju. Ovako izliveni filmovi su ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi u roku od 48 h. Osušeni filmovi su sečeni tako da se preseku i inkorporirane mikročestice, a zatim podvrgnuti pripremi za SEM analizu. Najpre su isecci filmova oblagani legurom zlata i platine pod sniženim pritiskom, a potom analizirani korišćenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa sa emisijom elektrona u polju (eng. Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM) (*TESCAN MIRA 3 XMU*, Brno, Češka), na 20 keV.

7.7.6. Naelektrisanje na površini mikročestica

Površinsko naelektrisanje mikročestica, tj. ζ -potencijal meren je po principu foton-korelacione spektroskopije, za šta je korišćen uređaj *Zetasizer Nano Series, Nano ZS* (Malvern Instruments Ltd.). Uzorci su pre analize razblaženi, i to ultracistom vodom (mikročestice hitozana umrežene TPP-om), odnosno apsolutnim etanolom (mikročestice umrežene genipinom) i sonicirani korišćenjem ultrazvučnog kupatila u trajanju od 4 min. Merenja su vršena na sobnoj temperaturi, pri čemu je svaki uzorak meren tri puta, a srednje vrednosti su prikazane kao rezultat.

7.7.7. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (eng. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) korišćena je kako bi se identifikovale veze između polimera i umreživača, kao i veze između polimera i inkapsuliranih polifenolnih jedinjenja iz ekstrakta majčine dušice. Analize su urađene korišćenjem *Bomem MB 100 FTIR* spektrofotometra. Oko 1 mg uzorka je samleveno i pomešano sa 50 mg kalijum-bromida, a zatim komprimovano u tabletu pri pritisku od 11 t i trajanju od 1 min, korišćenjem uređaja *Graseby Specac model: 15.011*. FTIR spektri su dobijeni u opsegu talasnih brojeva između 4000 i 400 cm^{-1} i pri rezoluciji od 4 cm^{-1} , na temperaturi od 25°C.

7.7.8. Kristaličnost mikročestica – rendgenska difrakciona analiza

Rendgenska difrakciona analiza (eng. X-Ray Diffraction analysis, XRD) korišćena je da bi se odredila kristaličnost dobijenih mikročestica. Suve mikročestice su analizirane difraktometrom *Rigaku Ultima IV*, korišćenjem $\text{CuK}\alpha$ zračenja ($\lambda = 1,4178 \text{ \AA}$), propuštenom kroz Ni-filter postavljen ispred detektora zračenja, pri brzini skeniranja od 5 °/min.

7.7.9. Određivanje mehaničkih karakteristika mikročestica

Mehaničke karakteristike čestica alginat-hitozan (srednji prečnik $2,48 \pm 0,14 \text{ mm}$) su određene metodom kompresije, korišćenjem uređaja *AG-Xplus Universal Testing Machine* (Shimadzu, Japan), opremljenog sa mernom ćelijom od 100 N. Eksperiment je izveden tako što je čestica potopljena u petri-šolju sa destilovanom vodom, a brzina kompresije je unapred definisana i podešena na 1 mm/min. Softver koji je korišćen za definisanje uslova testiranja i za obradu dobijenih podataka (*Trapezium X 1.13*, Shimadzu, Japan) je davao opciju korišćenja pred-test opcije, kako bi se neutralisao uticaj okolne vode na rezultujuće podatke sile i napona, kao i u cilju obezbeđivanja potpuno istih

uslova merenja za sve testirane čestice. Naime, u pred-test opciji definisana je sila od 0,1 N, što je omogućilo da merenje realne sile neophodne za postizanje zadatog procenta deformacije započne tek nakon postizanja početne sile od 0,1 N. Na ovaj način, neizvestnost stvarnog trenutka u kom merenje počinje, kao i uticaj kontaktne površine između kompresionog diska i same čestice su neutralisani. Kompresioni disk korišćen za merenja je čelični cilindar sa ravnim pločastim završetkom, velike kontaktne površine (prečnik 50 mm). Kompresija čestica je rađena do 30 % deformacije (odnos komprimovanog prečnika prema inicijalnom prečniku čestica). Sva merenja su rađena na 30 čestica i na sobnoj temperaturi.

7.8. Efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola u mikroinkapsuliranim sistemima

Sadržaj ukupnih polifenola (TPC) određen je korišćenjem FC reagensa, prema modifikovanoj metodi autora Lachman i sar. (1998), kao što je već objašnjeno u odeljku 7.3.1.

Efikasnost inkapsulacije (EE) je računata iz podataka o ukupnom sadržaju polifenola u mikročesticama i teorijskom sadržaju polifenola, kao što je prikazano u jednačini (17):

$$EE(\%) = \frac{TPC_e}{TPC_i} \quad (17)$$

gde je TPC_e ukupni sadržaj polifenola inkapsuliranih u hidrogelove, a TPC_i je ukupni sadržaj polifenola u početnom ekstraktu majčine dušice korišćenom za inkapsulaciju. TPC_e je računat kao razlika između ukupnog sadržaja polifenola (u početnom ekstraktu majčine dušice korišćenom za inkapsulaciju) i ukupnog sadržaja polifenola koji je preostao u ekstraktu nakon procesa inkapsulacije (odnosi se na proces inkapsulacije koji se odvija mehanizmom bubrenja hidrogelova u ekstraktu majčine dušice).

Kada su u pitanju mikročestice alginat-hitozan, TPC_e je određen rastvaranjem mikročestica u rastvoru natrijum-citrata (2 mas.%). Naime, mikročestice alginat-hitozan su homogenizovane sa rastvorom natrijum-citrata (u masenom odnosu 1:5) energičnim mešanjem u trajanju od 15 min, koristeći *Vortex EV-102* (Tehtnica Zelezniki, Slovenija), kako bi se rastvorile. Nakon toga, polifenolno-citratni rastvor je analiziran FC metodom, kao što je već objašnjeno u odeljku 7.3.1.

7.9. Otpuštanje polifenola iz mikroinkapsuliranih sistema

Otpuštanje polifenola iz suvih/liofilizovanih mikroinkapsuliranih sistema praćeno je u vodi na 25°C i u simuliranim gastro-intestinalnim (GI) uslovima, tj. u uslovima veštače pljuvačke (eng. artificial saliva), zatim u uslovima simulirane želudačne tečnosti (eng. Simulated Gastric Fluid, SGF) i na kraju u uslovima simuliranog intestinalnog fluida (eng. Simulated Intestinal Fluid, SIF), na 37°C. Oko 0,1 g uzorka je potopljeno u 10 ml medijuma za otpuštanje i mešano korišćenjem orbitalnog šejkera (pri brzini od 150 obr/min). U unapred definisanim vremenskim intervalima, uzimani su alikvoti uzorka i analiziran je sadržaj polifenola u njima. Otpuštanje u vodi je praćeno do 4 h. S druge strane, otpuštanje u SGF-SIF praćeno je prema sledećoj šemi: a) prva 2h u SGF-u, a zatim naredna 22 h u SIF-u (hidrogelovi su odmah prebačeni u odgovarajuću zapreminu SIF-a) ili b) prvih 15 min u veštačkoj pljuvački, zatim naredna 2 h u SGF-u, i na kraju u SIF-u, do ukupno 24 h.

Uzeti alikvoti uzoraka otpuštenih polifenola su dalje analizirani i sadržaj polifenolnih jedinjenja je određen na dva načina: spektrofotometrijski (FC metodom) i metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC); detalji svake metode dati su u odeljcima koji slede.

7.9.1. Otpuštanje polifenola – FC metoda

Količina otpuštenih polifenola u alikvotima je određena definisanjem TPC u njima, prema FC metodi, kao što je opisano u odeljku 7.3.1.

7.9.2. Otpuštanje polifenola – HPLC metoda

HPLC analiza uzoraka dobijenih iz eksperimenata otpuštanja rađena je u cilju određivanja sadržaja kafeinske kiseline (CA), ruzmarinske kiseline (RA) i ukupnih flavonoida (TF). HPLC metoda je urađena kao što je opisano u odeljku 7.3.2.

7.10. Određivanje zadržanog antioksidativnog kapaciteta polifenola nakon inkapsulacije

Antioksidativna aktivnost inkapsuliranih polifenola određena je analiziranjem vodenog medijuma u kome je vršeno otpuštanje polifenola iz mikroinkapsuliranih sistema. Ukratko, oko 0,1 g suvih mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima je potopljeno u 10 ml vode. Nakon 2 h otpuštanja polifenola, uzeto je 100 μ l uzorka, koji je zatim dodat u 2 ml razblaženog ABTS^{•+} rastvora (prema proceduri objašnjennoj u odeljku 7.3.3.). Apsorbanca nastalog kompleksa je očitana spektrofotometrijski na 734 nm nakon tačno 6 min. Vrednosti dobijene iz tri merenja su izražene kao μ mol Trolox/ g_{beads} .

7.11. Primena matematičkih modela na kinetiku bubrenja hidrogelova i otpuštanja polifenola

Eksperimentalno dobijeni profili otpuštanja/bubrenja su upoređeni sa nizom poznatih teorijskih, polu-empirijskih i empirijskih modela, prema jednačinama (3)-(11) koje su prikazane u teorijskom delu (odjeljak. 6.2).

Kao model koji najbolje opisuje karakteristike bubrenja uzoraka izabran je model sa najvećim R^2 koeficijentom, i sa najmanjim χ^2 i RMSE (Root Mean Square Error) vrednostima. Parametar modela RMSE je računat prema formuli:

$$RMSE = \frac{(\text{sum of squares residual})^{1/2}}{\text{regresion degrees of freedom}} \quad (16)$$

pri čemu su „sum of squares residual“ i „regresion degrees of freedom“ statistički parametri modela koji se softverski izračunavaju (*OriginPro 8.5*, OriginLab Corporation, Northampton, SAD).

7.12. Statistička obrada eksperimentalnih podataka

Svi eksperimenti su ponavljani minimum tri puta, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost sa standardnim devijacijama (STDEV). Tukey test je korišćen za određivanje značajne razlike između uzoraka, pri čemu je prag bio na nivou $p < 0,05$. Obrada eksperimenatlnih podataka je rađena korišćenjem softvera *Origin Pro 8.5* (OriginLab Corporation, Northampton, SAD) i *Microsoft Office Excel 2010* (Microsoft Corporation, WA, SAD).



III REZULTATI I DISKUSIJA



8. Karakterizacija ekstrakta majčine dušice

Da bi se neka biljna vrsta koristila u prehrambenoj industriji kao funkcionalni aditiv hrani neophodno je precizno utvrditi njen sastav. Poznavanje hemijskog sastava je važno i kako bi se procenio uticaj procesa pripreme i procesuiranja finalnog funkcionalnog prehrambenog proizvoda na osetljivi biljni materijal, imajući u vidu da se prehrambeni proizvodi često podvrgavaju agresivnim proizvodnim uslovima. Stoga je inicijalna karakterizacija ekstrakta majčine dušice u ovom radu izvršena određivanjem polifenolnog profila i sastava, antioksidativnog kapaciteta i sadržaja minerala.

8.1. Sadržaj ukupnih polifenola

Iako su u fokusu istraživanja najčešće esencijalna ulja lekovitog bilja, u poslednje vreme se posvećuje sve veća pažnja i njihovim ekstraktima. Međutim, malo istraživanja se sprovodi sa vodenim ekstraktima biljaka, već daleko više podataka ima o alkoholnim ekstraktima. Tako na primer, autori Jabri-Karoui i sar. (2012) su objavili ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu *Thymus capitatus* od 15 mgGAE/g suve droge, dok je sadržaj ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu jordanskog *T. capitatus* iznosio 31,1 mgGAE/g suve droge (Al-Mustafa i Al-Thunibat 2008). Slično tome, sadržaj ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu *Thymus vulgaris* grčkog porekla je iznosio 19,2 mgGAE/g suvog uzorka (Proestos i sar. 2005).

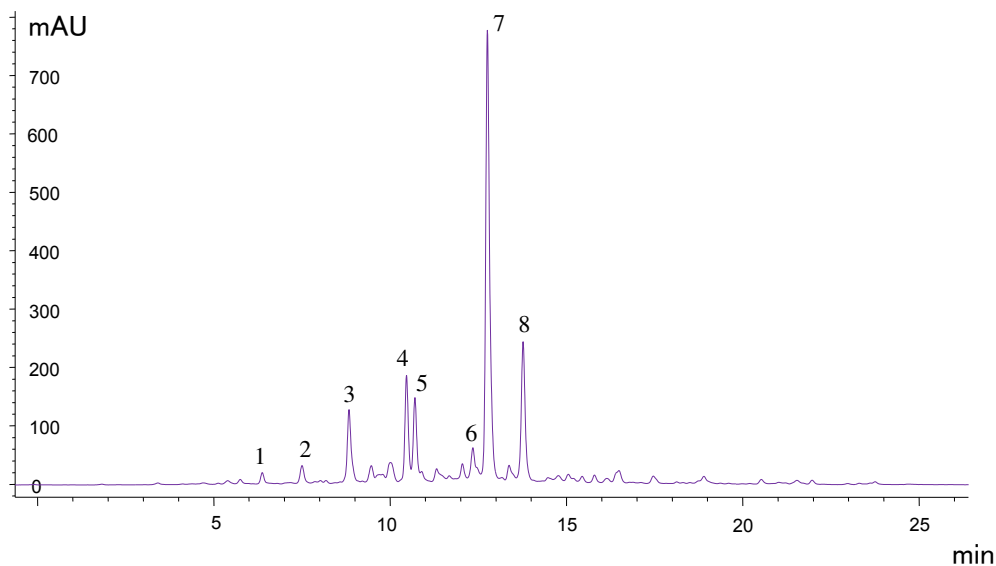
Tabela 3.1. Ukupan sadržaj polifenola u ekstraktu majčine dušice.

Ukupan sadržaj polifenola	mgGAE/ml ekstakta	mgGAE/g suve droge
Ekstrakt majčine dušice	2,40 ± 0,02	48,00 ± 0,27

Što se tiče tzv. divlje majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.), istraživanja su se do sada u najvećoj meri bazirala na esencijalnim uljima. Stoga se inovativnost ove doktorske disertacije u velikoj meri ogleda upravo u karakterizaciji i korišćenju vodenog ekstrakta majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.). Naime, pripremanjem vodenih ekstrakata zaobilaze se ekstrakcione procedure koje podrazumevaju upotrebu organskih rastvarača, najčešće metanola ili acetona, pa se time snižava cena procesa ekstrakcije i smanjuje negativan efekat na životnu sredinu. Kada govorimo o biljnom materijalu *Thymus serpyllum* L., najveći procenat polifenolnih komponenata je vodorastvoran, pa su dobijeni ekstrakti bogati polifenolima (sadržaj ukupnih polifenola – TPC u ekstraktu majčine dušice određen FC metodom prikazan je u *Tabeli 3.1*). Sličan rezultat za biljke iz porodice Lamiaceae su pokazali Dorman i sar. (2003), ističući prednost vodene ekstrakcije biljnog materijala, kao jednostavne i ekonomične procedure, koja ne zahteva upotrebu organskih rastvarača.

8.2. Analiza ekstrakta tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom

Na *Slici 3.1* prikazan je hromatogram vodenog ekstrakta majčine dušice. Kao što se može videti, najintenzivniji pik je od ruzmarinske kiseline, što je u saglasnosti i sa rezultatima kvantitativne analize (*Tabela 3.2*). Ovakav rezultat u skladu je sa prethodnim analizama u kojima je ispitivan sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u vodenim ekstraktima porodice *Lamiaceae* (Ollanketo i sar. 2002, Dorman i sar. 2003), kao i sa studijama koje su se odnosile konkretno na *Thymus serpyllum* L.) (Stojanović i sar. 2012).



Slika 3.1. HPLC hromatogram ekstrakta majčine dušice, pri čemu se pikovi odnose na: 1 - ukupne flavonoide (TF); 2 - kafeinsku kiselinu (CA); 3 - ukupne flavonoide (TF); 4 - ukupne flavonoide (TF); 5 - ukupne fenolne kiseline (TPA); 6 - ukupne flavonoide (TF); 7 - ruzmarinsku kiselinu (RA); 8 - ukupne fenolne kiseline (TPA).

Kada se uporede rezultati dobijeni kvantitativnom HPLC analizom vodenih i npr. metanolnih ekstrakata majčine dušice, može se zaključiti da su različita polifenolna jedinjenja dominantna. Bitno je naglasiti da se vodenom ekstrakcijom ne izdvaja frakcija isparljivih uljanih polifenolnih jedinjenja, koja uglavnom sadrži monoterenske derivate. Takođe, u ekstraktu dobijenom vodenom ekstrakcijom, diterpeni nisu prisutni (Ollanketo i sar. 2002). Najzastupljenija polifenolna komponenta je ruzmarinska kiselina, sa sadržajem od 5,67 mg/g suve droge. S druge strane, analize metanolnih ekstrakata majčine dušice pokazale su da je najzastupljenije polifenolno jedinjenje monoterpeniski derivat timol ($3,34 \pm 0,11$ mg/g), a zatim slede ferulna i galna kiselina ($1,74 \pm 0,05$ mg/g i $1,70 \pm 0,03$, redom) (Jabri-Karoui i sar. 2012).

Tabela 3.2. Sadržaj pojedinačnih komponentata u ekstraktu majčine dušice određen HPLC metodom.

Ekstrakt majčine dušice		µg/ml uzorka	mg/g suve droge
		<i>Ruzmarinska kiselina</i>	283,60 ± 1,51
	<i>Kafeinska kiselina</i>	3,10 ± 0,22	0,062 ± 0,005
	<i>Ukupni flavonoidi</i>	167,20 ± 1,10	3,34 ± 0,02

8.3. Antioksidativna aktivnost ekstrakta

Antioksidativna aktivnost sveže pripremljenog ekstrakta majčine dušice iznosi 2,0 mM Trolox (*Tabeli 3.3*).

Tabela 3.3. Antioksidativni kapacitet ekstrakta majčine dušice.

<i>Antioksidativni kapacitet</i>	mmol Trolox/l ekstrakta	µmol Trolox/g suve droge
<i>Ekstrakt majčine dušice</i>	2,00 ± 0,29	40,00 ± 2,21

S obzirom da je istraživanje antioksidativnog potencijala različitih biljnih vrsta veoma popularno, moguće je pronaći veliki broj literaturnih podataka o antioksidativnim aktivnostima ekstrakta majčine dušice. Tako su Dorman i sar. (2003) pokazali da antioksidativni kapacitet vrste *Thymus vulgaris* iz Poljske iznosi 6,1 ± 1,4 mmol/l Trolox. Slično tome, Wojdyło i sar. (2007) su ustanovili antioksidativni kapacitet takođe sorte *Thymus vulgaris* poreklom iz Poljske od 35,4 µmol Trolox u 100 g suve droge, što je nešto niži sadržaj kada se uporedi sa podacima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji (*Tabela 3.3*). Kada je ispitivana novozelandska vrsta *Thymus vulgaris* antioksidativni kapacitet je bio 38,07 mmol Trolox u 100 g biljke (Shan i sar. 2005). Stanojevic i sar. (2013) odredili su antioksidativni kapacitet vrste *Thymus serpyllum* iz Hrvatske od 8,60 ± 0,05 mM Trolox, što je nešto više od vrednosti dobijenih u ovom radu. Može se zaključiti da je antioksidativni kapacitet, uz ukupan sadržaj polifenola u ekstraktu,

funkcija ne samo postupka ekstrakcije, već i samog podneblja sa kojeg biljni materijal potiče.

8.4. Sadržaj minerala u ekstraktu

Rezultati dobijeni analizom sadržaja minerala pokazuju da ekstrakt majčine dušice sadrži različite koncentracije makro i mikro-nutrijenata, što u značajnoj mjeri doprinosi biološkom potencijalu i aktivnosti ekstrakta, na taj način dodatno opravdavajući njegovu upotrebu u formulisanju funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Sadržaj minerala u ekstraktu majčine dušice određen ICP-MS metodom prikazan je u *Tabeli 3.4.*

Tabela 3.4. Sadržaj minerala u ekstraktu majčine dušice.

<i>Mineral</i>	Koncentracija		<i>Mineral</i>	Koncentracija	
	mg/l ekstrakta	mg/g suve droge		µg/l ekstrakta	µg/g suve droge
Ca	66,34	1,33	Cu	94,00	1,88
Mg	31,00	0,620	Ni	62,00	1,24
Na	7,40	0,148	Zn	42,50	0,85
Mn	1,08	0,0216	Pb	10,75	0,215
Fe	0,972	0,0194	Co	6,90	0,138
Al	0,809	0,0162	Cr	4,68	0,0936
Ba	0,224	0,00448	V	3,46	0,0692
Sr	0,167	0,00334	Mo	1,80	0,0360
			As	0,71	0,0142
			Cd	0,55	0,0110
			Sb	0,36	0,0072

Kao što se iz *Tabele 3.4* može videti, ekstrakt majčine dušice je najbogatiji kalcijumom (66,34 mg/l ekstrakta). Kada se ova vrednost uporedi sa vrednostima iz literature može se zaključiti da je korišćeni ekstrakt sadrži manju koncentraciju kalcijuma (kao i ostalih minerala) od vrednosti prijavljenih u literaturi. Na primer, Arsenijević i sar. (2013) su izmerili 11,65 mg Ca u gramu suve droge *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*) (kada se količina Ca u ekstraktu iz ovog rada preračuna na g suve droge upotrebljen za pripremu ekstrakta dobija se vrednost od 1,33 mg/g, *Tabela 3.4*). Slično je i sa ostalim mineralima. Treba imati na umu da je ekstrakt u kome je određivan sadržaj minerala u principu ekstrakt koji je dalje korišćen za inkapsulaciju, tj. nikakva dodatna digestija same droge za ispitivanje sadržaja metala nije rađena. Ovakav pristup je izabran zbog činjenice da ekstrakt predstavlja polaznu sirovinu za pripremu mikroinkapsuliranih sistema, te da je njegov kvalitativni i kvantitativni sastav presudan za formulisanje funkcionalnih dodataka hrani, a ne sastav same droge.

Iz *Tabele 3.4* može se primetiti da su tri najzastupljenija elementa u ekstraktu Ca, Mg i Na. U drogi majčine dušice sa bliskog geografskog lokaliteta (Arsenijević i sar. 2013) najzastupljeniji su bili K, Ca, Mg i Fe. Izmeren sadržaj pojedinih elemenata u velikoj meri varira od polazne sirovine za merenje, tj. da li je sadržaj određivan u ekstraktu dobijenom klasičnim postupkom vodene ekstrakcije ili se radi o digestiji same droge biljke. Ovo su dokazali Ozkan i sar. (2008) kada su upoređivali sadržaj minerala u samoj biljci i u njenom vodenom ekstraktu. Oni su pokazali da je u drogi mediteranske majčine dušice (*Thymbra spicata*) koncentracija Ca bila 1,92 mg/g droge, dok je koncentracija Ca u ekstraktu (pripremljenim dodatkom 2 g suve droge u 98 ml destilovane vode, uz zagrevanje) bila 24,35 mg/100 ml ekstrakta. Ovo istraživanje opravdava analizu mineralnog sastava u samom ekstraktu a ne u suvoj drogi, s obzirom na primećene značajne razlike u koncentracijama. Kako su Ozkan i sar. (2008) pokazali, „transport“ minerala iz suve droge u čajnu infuziju nije isti za sve

elemente, te otuda i razlika u zastupljenosti pojedinih elemenata u drogi i u ekstraktu.

Bitno je naglasiti da je koncentracija teških metala u ekstraktu čaja mala, što ne ograničava primenu ekstrakta majčine dušice u prehrambenoj industriji. Takođe, mali je i sadržaj olova u ekstraktu (preračunato na masu suve droge 0,215 $\mu\text{g/g}$), s obzirom da dozvoljena koncentracija Pb prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (eng. World Health Organization, WHO) iznosi 10 $\mu\text{g/g}$ suve droge (Belšcak-Cvitanović i sar. 2011).

9. Karakterizacija dobijenih mikroinkapsuliranih sistema

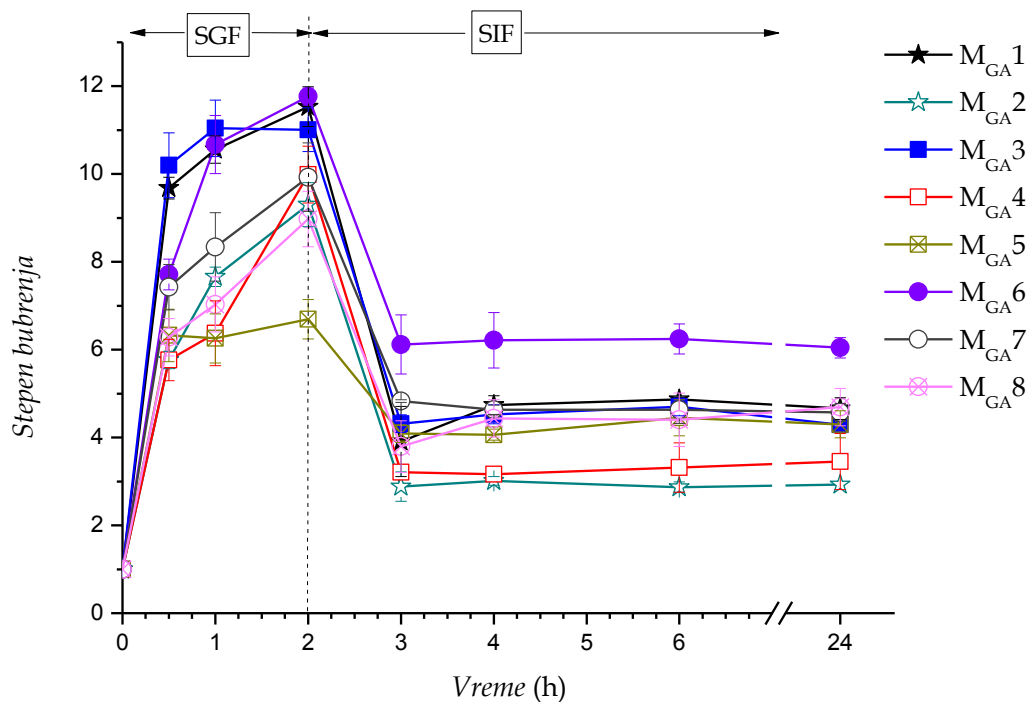
Hidrogelovi hitozana, tj. mikročestice su dobijene su korišćenjem tri različite tehnike, i to: (1) elektrostatička ekstruzija, (2) inverzna emulziona polimerizacija i (3) sprej-sušenje, a za umreženje hitozana korišćeni su različiti umrežavajući reagensi: (1) joni kalcijuma, (2) glutaraldehid, (3) natrijum-tripolifosfat i (4) genipin. Sam proces inkapsulacije izvođen je na dva načina: (1) postupkom „*in-situ*“ inkapsulacije, gde se formiranje mreže hidrogela i inkapsulacija polifenola simultano odvijaju, i (2) tzv. „*post-loading*“ postupkom, gde se najpre vrši priprema hidrogelova (tzv. „*ready-made support*“), a potom inkapsulacija polifenola, bubrenjem hidrogelova u vodenom ekstraktu majčine dušice. Ovako pripremljeni hidrogelovi na bazi hitozana sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice su dalje podvrgnuti različitim metodama karakterizacije.

9.1. Bubrenje mikroinkapsuliranih sistema na bazi hitozana

Kako inkapsulacija polifenola u neke od mikroinkapsuliranih sistema prikazanih u ovom radu predstavlja proces koji se odigrava simultano sa procesom bubrenja, od velike je važnosti ispitati i razumeti mehanizme po kojima se odigrava bubrenje, tj. apsorpcija vode u te hidrogelove.

9.1.1. Bubrenje mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom

Na *Slici 3.2* prikazano je dinamičko bubrenje mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog trakta (pH i temperature). Naime, najpre je bubrenje mikročestica praćeno u simuliranom želudačnom fluidu - SGF (pH $2,20 \pm 0,01$) u trajanju od 2 h, a zatim su mikročestice proceđene i prebaćene u simulirani intestinalni fluid (pH $6,80 \pm 0,01$), gde je bubrenje praćeno naredna 22 h. Sva merenja su vršena na temperaturi od 37°C.

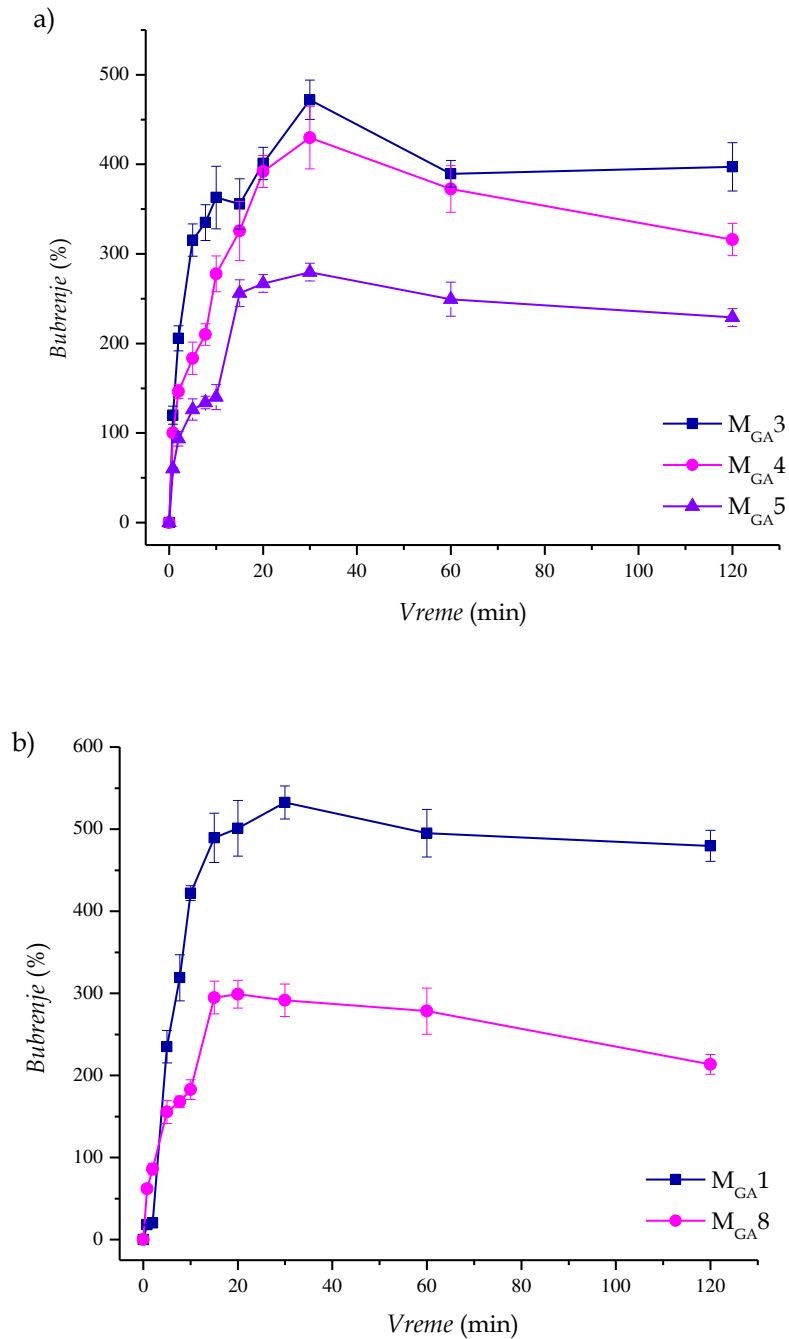


Slika 3.2. Bubrenje mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta.

Poznato je da u kiselj sredini dolazi do povećanja stepena bubrenja mikročestica, usled protonovanja amino grupa hitozana do NH_3^+ oblika. Kako je u literaturi pokazano (Kim i sar. 2003), novonastalo istoimeno naelektrisanje molekula polimera dovodi do stvaranja odbojnih sila između lanaca polimera, na taj način povećavajući stepen bubrenja. U toku prva 2 h, bubrenje mikročestica je bilo manje ukoliko je sadržaj glutaraldehyda u česticama bio veći, kao posledica smanjenog broja amino grupa dostupnih za protonovanje. Naime, aldehidne grupe glutaraldehyda formiraju kovalentne imino veze sa amino grupama hitozana, usled rezonance uspostavljene između susednih duplih etilenskih veza mehanizmom Šifove reakcije (Goncalves i sar. 2005). Stoga, sa povećanjem stepena umreženja glutaraldehyda, manji broj amino grupa u lancu hitozana je dostupan za protonovanje, što vodi manjem stepenu bubrenja mikročestica hitozana.

Nakon prebacivanja u simulirani intestinalni fluid ($\text{pH } 6,8 \pm 0,01$), sve ispitivane mikročestice umrežene hitozanom kontrahuju. Objašnjenje se može naći u činjenici da pri niskim koncentracijama H^+ jona, vodonične veze imaju tendenciju povezivanja usled prevođenja NH_3^+ u NH_2 grupe (Kim i sar. 2003). Važno je naglasiti da je nakon 24 h bubrenje mikročestica konstantno. Ovo implicira da su nabubrele mikročestice stabilne, pa se stoga mogu smatrati adekvatnim sistemima za dostavu aktivnih komponenata male molekulske mase kao što su polifenoli.

Pored bubrenja u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima, ispitano je i bubrenje mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom u vodi na 25°C . Dobijeni rezultati su prikazani na *Slici 3.3*.



Slika 3.3. Bubrenje mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom u vodi, na 25°C: a) uticaj koncentracije glutaraldehida, i b) uticaj koncentracije hitozana.

Slika 3.3a prikazuje efekat sadržaja glutaraldehida na kinetiku bubrenja mikročestica koje sadrže 2 mas.% hitozana. Svi uzorci su dostigli maksimalno

bubrenje za otprilike 30 min; nakon toga dolazi do smanjenja bubrenja svih uzoraka. Slično tome, smanjenje stepena bubrenja (u pH 7 i na 37°C) nakon postizanja maksimalne vrednosti primetili su i Gupta i Jabrail (2007) i to za uzorke dobijene od hitozana male molekulske mase (260 kg/mol) i sa malim stepenom deacetilovanja (48%). Objašnjenje koje su autori predložili jeste erozija mikročestica u toku vremena, usled smanjenja među-molekulskih interakcija. Krive bubrenja prikazane na *Slici 3.3a* pokazuju da je procenat bubrenja bio obrnuto proporcionalan koncentraciji umreživača (glutaraldehyda), što je bilo i očekivano. Naime, sa povećanjem stepena umreženja dolazi do smanjenja stepena bubrenja. Ovaj trend je u skladu sa prethodnim studijama prikazanim u literaturi, koje se bave bubrenjem kopolimera hitozana umreženih glutaraldehydom (Gupta i Jabrail, 2006; Wilson i Xue, 2013). Manji stepen bubrenja je rezultat veće gustine umreženja, koja uzrokuje smanjenu fleksibilnost polimernih lanaca kao i smanjen slobodan prostor između njih. Isti trend je primećen za uzorke sa 1,5 i 3,0 mas. % hitozana (Slika P1 iz priloga).

Uticaj koncentracije hitozana na bubrenje mikročestica prikazan je na *Slici 3.3b*, pri čemu je teorijski stepen umreženja mikročestica (odnos utrošene količine glutaraldehyda i hitozana) (Dini i sar. 2003) bio isti za oba prikazana uzorka (4,12). Rezultati su pokazali da sa povećanjem sadržaja hitozana dolazi do smanjenja stepena bubrenja, usled jačih među-molekulskih interakcija i shodno tome, snažnijeg umreženja. Maksimalni procenat bubrenja je bio u opsegu 280-530%, u zavisnosti od uzorka. Literaturni podaci za apsorpciju vode u hidrogelove hitozana umrežene glutaraldehydom prikazuju širok opseg vrednosti procenta bubrenja, što je posledica činjenice da veliki broj faktora utiče na interakcije hitozana i vode (tj. medijuma u kome se bubrenje odigrava). Neki od tih faktora su: molekulska masa i stepen deacetilovanja hitozana (Gupta i Jabrail, 2007), kao i geometrijske karakteristike uzorka hidrogela u odnosu na uslove pod kojima su sintetisani. Najbliži sistem za poređenje je sistem koji su istraživali Dini i sar. (2003): mikročestice hitozana (~10-100 μm) dobijene metodom emulzione polimerizacije uz umrežavanje (u principu istom

metodom su dobijene i mikročestica hitozana umrežene glutaraldehidom u ovom radu), pri čemu je korišćen 1 mas.% rastvor hitozana. Autori su u svom radu pokazali da je stepen bubrenja varirao u opsegu 470-320%, pri teorijskom stepenu umreženja od 5,00-10,00 (odnos utrošene količine glutaraldehyda i hitozana); mikročestice hitozana umrežene glutaraldehidom sa 1,5 mas.% hitozana iz ove teze sa teorijskim stepenom umreženja 4,12-9,50 imale procenat bubrenja u opsegu 530-300%.

9.1.2. Modelovanje kinetike bubrenja mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom

Prvi deo krive koja predstavlja kinetiku bubrenja, vremenski-zavisani deo, analiziran je korišćenjem osam kinetičkih modela, koji su dati jednačinama (3)-(11). *Tabela 3.5.* prikazuje kinetičke parametre modela za uzorak M_{GA4} kao reprezentativni uzorak.

Prema rezultatima prikazanim u *Tabeli 3.5.*, najbolje slaganje sa eksperimentalnim podacima je postignuto korišćenjem „burst effect“ modela (jednačina (7)), Peppas-Sahlin 1 modelom (jednačina (8)) i Weibull modelom (jednačina (10)), gde su vrednosti koeficijenta $R^2 \geq 0,99$. Vrednosti paramtera $n \leq 0,43$ ukazuju na mehanizam transporta vode koji se odvija po principima Fick-ove difuzije. Ovaj zaključak je opravdan veoma malim doprinosom transporta vode kontrolisanog relaksacijom u poređenju sa transportom kontrolisanim difuzijom (k_7 nasuprot k_6 , odnosno k_8 nasuprot k_9), kada se govori o Peppas-ovim modelima anomalnog transporta (jednačine (8) i (9), redom).

Tabela 3.5. Parametri i koeficijenti dobijeni primenom različitih modela za simulaciju profila bubrenja uzorka M_{GA}4.

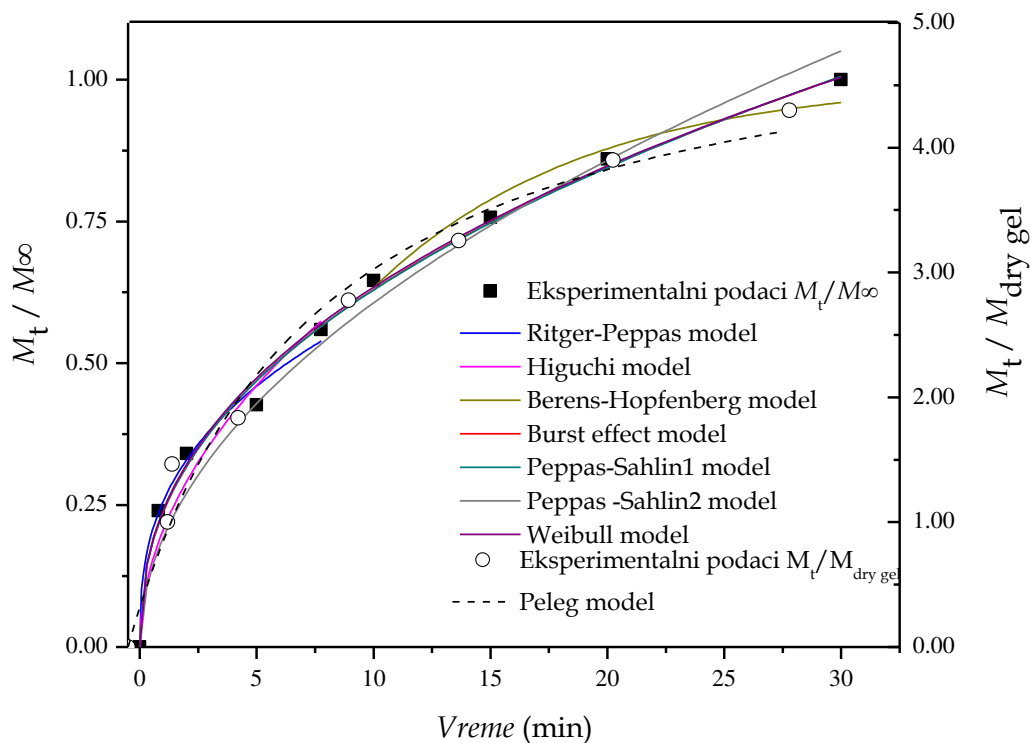
Model	Jednačina	Parametar	R ²	RMSE	χ ²
Ritger-Peppas	Jed. (3)	k_1 0,257 ± 0,017 n 0,363 ± 0,041	0,990	0,020	5,42×10 ⁻⁴
Higuchi	Jed. (4)	k_2 0,206 ± 0,011	0,96	0,083	0,0017
Baker-Lonsdale	Jed. (5)	k_3 0,014 ± 0,001	0,93	0,121	0,00183
Berens-Hopfenberg	Jed. (6)	A 1,11 ± 0,579 k_4 0,110 ± 0,045	0,91	0,026	0,0028
Burst effect	Jed. (7)	B 0,001 ± 0,030 k_5 0,236 ± 0,029 n 0,426 ± 0,003	0,992	0,017	8,97×10 ⁻⁴
Peppas-Sahlin 1	Jed. (8)	k_6 0,237 ± 0,020 k_7 0,002 ± 0,039 m 0,415 ± 0,173	0,992	0,017	8,97×10 ⁻⁴
Peppas-Sahlin 2	Jed. (9)	k_8 2,78×10 ⁻¹⁷ ± 1,98×10 ⁻¹⁸ k_9 0,192±0,006	0,98	0,024	0,0023
Weibull	Jed. (10)	c 12,9 ± 1,62 d 0,437 ± 0,166 k_{10} 1,04×10 ⁻⁴ ± 0,003	0,992	0,020	5,81×10 ⁻⁴
Peleg	Jed. (11)	k_{11}^a 1,57 ± 0,287 k_{12}^b 0,189 ± 0,020	0,97	0,262	0,0686

^a (min×g/g).

^b (g/g).

Pod ovim uslovima, Peppas-Sahlin-ovi modeli (jednačine (8) i (9)) postaju identični kao tzv. „power law“ model, tj. model stepenovanja (jednačina (3)), što znači da se model stepenovanja može koristiti za opisivanje celog opsega eksperimentalnih podataka. U tom kontekstu, primećena je i dobra proporcionalnost ($R^2 > 0,9$) između zbirno apsorbovane količine vode i kvadratnog korena vremena (jednačina (4)). Ovo se takođe može smatrati indikatorom mehanizma transporta kontrolisanog difuzijom. Kako su autori Papadopoulou i sar. (2006) pokazali, kada je vrednost parametra d Weibull-ovog modela (jednačina (10)) manja od 0,75 ($d = 0,43$), Fick-ova difuzija, bilo u fraktalnom ili u Euclidian-skome prostoru, je dominantan mehanizam prenosa. Na osnovu niske vrednosti parametra B (jednačina (7)), „burst effect“ koji se pripisuje nagloj inicijalnoj apsorpciji vode je zanemarljiv.

Konstanta k_{11} (jednačina (11)) se odnosi na brzinu prenosa mase, pri čemu niža vrednost k_{11} ukazuje na veću brzinu inicijalne apsorpcije vode. S druge strane, konstanta k_{12} je vezana za maksimalni kapacitet apsorpcije vode, odnosno, što je niža vrednost konstante k_{12} to je veći kapacitet apsorpcije. Kada se rezultati Peleg-ovog modela dobijeni za naš uzorak mikročestica hitozana (kapacitet apsorpcije $4,3 \text{ g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{dry gel}}$) uporede sa super-apsorbirajućim kopolimernim gelom, primećuje se dva reda veličina veći kapacitet apsorpcije ($232 - 316 \text{ g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{dry gel}}$) (Ismail, 2014). Može se zaključiti da su vrednosti konstanti k_{11} i k_{12} dobijenih za hitozanske mikročestice umrežene gluteraldehidom ($94,2 \text{ s} \times \text{g}/\text{g}$ i $0,189 \text{ g}/\text{g}$, redom) značajno veće nego vrednosti dobijene za super-apsorbirajući gel ($0,05842 - 0,03266 \text{ (s} \times \text{g}/\text{g)}$ i $0,00353 - 0,00257 \text{ (g}/\text{g)}$, redom) koji je bio predmet istraživanja Ismail (2014). Svi diskutovani modeli prikazani su na *Slici 3.4*.



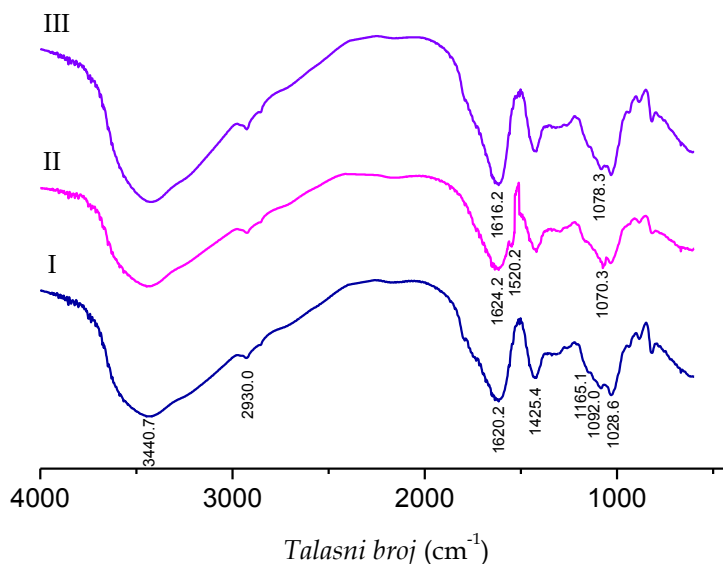
Slika 3.4. Udeo apsorpcije vode (izražene kao M_t/M_∞ , pri čemu se leva ordinata odnosi na jednačine (3)-(4) i (6)-(10), odnosno kao $M_t/M_{\text{dry gel}}$, gde se desna ordinata odnosi na jednačinu (11)) za uzorak M_{GA4} u funkciji vremena.

9.2. FTIR analiza

Analiza uzoraka korišćenjem FTIR spektroskopije se radi u cilju identifikacije funkcionalnih grupa, zatim veza nastalih u samom nosaču, tj. interakcija polimer-polimer ili polimer-umreživač, kao i za identifikaciju veza uspostavljenih između polimera, umreživača i inkapsuliranih polifenola.

9.2.1. FTIR analiza mikročestica alginat-hitozan

Na *Slici 3.5* prikazani su FTIR spektri mikročestica alginat-hitozan, i to praznih mikročestica, zatim mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima kao i mikročestica nakon otpuštanja polifenola. Kao što se može videti svi spektri su slični sa nekoliko relevantnih pikova: (1) na talasnim brojevima 3500 i 3000 cm^{-1} snimljeni su pikovi koji odgovaraju vibracijama istezanja slobodne hidroksilne grupe kao i N-H veze u amino grupi, redom, pri čemu su ovi pikovi intenzivniji u praznim mikročesticama (spektar I) u poređenju sa mikročesticama sa polifenolima (spektar II); (2) pikovi na 2930,0 i 2880,1 cm^{-1} koji se pripisuju asimetričnim i simetričnim vibracijama CH_2 veze, redom; (3) pikovi na 1654 i 1595,4 cm^{-1} odgovaraju amidnoj I i amidnoj II traci, redom.



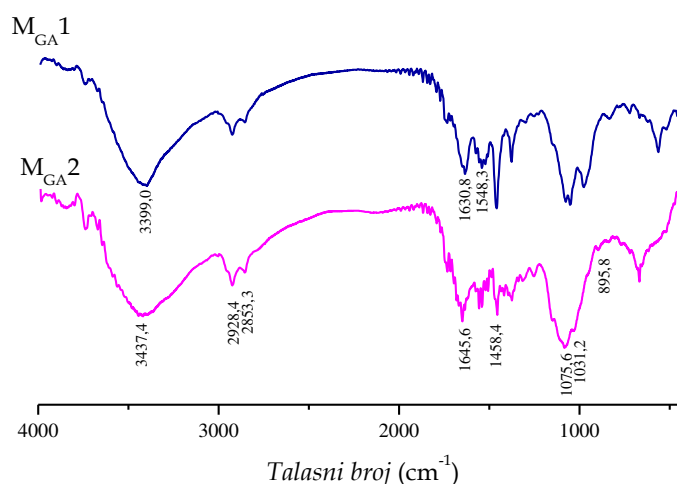
Slika 3.5. FTIR spektri mikročestica alginat-hitozan: I – prazne mikročestice; II – mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice; III – mikročestice nakon otpuštanja polifenola.

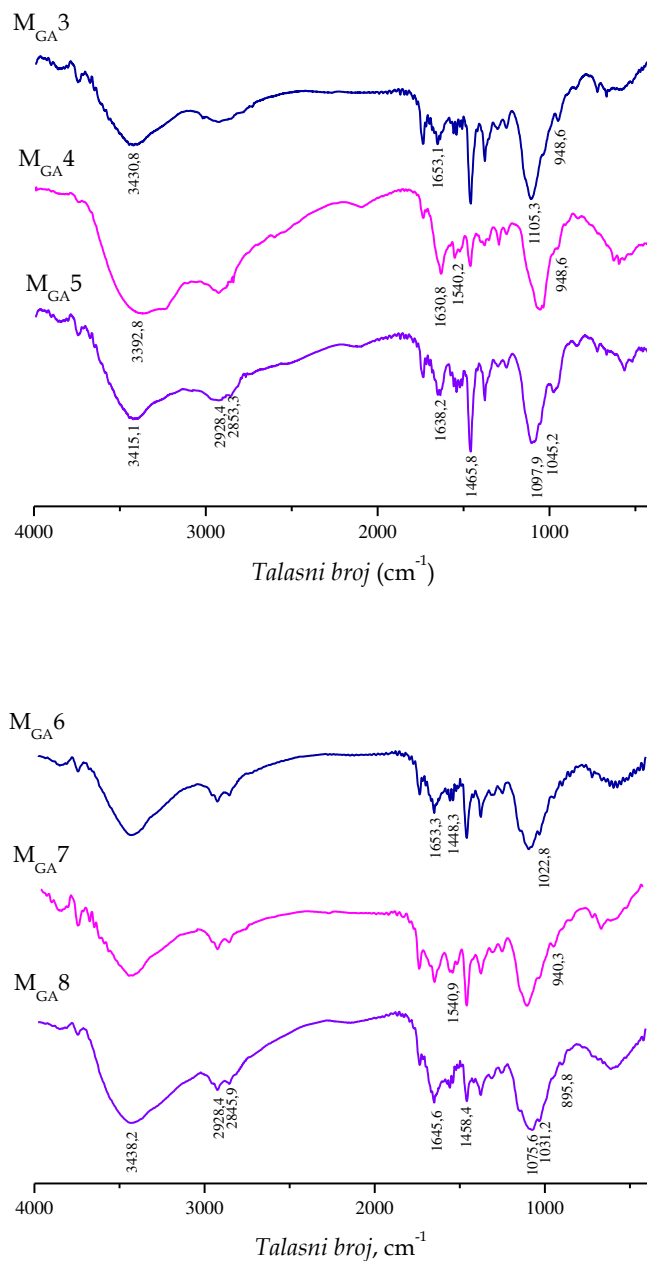
Kao što je i bilo očekivano, inkapsulacija polifenola iz ekstrakta majčine dušice prouzrokovala je određene promene u položaju i intenzitetu pikova. Pik na 1092,0 cm^{-1} u spektru praznih mikročestica (*Slika 3.5* spektar I) je pomeren na

nižu talasnu dužinu od 1073 cm^{-1} (Slika 3.5 spektar II), dok tri pika na $1595,4$; $1460,9$ and $1319,0\text{ cm}^{-1}$ nestaju nakon inkapsulacije, što ukazuje na određene promene i/ili interakcije između polifenolnih jedinjenja ekstrakta i polimera (Knaul i sar. 1999)

9.2.2. FTIR analiza mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom

Najpre, cilj FTIR analize je bio uočavanje međusobnih razlika između mikročestica. Na Slici 3.6 prikazani su FTIR spektri mikrogelova čistog hitozana različitog sastava pre inkapsulacije polifenola. Jaka i široka apsorpciona traka oko 3440 cm^{-1} je posledica O–H vibracija istezanja i savijanja. Jaka asimetrična apsorpciona traka istezanja oko 1630 cm^{-1} i slabija simetrična traka blizu 1450 cm^{-1} se javlja usled prisustva karboksilatnih anjona. Pikovi slabijeg intenziteta oko 2930 cm^{-1} i 2853 cm^{-1} potiču od prisustva CH_2 grupe. Trake oko 1075 cm^{-1} se javljaju usled prisustva C–O istezanja etarskih grupa, a trake oko 1028 cm^{-1} se pripisuju C–O istezanju alkoholnih grupa (Stojanović i sar. 2012).



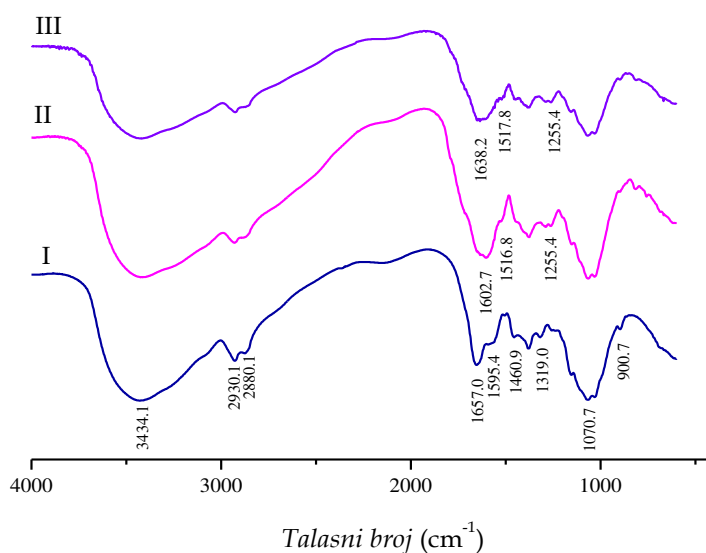


Slika 3.6. FTIR spektri praznih mikročestica hitozana različitog sastava.

Sa Slike 3.6 se može uočiti da spektri mikročestica hitozana poseduju apsorpcione trake na 1654 i 1587 cm⁻¹. Ove trake odgovaraju amidnim karbonilnim grupama (amidna traka I) i slobodnim amino grupama (Phromsopha i Baimark 2010).

Dalje, FTIR analiza rađena je i u cilju identifikovanja veza nastalih između matrice i polifenolnih jedinjenja iz ekstrakta majčine dušice. Na Slici 3.7

prikazan je FTIR spektar mikročestica hitozana pre inkapsulacije (*Slika 3.7*, spektar I), nakon inkapsulacije (*Slika 3.7*, spektar II), kao i nakon otpuštanja polifenola (*Slika 3.7*, spektar III).



Slika 3.7. FTIR spektri MGA5 mikročestica: I – prazne mikročestice; II – mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice; III – mikročestice nakon otpuštanja polifenola.

Nekoliko karakterističnih traka je primećeno u sva tri spektra na *Slici 3.7*; ove trake su vidjive i sa *Slika 3.5* i *3.6*, ali njihov intenzitet i položaj u spektru varira u zavisnosti od toga da li je reč o mikročesticama sa ili bez inkapsuliranih polifenola. Jaka i široka apsorpciona traka na oko 3440 cm^{-1} je, kao što je već rečeno karakteristika O–H vibracija istezanja i savijanja. FTIR spektar mikročestica hitozana sa inkapsuliranim polifenolima (*Slika 3.7*, spektar II) pokazuje pik velikog intenziteta na $2930,0$ i $2880,1\text{ cm}^{-1}$, što se povezuje sa asimetričnim i simetričnim ponašanjem CH_2 grupa, respektivno. Ovi pikovi su nešto slabijeg intenziteta kad se uporede sa pikovima prisutnim u praznim

mikročesticama, verovatno zbog interakcija metilenske grupe glutaraldehida sa reaktivnim grupama polifenola.

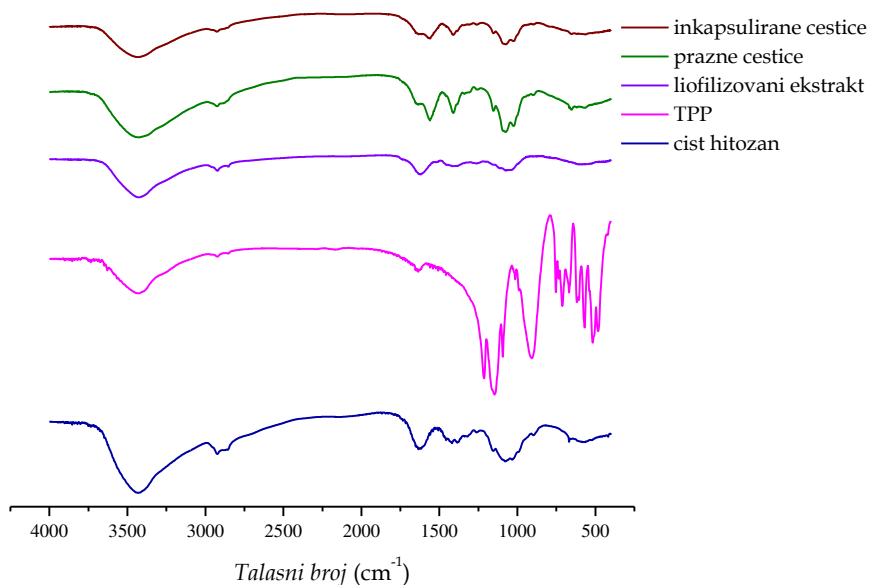
Na talasnom broju oko 1650 cm^{-1} postoji nekoliko traka karakterističnih za hitozan, koje se međusobno preklapaju: traka koja se pripisuje karbonilnim grupama amida (amidna traka I), asimetrična apsorpciona traka istezanja koja je rezultat prisustva karboksilatnih anjona (Vijaya i sar. 2008), kao i traka koja se povezuje sa vibracijama istezanja C=N veze karakterističnim za umrežene mikročestice hitozana, što ukazuje na formiranje Šifovih baza između karbonilnih grupa glutaraldehida i amino grupa hitozanskih lanaca. Nakon inkapsulacije polifenola, ova traka se pomera ka nižim talasnim brojevima ($1602,7\text{ cm}^{-1}$) što se pripisuje C–C istezanju u aromatičnom prstenu, a što ukazuje na prisustvo funkcionalnih grupa fenolnih jedinjenja (Siripatrawan i Harte, 2010). U spektru koji prikazuje mikročestice nakon otpuštanja polifenola (*Slika 3.7*, spektar III), ova traka se ponovo vraća na viši talasni broj (1638 cm^{-1}), kao posledica otpuštanja polifenola. Ove promene ukazuju na interakcije polifenolnih jedinjenja sa hitozanom preko hidroksilnih i amino grupa matrice.

Dalje, trake između 1516 i 1595 cm^{-1} su povezane sa savijanjem N–H veze (amidna traka II), dok su pikovi na $1070,7$ i $900,7\text{ cm}^{-1}$ povezani sa C–O–C istezanjem i piranskim prstenom, redom (Yoksan i sar. 2010).

9.2.3. FTIR analiza mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom

FTIR analiza čistog hitozana, TPP-a, liofilizovanog ekstrakta majčine dušice, kao i mikročestica hitozana umreženih TPP, sa i bez inkapsuliranih polifenola prikazana je na *Slici 3.8*. U spektru čistog hitozana, snimljeno je nekoliko karakterističnih pikova: na oko 3400 cm^{-1} identifikovane su vibracije –OH i –NH grupa, zatim pik na oko 1100 cm^{-1} karakterističan je za C–O–C vibracije (Qi i sar. 2004; Wu i sar. 2005). Pikovi na oko 1650 cm^{-1} i 1500 cm^{-1} se odnose na karbonilne grupe amida (amidna traka I) i amino grupe (Zhang i sar. 2004). Na

simetrične deformacije CH_3 grupa hitozana ukazuju pikovi na oko 1380 cm^{-1} kao i na oko 1420 cm^{-1} , dok pik na oko 2900 cm^{-1} ukazuje na C–H vibracije istezanja.



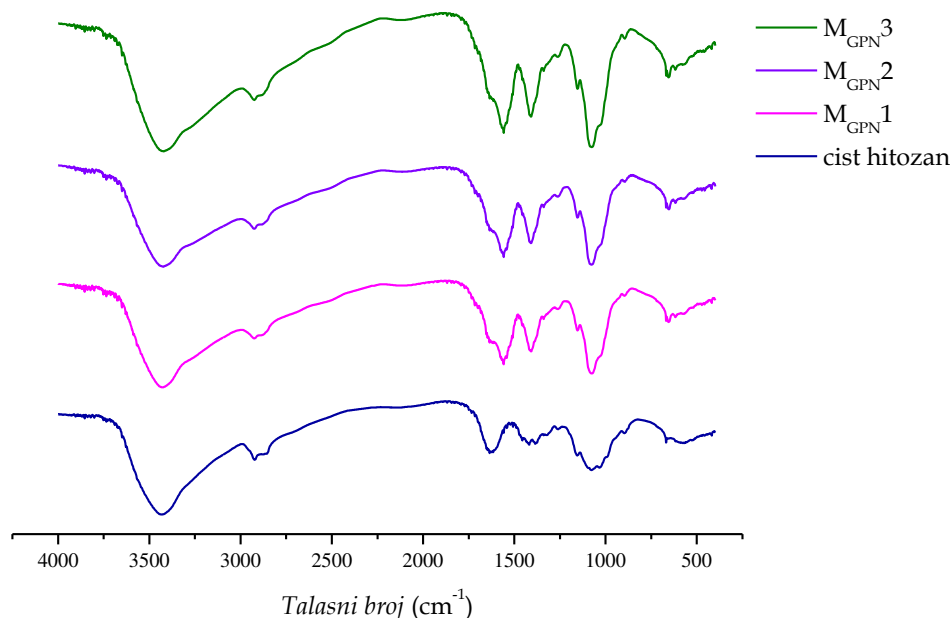
Slika 3.8. FTIR spektri čistog hitozana, TPP-a, liofilizovanog ekstrakta, i mikročestica hitozana $\text{M}_{\text{TPP}3\text{a}}$ praznih i sa inkapsuliranim polifenolima.

U spektru mikročestica hitozana umreženih TPP-om pik na oko 1650 cm^{-1} se smanjuje i pomera ka nižim vrednostima talasnog broja (na oko 1630 cm^{-1}). Amidna traka II u spektru hitozana (na oko 1500 cm^{-1}) se pomera kod mikročestica hitozana na oko $1400\text{--}1470\text{ cm}^{-1}$, što ukazuje da su amino grupe hitozana umrežene jonima fosfata (Dudhani i Kosaraju, 2010). U spektru TPP-a primetan je pik na oko 1200 cm^{-1} koji se odnosi na P=O vibracije istezanja, kao i pik na oko 900 cm^{-1} , koji ukazuje na savijanje P–O veze (Rampino i sar. 2013). U spektru mikročestica hitozana umreženih TPP-om pikovi karakteristični za fosfatne veze su manjeg intenziteta i pomereni ka nižim vrednostima talasnog broja (na oko 1150 cm^{-1}) ili su u potpunosti nestali, što takođe ukazuje na interakcije hitozana i fosfatnog anjona.

Pik u spektru hitozana na oko 3430 cm^{-1} , karakterističan za vodonične veze, se u spektru mikročestica hitozana sa inkapsuliranim polifenolima pojavljuje kao nešto širi pik (Dudhani i Kosaraju, 2010), što može biti posledica interakcija polifenolnih jedinjenja sa amino grupama hitozana (Zhang i Kosaraju, 2007). Pikovi snimljeni u spektru liofilizovanog ekstrakta nisu imali veći značaj na promenu pikova u mikročesticama hitozana.

9.2.4. FTIR analiza mikročestica hitozana umreženih genipinom

Na *Slici 3.9* prikazana je FTIR analiza mikročestica hitozana umreženih genipinom. Na osnovu literaturnih podataka, poznato je da genipin ima tri karakteristična pika u spektru: na 3416 cm^{-1} , zatim 3241 cm^{-1} i 1689 cm^{-1} , koji su karakteristika dve hidroksilne grupe i C=O grupe karboksilnih estara, redom (Zhang i sar. 2013).



Slika 3.9. FTIR spektri čistog hitozana i mikročestica hitozana umreženih genipinom.

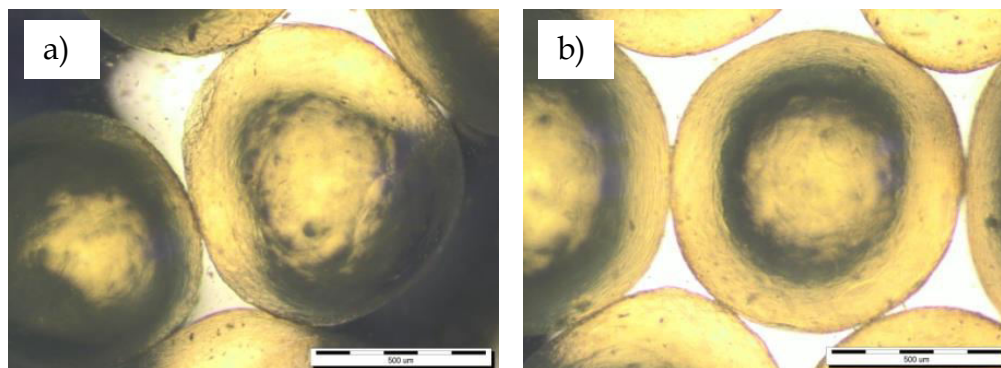
Kada se uporedi spektar čistog hitozana sa spektrima mikročestica umreženih genipinom, može se primetiti da se intenzitet apsorpcionog pika na oko 1640 cm^{-1} u spektrima genipinom umreženih mikročestica hitozana povećava u odnosu na spektar čistog hitozana (gde je gotovo zanemarljiv) ukazujući na reakciju amino grupa hitozana i karboksi-metil grupa genipina, pri čemu nastaju sekundarni amidi (Mi i sar. 2000; Moura i sar. 2015). Široki pik u spektru hitozana na oko 1550 cm^{-1} postaje intenzivniji i pomera se na oko 1480 cm^{-1} u spektrima mikročestica, i na 1556 cm^{-1} u spektrima mikročestica umreženih genipinom, što ukazuje na reakciju hitozana i genipina i formiranje novog heterocikličnog amina (Kawadkar i Chauhan, 2012). Promena intenziteta C–O–C vibracija istezanja u spektrima mikročestica u poređenju sa spektrom hitozana (na oko 1100 cm^{-1} i 640 cm^{-1}) ukazuje na nukleofilni napad amino grupa hitozana na C-3 atom deoksiloganin aglikona u strukturi genipina, što je praćeno otvaranjem dihidropiranskog prstena (šematski prikazano na *Slici 1.14*, u odeljku 5.1.5) (Mi i sar. 2000).

9.3. Veličina mikroinkapsuliranih sistema

Veličina dobijenih mikroinkapsulata igra značajnu ulogu sa aspekta bubrenja, tj. apsorpcije vode, a zatim i otpuštanja, tj. desorpcije polifenola. Takođe, veličina dobijenih mikroinkapsuliranih sistema je važna kada se govori o njihovoj primeni u realnim prehrambenim proizvodima, gde treba naći kompromisno rešenje između dva potpuno suprotstavljena zahteva: velike čestice su neophodne kako bi se postiglo produženo otpuštanje aktivne komponente, dok su male čestice poželjne sa aspekta teksturnih i senzornih karakteristika prehrambenih proizvoda.

9.3.1. Veličina mikročestica alginat-hitozan

Na *Slici 3.10* prikazane su mikrografije alginat-hitozan mikročestica dobijene optičkim mikroskopom.



c)	prečnik (μm)
Mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima	$891,5 \pm 14,5$
Mikročestice nakon otpuštanja polifenola	$817,8 \pm 32,1$

Slika 3.10. Optičke mikro-fotografije čestica alginat-hitozan a) sa inkapsuliranim polifenolima i b) nakon otpuštanja polifenola („bar“ 500 μm) i c) njihovi prečnici.

Kao što se sa *Slike 3.10* može videti, mikročestice alginat-hitozan sa inkapsuliranim polifenolima (*Slika 3.10a*), kao i nakon otpuštanja polifenola (*Slika 3.10b*), su sferičnog oblika i glatke površine, sa srednjim prečnikom 891,5 i 817,8 μm , redom (*Slika 3.10c*). Može se primetiti da nakon otpuštanja polifenola dolazi do smanjenja prečnika mikročestica, što se može objasniti desorpcijom polifenola prvenstveno sa površine mikročestica. Naime, kako se jedan deo polifenola vezuje površinski za mikročestice (analiza skenirajućom elektronskom mikroskopijom ukazuje na pojavu kristala polifenola po površini mikročestica) (Trifković i sar. 2014), to se smanjenje prečnika mikročestica nakon otpuštanja može pripisati upravo odsustvu polifenolnih jedinjenja sa površine i/ili iz strukture mikročestica.

9.3.2. Veličina mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom

Mikročestice hitozana umrežene glutaraldehidom dobijene su metodom inverzne emulziona polimerizacije, a njihov srednji prečnik (u formi hidrogela) je varirao u širokom opsegu, od ~220 do ~ 790 μm , u zavisnosti od sadržaja hitozana i glutaradehida, što je prikazano u *Tabeli 3.6*.

Tabela 3.6. Srednji prečnik (D), faktor sferičnosti (SF) i faktor skupljanja (k_{SF}) za hidrogel, suve i mikročestice nakon rehidratacije u puferu pH vrednosti 2,20 \pm 0,01.

Mikročestice	Mikročestice u hidrogel obliku		Suve mikročestice		Rehidrirane mikročestice ^a	
	D^b (μm)	SF^c	D^b (μm)	k_{SF}^d	D (μm)	SF^c
M _{GA1}	792,2	0,056	233,3	0,706	890,9	0,080
M _{GA2}	616,6	0,067	209,8	0,771	618,9	0,112
M _{GA3}	721,7	0,028	168,9	0,766	435,5	0,050
M _{GA4}	602,4	0,043	140,7	0,766	359,1	0,069
M _{GA5}	602,6	0,046	135,4	0,775	343,9	0,074
M _{GA6}	427,5	0,011	99,3	0,768	445,4	0,057
M _{GA7}	299,1	0,014	72,1	0,759	367,8	0,079
M _{GA8}	220,3	0,016	68,2	0,763	358,6	0,081

^a sa inkapsuliranim polifenolima

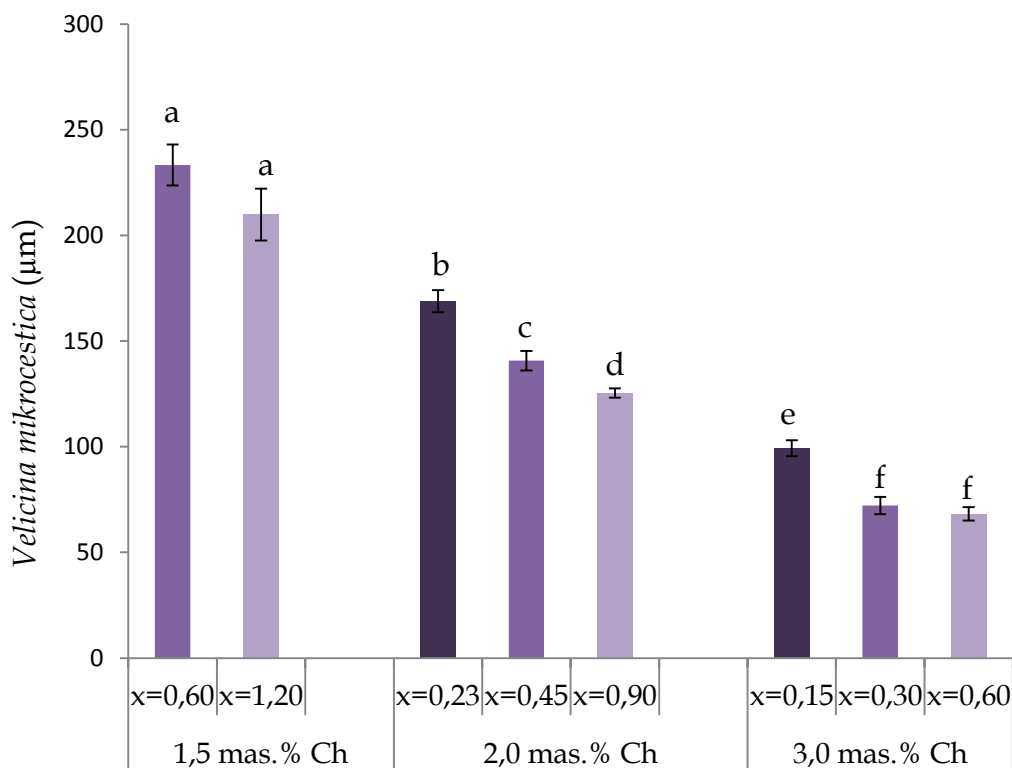
^b n=30

^c Srednja vrednost standardne devijacije je manja od 11% (n=30)

^d Srednja vrednost standardne devijacije je manja od 4% (n=30)

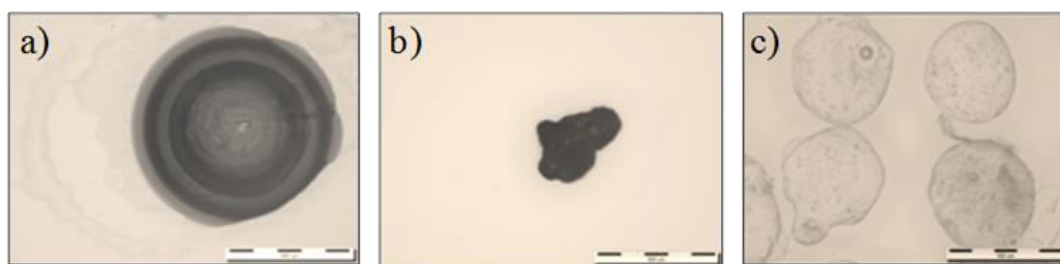
Očigledno je da formiranje kovalentne veze između glutaraldehida i hitozana utiče na veličinu dobijenih mikročestica. Shodno tome, primećena je nekonzistentnost u trendu smanjenja veličine čestica kako za mikročestice u hidrogel formi tako i za mikročestice nakon rehidratacije. Mikročestice koje sadrže veće koncentracije glutaraldehida i/ili veće koncentracije hitozana su generalno imale manje prečnike u poređenju sa mikročesticama koje sadrže

manje koncentracije hitozana i glutaraldehida ($p > 0,05$). Ovo očigledno ukazuje da su mikročestice kompaktnije ukoliko je stepen umreženja veći, odnosno ukoliko je maseni odnos GA/Ch veći (*Slika 3.11*).



Slika 3.11. Veličina mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom kao funkcija masenog odnosa GA/Ch (x) i koncentracije hitozana. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm STDEV ($n=3$). Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p \leq 0,05$)

Mikročestice dobijenih hidrogelova imaju oblik skoro savršene sfere, što se može videti na *Slici 3.12a*. Takođe, vrednosti faktora sferičnosti (SF) prikazanih u *Tabeli 3.6* potvrđuju veliku sferičnost uzoraka (čestice koje imaju $SF \leq 0,05$ smatraju se sferičnim) (Chan i sar. 2011), sa izuzetkom mikročestica M_{GA1} i M_{GA2} .

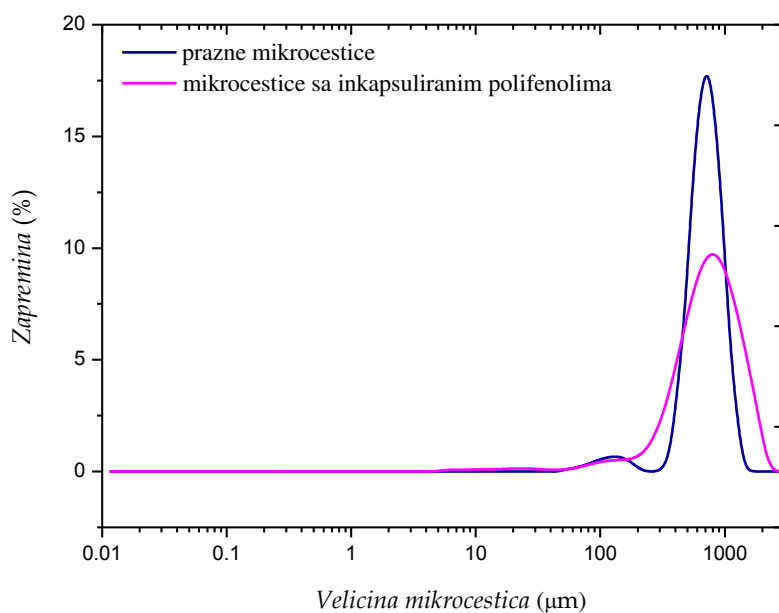


Slika 3.12. Mikro-fotografije uzorka MGA5 a) u formi hidrogela, b) aglomerata suvih čestica, i c) rehidriranih mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima („bar“ 500 μm).

Sadržaj hitozana uticao je na oblik mikročestica, što je evidentno iz vrednosti faktora sferičnosti (SF). Smanjenje faktora sferičnosti sa povećanjem sadržaja hitozana (pri istoj koncentraciji glutaraldehida) je potvrda jakog molekulskog pakovanja. Ovaj efekat nadmašuje uticaj povećane viskoznosti dispergovane faze hitozana (u toku pripreme emulzije, tj. mikročestica), s obzirom da povećanje viskoznosti obično utiče na efikasnost procesa emulgovanja u smislu povećanja prečnika emulgovanih čestica. Sa druge strane, povećanje količine dodatog glutaraldehida uzrokuje smanjenje sferičnosti, pri istoj koncentraciji hitozana. Pretpostavlja se da glutaraldehyd, ukoliko je prisutan u većim koncentracijama, okupira amino grupe hitozana brže, što vodi bržem formiranju polimerne mreže, te je stoga vreme neophodno za formiranje regularnih sferičnih čestica nedovoljno dugo. Nakon sušenja mikročestice se skupljaju, poprimajući nepravilan oblik (*Slika 3.12b*), pri tome zadržavajući 22-34% inicijalne veličine (tj. faktor skupljanja je između 0,706 i 0,775). Vrednosti faktora sferičnosti suvih čestica pokazuju da je njihova geometrija daleko od sferične simetrije (Tabela P1 iz priloga).

Nakon rehidratacije u puferu ($\text{pH } 2,20 \pm 0,01$) mikročestice su povratile sferičan oblik, ali sa određenim odstupanjem od idealne sfere (*Slika 3.12c*) ($\text{SF} \geq 0,05$; *Tabela 3.6*), pri čemu su imale 57-163% inicijalnog prečnika. Dodatno, kada se govori o širini raspodele veličine čestica, polidisperznost uzorka varira

neznatno za prazne mikročestice ($0,813 \pm 0,091$), kao i za mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima ($1,678 \pm 0,432$) ($p > 0,05$). Značajna razlika primećena je samo između praznih mikročestica i mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima, što ukazuje na smanjenje uniformnosti mikročestica nakon inkapsulacije (Slika 3.13). Može se pretpostaviti da u toku sušenja dolazi do značajnog smanjenja prosečnog rastojanja između mesta za umreženje, što u velikoj meri povećava stvarnu gustinu umreženja mikročestica, a što je verovatno posledica dodatnog uspostavljanja vodoničnih veza između polimernih lanaca (Barreiro-Iglesias i sar. 2005).



Slika 3.13. Raspodela veličina mikročestica M_{GA5} , praznih i sa inkapsuliranim polifenolima.

9.3.3. Veličina mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom

Mikročestice hitozana umrežene TPP-om dobijene su metodom sprej-sušenja, a inkapsulacija u tako dobijene mikročestice je vršena ili „*in situ*“ ili „*post-loading*“ postupkom. U *Tabeli 3.7* prikazane su veličine mikročestica hitozana umreženih TPP-om, praznih i sa „*in situ*“ inkapsuliranim polifenolima.

Tabela 3.7. Hidrodinamički prečnici mikročestica hitozana umreženih TPP-om.

Mikročestice		Na osnovu broja čestica (μm)						Na osnovu zapremine čestica (μm)					
		D(0.1)	D(0.5)	D(0.9)	D[3,2]	D[4,3]	Span	D(0.1)	D(0.5)	D(0.9)	D[3,2]	D[4,3]	Span
Prazne	M _{TPP1a}	0,575	0,906	2,051	4,792	9,250	1,630	2,176	8,264	20,541	4,926	10,156	2,222
	M _{TPP2a}	0,573	0,904	2,058	4,674	8,584	1,643	2,148	7,900	18,095	4,788	9,218	2,018
	M _{TPP3a}	0,503	0,745	1,504	4,255	8,519	1,344	1,783	7,937	17,754	4,318	9,082	2,012
Inkapsulirane	M _{TPP1a}	0,410	0,597	1,164	6,271	14,682	1,262	3,442	15,685	32,806	6,780	17,291	1,872
	M _{TPP2a}	0,475	0,697	1,405	5,442	11,960	1,334	2,441	12,402	26,604	5,793	13,785	1,948
	M _{TPP3a}	0,543	0,750	1,408	7,823	17,314	1,153	4,627	18,231	36,946	8,378	19,974	1,773

Tabela 3.8. Hidrodinamički prečnici mikročestica hitozana umreženih genipinom.

Mikročestice		Na osnovu broja čestica (μm)						Na osnovu zapremine čestica (μm)					
		D(0.1)	D(0.5)	D(0.9)	D[3,2]	D[4,3]	Span	D(0.1)	D(0.5)	D(0.9)	D[3,2]	D[4,3]	Span
Inkapsulirane	M _{GPN1}	0,504	0,759	1,500	2,802	6,291	1,313	1,188	5,227	16,960	2,934	7,480	3,017
	M _{GPN2}	0,510	0,773	1,546	3,012	6,740	1,341	1,301	6,195	21,872	3,301	9,563	3,321
	M _{GPN3}	0,506	0,759	1,498	2,830	6,384	1,305	1,206	5,495	18,869	3,022	8,235	3,215

Kada se analiziraju rezultati dobijeni za prazne mikročestice hitozana umrežene TPP-om (*Tabela 3.7*) može se primetiti da sa povećanjem količine umreživača u mikročesticama dolazi do smanjenja njihove veličine. S obzirom da se sa povećanjem koncentracije TPP povećava i broj grupa dostupnih za umreženje sa hitozanom, ovakav rezultat je očekivan. Slično tome, Desai i Park (2005; 2006) su u dve studije pokazali da sa povećanjem količine korišćenog umreživača dolazi do smanjenja prečnika mikročestica.

Što se tiče čestica sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice, primetno je da nakon inkapsulacije dolazi do smanjenja njihove veličine kada se uporede sa odgovarajućim česticama pre inkapsulacije (*Tabela 3.7*, Slika P2). Naime, polifenoli iz ekstrakta se preko svojih hidrosilnih grupa vezuju za amino grupe hitozana (što je i potvrđeno FTIR analizom, odeljak 10.2) na taj način dodatno umrežavajući hitozansku matricu, što rezultira smanjenjem veličine čestica. Međutim, za razliku od praznih mikročestica, kod mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima je očigledno povećanje prečnika sa povećanjem količine TPP-a (*Tabela 3.7*). Kako je već pokazano da se polifenoli vezuju za hitozansku matricu (pri čemu dolazi do uspostavljanja veza između OH grupa polifenola i NH₂ grupa hitozana) (Trifković i sar. 2015; FTIR analiza, odeljak 10.2), može se pretpostaviti da je u slučaju mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima deo NH₂ grupa zauzet interakcijom sa polifenolima, te stoga nije moguća interakcija dodatnog TPP-a i hitozanske matrice. Upravo zbog toga ne dolazi do smanjenja prečnika mikročestica sa povećanjem koncentracije TPP-a, kao što je to slučaj sa praznim mikročesticama.

Kada se govori o širini raspodele veličina mikročestica, koja je okarakterisana vrednostima Span faktora, može se zaključiti da mikročestice umrežene TPP-om sa inkapsuliranim polifenolima imaju užu raspodelu veličina od praznih mikročestica. Pretpostavka je da vezivanje polifenola za matricu, koje je prvenstveno zaslužno i za smanjenje prečnika mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima, doprinosi i povećanju njihove uniformnosti.

9.3.4. Veličina mikročestica hitozana umreženih genipinom

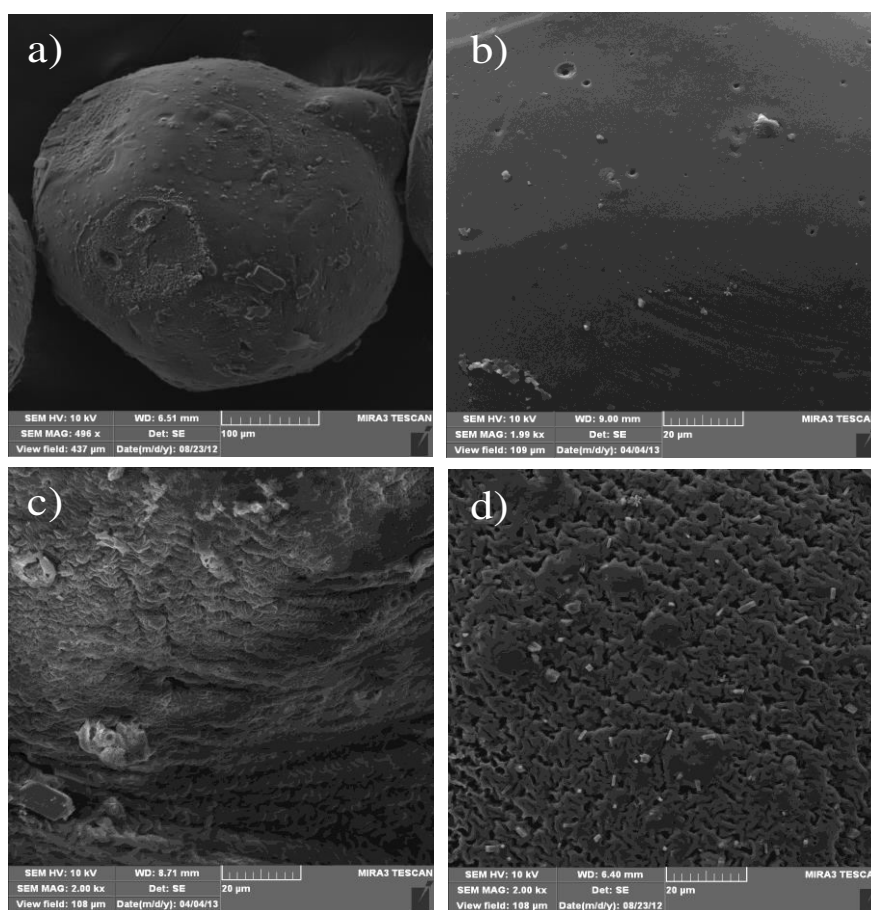
U *Tabeli 3.8* dat je prikaz veličine mikročestica hitozana umreženih genipinom sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice. Povećanje koncentracije genipina u mikročesticama nije imalo značajniji efekat na prečnike mikročestica. Slično tome, Anal i sar. (2006) su pokazali da povećanje koncentracije umreživača u hitozanskim mikročesticama nema statistički značajan efekat na njihovu veličinu. Navedeni autori su predložili sledeće objašnjenje: s obzirom da se prilikom pripreme mikročestica hitozan i umreživač mešaju pre samog procesa sprej-sušenja, do njihove interakcije dolazi u toj fazi pripreme mikročestica. U toku sprej-sušenja, sve kapljice sadrže otprilike istu količinu hitozana, dok se očekuje da je umreživač prisutan u unutrašnjosti mikročestica. Sličan fenomen mogao bi da bude uzrok male razlike u veličinama mikročestica koje sadrže različite koncentracije genipina.

9.4. SEM analiza

SEM analiza uzoraka je rađena u cilju izučavanja oblika i karakteristika (morfologije) površine dobijenih uzoraka, kao i uticaja različitih umreživača na površinsku morfologiju hitozanskih sistema. Proučavanje ovih parametara igra veliku ulogu u karakterizaciji dobijenih sistema na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola, s obzirom da je površina sistema zapravo njegov prvi deo koji dolazi u kontakt sa okruženjem (bilo da je reč o fluidima, čvrstom ili gasovitom okruženju). Stoga površinska morfologija sistema, zajedno sa njegovom unutrašnjom strukturom u velikoj meri utiče, ako ne i predodređuje njihovu potencijalnu primenu (Stojanović i sar. 2011).

9.4.1. SEM analiza mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom

Na *Slici 3.14* prikazane su mikrografije suvih mikročestica (kserogelova) kao i odgovarajućih površina. Suve čestice imaju sferičan oblik, sa gotovo neporoznom i glatkom morfologijom (*Slika 3.14a* i *3.14b*). Kada se mikročestice posmatraju pod većim uvećanjem, primetno je povećanje hrapavosti njihove površine ukoliko je za umreženje korišćena veća koncentracija glutaraldehyda (0,4 vol.%) (*Slika 3.14c*).

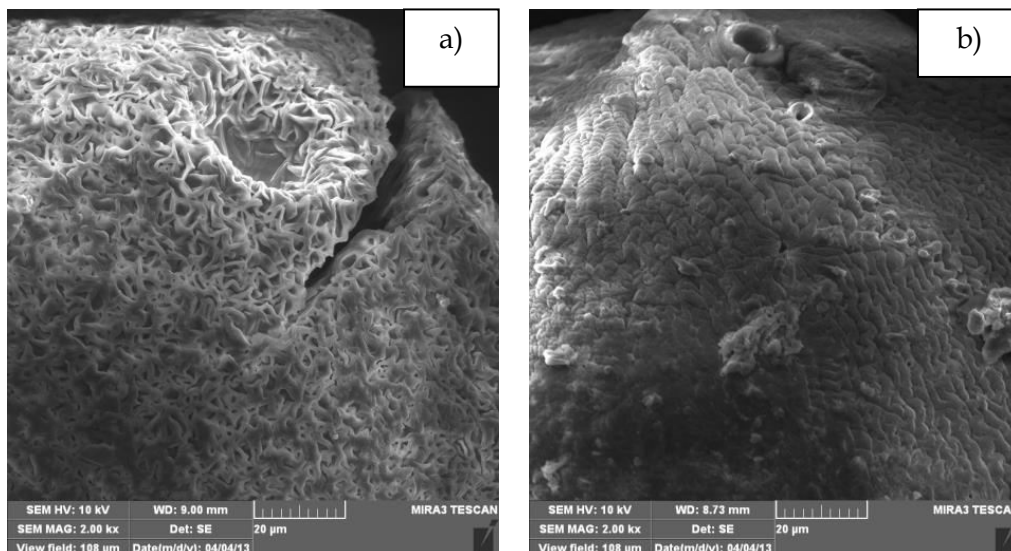


Slika 3.14. SEM mikrografije suvih mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom: a) M_{GA5} mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima ($\times 496$); b) M_{GA3} prazna mikročestica – površina ($\times 2000$); c) M_{GA5} prazna mikročestica – površina ($\times 2000$); d) M_{GA6} mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima – površina ($\times 2000$).

Poznato je da umrežavanje sa glutaraldehidom često dovodi do formiranja mikročestica izuzetno hrapave površine, što se može prevazići korišćenjem rastvora glutaraldehyda zasićenog toluenom, kao što su predložili Gohel i sar. (1994). Naučnici su i dalje u potrazi za odgovarajućim umreživačem, koji će omogućiti dobijanje mikročestica željenih karakteristika, i pri tome biti siguran za oralnu upotrebu.

Proces inkapsulacije uticao je na površinsku morfologiju mikročestica, što se jasno može videti na SEM mikrografijama za uzorke bez (Slika 3.14c) i sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice (Slika 3.14d). Inkapsulacija polifenola doprinosi velikoj površinskoj hrapavosti mikročestica, što se može povezati sa taloženjem kristala polifenola na površini.

Uticaj stepena umreženja na površinsku morfologiju mikročestica se može detaljnije videti na Slici 3.15. Naime, površina uzorka koji sadrži 3 mas.% hitozana se menja od veoma hrapave (Slika 3.15a) do nešto glatkije (Slika 3.15b) sa povećanjem stepena umreženja, tj. sa povećanjem GA/Ch masenog odnosa sa 0,15 na 0,60 (uzorci M_{GA6} i M_{GA8}, redom). Sličan efekat stepena umreženja na karakteristike površine mikročestica opisali su i autori Gupta i Jabrail (2006).

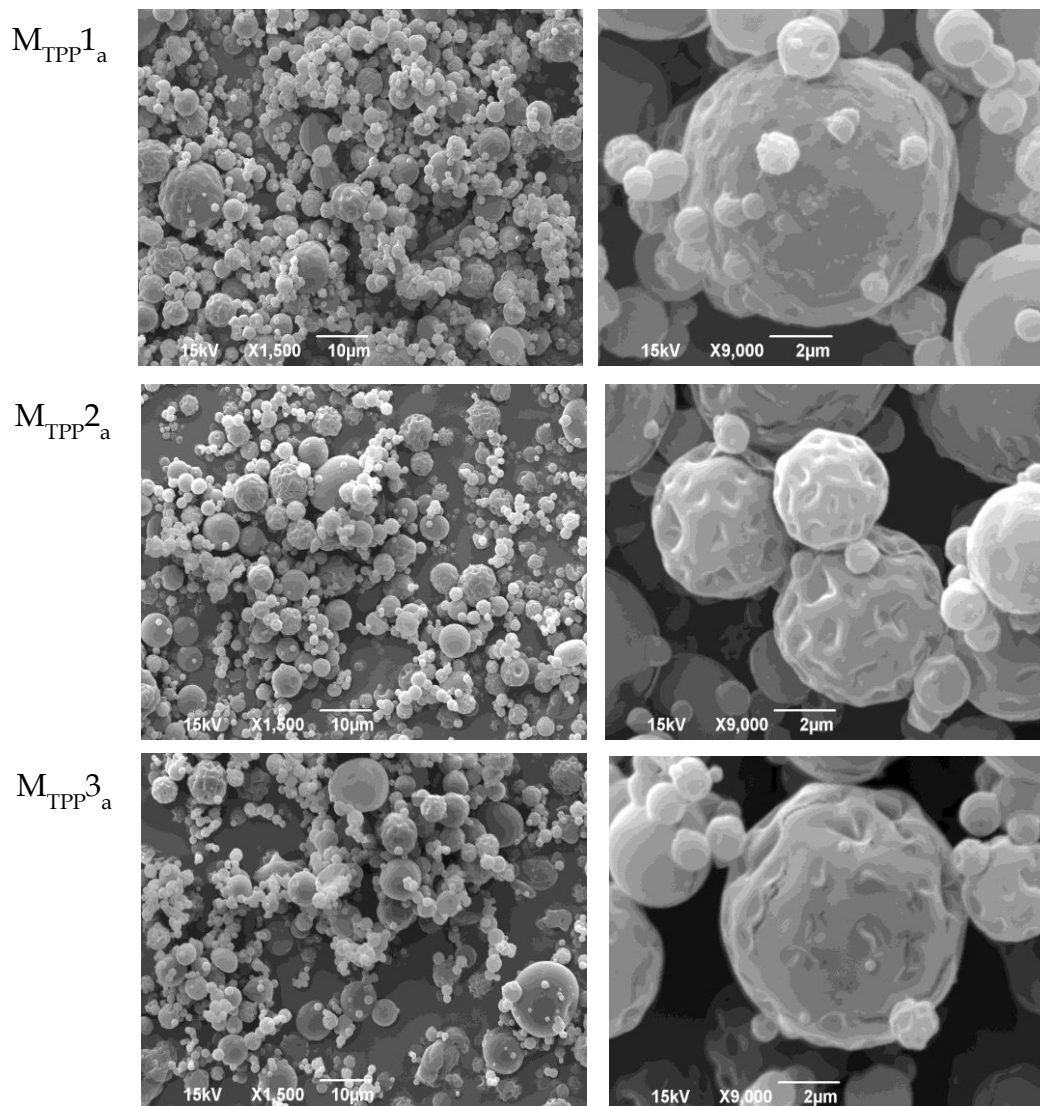


Slika 3.15. SEM mikrografije mikročestica hitozana sa različitim stepenom umreženja: a) M_{GA6} i b) M_{GA8}.

9.4.2. SEM analiza mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom

Na *Slici 3.16* prikazane su sprej-sušene prazne mikročestice hitozana umrežene korišćenjem različitih zapremina 1 mas.% rastvora TPP-a (5, 10 i 15 ml za mikročestice M_{TPP1a}, M_{TPP2a} i M_{TPP3a}, redom). Sve mikročestice su sferičnog oblika, a prisustvo frakcija mikročestica različitih dimenzija je primećeno nezavisno od koncentracije TPP-a u njima. Takođe, primećena je i pojava agregacije mikročestica, što se pripisuje samom procesu sušenja, a što je opisano u literaturi (Rampino i sar. 2013). Uticaj procesa sušenja na morfologiju dobijenih mikročestica vidljiv je i kroz nastanak udubljenja na površini mikročestica. Naime, brzo isparavanje rastvarača u toku sprej-sušenja ostavlja trag na površini mikročestice u vidu udubljenja (Harris i sar. 2011). Sa povećanjem koncentracije TPP-a u mikročesticama evidentno je da dolazi do promene njihove morfologije, tj. površina mikročestica postaje hrapavija, sa vidljivijim udubljenjima i brazdama (*Slika 3.16*). Sličan trend povećanja nepravilnosti u površinskoj strukturi umreženih mikročestica hitozana sa

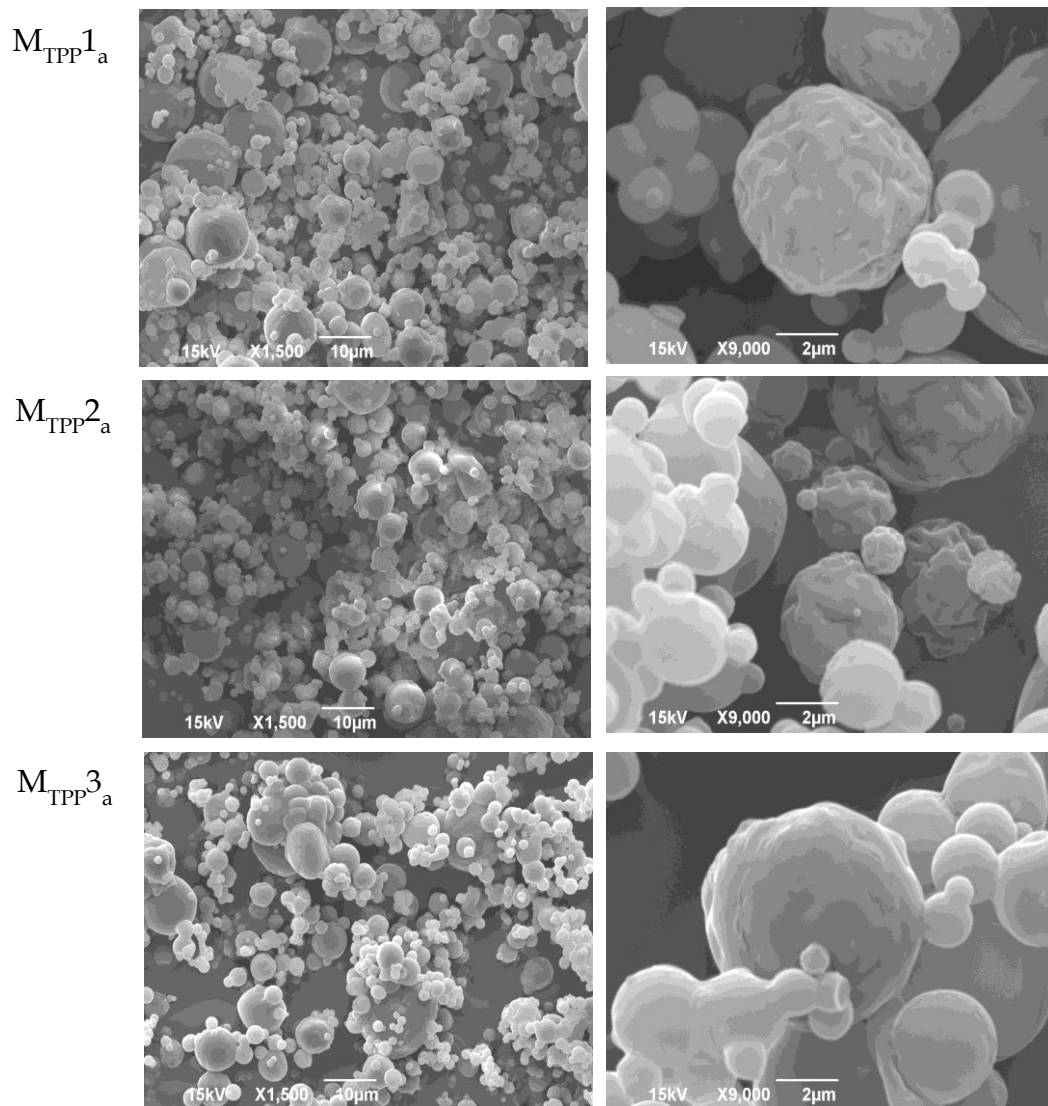
povećanjem koncentracije umreživača primetili su i drugi autori (Desai i Park, 2005a; 2005b; 2005c).



Slika 3.16. SEM mikrografije praznih mikročestica hitozana umreženih TPP-om.

Slika 3.17 prikazuje mikročestice hitozana umrežene TPP-om sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice. Može se primetiti da inkapsulacija polifenola dovodi do poboljšanja površinske morfologije mikročestica (u poređenju sa praznim mikročesticama, *Slika 3.16*), odnosno primetno je

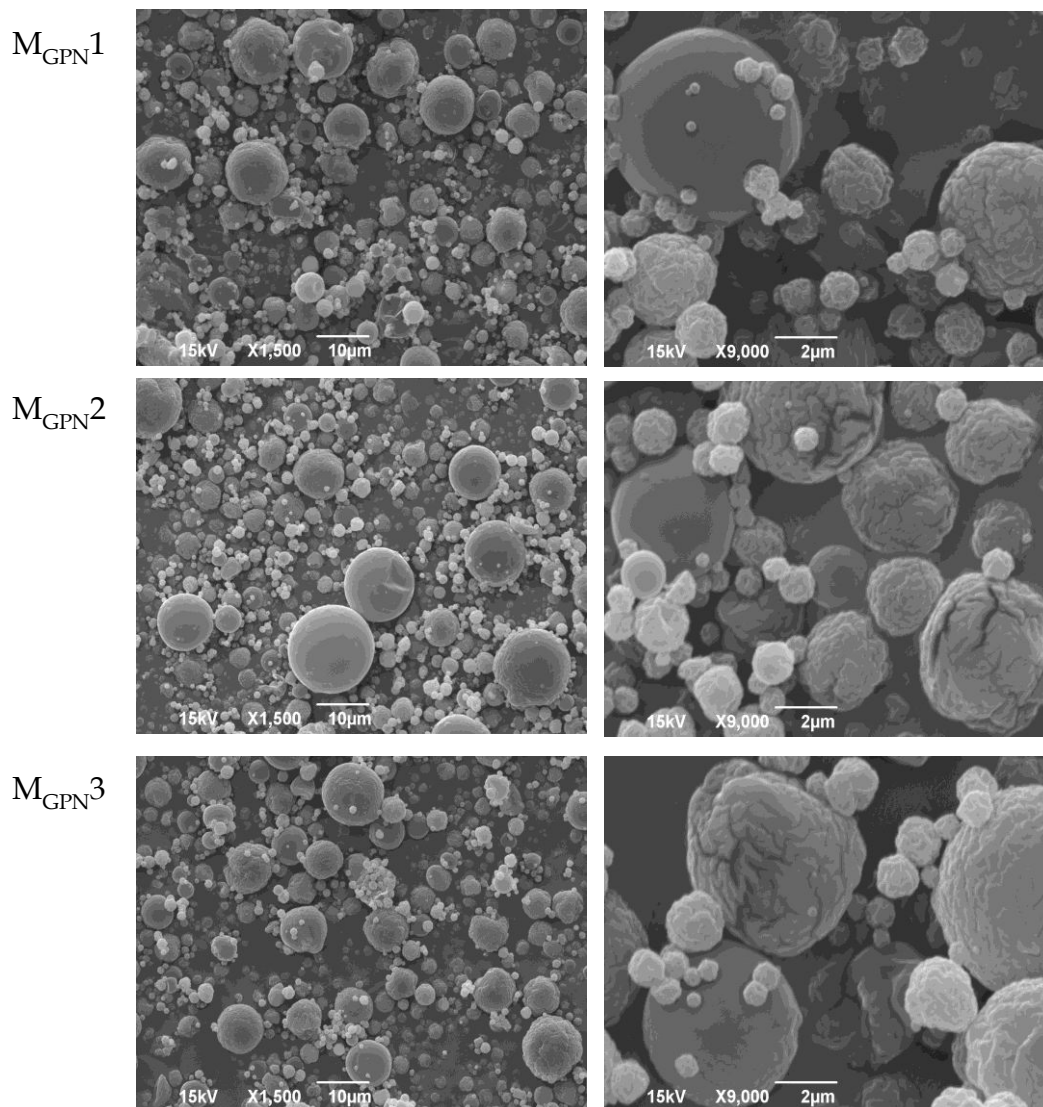
smanjenje naboranosti površine mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima u odnosu na mikročestice bez polifenola. Sličan efekat zapažen je i za sprej-sušene mikročestice hitozana sa i bez inkapsuliranih polifenola lista masline (Kosaraju i sar. 2006), kao i za spej-sušene mikročestice hitozan-želatin i hitozan-pluronik F68 (Huang i sar. 2003). Autori promene u površinskoj morfologiji mikročestica pripisuju parametrima procesa sprej-sušenja, kao što su brzina sušenja i sastav mikročestica.



Slika 3.17. SEM mikrografije mikročestica hitozana umreženih TPP-om sa inkapsuliranim polifenolima.

9.4.3. SEM analiza mikročestica hitozana umreženih genipinom

Mikročestice hitozana umrežene genipinom i pripremljene sprej-sušenjem su analizirane korišćenjem SEM uređaja, a dobijene mikro-fotografije su prikazane na *Slici 3.18*. Kao i za mikročestice umrežene TPP-om, o kojima je bilo reči u prethodnom odeljku, i za mikročestice umrežene genipinom se može primetiti da su sferične strukture i sa heterogenom raspodelom veličina, što je karakteristika procesa sprej-sušenja (Moura i sar. 2015). Dalje, kada se mikročestice analiziraju pri većem uvećanju, može se zaključiti da je njihova površina gruba, sa brazdama i udubljenjima, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima. Harris i sar. (2010) su pripisali izboranu površinsku strukturu mikročestica brzom skupljanju mikročestica koje je posledica brzog uparavanja rastvarača prilikom sprej-sušenja.



Slika 3.18. SEM mikrografije mikročestica hitozana umreženih genipinom sa inkapsuliranim polifenolima.

9.5. Naelektrisanje na površini mikročestica

Određivanje ζ -potencijala, odnosno naelektrisanja po površini mikročestica hitozana daje uvid u njihovu stabilnost. Takođe, određivanjem promena vrednosti površinskog napona moguće je proceniti uticaj koncentracije umreživača, kao i prisustva polifenolnih jedinjenja na stabilnost mikročestica.

9.5.1. Naelektrisanje na površini mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom

U *Tabeli 3.9* date su vrednosti površinskog naelektrisanja mikročestica hitozan umreženih TPP-om, sa i bez inkapsuliranih polifenola.

Tabela 3.9. ζ -potencijal mikročestica hitozana umreženih TPP-om.

Mikročestice	ζ -potencijal (mV)		
	$M_{\text{TPP}1_a}$	$M_{\text{TPP}2_a}$	$M_{\text{TPP}3_a}$
Prazne	$30,5 \pm 0,7$	$32,0 \pm 0,5$	$21,4 \pm 1,9$
Sa inkapsuliranim polifenolima	$14,1 \pm 1,8$	$18,4 \pm 1,3$	$7,91 \pm 0,9$

Sprej-sušene mikročestice hitozana umrežene TPP-om, prazne ili sa inkapsuliranim polifenolima bile su pozitivno naelektrisane, što pokazuju pozitivne vrednosti ζ -potencijala. Uopšteno, sa povećanjem koncentracije umreživača, dolazi do smanjenja vrednosti ζ -potencijala, što je pokazano brojnim istraživanjima (Desai i Park, 2005c; Gan i sar. 2005; Desai i Park, 2006). Slično je bilo i u ovoj doktorskoj disertaciji, pri čemu je malo odstupanje od navedenog pravila primećeno za mikročestice $M_{\text{TPP}2_a}$, bilo da je reč o praznim ili mikročesticama sa inkapsuliranim polifenolima. Objašnjenje za ovo bi se moglo potražiti u činjenici da je za pripremu mikročestica hitozana u ovoj disertaciji korišćena relativno visoka koncentracija hitozana (2 mas.%), dok je u literaturno dostupnim istraživanjima obično korišćen 0,5-1% rastvor hitozana. Stoga je moguće da razlike u koncentracijama TPP-a u pripremljenim mikročesticama nisu dovoljno velike kako bi se sa sigurnošću mogao proceniti uticaj umreživača na vrednost površinskog naelektrisanja.

Kako sa povećanjem koncentracije TPP-a dolazi do smanjenja ζ -potencijala, može se zaključiti da mikročestice sa većim stepenom umreženja imaju manje naelektrisanje po površini, odnosno, stabilnije su. Ovakav zaključak u saglasnosti je sa drugim istraživanjima (Desai i Park, 2006). Takođe, kada se porede

mikročestice sa i bez inkapsuliranih polifenola, primetno je smanjenje vrednosti ζ -potencijala nakon inkapsulacije. Budući da jedan deo polifenolnih jedinjenja iz ekstrakta učestvuje u formiranju interakcija sa hitozanskim matriksom (što je potvrđeno FTIR analizom, odeljak 9.2), dolazi do dodatnog povećanja stepena umreženja hitozana, pa je smanjenje vrednosti ζ -potencijala očekivano.

9.5.2. Naeletrisanje na površini mikročestica hitozana umreženih genipinom

Tabela 3.10 prikazuje vrednosti površinskog naelektrisanja za mikročestice hitozana umrežene genipinom.

Tabela 3.10. ζ -potencijal mikročestica hitozana umreženih genipinom.

Mikročestice	ζ -potencijal (mV)		
	M _{GPN1}	M _{GPN2}	M _{GPN3}
Sa inkapsuliranim polifenolima	15,5 ± 1,1	15,2 ± 0,7	11,8 ± 1,9

Kao što je bio slučaj i za mikročestice umrežene TPP-om, sa povećanjem koncentracije umreživača, u ovom slučaju genipina, dolazi do smanjenja vrednosti ζ -potencijala, što potvrđuje da je došlo do umrežavanja hitozana i genipina. Takođe, sve vrednosti ζ -potencijala su bile pozitivne.

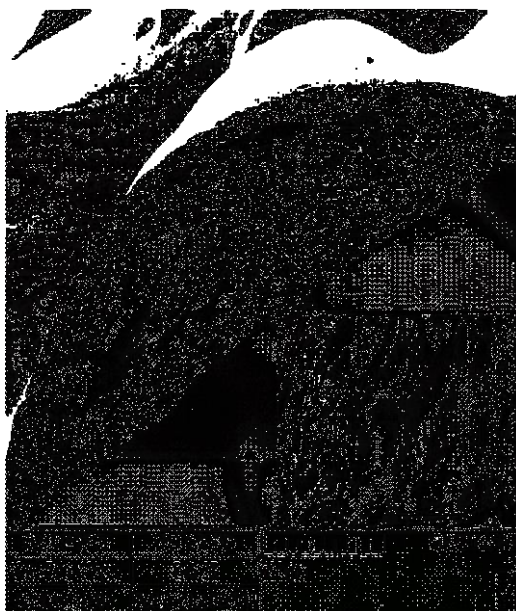
Analiza površinskog naelektrisanja mikročestica hitozana umreženih bilo TPP-om bilo genipinom, dovodi do zaključka da iako dolazi do smanjenja površinskog naelektrisanja mikročestica usled procesa umrežavanja hitozana, pozitivne vrednosti ζ -potencijala ukazuju da su sve čestice zadržale svojstva hitozana, kao što su mukoadhezivnost i poboljšanje apsorpcije tj. permeacije, te stoga mogu biti korišćene kao nosači aktivnih komponenti u sistemima za kontrolisano otpuštanje (Bernkop-Schnürch, 2005; Harris i sar. 2010).

9.6. Poroznost mikročestica hitozana

Poroznost mikročestica ima značajnu ulogu sa aspekta njihove primene, s obzirom da veličina pora u velikoj meri utiče kako na efikasnost inkapsulacije, tako i na brzinu otpuštanja aktivne komponente. Stoga je neophodno ispitati uticaj koncentracije hitozana i koncentracije umreživača na poroznost dobijenih hidrogelova.

9.6.1. Poroznost mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom

Suva mikročestica hitozana sa inkapsuliranim polifenolima (M_{GA5}) je prepolovljena, kako bi se ispitala struktura pora u unutrašnjosti matrice (*Slika 3.19*). SEM analiza dobijenog poprečnog preseka ukazala je na prisustvo kristala polifenola (istaknuto strelicama na *Slici 3.19*).



Slika 3.19. SEM mikrografija preseka suve M_{GA5} mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima (496 \times); inset: (30,000 \times).

Merenja poroznosti mikročestica BET metodom takođe su potvrdila da nakon inkapsulacije polifenoli ispunjavaju šupljine matriksa, na taj način smanjujući mu poroznost (*Tabela 3.11*). Stoga su prazne mikročestice daleko poroznije (srednji prečnik pora 35,0 nm a specifična površina 2,18 m²/g) u poređenju sa mikročesticama sa inkapsuliranim polifenolima, gde je srednji prečnik pora 12,3 nm a specifična površina 0,59 m²/g. Zapravo, poroznost mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima je bila na granici limita detekcije. Stoga, nije moguće međusobno porediti prazne uzorke, već samo uzorke sa i bez inkapsuliranih polifenola. Rezultati merenja poroznosti za uzorak M_{GA5} kao reprezentativni uzorak, data su u *Tabeli 3.11*.

Tabela 3.11. Parametri poroznosti mikročestica hitozana M_{GA5}. [S_p - specifična površina; V_{total} - ukupna zapremina pora; V_{meso} - zapremina mezo-pora (veličina pora između 1,7 i 300 nm); V_{micro} - zapremina mikro-pora; D_{sr} srednji prečnik pora].

Mikročestice	S _p ,	V _{total} × 10 ⁻³ ,	V _{meso} × 10 ⁻³ ,	V _{micro} × 10 ⁻³ ,	D _{sr} ,
M _{GA5}	m ² /g	cm ³ /g	cm ³ /g	cm ³ /g	nm
Prazne	2,18	14,59	22,26	2,74 ± 0,51	34,90
Inkapsulirane	0,59	0,34	0,68	0,30 ± 0,07	12,31

9.6.2. Poroznost mikročestica hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom

U *Tabeli 3.12* dati su rezultati merenja poroznosti BET metodom za mikročestice hitozana umrežene TPP-om. Očigledno je da sa povećanjem udela TPP-a u mikročesticama dolazi do povećanja njihove poroznosti, odnosno do povećanja specifične površine. Pri tome, navedeni trend je primetan i za prazne i za inkapsulirane mikročestice.

Slično tome, ispitujući uticaj koncentracije umreživača na poroznost i specifičnu površinu čestica hitozana Hsien i Rorrer (1995) su pokazali da se sa povećanjem koncentracije umreživača BET specifična površina čestica povećava, do određene koncentracije umreživača. Naizgled, pri jako visokim koncentracijama umreživača, značajan udeo amino grupa hitozana u blizini spoljašnje površine mikročestica je umrežen. Takva visoko umrežena spoljašnja ljuska je najverovatnije zaslužna za sve krajnje karakteristike mikročestica, uključujući i njihovu poroznost.

Tabela 3.12. Parametri poroznosti mikročestica hitozana umreženih TPP-om. [S_p - specifična površina; V_{total} - ukupna zapremina pora; V_{meso} - zapremina mezo-pora (veličina pora između 1,7 i 300 nm); V_{micro} - zapremina mikro-pora; D_{sr} srednji prečnik pora].

	Mikročestice	S_p , m ² /g	$V_{total} \times 10^{-3}$, cm ³ /g	$V_{meso} \times 10^{-3}$, cm ³ /g	$V_{micro} \times 10^{-3}$, cm ³ /g	D_{sr} , nm
Prazne	M _{TPP1a}	0,96	1,10	1,14	nd	26,22
	M _{TPP2a}	1,40	2,12	2,11	nd	21,90
	M _{TPP3a}	1,17	1,81	1,33	0,51	12,05
Inkapsulirane	M _{TPP1a}	0,49	0,83	0,70	nd	24,44
	M _{TPP2a}	1,04	nd	nd	nd	nd
	M _{TPP3a}	1,22	0,81	0,74	nd	27,81

nd-nije detektovano

Kada se uporedi poroznost mikročestica umreženih TPP-om sa i bez inkapsuliranih polifenola, primetno je smanjenje specifične površine nakon inkapsulacije (isti trend je primećen i za mikročestice hitozana umrežene

glutaraldehydom). Budući da se jedan deo polifenola vezuje u obliku kristala po površini mikročestica (SEM analiza, odeljak 9.4.1), na taj način ispunjavajući šupljine matriksa i smanjujući njegovu poroznost.

9.6.3. Poroznost mikročestica hitozana umreženih genipinom

Isti trend povećanja specifične površine sa povećanjem koncentracije TPP-a u mikročesticama primećen je i za mikročestice hitozana umrežene genipinom, što je prikazano u *Tabeli 3.13*.

Tabela 3.13. Parametri poroznosti mikročestica hitozana umreženih genipinom.

[S_p - specifična površina; V_{total} - ukupna zapremina pora; V_{meso} - zapremina mezo-pora (veličina pora između 1,7 i 300 nm); V_{micro} - zapremina mikro-pora; D_{sr} srednji prečnik pora].

	Mikročestice	S_p , m ² /g	$V_{total} \times 10^{-3}$, cm ³ /g	$V_{meso} \times 10^{-3}$, cm ³ /g	$V_{micro} \times 10^{-3}$, cm ³ /g	D_{sr} , nm
Inkapsulirane	M _{GPN1}	1,00	2,81	2,83	nd	32,42
	M _{GPN2}	1,58	3,42	2,60	0,72	31,01
	M _{GPN3}	1,99	nd	nd	nd	nd

nd-nije detektovano

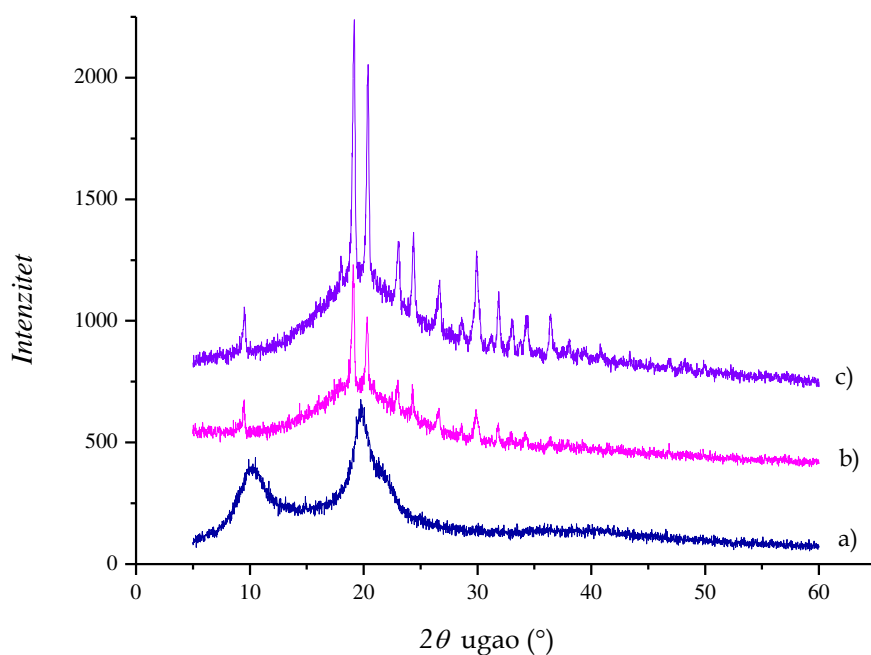
Povećana poroznost umreženih mikročestica hitozana dobijenih sprej-sušenjem sa povećanjem koncentracije umreživača je primećena i u istraživanjima drugih autora. Naime, prilikom inkapsulacije arome breskve u mikročestice hitozana autori Estevinho i sar. (2013a, 2013b) pokazali su da sa povećanjem udela umreživača dolazi do povećanja hrapavosti površine dobijenih mikročestica, pa samim tim i njihove specifične površine.

11.7. XRD analiza

Rendgenska difrakciona analiza rađena je u cilju određivanja uticaja umreživača, tj. procesa umrežavanja i/ili procesa inkapsulacije polifenola na kristalnu strukturu hitozana.

11.7.1. XRD analiza mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom

Na *Slici 3.20* prikazani su XRD difraktogrami čistog hitozana i umreženih mikročestica MGA4, praznih i sa inkapsuliranim polifenolima. XRD difraktogram čistog hitozana (*Slika 3.20a*) pokazuje intenzivne pikove na oko 10° i 20° ugla 2θ , što ukazuje na polu-kristaličnu strukturu hitozana (Walke i sar. 2015). Pik na 9.4° ugla 2θ odgovara hidratisanim kristalima hitozana, dok je pik na $11,6^\circ$ ugla 2θ povezan sa anhidrovanim kristalima hitozana. Sledeći široki pik koji se proteže od $15,5$ do 24° ugla 2θ ukazuje na region amorfne strukture hitozana (Sharma i sar. 2012).

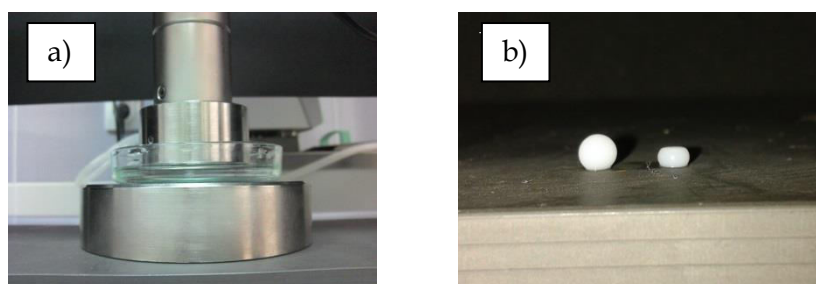


Slika 3.20. XRD difraktogrami a) čistog hitozana i MGA4 mikročestica b) praznih i c) sa inkapsuliranim polifenolima.

Dalje, XRD difraktogrami praznih M_{GA4} mikročestica (*Slika 3.20b*) i M_{GA4} mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima (*Slika 3.20c*) otkrivaju pojavu novih pikova (tj. $2\theta = 21^\circ$), većeg intenziteta (kao rezultat porasta kristaličnih domena), ukazujući na povećanje kristaličnosti hitozana nakon umrežavanja sa glutaraldehidom. Do sličnih zaključaka su došli i Mishra i sar. (2010), koji su pokazali da filmovi na bazi hitozana i fosfomolibdenske kiseline umreženi glutaraldehidom imaju veći procenat kristaličnosti u poređenju sa čistim hitozanom. Pikovi snimljeni za M_{GA4} mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima su najintenzivniji (*Slika 3.20c*). Proučavajući kristaličnost hitozan-TPP nanočestica Hosseini i sar. (2013) su primetili da nakon inkapsulacije esencijalnog ulja origana dolazi do povećanja kristaličnosti, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj tezi. Stoga, može se zaključiti da XRD analiza pokazuje da umrežavanje mikročestica glutaraldehidom, kao i prisustvo polifenola u mikročesticama, utiče na strukturu hitozana, i to u smislu povećanja njene kristaličnosti.

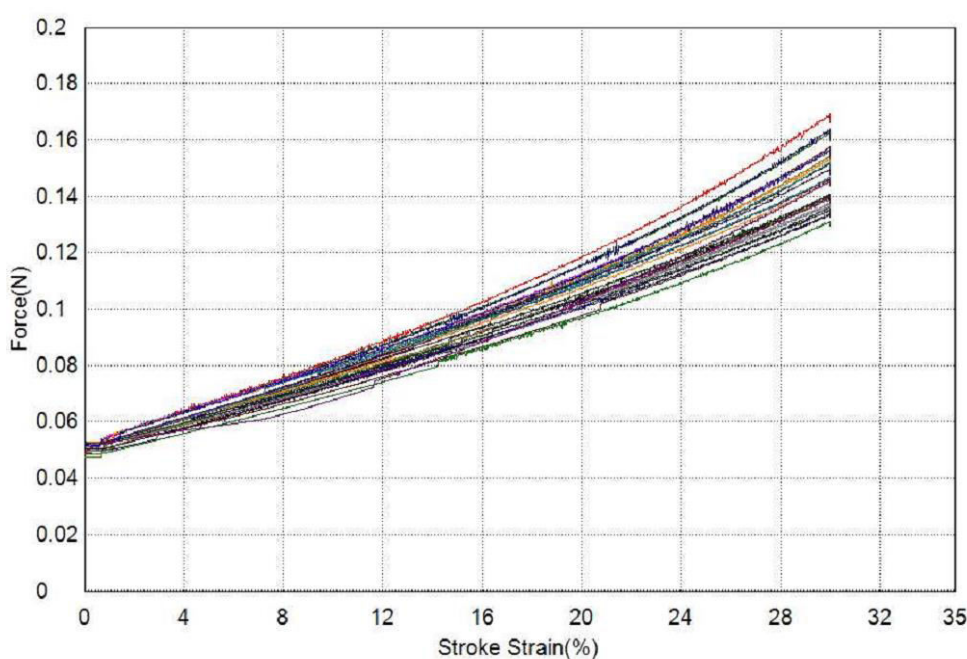
9.8. Mehaničke karakteristike čestica alginat-hitozan

Mehaničke karakteristike čestica alginat-hitozan određene su kompresijom jedne čestice u destilovanoj vodi do postizanja unapred definisane deformacije od 30% (*Slika 3.21a* prikazuje proces testiranja, dok je na *Slici 3.21b* prikazana čestica pre i nakon testiranja, tj. nakon postizanja 30% deformacije).



Slika 3.21. a) Testiranje čestice alginat-hitozan u vodi; b) čestica pre i nakon testiranja.

Princip merenja se zasniva na izlaganju mikročestice određenom naponu (kompresijom), i merenju odgovora koji mikročestica daje u vidu sile i rezultujućeg napona. Dobijeni rezultati najpre su prikazani kroz dijagrame sila-deformacija (*Slika 3.22*). Kao što se sa *Slike 3.22* može videti, uniformnost krivih dobijenih testiranjem 30 čestica je bila dobra, pri čemu su sve krive imale isti trend – kako bi se postigao veći procenat deformacije neophodno je uložiti veću silu.



Slika 3.22. Zavisnost deformacije od primenjene sile za mikročestice alginat-hitozan.

Parametri mehaničke karakterizacije mikročestica alginat-hitozan zatim su prikazani su u *Tabeli 3.14*. Vrednosti dobijene za rezultujuću silu (0,146 N), napon (0,021 MPa) i kompresioni modul elastičnosti (0,041 MPa), u saglasnosti su sa literaturno dostupnim podacima za alginat-hitozan mikročestice (Obradović i sar. 2015).

Tabela 3.14. Mehaničke karakteristike mikročestica alginat-hitozan, pri deformaciji od 30%.

Mikročestice Alg/Ch	Sila ^a (N)	Napon ^a (MPa)	Modul elastičnosti ^b (MPa)
		0,146 ± 0,0098	0,021 ± 0,0014

^a Računato prema celokupnoj površini.

^b Računato kao nagib linearnog dela krive.

10. Efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola

Sadržaj polifenola u hidrogelovima, kao i efikasnost inkapsulacije su parametri koji značajno utiču na finalne karakteristike dobijenih sistema i time određuju njihovu pogodnost za dalju primenu. Stoga je neophodno precizno utvrditi koji su to procesni parametri koji utiču na efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola i u kojoj meri.

10.1. Efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola u mikročesticama alginat-hitozan

U *Tabeli 3.15* prikazane su vrednosti ukupnog sadržaja polifenola i efikasnosti inkapsulacije za mikročestice alginat-hitozan.

Tabela 3.15. Ukupan sadržaj polifenola (TPC) i efikasnost inkapsulacije (EE) za mikročestice alginat-hitozan.

<i>Mikročestice</i>	TPC (mgGAE/ g_{beads})	EE (%)
<i>alginat-hitozan</i>	11,89 \pm 1,97	68,02 \pm 2,31

Vrednost TPC u mikročesticama alginat-hitozan je relativno niska. Poznato je da je nedostatak klasičnih ekstruzionih metoda upravo niska vrednost efikasnosti inkapsulacije, posebno kada se radi o inkapsulaciji vodorastvornih jedinjenja (Moses i sar. 2000; Kulkarni i sar. 2000). Problem koji se javlja pri inkapsulaciji vodorastvornih jedinjenja klasičnim ekstruzionim metodama jeste njihova difuzija u rastvor za geliranje. Rešenje za ovaj problem se može potražiti u modifikovanim metodama inkapsulacije vodorastvornih jedinjenja. Najpre, neophodno je eliminisati pogonsku silu za difuziju polifenola održavanjem iste koncentracije polifenola u medijumu za geliranje i u mikročesticama, što je u ovom radu i urađeno (videti odeljak 7.5, priprema mikročestica alginat-hitozan). Dalje, procedura izvođenja samog procesa

inkapsulacije polifenola u mikročestice (inkapsulacija postupkom „*post-loading*”-a nasuprot „*in situ*” inkapsulacija) igra veliku ulogu u ostvarivanju visokih vrednosti sadržaja inkapsuliranih bioaktivnih jedinjenja (Trifković i sar. 2012). Tako su Chan i sar. (2010) u svojim istraživanjima pokazali da se klasičnom metodom ekstruzije postiže TPC vodenog ekstrakta *Piper sarmentosum* u kalcijum-alginatnim česticama od 0,14 g/g, dok se sadržaj inkapsuliranih jedinjenja uvećava 2-6 puta ukoliko se inkapsulacija vrši metodom apsorpcije. Takođe, iz istraživanja Stojanović i sar. (2012) očigledno je da se metodom apsorpcije postiže veća efikasnost inkapsulacije u mikročesticama alginata u poređenju sa rezultatima dobijenim klasičnom ekstruzijom (83% nasuprot 51%, redom), ali i da je ukupan sadržaj polifenola u mikročesticama u koje je inkapsulacija vršena procesom apsorpcije smanjen.

10.2. Efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola u mikročesticama hitozana umreženih glutaraldehidom

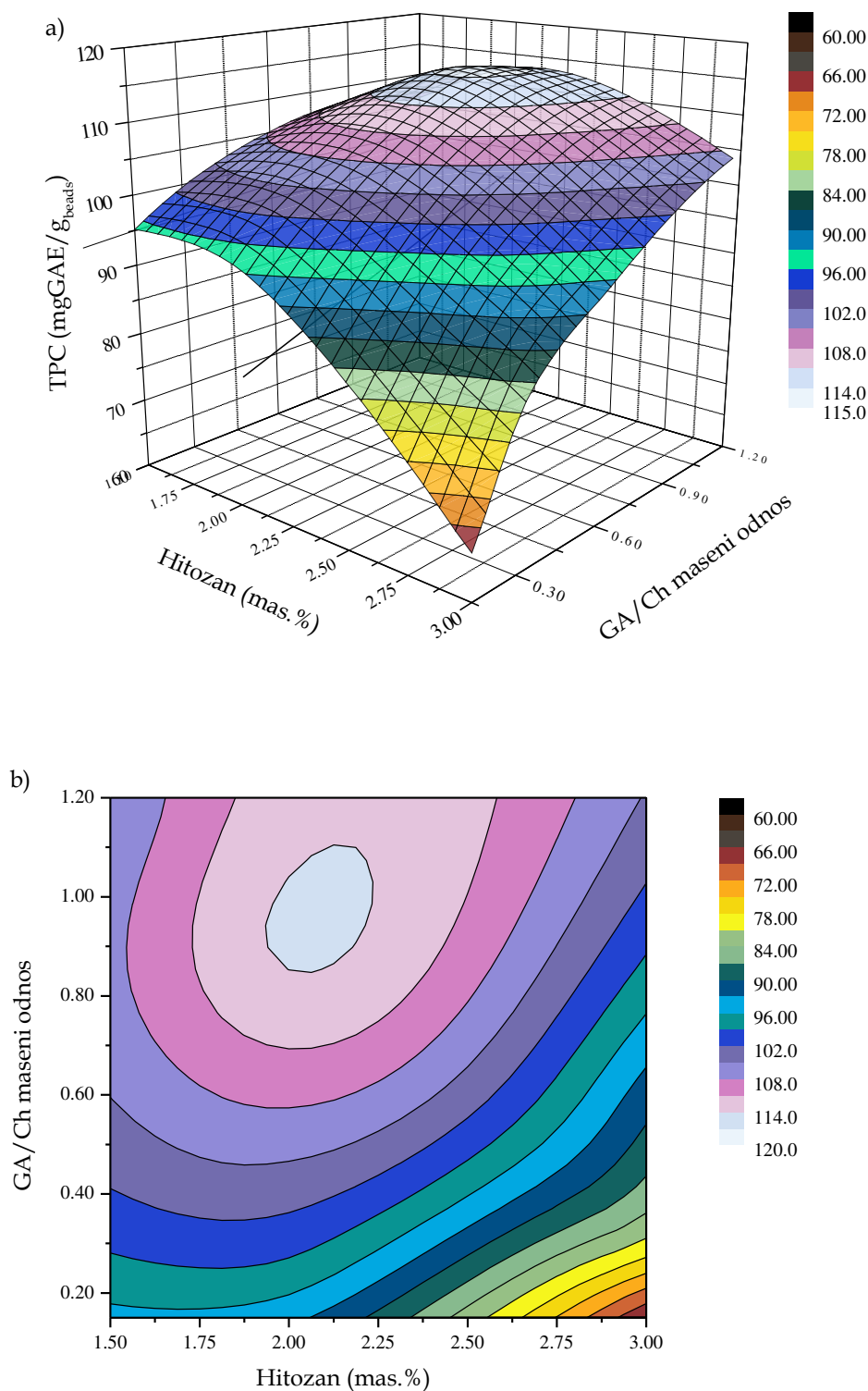
Koncentracija hitozana u mikročesticama, kao i koncentracija korišćenog glutaraldehida su u velikoj meri uticali na sadržaj polifenola u mikročesticama kao i na efikasnost inkapsulacije. Kao što se može videti iz *Tabele 3.16*, najveća efikasnost inkapsulacije je postignuta kada je korišćena koncentracija hitozana i glutaraldehida od 2,0 mas.% i 0,4 vol.%, redom (uzorak M_{CA5}). S druge strane, najlošiji rezultati efikasnosti inkapsulacije su postignuti korišćenjem 3,0 mas.% hitozana, dok je generalno povećanje koncentracije glutaraldehida vodilo efikasnijoj inkapsulaciji.

Tabela 3.16. Efikasnost inkapsulacije (EE) i sadržaj ukupnih polifenola (TPC) mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom sa inkapsuliranim polifenolima.

Mikročestice	EE (%)	TPC (mg GAE/ g _{beads})
M _{GA1}	61,77 ± 1,21	105,11 ± 12,01
M _{GA2}	62,27 ± 1,22	105,70 ± 18,04
M _{GA3}	59,27 ± 0,83	97,21 ± 1,81
M _{GA4}	61,77 ± 1,14	104,59 ± 4,12
M _{GA5}	67,28 ± 1,00	114,49 ± 1,93
M _{GA6}	44,84 ± 0,93	66,39 ± 2,30
M _{GA7}	54,60 ± 0,90	80,51 ± 5,01
M _{GA8}	56,47 ± 1,12	91,52 ± 7,92

Rezultati efikasnosti inkapsulacije i ukupnog sadržaja polifenola su međusobno konzistentni (*Tabela 3.16*), imajući na umu da je ista količina ekstrakta korišćena za pripremu svih uzoraka. S obzirom da se inkapsulacija polifenola odvija procesom bubrenja pripremljenih hidrogelova u višku polifenola, moguće je smanjenjem količine upotrebljenog ekstrakta (pri čemu količina mikročestica ostaje ista) uticati na povećanje efikasnosti inkapsulacije. Pitanje je do kog nivoa je moguće smanjiti odnos ekstrakt - mikročestice, a da se ne naruši izvodljivost samog procesa inkapsulacije. Zbog svega navedenog, stvaran sadržaj polifenola u mikročesticama, odnosno sadržaj ukupnih polifenola (TPC) predstavlja relevantniji parametar za procenu efikasnosti procesa inkapsulacije. Ukupan sadržaj polifenola u mikročesticama varirao je u opsegu 66-114 mg GAE/g_{beads}, u zavisnosti od uzorka (*Tabela 3.16*) (TPC originalnog ekstrakta iznosio je 2,4 mgGAE/ml). Ovo predstavlja dobar rezultat kada se uporedi sa podacima dostupnim u literaturi. Na primer, kada je ekstrakt majčine dušice inkapsuliran u čestice alginata, TPC je iznosio 2,5

mgGAE po gramu suvih čestica (inicijalni ekstrakt majčine dušice sadržao je 2,0 mgGAE/ml) (Stojanović i sar. 2012). Dalje, u mikročestice alginat-hitozan bilo je moguće inkapsulirati do 15 mgGAE/g_{beads} iz vodenog ekstrakta lista maline (koji je sadržao 32 mgGAE/g suve droge) (Belščak-Cvitanović i sar. 2011). Chan i sar. (2010) inkapsulirali su između 140 i 840 mg *Piper sarmentosum* ekstrakta po gramu mikročestica kalcijum-alginata (u zavisnosti od primenjene metode), ali u njihovom radu nije naznačena koncentracija polifenola u početnom ekstraktu.



Slika 3.23. Ukupan sadržaj polifenola (TPC) mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom kao funkcija koncentracije hitozana i GA/Ch masenog odnosa: a) 3D površina i b) konturni dijagram (n=3, SD < 11%).

Uopšteno, efikasnost inkapsulacije, tj. ukupan sadržaj polifenola u mikročesticama, je složena funkcija nekoliko parametara koji utiču na apsorpciju polifenola iz ekstrakta, i to hidrofилности polimerne matrice, poroznosti polimerne mreže i interakcija koje se javljaju između matrice i jedinjenja iz ekstrakta. Glutaraldehid doprinosi hidrofobnoj prirodi matrice, jer kao što je već poznato dialdehidi blokiraju (zauzimaju) grupe koje su odgovorne kako za vezivanje vode i formiranje vodoničnih veza (Beppu i sar. 2007), tako verovatno i ostalih molekula, s obzirom da su amino grupe hitozana zauzete alifatskim lancima, što je i potvrđeno FTIR analizom (odjeljak 9.2). *Slika 3.23* svedoči o tome da ukupni sadržaj polifenola u velikoj meri zavisi od sastava matrice. Može se primetiti da smanjenje masenog odnosa GA/Ch doprinosi smanjenju ukupnog sadržaja polifenola (pri istoj koncentraciji hitozana), što je potpuno suprotan rezultat od očekivanog. Naime, povećanje udela glutaraldehida smanjuje broj protonovanih amino grupa dostupnih za vezivanje sa polifenolima. Međutim, pri nižim GA/Ch masenim odnosima, dolazi do povećanja prečnika čestica (što je prikazano na *Slici 3.11* i diskutovano u odeljku 10.3.2), što ukazuje na slabljenje interakcija između hitozanske matrice i polifenola. Zhang i Kosaraju (2007) su primetili isti efekat veličine čestica na efikasnost inkapsulacije katehina. Drugo moguće objašnjenje za povećanje TPC sa povećanjem udela glutaraldehida u mikročesticama jeste da glutaraldehid obezbeđuje dodatna mesta za vezivanje polifenola preko svojih metilenskih grupa (koje su identifikovane FTIR analizom). U literaturi je već pokazano da su moguće interakcije glutaraldehida sa drugim molekulima koji sadrže grupe neophodne za formiranje Šifovih baza sa aldehydima (Gomaa i sar. 2010). Što se tiče uticaja koncentracije hitozana (pri istom masenom odnosu GA/Ch), očigledno je povećanje sadržaja ukupnih polifenola sa povećanjem koncentracije hitozana od 1,5 na 2,0 mas.%. Sličan efekat primetili su i Hu i sar. (2008); naime, efikasnost inkapsulacije katehina iz čaja u nanočestice hitozana (umrežene TPP-om) je linearno rasla sa povećanjem koncentracije hitozana sa 0,5 na 2,5 mg/ml. Međutim, sa *Slike 3.23* je očigledno da formulacije sa 3 mas.%

hitozana apsorbuju manje polifenola u procesu inkapsulacije. Najverovatnije objašnjenje za navedeno se može naći u činjenici da mikročestice sa 3 mas.% hitozana manje bubre u kiseloj sredini (Trifković i sar. 2014) u kojoj se tzv. „*post-loading*“ inkapsulacija odvija simultanim procesima bubrenja hitozanske matrice i apsorpcije polifenola, a kao posledica jačeg vezivanja lanaca hitozanske matrice.

10.3. Efikasnost inkapsulacije i sadržaj ukupnih polifenola u mikročesticama hitozana umreženih natrijum-tripolifosfatom

U *Tabeli 3.17* prikazane su vrednosti efikasnosti inkapsulacije i sadržaja ukupnih polifenola za mikročestice hitozana umrežene TPP-om u koje se inkapsulacija polifenola vršila procesom apsorpcije, tj. tzv. „*post-loading*“ postupkom. Kao što je bio slučaj i sa mikročesticama hitozana umreženim glutaraldehydom, rezultati efikasnosti inkapsulacije i ukupnog sadržaja polifenola su međusobno konzistentni (*Tabela 3.17*), imajući na umu da je ista količina ekstrakta korišćena za pripremu svih uzoraka.

Tabela 3.17. Efikasnost inkapsulacije (*EE*) i sadržaj ukupnih polifenola (*TPC*) mikročestica hitozana umreženim TPP sa inkapsuliranim polifenolima.

Mikročestice	<i>EE</i> (%)	<i>TPC</i> (mgGAE/g _{beads})
M _{TPP1b}	41,67 ± 7,51	118,79 ± 12,92
M _{TPP2b}	34,55 ± 6,00	104,86 ± 18,21
M _{TPP3b}	34,24 ± 8,14	103,59 ± 24,63

Očigledno je da je najveći sadržaj polifenola postignut inkapsulacijom u mikročestice sa najmanjim udelom TPP-a (M_{TPP1b}). Ovakav rezultat je i očekivan, budući da mikročestice sa najmanjim udelom TPP-a raspolazu najvećim brojem slobodnih protonovanih amino grupa hitozana preko kojih

može doći do vezivanja sa polifenolnim jedinjenjima. Takođe, u prilog visokom stepenu inkapsulacije postignutom za čestice M_{TPP1b} ide i činjenica da su ove čestice najvećeg prečnika (*Tabela 3.7*).

Kada se uzme u obzir površinska struktura mikročestica umreženih TPP-om (odjeljak 9.4.2), može se primetiti da sa povećanjem nepravilnosti strukture, dolazi do smanjenja efikasnosti procesa inkapsulacije. Naime, sa povećanjem udela TPP-a u mikročesticama, dolazi do povećanja naboranosti površine mikročestica, kao i do pojave brazda ili rupa u njihovoj strukturi. Upravo ovakva površinska morfologija mikročestica može da bude razlog gubitka značajne količine aktivne komponente u toku samog procesa inkapsulacije, što je i pokazano u literaturi (Fu i sar. 2001; Desai i Park, 2005a; 2005b).

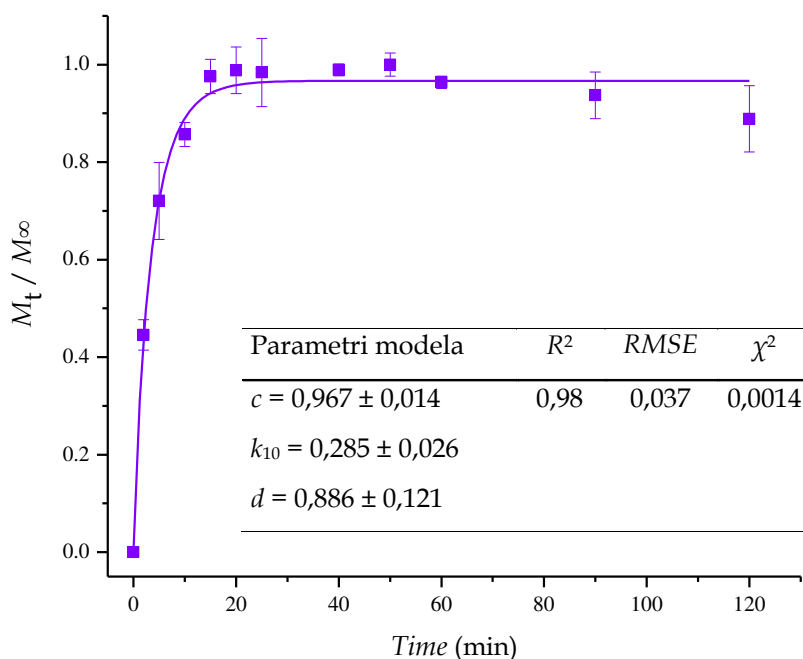
11. Otpuštanje polifenola iz hidrogelova na bazi hitozana

Otpuštanje vodo-rastvornih polifenolnih jedinjenja iz hidrogelova na bazi hitozana podrazumeva simultane procese apsorpcije medijuma za otpuštanje i desorpcije inkapsuliranih polifenola, mehanizmom koji je kontrolisan bubrenjem matrice (Dini i sar. 2003). Difuzione karakteristike sistema, kao i kinetika otpuštanja inkapsuliranih polifenolnih jedinjenja, su funkcija oblika, veličine i raspodele veličina dobijenih mikročestica, zatim stepena umreženja polimerne matrice, sadržaja inkapsuliranih polifenolnih jedinjenja (tj. efikasnosti inkapsulacije i TPC-a) i kinetike procesa bubrenja. Otpuštanje polifenola iz hidrogelova na bazi hitozana je analizirano praćenjem otpuštanja ukupnog sadržaja polifenola, kao i pojedinačnih polifenolnih komponenti, i to u dva medijuma, u vodi (na 25°C) i u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog (GI) trakta (na 37°C), tj. u simuliranom želudačnom fluidu (SGF) a zatim u simuliranom intestinalnom fluidu (SIF).

11.1. Otpuštanje polifenola iz mikročestica alginat-hitozan

Profil otpuštanja polifenola iz mikročestica alginat-hitozan prikazan je na *Slici 3.24*. Najveći deo polifenolnih jedinjenja se iz mikročestica alginat-hitozan otpušta relativno brzo, te kriva otpuštanja dostiže plato nakon otprilike 20-30 min. U principu, ovakvi rezultati su u saglasnosti sa podacima dostupnim u literaturi. Na primer, polifenoli ekstrahovani iz različitih vrsta medicinskih biljaka (lista maline, gloga, dobričice, koprive, hajdučke trave, lista masline) su iz čestica alginat-hitozan produženo otpušteni do 30 min, nakon čega se potiže ravnotežno stanje (Belščak-Cvitanović i sar. 2011). Naime, ovo otpuštanje polifenola iz mikročestica alginat-hitozan u trajanju od 30 min predstavlja unapređenje sistema mikroinkapsuliranih polifenola u čestice alginata, gde se otpuštanje odvija u prvih 10 min (Belščak-Cvitanović i sar. 2010). Može se pretpostaviti da je donekle produženo otpuštanje aktivne komponente iz mikročestica alginat-hitozan posledica veza koje se uspostavljaju između

alginata i hitozana, kao i umrežavanja alginata (Wong i sar. 2002). Takođe, treba uzeti u obzir moguće interakcije između polifenola iz ekstrakta i hitozana, koje mogu uticati na produženo otpuštanje (Popa i sar. 2000), a koje su pokazane FTIR analizom (odjeljak 9.2).



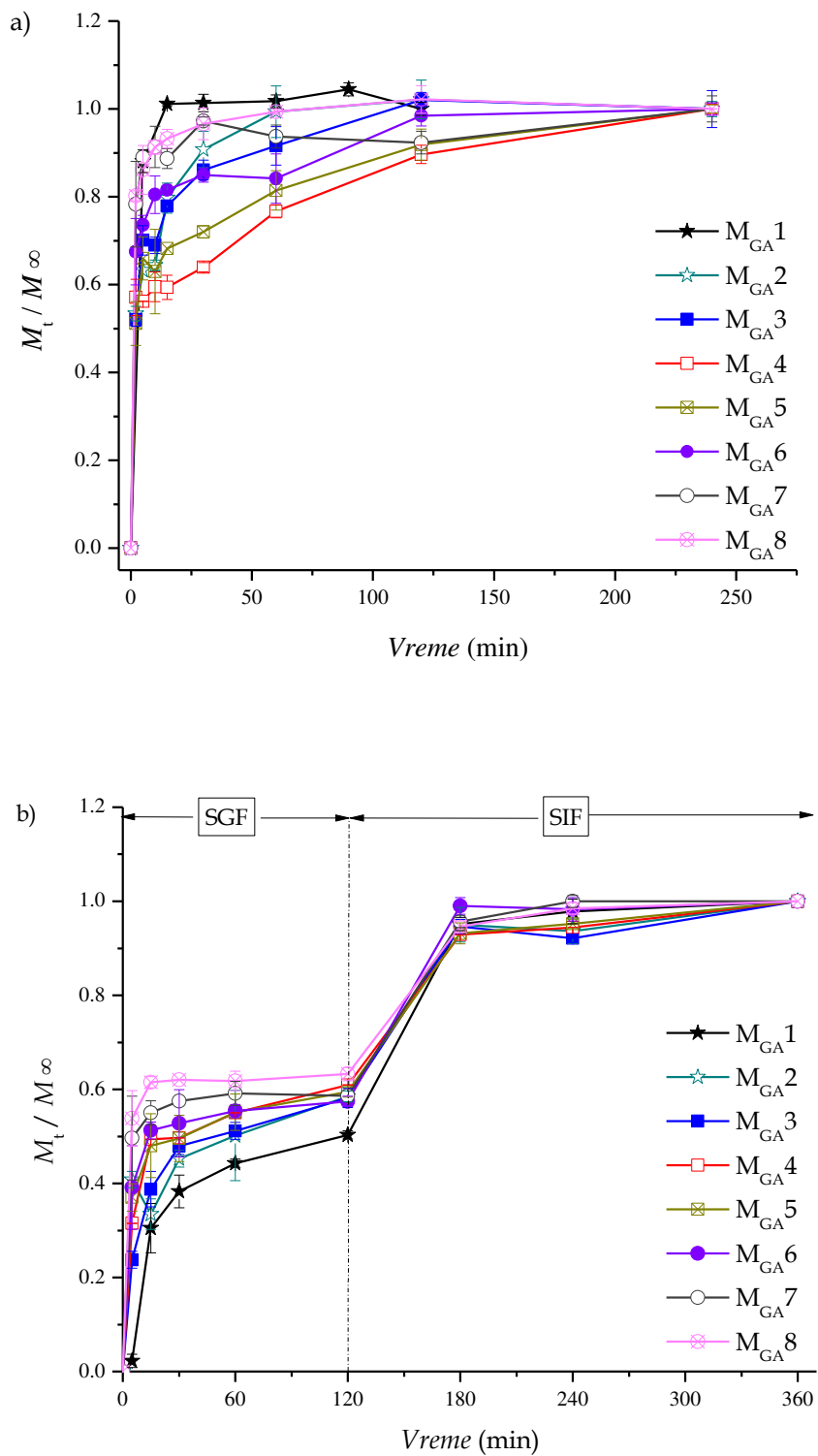
Slika 3.24. Kinetika otpuštanja polifenola iz mikročestica alginat-hitozan i parametri Weibull-ovog modela (simboli označavaju eksperimentalno dobijene podatke, dok se linija odnosi na Weibull-ov model).

Eksperimentalno dobijeni podaci za otpuštanje polifenola iz mikročestica alginat-hitozan su analizirani primenom različitih teorijskih i empirijskih modela (jednačine (3)-(11)). Najbolje slaganje sa eksperimentalnim podacima postignuto je primenom Weibull-ovog modela, dok su za ostale primenjene modele koeficijenti korelacije bili niski ($R^2 < 0,9$). Na osnovu vrednosti parametra d ($d=0,89 \pm 0,12$) dobijenog primenom Weibull-ovog modela na eksperimentalno dobijene podatke otpuštanja polifenola iz mikročestica alginat-hitozan, može se zaključiti da se otpuštanje odvija po kombinovanom

mehanizmu, koji se često susreće u studijama otpuštanja inkapsulirane aktivne komponente. Naime, prema Papadopoulou i sar. (2006) ukoliko je parametar d Weibull-ovog modela u opsegu 0,75–1,0 reč o kombinovanom mehanizmu otpuštanja, pri čemu je dominantna difuzija u Euclidian-skom supstratu.

11.2. Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom

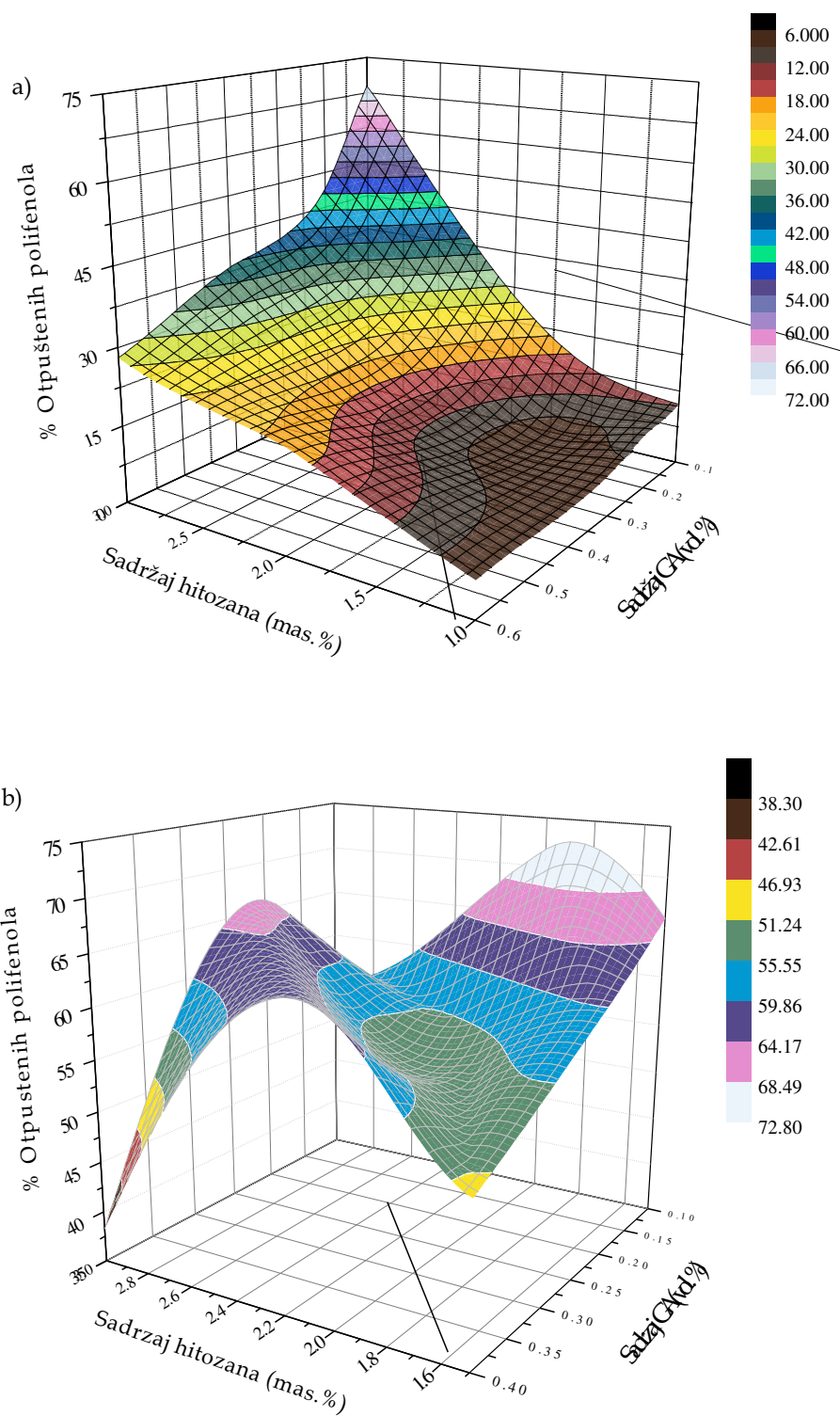
Udeo otpuštenih polifenola iz mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom (M_t/M_∞) u zavisnosti od vremena, u vodi i u simuliranim uslovima GI trakta je prikazan na *Slici 3.25a* i *3.25b*, redom.



Slika 3.25. Otpuštanje polifenola majčine dušice iz mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom a) u vodi i b) u SGF-SIF.

Na *Slici 3.25a* se jasno uočava tzv. „burst“ efekat, tj. brzo inicijalno otpuštanje polifenola u vodi, pri čemu se može primetiti da se 56-89% ukupno otpuštenih polifenola otpusti u prvih 5 min eksperimenta, u zavisnosti od uzorka.

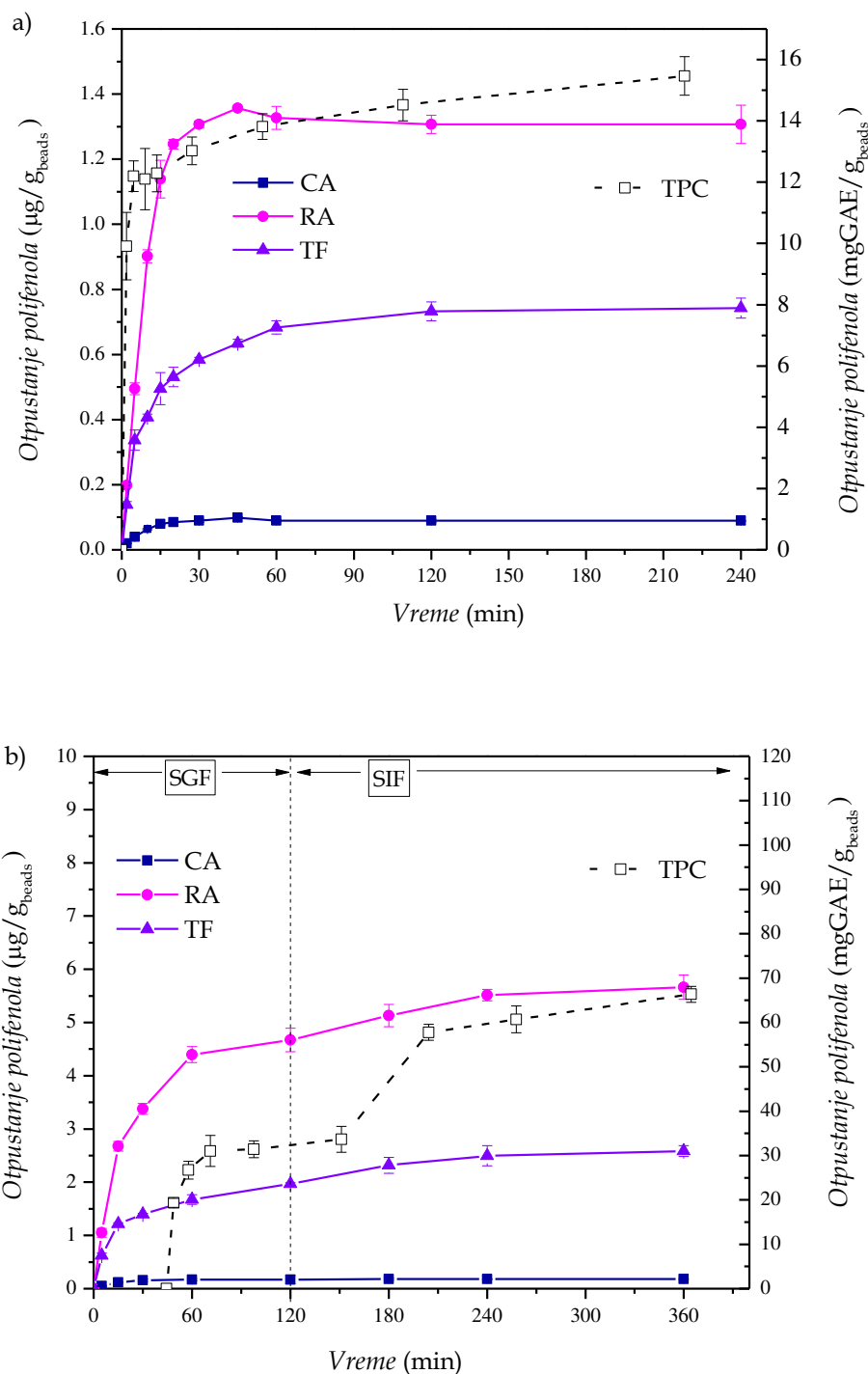
Slično tome, otpuštanje polifenola iz mikročestica u uslovima SGF-SIF (*Slika 3.25b*) takođe ispoljava početni „burst“ efekat, koji je u nekim uzorcima bio više izražen (npr. uzorak M_{GA8}) dok je u drugim uzorcima manje uočljiv (npr. uzorak M_{GA1}). Difuzija polifenola u okolni medijum se odvija simultano sa bubrenjem polimerne matrice. Inicijalno brzo otpuštanje polifenola je u najvećoj meri uzrokovano desorpcijom neinkapsuliranih polifenola sa površine mikročestica. Nakon početnog brzog otpuštanja polifenola, sledi period sporijeg otpuštanja, što je karakteristika desorpcije polifenola iz unutrašnjosti nabubrela polimerne matrice, pri čemu se difuzija polifenola odvija preko kompleksnih šupljina u matrici (Forni i sar. 1992). Step en bubrenja je u najvećoj meri uslovljen gustinom umreženja polimerne mreže, o čemu je već bilo reči u odeljku 9.1.1, a što je potvrđeno i u literaturi (Dini i sar. 2003). Očekivani efekat jeste da sa smanjenjem koncentracije umreživača dolazi do povećanja brzine otpuštanja polifenola, usled smanjenja slobodnog prostora za difuziju polifenola. Međutim, dobijeni rezultat je bio potpuno suprotan; kada se porede čestice od M_{GA8} (najmanje mikročestice) do M_{GA1} (mikročestice najvećeg prečnika) (*Tabela 3.6*) primetno je smanjenje brzine otpuštanja. Naime, veće mikročestice obezbeđuju dužu putanju za difuziju polifenola, dok čestice manjeg prečnika imaju veću specifičnu površinu, što dodatno olakšava otpuštanje inkapsuliranih jedinjenja. Oko 70% ukupnog sadržaja inkapsuliranih polifenola je otpušteno u toku 6 h, pri čemu je oko polovine te količine polifenola otpušteno u medijumu pH vrednosti $2,20 \pm 0,01$ (*Slika 3.26*). Nepotpuno otpuštanje polifenola (i u vodi i u SGF-SIF) dovodi do zaključka da postoje hemijske interakcije između polifenolnih jedinjenja i matrice (što je takođe potvrđeno FTIR analizom, odeljak 9.2), s obzirom da su polifenoli potpuno rastvorni u vodenom medijumu (Popa i sar. 2000).



Slika 3.26. Procenat otpuštenih polifenola iz mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom a) u vodi i b) u SGF-SIF.

Na *Slici 3.27* prikazano je otpuštanje ukupnih polifenolnih jedinjenja (TPC), kafeinske kiseline (CA), ruzmarinske kiseline (RA) i ukupnih flavonoida (TF) u a) vodi i b) uslovima simuliranog GI trakta. Kao reprezentativni uzorak izabrane su mikročestice M_{GA5}. Podaci otpuštanja su prikazani kao količina otpuštenih jedinjenja po gramu čestica (suve mase) u zavisnosti od vremena. Sa *Slike 3.27a* može se primetiti da svi profili otpuštanja imaju isti oblik, kao i da otpuštanje fenol-karboksilnih kiselina traje 45 min, dok je otpuštanje flavonoida znatno sporije, čak do 2 h. Ovo je očekivani rezultat, s obzirom da su fenolne kiseline molekuli malih masa (npr. CA ima molekulsku masu od 180 kDa), pa je shodno tome njihovo otpuštanje brže, za razliku od flavonoida koji imaju veće molekulske mase (200-600 kDa). Odnos koncentracija TF:CA:RA u medijumu za otpuštanje iznosio je 0,58:0,07:1, dok je odnos ovih jedinjenja u svežem ekstraktu majčine dušice 0,56:0,01:1 ($0,1672 \pm 0,0011$ mg/ml TF, $0,0031 \pm 0,0002$ mg/ml CA, i $0,2836 \pm 0,0015$ mg/ml RA, što je utvrđeno HPLC analizom, odeljak 8.2). Može se zaključiti da se CA otpušta u većem procentu u odnosu na druge dve grupe jedinjenja praćena ovom analizom ($p < 0,05$). Najverovatniji razlog je činjenica da RA, a posebno TF, formiraju jače kovalentne i vodonične veze sa amino grupama hitozana (koje su potvrđene FTIR analizom), budući da poseduju veći broj hidroksilnih grupa.

Količina polifenola otpuštenih u uslovima SGF je 2-4 puta veća od količine polifenola otpuštenih u vodi, što je zapravo posledica činjenice da mikročestice hitozana umrežene glutaralhidom bubre više u kiseloj sredini (*Slika 3.2*). Naime, pri niskim vrednostima pH (prva 2 h u SGF) odigrava se protonovanje amino grupa hitozana. Novonastale naelektrisane grupe hitozana dovode do odbijanja polimernih lanaca i raskidanja sekundarnih interakcija između molekula, kao što su vodonične veze, na taj način pospešujući difuziju vode u gel mikročestice, što na kraju rezultuje stepenom bubrenja od čak 570%; u vodi iste mikročestice bubre do 280% (odeljak 9.1.1). Slično ovome, Zhang i Kosaraju (2007) su pokazali da je otpuštanje katehina iz mikročestica hitozana umreženih TPP-om u vezi sa bubrenjem mikročestica.



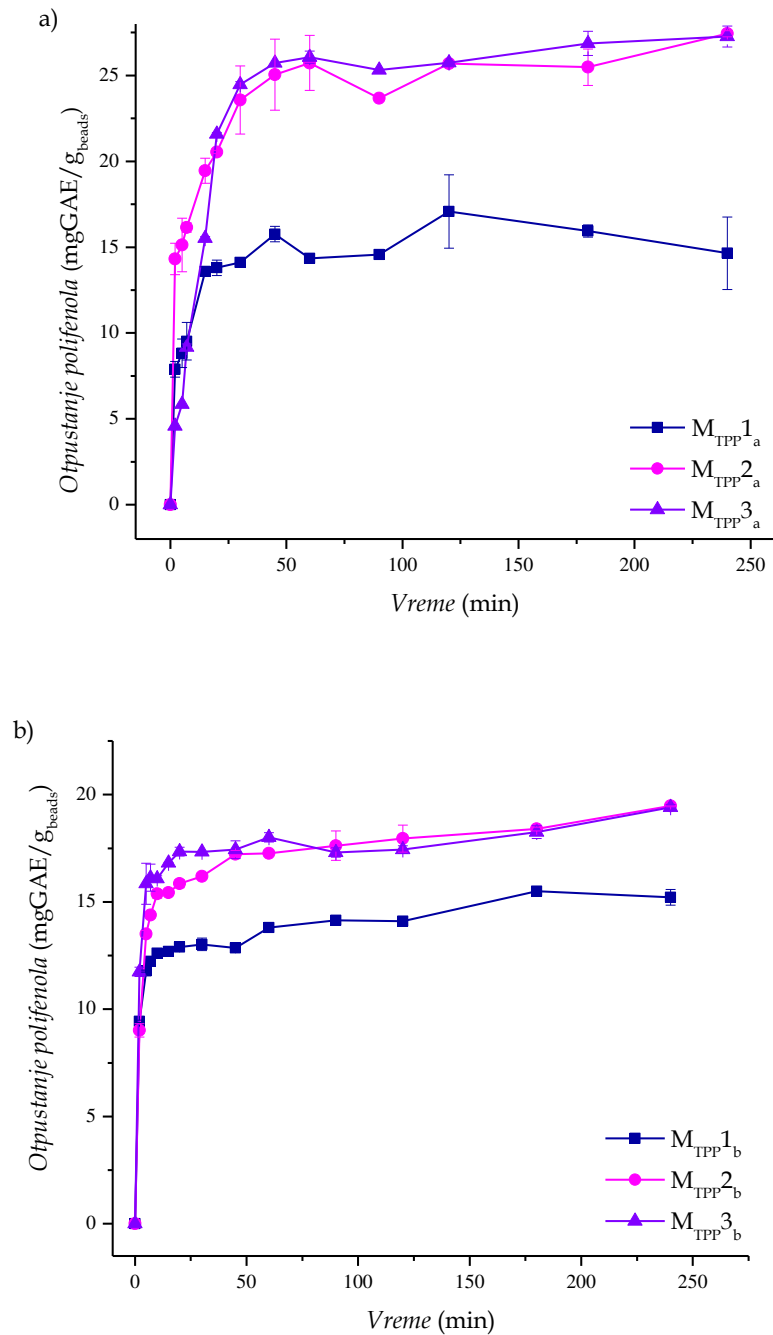
Slika 3.27. Kinetika otpuštanja kafeinske kiseline (CA), ruzmarinske kiseline (RA), ukupnih flavonoida (TF) i ukupnih polifenola (TPC) iz mikročestica hitozana M_{GA5}: a) u vodi i b) u uslovima SGF-SIF. Leva ordinata se odnosi na otpuštanje CA, RA i TF, dok se desna ordinata odnosi na TPC.

Dalje, u simuliranim uslovima intestinalnog fluida (SIF) dolazi do skupljanja mikročestica, usled tendencije vodoničnih veza da se udružuju prevođenjem NH_3^+ u NH_2 grupe. Profili otpuštanja pokazuju da je u vodi CA lakše otpuštena iz mikročestica, a da je ravnotežna koncentracija u simuliranom želudačnom fluidu postignuta posle 2 h. S druge strane, otpuštanje RA i TF je produženo dodatna 4 h u medijumu intestinalne pH vrednosti od 6,8. Produženo otpuštanje polifenolnih jedinjenja u SGF u poređenju sa otpuštanjem u vodi je u saglasnosti sa niskom rastorljivošću kompleksa hitozan-polifenoli u kiseloj sredini, što je bilo predmet istraživanja Popa i sar. (2000).

Količina otpuštenih ukupnih polifenola (TPC) varira u opsegu 50-70%, što ukazuje da postoji određena količina polifenola dostupna za dalje otpuštanje. Imajući u vidu da su mikročestice hitozana mukoadhezivne i degradabilne u uslovima sredine koji vladaju u debelom crevu (Knežević -Jugović i sar. 2010), preostali polifenoli mogu biti otpušteni u dužim vremenskim periodima u ovom regionu.

11.3. Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih tri-polifosfatom

Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih TPP-om u vodi na 25°C prikazano je na *Slici 3.28*. Uopšteno, literaturno dostupni podaci o otpuštanju aktivne komponente i uticaju stepena umreženja na otpuštanje iz čestica dobijenih procesom sprej-sušenja pokazuju različite trendove. Tako su na primer autori Desai i Park (2005c) pokazali da sa povećanjem udela umreživača dolazi do smanjenja otpuštanja aktivne komponente. Razlog za ovaj trend leži u činjenici da sa povećanjem udela umreživača dolazi do formiranja jače polimerne mreže, koja ima manji kapacitet bubrenja, pa je samim tim i otpuštanje manje, što je potvrđeno i drugim studijama (Shu i Zhu, 2000; Mi i sar. 2003).

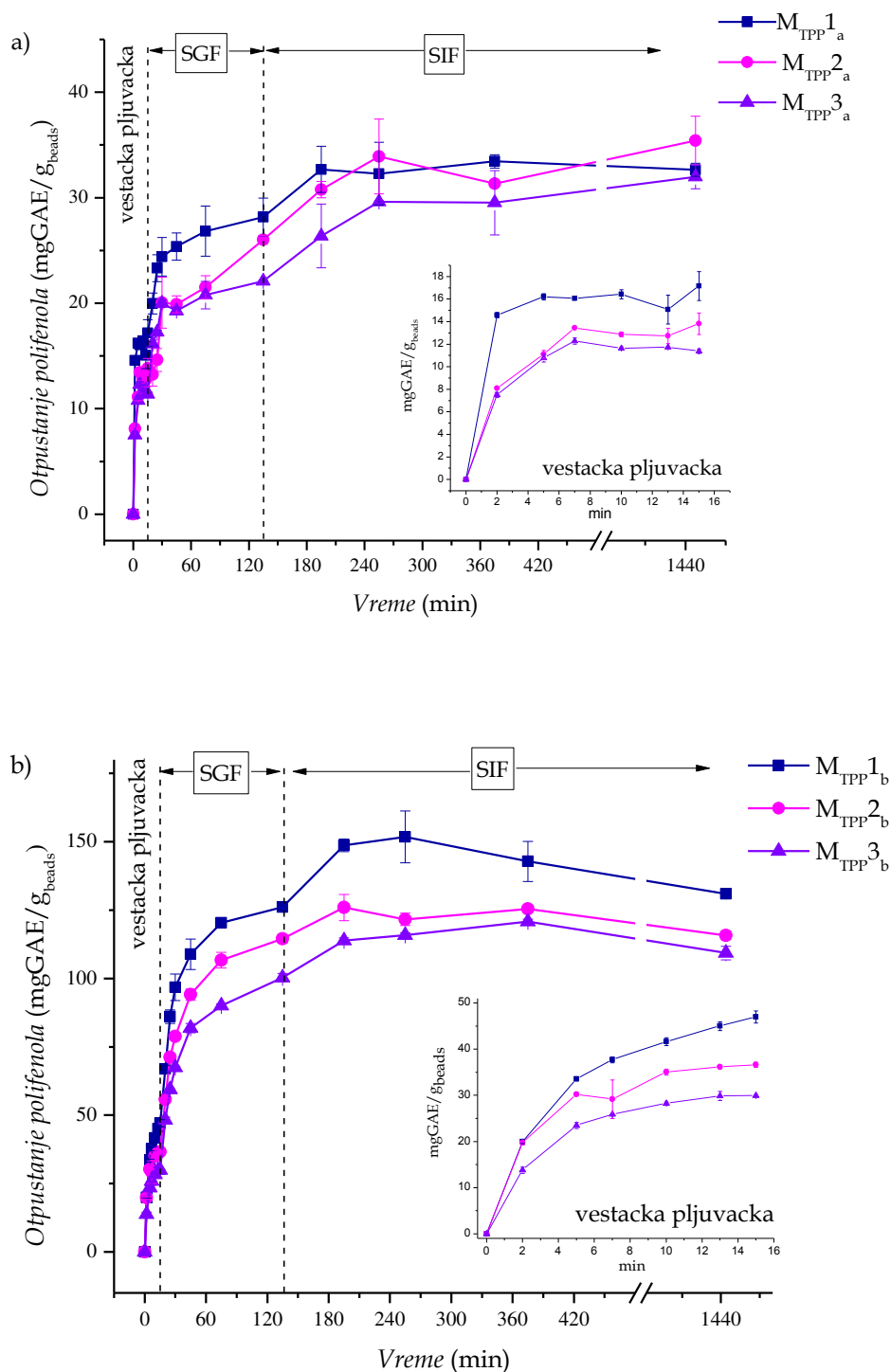


Slika 3.28. Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih TPP-om u vodi, pri čemu je inkapsulacija polifenola vršena a) „in-situ“ postupkom i b) „post-loading“ postupkom.

Otpuštanje aktivne komponente iz mikročestica je funkcija i njihove morfologije, odnosno površinske strukture. Poznato je da čestice koje su poroznije strukture brže otpuštaju inkapsulirane aktivne komponente (Mi i sar. 1999; Desai i Park, 2005b). Naime, porozna struktura mikročestica je podložnija degradaciji u medijumu za otpuštanje od manje poroznih mikročestica umreženije strukture.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivanje otpuštanja polifenola iz mikročestica hitozana umreženih TPP-om u vodi dalo je slične rezultate, bilo da je sam postupak inkapsulacije rađen „*in situ*” ili postupkom „*post-loading*”-a. Polifenoli se najsporije otpuštaju iz mikročestica M_{TPP1} . Budući da su ove mikročestice imale najveći prečnik, ovo je očekivan rezultat. Naime, put koji polifenoli moraju da pređu prilikom difuzije iz mikročestica u okolni medijum, u velikoj meri određuje brzinu otpuštanja polifenola. Pri tome, količina otpuštenih polifenola je bila nešto veća za čestice kod koji je inkapsulacija vršena „*in situ*” za razliku od čestica koje su inkapsulirane „*post-loading*” postupkom (~27 mg GAE po gramu čestica i ~19 mg GAE po gramu čestica, redom).

Na *Slici 3.29* prikazani su rezultati otpuštanja polifenola iz mikročestica umreženih TPP-om u uslovima simuliranog gastrointestinalnog trakta, i to najpre u uslovima veštačke pljuvačke, zatim SGF i na kraju SIF, na temperaturi od 37°C. Pod ovakvim uslovima, polifenoli se najbrže otpuštaju iz mikročestica M_{TPP1a} , pri čemu je trend isti za sva tri ispitana medijuma, i za oba postupka inkapsulacije – „*in situ*” (*Slika 3.29a*) i „*post-loading*” postupak (*Slika 3.29b*). Naime, poznato je da se difuzija polifenola u okolni medijum odvija simultano sa bubrenjem polimerne matrice, pri čemu polifenoli difunduju kroz šupljine u matrici (Forni i sar. 1992); što je polimerna matrica umreženija, to će bubrenje mikročestica biti teže, odnosno šupljine u matrici manje, pa samim tim i otpuštanje polifenola otežano.



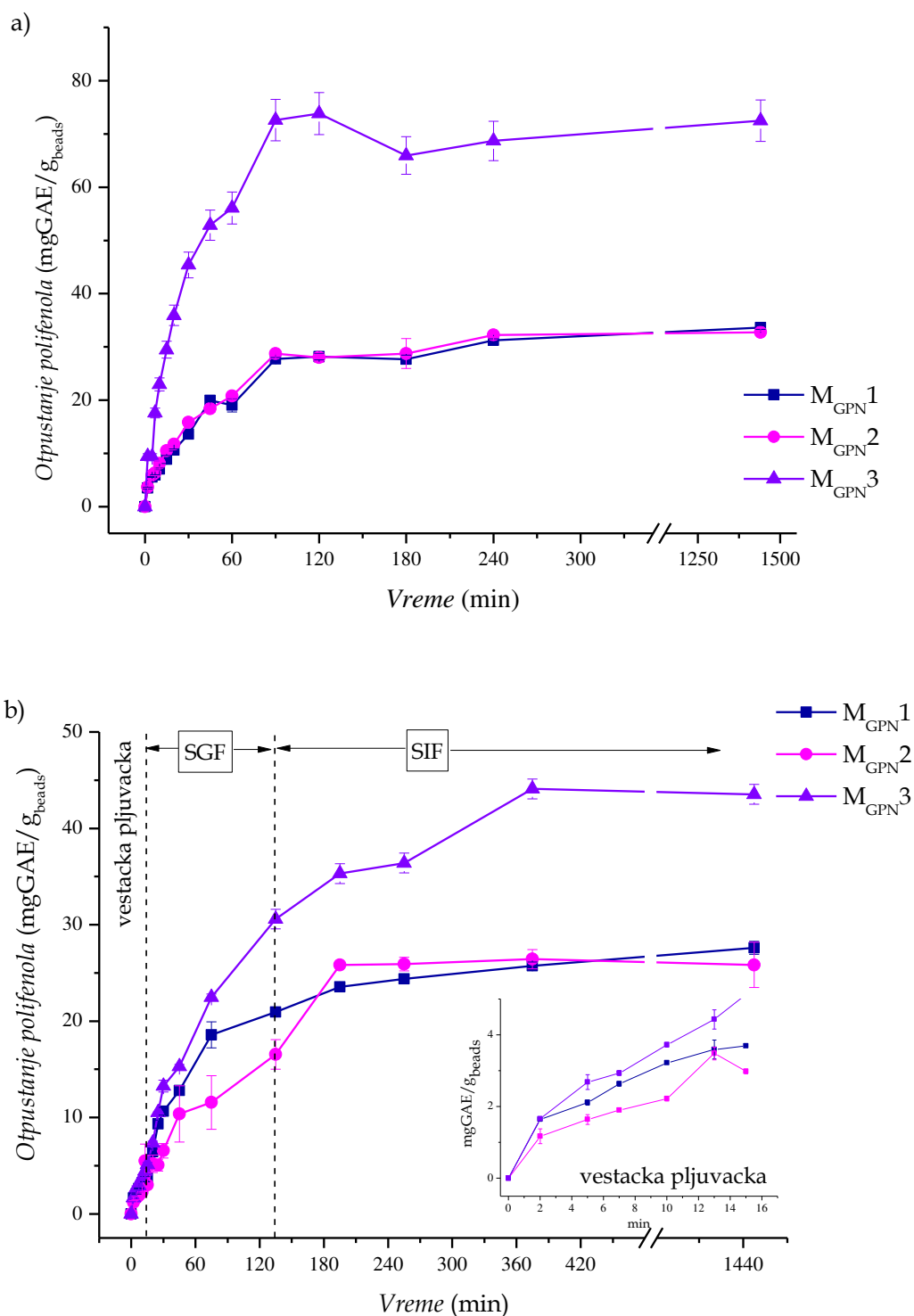
Slika 3.29. Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih TPP-om u simuliranim uslovima GI trakta, pri čemu je inkapsulacija polifenola vršena a) „in-situ“ postupkom i b) „post-loading“ postupkom.

Kada se upoređi otpuštanje polifenola iz mikročestica umreženih TPP-om u uslovima simuliranog gastrointestinalnog trakta i u vodi, može se zaključiti da se značajno veća koncentracija polifenola otpusti u simuliranim uslovima. Najpre se u uslovima veštačke pljuvačke oslobodi do 63% odnosno do 47% ukupno otpuštenih polifenola (u zavisnosti od postupka kojim je vršena inkapsulacija polifenola - „*in situ*” ili „*post-loading*”). Zatim se oslobađanje nastavlja u uslovima SGF. Proces bubrenja mikročestica hitozana zavisi od pH okruženja, jer protonovane amino grupa hitozana u uslovima kisele sredine uslovljavaju elektrostatičko odbijanje polimernih lanaca i razbijanje sekundarnih interakcija između molekula. Sve navedeno pospešuje proces difuzije polifenola u okolni medijum, pa se najveći procenat inkapsuliranih polifenola se oslobodi upravo u SGF (do 88% odnosno do 83% ukupno oslobođenih polifenola, za „*in situ*” odnosno „*post-loading*” postupak inkapsulacije, redom). Prilikom transfera u SIF dolazi do kontrahovanja mikročestica, usled prevođenja NH_3^+ u NH_2 grupe., pri čemu dolazi do oslobađanja preostale količine polifenola iz matrice.

Postupak „*post-loading*” inkapsulacije polifenola u prethodno pripremljene mikročestice pokazao se kao superiorniji u odnosu na inkapsulaciju „*in situ*” za mikročestice hitozana umrežene TPP-om, sa aspekta količine otpuštenih polifenola. Ukoliko mikročestice hitozana posmatramo kao nosače aktivnih komponenti sa glavnim ciljem dostave aktivne komponente na ciljano mesto dejstva, evidentno je da mikročestice sa polifenolima inkapsuliranim „*post-loading*” postupkom ispunjavaju taj cilj u većem procentu: ukupna količina otpuštenih polifenola za npr. mikročestice M_{TPP1} je bila 152 mgGAE/g_{beads} za „*post-loading*” postupak nasuprot 33 mgGAE/g_{beads} za „*in situ*” inkapsulaciju, 4 puta više (podaci se odnose na otpuštanje u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta, [Slika 3.29](#)). Stoga, sa aspekta otpuštanja „*post-loading*” postupak inkapsulacije polifenola se pokazao kao efikasniji.

11.4. Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih genipinom

Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih genipinom prikazano je na *Slici 3.30*. Trend otpuštanja polifenola iz mikročestica bio je isti i kada je otpuštanje vršeno u vodi (*Slika 3.30a*) i u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta (*Slika 3.30b*). Najbrže otpuštanje, kao i najveća količina otpuštenih polifenola postignuta je iz mikročestica M_{GPN3}. Međutim, za razliku od mikročestica umreženih TPP-om gde je nešto veća koncentracija polifenola otpuštena u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta (*Slika 3.28a*) nego u vodi (*Slika 3.29a*), za mikročestice umrežene genipinom to nije bio slučaj. Oko 72 mgGAE/g_{beads} je oslobođeno iz mikročestica M_{GPN3} u vodi, dok je u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta oslobođeno oko 44 mgGAE/g_{beads}.

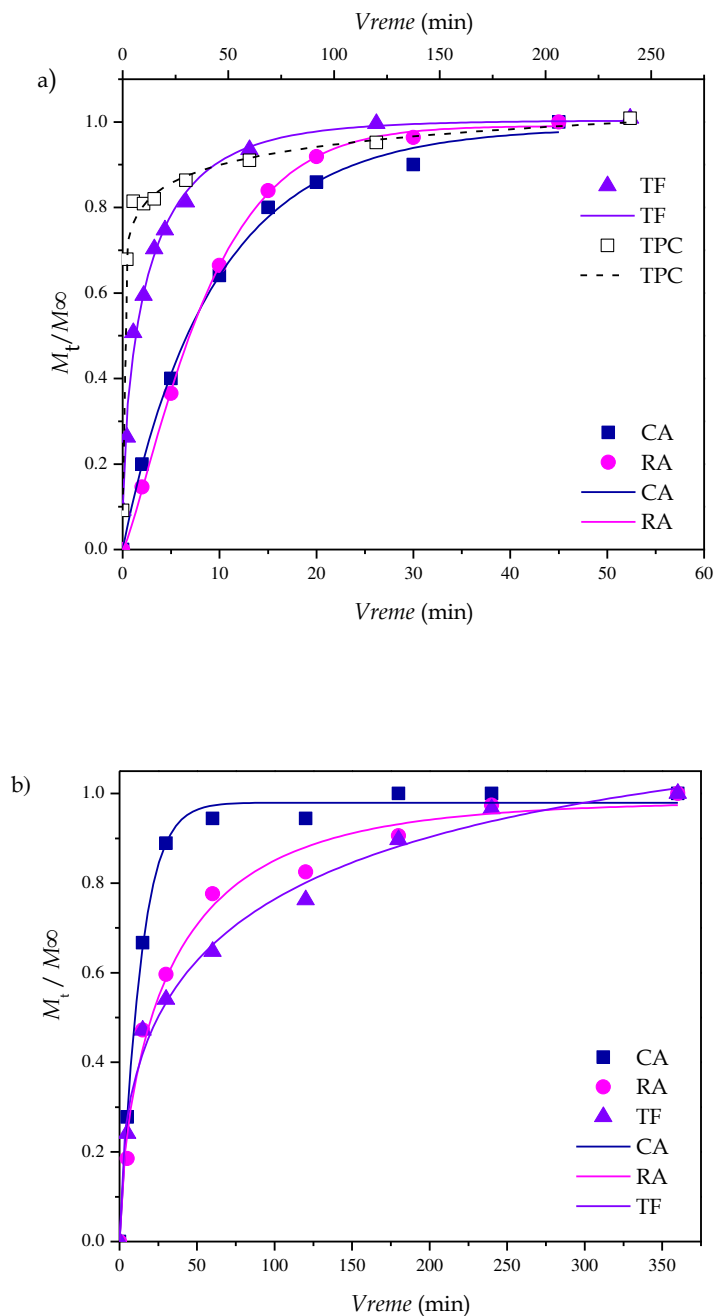


Slika 3.30. Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih genipinom a) u vodi i b) u simuliranim uslovima GI trakta.

11.5. Modelovanje otpuštanja polifenola iz mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom

Eksperimentalno određeni profili otpuštanja polifenola su analizirani primenom poznatih teorijskih, polu-empirijskih i empirijskih modela predstavljenim jednačinama (7) - (15). Na *Slici 3.31a* i *3.31b* prikazano je poređenje rezultata fitovanja dobijenih korišćenjem Weibull-ovog modela za četiri profila otpuštanja (linije) i odgovarajućih eksperimentalnih podataka (simboli) u vodi, i u SGF-SIF, redom.

Za razliku od kinetike bubrenja, modeli prikazani jednačinama (7) - (13) ili nisu pokazali dobre rezultate fitovanja ($R^2 < 0,98$) ili su u potpunosti bili neadekvatni. Najbolji rezultate fitovanja ($R^2 \geq 0,99$) dobijeni su korišćenjem Weibull-ovog modela, pri čemu su nešto niže vrednosti korelacionog koeficijenta dobijene za TPC, posebno u SGF-SIF uslovima. Rezultati dobijeni korišćenjem Weibull-ovog modela (jednačina (10)) prikazani su u *Tabeli 3.18*.



Slika 3.31. Kinetika otpuštanja polifenola (M_t/M_∞) za mikročestice M_{GA5} : a) u vodi (donja apcisa se odnosi na vreme otpuštanja kafeinske (CA) i ruzmarinske (RA) kiseline, a gornja apcisa se odnosi na vreme otpuštanja ukupnih polifenola (TPC) i ukupnih flavonoida (TF)) i b) u uslovima SGF-SIF. Simboli se odnose na eksperimentalne podatke, dok se linije odnose na primenu Weibull-ovog modela.

Tabela 3.18. Vrednosti parametara c , k_{10} i d i statistički parametri dobijeni primenom jednačine (10) na eksperimentalno dobijene rezultate otpuštanja.

Medijum za otpuštanje	Jedinjenje	c	k_{10}	d	R^2	RMSE	χ^2
VODA	TPC ^a	4,49 ± 3,34	1,95×10 ⁻⁷ ± 1,32×10 ⁻⁸	0,141 ± 0,111	0,98	0,023	7,68×10 ⁻⁴
	CA ^b	0,988 ± 0,035	0,105 ± 0,012	0,962 ± 0,097	0,995	0,017	9,12×10 ⁻⁴
	RA ^b	0,991 ± 0,010	0,109 ± 0,003	1,24 ± 0,045	0,9992	7,01×10 ⁻³	1,48×10 ⁻⁴
	TF ^b	0,995 ± 0,030	0,074 ± 0,011	0,664 ± 0,068	0,990	0,028	0,0014
SGF - SIF	TPC ^a	58,1 ± 4,81	1,29×10 ⁻⁸ ± 6,43×10 ⁻⁹	0,331 ± 0,030	0,91	0,078	0,0091
	CA ^b	0,979 ± 0,011	0,074 ± 0,004	1,09 ± 0,083	0,996	0,019	5,63×10 ⁻⁴
	RA ^b	0,984 ± 0,041	0,029 ± 0,005	0,655 ± 0,085	0,990	0,034	0,0017
	TF ^b	1,25 ± 0,230	0,009 ± 0,007	0,441 ± 0,070	0,990	0,028	0,0011

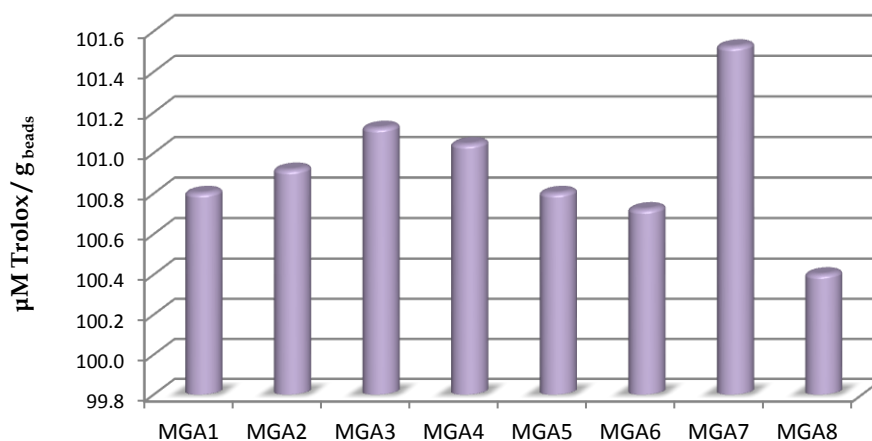
^a određeno spektrofotometrijski.

^b određeno HPLC-om.

Iako je već pokazano da Weibull-ovog model adekvatno opisuje kinetiku otpuštanja aktivnih jedinjenja iz različitih sistema (Papadopoulou i sar. 2006; Segale i sar. 2008), i dalje postoje autori koji ne podržavaju primenu ovog modela usled činjenice da nije kinetički zasnovan (Costa i Sousa Lobo, 2001). Uprkos tome, u literaturi se mogu naći studije koje su za cilj imale racionalizaciju i objašnjenje kinetičkih parametara Weibull-ovog modela (Dini i sar. 2003; Kosmidis i sar. 2003a; 2003b). Naime, otkriveno je da, polazeći od Monte Carlo simulacija, otpuštanje aktivne komponente iz Euclidian-skih ili fraktalnih matrica po mehanizmu Fick-ove difuzije, može biti opisano Weibull-ovim modelom (Kosmidis i sar. 2003a; 2003b). Prema istraživanju Papadopoulou i sar. (2006), ukoliko je eksponent iz Weibull-ove jednačine $d = 1$, difuzija aktivne komponente se odvija po Prvom Fick-ovom zakonu difuzije. U slučaju otpuštanja polifenolnih jedinjenja iz mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom, može se zaključiti da je otpuštanje CA u oba medijuma (i u vodi i u SGF-SIF) blizu difuzije po Prvom Fick-ovom zakonu, s obzirom na vrednost eksponenta d (Tabela 3.18). Za ostala jedinjenja čije je otpuštanje praćeno, određeno je da je $d < 0,75$, što se može pripisati Fick-ovoj difuziji ili u fraktalnim ili u Euclidian-skim prostorima, kao dominantnom mehanizmu otpuštanja. Jedini izuzetak je otpuštanje RA u vodi, gde je $d > 1$, što je posledica kompleksnog mehanizma otpuštanja.

12. Antioksidativna aktivnost inkapsuliranih polifenola

Zadržana antioksidativna aktivnost inkapsuliranih polifenola ispitana je za mikročestice hitozana umrežene glutaraldehidom, a rezultati su prikazani na *Slici 3.32*. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti inkapsuliranih polifenola je vršeno nakon otpuštanja. Naime, cilj inkapsulacije je da se zaštiti aktivnost polifenola do njihovog otpuštanja na ciljanom mestu dejstva, gde polifenolna jedinjenja treba da ispolje svoje biološko dejstvo. S tim u vezi, zadržana antioksidativna aktivnost inkapsuliranih polifenola je ispitana nakon 2 h otpuštanja u vodi, kako bi bilo moguće proceniti i uticaj procesa inkapsulacije, zaštitni efekat matrice, ali i uticaj procesa otpuštanja na antioksidativnu aktivnost polifenola.



Slika 3.32. Antioksidativna aktivnost polifenola inkapsuliranih u mikročestice hitozana umrežene glutaradehidom.

Iako su mikročestice hitozana umrežene gluteraldehidom sa inkapsuliranim polifenolima bile izložene procesu sušenja na 37°C u toku 48 h, inkapsulirani polifenoli su zadržali visoku antioksidativnu aktivnost od $100,92 \pm 0,36$ μmol Trolox/gbeads za sve uzorke (*Slika 3.32*) (antioksidativna aktivnost ekstrakta majčine dušice iznosila je $2,0 \pm 0,29$ mmol Trolox/l ekstrakta, odnosno $40,0 \pm 2,21$ μmol Trolox/g suve droge, *Tabela 3.3*). Kada se dobijeni rezultati uporede

sa literaturno dostupnim podacima, može se zaključiti da sačuvana antioksidativna aktivnost u mikročesticama hitozana umreženim glutaraldehydom predstavlja dobar rezultat. Na primer, Stojanović i sar. (2012) pokazali su da je antioksidativni kapacitet polifenola majčine dušice nakon inkapsulacije u alginatne mikročestice iznosio 10,36 $\mu\text{mol Trolox/gbeads}$ za hidrogel mikročestice, odnosno 56,6 $\mu\text{mol Trolox/gbeads}$ za suve mikročestice. Slično tome, Belščak-Cvitanović i sar. (2011) su pokazali antioksidativni kapacitet nekoliko različitih biljnih ekstrakata (lista maline, gloja, bršljana, koprive, hajdučke trave i lista masline) inkapsuliranih u mikročestice alginat-hitozan iznosio od ~25 do ~60 $\mu\text{mol Trolox/gbeads}$.

13. Poređenje hidrogelova na bazi hitozana za inkapsulaciju polifenola

Uopšteno, kada se govori o primeni sistema za kontrolisano otpuštanje aktivne komponente u prehrambenoj/farmaceutskoj industriji, neophodno je voditi računa o sledećem: (1) veličini dobijenih čestica, (2) pogodnosti primenjenog materijala za proizvodnju mikročestica, i (3) pogodnosti, tj. izvodljivosti samog procesa proizvodnje na „large-scale“ nivou. Ovi zahtevi predstavljaju preduslov koji je neophodno ispuniti kako bi uvođenje novog postupka u prehrambenu/farmaceutsku industriju, tj. formulisanje funkcionalnih aditiva i njihova primena u proizvodima, odnosno formulisanje inovativnog prehrambenog/farmaceutskog proizvoda bilo uspešno.

Veličina mikročestica predstavlja glavni preduslov uspešnoj formulaciji sistema za kontrolisano otpuštanje i dostavom aktivne komponente. Naime, veličina čestica je parametar koji u velikoj meri kontroliše brzinu difuzije aktivne komponente iz sistema za kontrolisano otpuštanje, budući da čestice većeg prečnika predstavljaju veću prepreku difuziji aktivne komponente iz unutrašnjosti mikročestica u okolni medijum, te je samim tim otpuštanje aktivne komponente produženo. Međutim, sa aspekta teksturnih i senzornih karakteristika krajnjeg proizvoda poželjne su male čestice, kako ne bi došlo do narušavanja senzornih karakteristika proizvoda na koje su potrošači navikli. Stoga je pri formulisanju sistema za kontrolisano otpuštanje aktivne komponente neophodno pronaći kompromisno rešenje i pomiriti ova dva potpuno suprotstavljena zahteva.

U ovoj doktorskoj disertaciji, najmanje mikročestice su bile mikročestice hitozana umrežene genipinom i TPP-om (od 6,5 μm do 9,3 μm), zatim mikročestice umrežene glutaraldehydom (220 - 792 μm), dok su mikročestice najvećeg prečnika bile mikročestice alginat-hitozan (~890 μm). Međutim, uprkos velikom prečniku alginat-hitozan mikročestica, otpuštanje polifenola iz ovih sistema se odvijalo veoma brzo - u prvih 30 min otpuštanja oslobodi se skoro celokupna količina ukupno otpuštenih polifenola (98%), kao posledica velike poroznosti matrice alginat-hitozan. Sa druge strane, iako najmanjeg

prečnika, mikročestice umrežene TPP-om i genipinom pokazale su se kao bolje sa aspekta otpuštanja budući da omogućavaju produženo/kontrolisano otpuštanje polifenola do čak 6 h u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta. Mikročestice hitozana umrežene glutaraldehidom takođe su se pokazale kao superiorne sa aspekta otpuštanja polifenola, budući da su polifenoli kontrolisano otpušteni u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta do 6 h. Pri tome, količina otpuštenih ukupnih polifenola iz mikročestica varirala je u opsegu 50-70%, što govori o tome da postoji određena količina polifenola dostupna za dalje otpuštanje. Imajući u vidu da su mikročestice hitozana mukoadhezivne i degradabilne u uslovima sredine koji vladaju u debelom crevu, preostali polifenoli mogu biti otpušteni u dužim vremenskim periodima u ovom regionu.

Da bi neki materijal mogao biti korišćen u prehrambenoj/farmaceutskoj industriji, on mora biti odobren od strane odgovarajućih zakonodavnih tela. Pri tome, često su regulative koje propisuju dozvoljene prehrambene aditive znatno strožije od onih koje se tiču farmaceutske ili kozmetičke industrije, a propisi vezani za dozvoljene materijale mogu varirati u zavisnosti od kontinenta do kontinenta, pa i od države do države. Stoga je neophodno uzeti u obzir sve te zahteve pri odabiru materijala za inkapsulaciju. U tom smislu, biodegradabilni, biokompatibilni i netoksični materijali poput hitozana i alginata su uvek dobar izbor kada se govori o formulacijama namenjenim prehrambenoj i/ili farmaceutskoj industriji. Međutim, kada se koriste umreženi hidrogelovi kao nosači u sistemima za kontrolisano otpuštanje, pored glavnog polimera koji mora ispunjavati sve zakonom propisane zahteve, mora se voditi računa i o ostalim reagensima, na primer onima koji se koriste kao umreživači. U ovoj doktorskoj disertaciji mikročestice hitozana su prvenstveno umrežavane glutaraldehidom. Uprkos činjenici da su se ti sistemi pokazali kao jako dobri sa aspekta veličina čestica - efikasnost inkapsulacije - produženo otpuštanje polifenola, oni ipak nisu dovoljno bezbedni za primenu u prehrambenoj industriji. Naime, upotreba glutaraldehida je ograničena, budući da nakon

određene koncentracije ispoljava toksično dejstvo na ljudski organizam. Iako su u ovoj doktorskoj disertaciji korišćene minimalne koncentracije glutaraldehida, kako bi se dobili što efikasniji sistemi za kontrolisano otpuštanje, ipak je u cilju povećanja sigurnosti hidrogelova na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola glutaraldehyd zamenjen umreživačima koji su dozvoljeni za upotrebu u prehrambenoj industriji (poput TPPa i genipina). Kada se u obzir uzme i ekonomičnost procesa, umrežavanje hitozana TPP-om predstavlja najbolji izbor za formulisanje sistema za kontrolisano otpuštanje polifenola, s obzirom da je cena genipina, kao umreživača izolovanog iz prirodnih izvora još uvek jako visoka.

Sa aspekta odabira adekvatne tehnike za proizvodnju mikročestica, najpre se mora voditi računa o izvodljivosti procesa u uslovima uvećanih razmera tj. na industrijskom nivou. S tim u vezi, tehnika elektrostatičke ekstruzije nije najbolji izbor, s obzirom na malu produktivnost koju je ovom tehnikom moguće postići. S druge strane, tehnika inverzne emulziona polimerizacije je primenljiva na industrijskom nivou, jer ne zahteva specijalnu opremu, niti uslove procesa. Takođe, tehnika sprej-sušenja je tehnika koja se već godinama uspešno koristi u prehrambenoj industriji. Obe tehnike daju mikroinkapsulirane sisteme sa relativno visokom efikasnošću inkapsulacije (sa ukupnim sadržajem inkapsuliranih polifenola od 114 mgGAE/g_{beads} za inverznu emulzionu polimerizaciju, odnosno 118 mgGAE/g_{beads} za sprej-sušenje). Međutim, problem koji se javlja prilikom proizvodnje mikročestica bilo tehnikom inverzne emulziona polimerizacije bilo sprej-sušenjem, jeste teška kontrola veličine čestica. Naime, povećanjem brzine mešanja i kontrolom temperature pod kojom se izvodi proces inkapsulacije temperaturno osetljivih komponenti (za inverznu emulzionu polimerizaciju), kao i kontrolom protoka ulazne emulzije i ulazne temperature vazduha (za tehniku sprej-sušenja) moguće je u određenoj meri uticati na veličinu dobijenih mikročestica. Ipak, raspodela veličina mikročestica dobijenih ovim tehnikama najčešće je široka što može biti problem ako je primena dobijenih mikročestica ciljana za

farmaceutsku industriju, prvenstveno za kliničku terapiju. S druge strane, primena mikročestica u prehrambenoj industriji ne zahteva tako strogo kontrolisanu veličinu i uniformnost mikročestica.

Na odabir adekvatnog procesa za dobijanje mikroinkapsuliranih sistema za inkapsulaciju i kontrolisano otpuštanje aktivne komponente utiče i priroda, odnosno stabilnost same aktivne komponente. Naime, poznato je da su polifenoli (kao i većina prirodnih antioksidanasa) temperaturno osetljiva jedinjenja, pa je stoga neophodno voditi računa o temperaturi pri kojoj se vrši njihova inkapsulacija. Ovo se prvenstveno odnosi na proces sprej-sušenja, u kome su visoke ulazne temperature vazduha neophodne za raspršivanje ulazne emulzije i dobijanje sprej-sušenih mikročestica, tj. prahova. U ovakvim slučajevima, prednost se može dati procesu inkapsulacije polifenola „*post-loading*“ postupkom. Naime, ukoliko je za dobijanje mikročestičnih nosača za inkapsulaciju neophodna primena jako visokih temperatura (kao što je slučaj sa ulaznom temperaturom vazduha u procesu sprej-sušenja), a pri tome se radi o inkapsulaciji temperaturno osetljivih jedinjenja, onda bi rešenje moglo biti u proceduri inkapsulacije predloženoj u ovoj doktorskoj disertaciji, gde će se najpre vršiti priprema mikročestica (tzv. „*ready-made support*“) a tek naknadno i inkapsulacija aktivne komponente. Poređenjem mikročestica hitozana u koje je inkapsulacija vršena „*in-situ*“ nasuprot „*post-loading*“ postupka dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji, može se zaključiti da su mikročestice sa polifenolima inkapsuliranim „*post-loading*“ postupkom superiornije sa aspekta otpuštanja polifenola (u uslovima gastro-intestinalnog trakta), tj. ukupne količine otpuštenih polifenola, koja je bila i do 4 puta veća za inkapsulaciju „*post-loading*“ postupkom u poređenju sa „*in situ*“ postipkom inkapsulacije. Tako se korišćenjem ovog pristupa u inkapsulaciji polifenola može prevazići nepovoljan uticaj visokih temperatura neophodnih za proces sprej-sušenja, koje mogu uticati na stabilnost i aktivnost temperaturno osetljivih aktivnih komponenti.

Očigledno je da na izbor adekvatnog procesa za proizvodnju mikroinkapsuliranih sistema utiču različiti parametri. Prilikom odabira

adekvatnog procesa, mora se najpre utvrditi koji su to prioritetni zahtevi koje je neophodno ispuniti. Ukoliko je reč o formulisanju sistema za farmaceutsku industriju, najpre se mora voditi računa o uniformnosti dobijenih mikročestica, ali i o mogućnosti kontrole svih proizvodnih faza kako bi se ispunili zahtevi proizvodnje u strogo kontrolisanim uslovima. Sa druge strane, ukoliko je ciljana primena dobijenih sistema u prehrambenoj industriji, zahtevi za kontrolisanu proizvodnju su nešto blaži, ali se i dalje mora voditi računa o dozvoljenim materijalima za prehrambenu industriju. Naravno, karakteristike dobijenih mikroinkapsuliranih sistema igraju važnu ulogu u odabiru adekvatnog pristupa u proizvodnji. Na kraju, ekonomičnost i isplativost odabranog procesa se uvek mora uzeti u obzir.



IV ZAKLJUČAK



Prvi deo doktorske disertacije posvećen je pripremi i karakterizaciji ekstrakta majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.). Bitno je naglasiti da je ekstrakt karakterisan u onom obliku u kome je dalje korišćen za inkapsulaciju, tj. nikakva dodatna digestija same droge nije rađena. Ovakav pristup je izabran zbog činjenice da vodeni ekstrakt predstavlja polaznu sirovinu za pripremu mikroinkapsuliranih sistema, te da je njegov kvalitativni i kvantitativni sastav presudan za formulisanje funkcionalnih dodataka hrani, a ne sastav same droge. Dobijeni rezultati pokazali su sledeće:

- Vodeni ekstrakt majčine dušice bogat je polifenolima – ukupni sadržaj polifenola je 2,4 mgGAE/ml ekstrakta.
- Najzastupljenije polifenolne komponente u ekstraktu su ruzmarinska i kafeinska kiselina, sa ukupnim sadržajem od 283,6 µg/ml i 3,1 µg/ml ekstrakta, redom, dok je sadržaj ukupnih flavonoida 167,2 µg/ml ekstrakta.
- Visok udeo polifenolnih komponenti u ekstraktu doprinosi i njegovom značajnom antioksidativnom kapacitetu, koji je određen ABTS metodom i iznosi 2,0 mmol Trolox/l ekstrakta.
- Određivanje mineralnog profila ekstrakta ukazalo je na značajne koncentracije makro i mikro-nutrijenata (Ca, Mg, Na, Mn, i ostalih) što u značajnoj meri doprinosi biološkom potencijalu i aktivnosti ekstrakta, na taj način dodatno opravdavajući njegovu upotrebu u formulisanju funkcionalnih prehrambenih proizvoda. S druge strane, bitno je naglasiti da je koncentracija teških metala u ekstraktu čaja mala, što ne ograničava primenu ekstrakta majčine dušice u prehrambenoj industriji.

U drugom delu doktorske disertacije vršena je priprema i karakterizacija hidrogelova na bazi hitozana sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice. Hidrogelovi hitozana u obliku mikročestica su sintetisani korišćenjem tri različite tehnike, i to: (1) elektrostatička ekstruzija, (2) inverzna emulziona polimerizacija i (3) sprej-sušenje. Kako bi se postigla što veća stabilnost

pripremljenih mikročestica, rađeno je umrežavanje hitozana različitim umreživačima: (1) joni kalcijuma, (2) glutaraldehid, (3) natrijum-tripolifosfat i (4) genipin. Sam proces inkapsulacije izvođen je na dva načina: (1) postupkom „*in-situ*“ inkapsulacije, gde se formiranje mreže hidrogela i inkapsulacija polifenola simultano odvijaju, i (2) tzv. „*post-loading*“ postupkom, gde se najpre vrši sinteza hidrogelova (tzv. „*ready-made support*“), a potom inkapsulacija polifenola, bubrenjem hidrogelova u vodenom ekstraktu majčine dušice. Ovako pripremljeni hidrogelovi na bazi hitozana sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice su dalje podvrgnuti karakterizaciji.

Kako bi se razumeo proces inkapsulacije polifenola u mikročestice „*post-loading*“ postupkom, neophodno je ispitati i razumeti mehanizme bubrenja, odnosno apsorpcije vode u mikročestice. Ispitivanjem bubrenja mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom utvrđeno je sledeće:

- Hidrogelovi na bazi hitozana imaju veći stepen bubrenja u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta nego u vodi. Pri tome, u uslovima simuliranog želudačnog soka, hidrogelovi hitozana ispoljavaju najviši stepen bubrenja (usled protonovanja slobodnih amino grupa hitozana), dok u uslovima simuliranog intestinalnog fluida dolazi do kontrahovanja mikročestica, usled deprotonovanja funkcionalnih grupa na nosaču.
- Koncentracija hitozana u mikročesticama utiče na njihovo bubrenje, pri čemu sa povećanjem sadržaja hitozana dolazi do smanjenja stepena bubrenja, usled jačih među-molekulskih interakcija i shodno tome, snažnijeg umreženja.
- Koncentracija umreživača takođe ima uticaj na stepen bubrenja, jer je sa povećanjem stepena umreženja, manji broj amino grupa u lancu hitozana dostupan za protonovanje, što vodi manjem stepenu bubrenja mikročestica hitozana.
- Poređenjem eksperimentalnih podataka kinetike bubrenja, odnosno apsorpcije vode, sa teorijskim i empirijskim modelima dostupnim u

literaturi (pri čemu se najbolje slaganje sa eksperimentalnim podacima dobilo korišćenjem „burst effect“ i Weibull-ovog modela, kao i Peppas-ovih modela anomalnog transporta) može se zaključiti da se mehanizam transporta vode odvija po principima Fick-ove difuzije.

FTIR analizom potvrđeno je sledeće:

- FTIR spektri ukazuju na postojanje interakcija polimer-umreživač. Naime, bilo da je reč o umrežavanju hitozana glutaradehidom, TPP-om ili genipinom, interakcije amino grupa hitozana sa funkcionalnim grupama umreživača (aldehidnim grupama, fosfatnim anjonima ili karboksi-metil grupama, redom) dovode do promena u položaju i intenzitetu pikova u spektrima.
- Step en umreženja matrice (tj. odnos hitozana i umreživača u mikročesticama) utiče na položaj i intenzitet pikova u FTIR spektrima čistih mikročestica hitozana, što ukazuje na različite interakcije, odnosno različit intenzitet interakcija formiranih u mikročesticama u zavisnosti od njihovog stepena umreženja.
- FTIR spektrima je takođe potvrđeno uspostavljanje interakcija polifenola i polimerne matrice nakon otpuštanja, praćenjem pomeranja i intenziteta pojedinih pikova, kao i nestajanja određenih pikova u spektrima inkapsuliranih mikročestica. Pri tome, utvrđeno je da polifenolna jedinjenja ekstrakta formiraju interakcije kako sa hidroksilnim i amino grupama hitozana, tako i sa slobodnim funkcionalnim grupama umreživača.

Primena dobijenih mikroinkapsuliranih sistema na bazi hitozana koji sadrže polifenole majčine dušice u realne prehrambene/farmaceutske proizvode limitirana je veličinom mikročestica. Naime, sa aspekta teksturnih i senzornih karakteristika proizvoda poželjne su male čestice. Međutim, sa aspekta produženog otpuštanja aktivne komponente, veće čestice ispoljavaju superiornije karakteristike, jer je putanja koju aktivna komponenta treba da

pređe prilikom difundovanja u okolni medijum veća. Ispitivanjem veličine i optičkih karakteristika mikročestica hitozana pokazalo je da:

- Veličina mikročestica u formi hidrogela je ~890 μm za alginat-hitozan mikročestice, zatim 220 - 792 μm za mikročestice umrežene glutaraldehydom, 8,5 - 9,3 μm za mikročestice umrežene TPP-om i oko 6,5 μm za mikročestice umrežene genipinom.
- Mikročestice koje sadrže veće koncentracije umreživača i/ili veće koncentracije hitozana su uopšteno imale manje prečnike u poređenju sa mikročesticama koje sadrže manje koncentracije hitozana i umreživača. Ovo očigledno ukazuje da su mikročestice kompaktnije ukoliko je stepen umreženja veći, odnosno ukoliko je maseni odnos umreživač/hitozan veći.
- Raspodela veličina mikročestica (procenjena na osnovu vrednosti SPAN faktora) umreženih glutaraldehydom je šira za mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima u poređenju sa praznim mikročesticama, ukazujući na smanjenu uniformnost mikročestica nakon inkapsulacije. Sa druge strane, za mikročestice umrežene TPP-om to nije bio slučaj, već su vrednosti SPAN faktora bile manje za mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima.
- Sve dobijene mikročestice, kako prazne, tako i sa inkapsuliranim polifenolima bile su sferičnog oblika. Ipak, sferičnost mikročestica je bila funkcija njihovog sastava, odnosno koncentracije hitozana, gde sa povećanjem koncentracije hitozana dolazi do smanjenja faktora sferičnosti mikročestica; isti trend je primećen i sa povećanjem koncentracije umreživača.
- Do gubitka sferičnosti dolazi nakon sušenja mikročestica, ali se nakon rehidratacije sferičnost mikročestica u određenom procentu regeneriše, pri čemu čestice nakon rehidratacije zadržavaju 57-163% svog inicijalnog prečnika.

Još jedna od karakteristika dobijenih mikročestica koja utiče na njihovu potencijalnu primenu jeste površinska morfologija. Analiza skenirajućom elektronskom spektroskopijom pokazala je da povećanje stepena umreženja mikročestica, dovodi do povećanja hrapavosti njihove površine, za sve dobijene mikročestice. Inkapsulacija polifenola u mikročestice umrežene glutaraldehydom takođe doprinosi povećanju nepravilnosti površinske strukture mikročestica, što je posledica taloženja kristala polifenola na površini nosača. Za mikročestice umrežene TPP-om primećeno je da nakon inkapsulacije polifenola dolazi do smanjenja naboranosti njihove površine.

Kada se govori o poroznosti mikročestica, primećeno je da proces inkapsulacije polifenola smanjuje poroznost polimerne matrice, budući da se polifenoli smeštaju u njene šupljine. Pri tome, povećanje koncentracija umreživača u mikročesticama doprinelo je povećanju specifične površine mikročestica, pa samim tim i njihove poroznosti.

Naelektrisanje po površini je parametar koji govori o stabilnosti dobijenih mikročestica. Tako, čestice sa većom koncentracijom umreživača imaju smanjeno naelektrisanje po površini, odnosno stabilnije su u odnosu na čestice sa manjom koncentracijom umreživača. Takođe, prisustvo polifenola u mikročesticama dovodi do dodatne stabilizacije mikročestica i smanjenja ζ -potencijala. Budući da su dobijene umrežene mikročestice hitozana zadržale pozitivne vrednosti ζ -potencijala karakteristične za hitozan, može se zaključiti da poseduju i druge karakteristike hitozana, kao što su mukoadhezivnost i poboljšanje apsorpcije tj. permeacije, te stoga mogu biti uspešno korišćene kao nosači aktivnih komponenti u sistemima za kontrolisano otpuštanje.

Procena uticaja procesa umrežavanja i inkapsulacije polifenola na polimerni nosač vršena je i određivanjem njegove kristaličnosti. XRD analiza pokazala je da umrežavanje mikročestica glutaraldehydom, kao i inkapsulacija

polifenolnih jedinjenja u mikročestice, utiče na strukturu hitozana i povećava njegovu kristaličnost.

Uopšteno, efikasnost inkapsulacije, tj. ukupan sadržaj polifenola u mikročesticama, je složena funkcija nekoliko parametara koji utiču na apsorpciju polifenola iz ekstrakta, i to hidrofилности polimerne matrice, poroznosti polimerne mreže i interakcija koje se javljaju između matrice i jedinjenja iz ekstrakta. Izvedeni su sledeći zaključci:

- Stepен umreženja je faktor koji u velikoj meri utiče na ukupan sadržaj polifenola i efikasnost procesa inkapsulacije. Sa povećanjem sadržaja glutaraldehida u mikročesticama dolazi do povećanja ukupnog sadržaja polifenola, što može biti posledica (a) povećanja prečnika čestica, usled čega dolazi do slabljenja interakcija između polimerne matrice i polifenola i/ili (b) pojave dodatnih mesta za vezivanje polifenola, i to preko metilenskih grupa gluteraldehida.
- Povećanje koncentracija hitozana (do 2 mas.%) doprinosi povećanju sadržaja ukupnih polifenola. Međutim, mikročestice u kojima je koncentracija hitozana iznosila 3 mas.% imale su nešto manji sadržaj polifenola. Ovo je posledica činjenice da mikročestice sa visokim udelom hitozana manje bubre u kiseloj sredini, u kojoj se tzv. „*post-loading*“ inkapsulacija odvija simultanim procesima bubrenja polimerne matrice i apsorpcije polifenola.
- Za mikročestice hitozana umrežene TPP-om primećeno je da sa povećanjem koncentracije umreživača dolazi do smanjenja ukupnog sadržaja polifenola, što je i bio očekivan rezultat budući da mikročestice sa najmanjim udelom TPP-a (a) raspolažu najvećim brojem slobodnih protonovanih amino grupa hitozana preko kojih može doći do vezivanja sa polifenolnim jedinjenjima i (b) imaju najveći prečnik.

Zadržana antioksidativna aktivnost inkapsuliranih polifenola u mikročesticama bila je visoka, $100,92 \pm 0,36$ $\mu\text{mol Trolox/g}_{\text{beads}}$, što opravdava

upotrebu hidrogelova na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola majčine dušice.

Otpuštanje polifenola iz mikročestica je ispitivano kako bi se video potencijal hidrogelova na bazi hitozana za primenu u sistemima za ciljanu dostavu aktivnih komponenti. Stoga je otpuštanje praćeno na dva načina, u vodi na 25°C i u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta, na 37°C.

- Za sve profile otpuštanja karakterističan je tzv. „burst“ efekat otpuštanja, odnosno brza inicijalna desorpcija neinkapsuliranih polifenola sa površine mikročestica hitozana. Dalja difuzija polifenola u okolni medijum se odvijala simultano sa bubrenjem polimerne matrice, pri čemu je otpuštanje polifenola bilo najbrže iz čestica najmanjeg prečnika.
- Pri tome, u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta otpusti se značajno veća koncentracija polifenola, budući da hidrogelovi na bazi hitozana više bubre u kiseljoj sredini.
- Polifenolna jedinjenja različite molekulske mase i hemijske strukture imaju različite brzine otpuštanja. Tako, otpuštanje kafeinske i ruzmarinske kiseline traje 45 min, dok se flavonoidi otpuštaju do 2 h. Razlog za to je činjenica da kafeinska kiselina poseduje najmanji broj hidroksilnih grupa preko kojih može doći do interakcija sa amino grupama hitozana.
- „*Post-loading*“ postupak inkapsulacije mikročestica hitozana umreženih TPP-om pokazao se kao superiorniji izbor od „*in situ*“ inkapsulacije, budući da je količina otpuštenih polifenola (u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta) bila do 4 puta veća.
- Količina otpuštenih ukupnih polifenola varira u opsegu 50-70%, što govori o tome da postoji određena količina polifenola dostupna za dalje otpuštanje. Imajući u vidu da su mikročestice hitozana mukoadhezivne i degradabilne u uslovima koji vladaju u debelom crevu, preostali polifenoli mogu biti otpušteni u dužim vremenskim periodima u ovom regionu, što je prednost ispitanih sistema za inkapsulaciju polifenola.

- Na kraju, primenom različitih teorijskih i empirijskih modela na eksperimentalno dobijene profile otpuštanja polifenola, došlo se do zaključka da se otpuštanje kafeinske kiseline odvija po mehanizmu karakterističnom za difuziju po Prvom Fick-ovom zakonu, dok se mehanizam transporta ostalih polifenolnih jedinjenja može pripisati ili Fick-ovoj difuziji u fraktalnim/Euclidian-skim prostorima, ili kompleksnom mehanizmu otpuštanja, što je slučaj sa otpuštanjem ruzmarinske kiseline u vodi.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji daju uvid u karakteristike dobijenih hidrogelova na bazi hitozana, ilustrujući njihov potencijal za primenu u prehrambenoj i/ili farmaceutskoj industriji, kao sistema za dostavu polifenola i njihovo produženo/kontrolisano otpuštanje na ciljanom mestu. Prikazani rezultati podržavaju ideju formulisanja hidrogelova na bazi hitozana sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice koji će se potom koristiti kao funkcionalni aditivi hrani ili u farmaceutskoj industriji. Pretpostvka da će globalno tržište biljnih polifenola, kao vodećih nutritivnih aditiva hrani, dostignuti 367,7 miliona američkih dolara do 2020. godine, dodatno opravdava razvoj predloženih formulacija na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola.



V LITERATURA



Adlercreutz H. (2007) Lignans and human health, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44, 483–525.

Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agrawald R, Mukhtar H. (1997) Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells, *Journal of the National Cancer Institute*, 89, 1881–1886.

Albers W, Overbeek JThG. (1959) Stability of emulsions of water in oil: I. The correlation between electrokinetic potential and stability, *Journal of Colloid Science*, 14, 501.

Al-Mustafa AH, Al-Thunibat OY. (2008) Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(3), 351–358.

Anal AK, Stevens WF, Remunan-Lopez C. (2006) Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin, *International Journal of Pharmaceutics*, 312, 166–173.

Anandharamakrishnan C, Rielly CD, Stapley AGF. (2007) Effects of process variables on denaturation of whey protein during spray drying, *Drying Technology*, 25, 799–807.

Anandharamakrishnan C, Rielly CD, Stapley AGF. (2008) Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during spray drying of whey proteins, *LWT- Food Science and Technology*, 41, 270–277.

Anhe FF, Desjardins Y, Pilon G. (2013) Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review, *Pharma Nutrition*, 1, 105–114.

Arimoto-Kobayashi S, Sugiyama C, Harada N, Takeuchi M, Takemura M, Hayatsu H. (1999) Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA Adduct formation induced by several carcinogens, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 221–230.

Arshady R. (1992) Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey, *Colloid and Polymer Science*, 270, 717–732.

Ateeq-ur-Rehman, Mannan A, Inayatullah S, Akhtar MZ, Qayyum M, Mirza B. (2009) Biological evaluation of wild thyme (*Thymus serpyllum*), *Pharmaceutical Biology*, 47(7), 628–633.

Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. (2005) Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile, *Food Chemistry*, 89, 27–36.

Augustin MA, Hemar Y. (2009) Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients, *Chemical Society Reviews*, 38, 902-912.

Bae KE, Lee SJ. (2008) Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin, *Journal of Microencapsulation*, 25, 549-560.

Bagchi P, Gray BV, Birnbaum SM. (1979) Preparation of model poly(vinyl toluene) latices and characterization of their surface charge by titration and electrophoresis, *Journal of Colloid and Interface Science*, 69, 502-528.

Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F. (2013) Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review, *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 2013, 12-43.

Baker RW, Lonsdale HK. (1974) Controlled release: Mechanism and rates. In: Tanquary AC, Lacey RE (eds) *Controlled release of biological active agents*. New York: Plenum Press, pp. 15-71.

Baranauskiene R, Bylaite E, Rate JH, Zukauskaite J, Venskutonis RP. (2007) Flavour retention of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3027-3036.

Barreiro-Iglesias R, Coronilla R, Concheiro A. (2005) Preparation of chitosan beads by simultaneous cross-linking/insolubilisation in basic pH Rheological optimisation and drug loading/release behaviour, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 77-84.

Basan H, Gümüşderelioğlu M, Orbey T. (2002) Diclofenac sodium releasing pH-sensitive monolithic devices, *International Journal of Pharmaceutics*, 245, 191-198.

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? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57, 101-110.

Bell LN. (2001) Stability testing of nutraceuticals and functional foods. In R. E. C. Wildman (Ed.), *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. New York: CRC Press, pp. 501-516.

Belščak-Cvitanović A, Stojanović R, Dujmić F, Horžić D, Manojlović V, Komes D, Nedovic V, Bugarski B. (2010) Encapsulation of polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves extract by electrostatic extrusion, *Book of Full Papers of the 5th Central European Congress on Food*, pp. 8-14.

Belščak-Cvitanović A, Stojanović R, Manojlović V, Komes D, Juranovic-Cindric I, Nedovic V, Bugarski B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion, *Food Research International*, 44, 1094–1101.

Belščak-Cvitanović A. (2013) Utjecaj dodatka polifenolnih ekstrakata biljnoga podrijetla na funkcionalna svojstva čokolade, Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska.

Bennick A. (2002) Interaction of plant polyphenols with salivary proteins, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13, 184–196.

Beppu MM, VieiraRS, Aimoli CG, Santana CC. (2007) Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption, *Journal of Membrane Science*, 301, 126–130.

Berens AR, Hopfenberg HB. (1978) Diffusion and relaxation in glassy polymer powders. 2. Separation of diffusion and relaxation parameters, *Polymer*, 19, 489–496.

Bernkop-Schnürch A. (2005) Mucoadhesive systems in oral drug delivery, *Drug Discovery Today: Technologies*, 2, 83–87.

Beutner S, Bloedorn B, Frixel S, Blanco IH, Hoffmann T, Martin HD, Mayer B, Noack P, Ruck C, Schmidt M, Schulke I, Sell S, Ernst H, Haremza S, Seybold G, Sies H, Stahl W, Walsh R. (2001) Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of b-carotene in antioxidant functions, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(6), 559–568.

Boros B, Jakabová S, Dörnyei Á, Horváth G, Pluhár Z, Kilár F, Felinger A. (2010) Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species, *Journal of Chromatography A*, 1217, 7972–7980.

Botrel DA, Borges SV, Fernandes RVB, Viana AD, Gomes JMC, Marques GR. (2012) Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil, *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2289–2296.

Bravo L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, *Metabolism and Nutritional Significance Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.

Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺-ions: implications for their antioxidant properties, *Biochemical Journal*, 330, 1173–1178.

Bugarski B, Li Q, Goosen MFA, Poncelet D, Neufeld RJ, Vunjak G. (1994) Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation, *AIChE Journal*, 40, 1026–1031.

Bugarski B, Obradovic B, Nedovic V, Poncelet D. (2004) Immobilization of cells and enzymes using electrostatic droplet generator. In: Nedovic V, Willaert RG editors. Focus on biotechnology, vol 8a: Fundamentals of cell immobilisation biotechnology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 277–294.

Butler MF, Ng YF, Pudney PDA. (2003) Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 41, 3941–3953.

Cabrera C, Artacho R, Giménez R. (2006) Beneficial effects of green tea-a review, *Journal of American College Nutrition*, 25, 79–99.

Chan ES, Wong SL, Lee PP, Lee JS, Ti TB, Zhang Z, Poncelete D, Ravindraa P, Phana S-H, Yim Z-H. (2011) Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells, *Carbohydrate Polymers*, 83, 225–232.

Chan ES, Yim ZH, Phan SH, Mansa RF, Ravindra P. (2009) Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with Ca-alginate hydrogel beads, *Food and Bioproducts Processing*, 88, 195–201.

Chan ES. (2011) Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties, *Carbohydrate Polymers*, 84, 1267–1275.

Chavarri M, Maranon I, Ares R, Ibanez FC, Marzo F, Vilaran MC. (2010) Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 142, 185–189.

Chegini GR, Ghobadian B. (2007) Spray dryer parameters for fruit juice drying, *World Journal of Agricultural Sciences*, 3, 230-236.

Chen L, Remondetto GE, Subirade M. (2006) Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 272-283.

Chen SC, Wu YC, Mi FL, Lin YH, Yu LC, Sung HW. (2004) A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 96, 285-300.

Chen X, Ahn DU. (1998) Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or ultraviolet light, *Journal of American Oil Chemistry Society*, 75, 1717-1721.

Cheyrier V. (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223S-229S.

Chosa H, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. (1992) Antimicrobial and microbicidal activities of tea and catechins against Mycoplasma, *Kansenshogaku Zasshi*, 66, 606-611.

Chun OK, Chung SJ, Song WO. (2007) Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults, *Journal of Nutrition*, 137, 1244-1252.

Cos P, Ying L, Calome M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Van den Berghe D. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, *Journal of Natural Products*, 61, 71-76.

Costa P, Sousa Lobo JM. (2001) Modeling and comparison of dissolution profiles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 123-133.

Crank J. (1975) *The mathematics of diffusion*, 2nd Ed. Oxford University Press, London.

Cui-Yun Y, Bo-Cheng Y. (2009) Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 68, 245-249.

Cushnie TPT, Lamb AJ. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.

Cutillo F, DellaGreca M, Gionti M, Previtiera L, Zarrelli A. (2006) Phenols and lignans from *Chenopodium album*, *Phytochemical Analysis*, 17, 344-349.

Czank C, Cassidy A, Zhang Q, Morrison DJ, Preston T, Kroon PA, Botting NP, Kay CD. (2013) Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A ¹³C-tracer study, *American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 995–1003.

Daglia M. (2012) Polyphenols as antimicrobial agents, *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 174–181.

Dai F, Chen WF, Zhou B. (2008) Antioxidant synergism of green tea polyphenols with α-tocopherol and l-ascorbic acid in SDS micelles, *Biochimica*, 90, 1499–1505.

Dapkevicius A, Venskutonis R, van Beek TA, Linssen JPH. (1998) Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from some Aromatic Herbs Grown in Lithuania, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 140–146.

Davies KJA. (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In C. Rice-Evans, B. Halliwell, & G. G. Lunt (Eds.), *Free radicals and oxidative stress: environment, drugs and food additives*, Biochemical Society Symposium, 61, pp. 1–31.

Day AJ, Williamson G. (2001) Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma, *British Journal of Nutrition*, 86, 105–110.

De Whalley C, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake D. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages, *Biochemical Pharmacology*, 39, 1743–1750.

Deacon MP, McGurk S, Roberts CJ, Williams PM, Tendler SJ, Davies MC, Davis SS, Harding SE. (2000) Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems, *Biochemical Journal*, 348, 557–563.

Deladino L, Anbinder PS, Navarro AS, Martino MN. (2008) Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*, *Carbohydrate Polymers*, 71, 126–134.

Desai KG, Park HJ. (2005a) Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres, *Journal of Microencapsulation*, 22(4), 377–395.

Desai KG, Park HJ. (2005b) Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying, *Journal of Microencapsulation*, 22(2), 179–192.

Desai KG, Park HJ. (2005c) Preparation and Characterization of Drug-Loaded Chitosan-Tripolyphosphate Microspheres by Spray Drying, *Drug Development Research*, 64, 114–128.

Desai KG, Park HJ. (2006) Effect of manufacturing parameters on the characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres prepared by spray-drying, *Journal of Microencapsulation*, 23(1), 91-103.

Desai KGH, Park HJ. (2005d) Recent developments in microencapsulation of food ingredients, *Drying Technology*, 23, 1361-1394.

Desobry S, Debeaufort F. (2011) Encapsulation of flavours, nutraceuticals, and antibacterials. In: *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, Eds. Baldwin EA, Hagenmaier R, Bai J, Second Edition, CRC Press, pp. 333-373.

Dini E, Alexandridou S, Kiparissides C. (2003) Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications, *Journal of Microencapsulation*, 20, 375-385.

Diplock AT. (1994) Antioxidants and disease prevention, In: *Molecular Aspects of Medicine*, Ed. Baum H, Pergamon Press, Oxford, New York, USA, pp. 295-376.

Donovan JL, Bell JR, Kasim-Karakas S, German JB, Walzem RL, Hansen RJ, Waterhouse AL. (1999) Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine, *Journal of Nutrition*, 129, 1662-1668.

Đorđević V, Balanč B, Belščak-Cvitanović A, Lević S, Trifković K, Kalušević A, Kostić I, Komes D, Bugarski B, Nedović V. (2015) Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds, *Food Engineering Review*, 7, 452-490.

Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ. (2003) Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs, *Food Chemistry*, 83, 255-262.

Dudhani AR, Kosaraju SL. (2010) Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization, *Carbohydrate Polymers*, 81, 243-251.

Dugas AJ, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price K, Fischer NH, Winston GW. (2000) Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships, *Journal of Natural Products*, 63, 327-331.

Ersus S, Yurdagel U. (2007) Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier, *Journal of Food Engineering*, 80, 805-812.

Espevik T, Otterlei M, Skjak-Bræk G, Ryan L, Wright SD, Sundan A. (1993) The ortsinvolvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers, *European Journal of Immunology*, 23, 255–261.

Essawi T, Srour M. (2000) Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 343–349.

Estevinho BN, Rocha F, Santos L, Alves A. (2013a) Using water soluble chitosan for flavour microencapsulation in food industry, *Journal of Microencapsulation*, 30(6), 571-579.

Estevinho BN, Rocha F, Santos L, Alves A. (2013b) Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review, *Trends in Food Science & Technology*, 31, 138-155.

Fang X, Shima M, Adachi S. (2005) Effects of drying conditions on the oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic by spray drying, *Food Science and Technology Research*, 11, 380–384.

Fang Z, Bhandari B. (2010) Encapsulation of polyphenols – A review, *Trends in Food Science and Technology*, 21, 510–523.

Fernandes RVB, Borges SV, Botrel DA. (2013) Influence of spray drying operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties, *Food Science and Technology (Campinas)*, 33, 171-178.

Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, De Natale A, Pollio A. (2009) Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea), *Fitoterapia*, 80, 255–262.

Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. (2011) Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review, *Molecules*, 16, 1486-1507.

Finney J, Buffo R, Reineccius GA. (2002) Effects of Type of Atomization and Processing Temperatures on the Physical Properties and Stability of Spray-Dried Flavors, *Journal of Food Science*, 67, 1108-1114.

Fitch RM, Watson RC. (1979) Coagulation kinetics in polymer colloids determined by light scattering, *Journal of Colloid and Interface Science*, 68, 14-20.

Forni F, Vandelli M, Cameron R. (1992) Influence of drugloadinglevel on drug loading level on drug release and dynamic swelling of crosslinked gelatin microspheres, *Journal of Microencapsulation*, 9, 29–39.

Fu YJ, Mi FL, Wong TB, Shyu SS. (2001) Characteristic and controlled release of anticancer drug loaded poly (D,L-lactide) microparticles by spray drying technique, *Journal of Microencapsulation*, 18, 733–747.

Fukai K, Ishigami T, Hara Y. (1991) Antibacterial activity of tea polyphenols against phytopathogenic bacteria, *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 1895–1897.

Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. (2005) Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44, 65–73.

Gåserød O, Jolliffe AG, Hampson FC, Dettmar PW, Skjåk-Bræk G. (1998) The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan, *International Journal of Pharmaceutics*, 175, 237–246.

Gåserød O, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. (1998) Microcapsules of alginate–chitosan: I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan, *Biomaterials*, 19, 1815–1825.

Genta I, Perugini P, Pavanetto F, Modena T, Conti B, Muzzarelli RA. (1999) Microparticulate drug delivery systems, *EXS*, 87, 305–313.

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

Gharras HE. (2009) Polyphenols: food sources, properties and applications – a review, *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2512–2518.

Ghosh Ray S., Ghangrekar MM. (2015) Enhancing organic matter removal, biopolymer recovery and electricity generation from distillery wastewater by combining fungal fermentation and microbial fuel cell, *Bioresource Technology*, 176, 8–14.

Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN. (1999) Encapsulation in the food industry: a review, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 213–224.

Giordani R, Hadeif Y, Kaloustian J. (2008) Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants, *Fitoterapia*, 79, 199–203.

Gohel MC, Sheth MN, Patel MM, Jani GK, Patel H. (1994) Design of chitosan microspheres containing diclofenac sodium, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, 210–214.

Gomaa YA, El-Khordagui LK, Boraie NA, Darwish IA. (2010) Chitosan microparticles incorporating a hydrophilic sunscreen agent, *Carbohydrate Polymers*, 81, 234–242.

Gombotz WR, Wee SF. (2012) Protein release from alginate matrices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 194–205.

Goncalves da Rosa C, Dellinghausen Borges C, Zambiasi RC, Ramos Nunes M, Benvenuti EV, Rickes da Luz S, Farias D'Avilaa R, Rutz JK. (2013) Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan, *Industrial Crops and Products*, 46, 138–146.

Gonçalves VL, Laranjeira MCM, Fávere VT, Pedrosa RC. (2005) Effect of Crosslinking Agents on Chitosan Microspheres in Controlled Release of Diclofenac Sodium, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15, 6–12.

Gonzalez-Rodriguez ML, Holgado MA, Sanchez-Lafuente C, Rabasco AM, Fini A. (2002) Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release, *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 225–234.

Gouin S. (2004) Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330–347.

Goula AM, Adamopoulos KG. (2008) Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: I. Powder properties, *Drying Technology*, 26, 726–737.

Gramza A, Korczak J, Amarowic R. (2005) Tea polyphenols – their antioxidant properties and biological activity – a review, *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 14(55), 219–235.

Gupta KC, Jabrail FH. (2006) Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman, *Carbohydrate Research*, 341, 744–756.

Gupta KC, Jabrail FH. (2007) Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled release of centchroman, *Carbohydrate Research*, 342, 2244–2252.

Gupta S, Saha B, Giri AK. (2002) Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review, *Mutation Research*, 512, 37–65.

Halliwell B. (1997) Antioxidants and Human Disease: A General Introduction, *Nutrition Reviews*, 55, S44–S52.

Han X, Loa T. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance, *International Journal of Molecular Science*, 8, 950–988.

Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K. (2010) Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism, *International Journal of Molecular Science*, 11, 1365–1402.

Hansen FK, Ugelstad J. (1978) Particle nucleation in emulsion polymerization. I. A theory for homogeneous nucleation, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 16, 1953-1979.

Hari PR, Chandy T, Sharma CP. (1996) Chitosan/calcium alginate beads for oral delivery of insulin, *Journal of Applied Polymer Science*, 59, 1795–1801.

Harris R, Lecumberri E, Heras A. (2010) Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin, *Marine Drugs*, 8, 1750-1762.

Harris R, Lecumberri E, Mateos-Aparicio I, Mengíbar M, Heras A. (2011) Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*, *Carbohydrate Polymers*, 84, 803–806.

Haslam E, Lilley TH, Warminski E, Liao H, Cai Y, Martin R, Gaffney SH, Goulding PN, Luck G. (1992) Polyphenol complexation. A study in molecular recognition, *ACS Symposium Series*, 506, 8-50.

Haslam E, Lilley TH. (1988) Natural astringency in foodstuffs - a molecular interpretation, *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 27, 1-40.

Hazzit M, Baaliouamer A, Verissimo AR, Faleiro ML, Miguel MG. (2009) Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils, *Food Chemistry*, 116, 714–721.

He P, Davis SS, Illum L. (1998) In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 166, 75–88.

Higuchi T. (1961) Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions, *Journal of Pharmaceutical Science*, 50, 874–875.

Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea FM, Arguelles-Monal W. (2003) Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix, *Carbohydrate Polymers*, 56, 41–45.

Hollman PC, vanTrijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. (1997) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man, *FEBS Letters*, 418, 152-156.

Horiuchi Y, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. (1992) Protective activity of tea and catechins against *Bordetella pertussis*, *Kansenshogaku Zasshi*, 66, 599-605.

Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F. (2013) Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study, *Carbohydrate Polymers*, 95, 50-56.

Hsien T-Y, Rorrer GL. (1995) Effects of Acylation and Crosslinking on the Material Properties and Cadmium Ion Adsorption Capacity of Porous Chitosan Beads, *Separation Science and Technology*, 30(12), 2455-2475.

Hu B, Pan C, Sun Y, Hou Z, Ye H, Zeng X. (2008) Optimization of fabrication parameters to produce chitosantripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7451-7458.

Huang X, Brazel CS. (2001) On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 73, 121-136.

Huang YC, Chiang CH, Yeh MK. (2003) Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying method. *Journal of Microencapsulation*, 20(2), 247-260.

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

Illum L, Farraj NF, Davis SS. (1994) Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs, *Pharmaceutical Research*, 11, 1186-1189.

Ismail O. (2014) Peleg and Weibull models for water absorption of copolymer gels crosslinked on polyethylene glycol dimethacrylates, *Research on Chemical Intermediates*, 40, 1327-1335.

Iwai K, Kim MY, Onodera A, Matsue H. (2006) Alpha-glucosidase inhibitory and antihyperglycemic effects of polyphenols in the fruit of *Viburnum dilatatum* Thunb, *Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4588-4592.

Iwai K. (2008) Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-A(y) mice, *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 163–169.

Jabri-Karoui I, Bettaieb I, Msaada K, Hammami M, Marzouk B. (2012) Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*, *Journal of functional foods*, 4, 661–669.

Jackson RS. (1994) Chemical constituents of grapes and wines. In R. S. Jackson (Ed.), *Wine science: Principles and applications* San Diego, CA: Academic Press, pp. 178–219.

Jafari SM, Assadpoor E, Bhandari B, He Y. (2008) Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying, *Food Research International*, 41, 172–183.

Jafari SM, He Y, Bhandari B. (2007) Encapsulation of nanoparticulates of D-limonene by spray drying: role of emulsifiers and emulsifying agent, *Drying Technology*, 25, 1079–1089.

Jankun J, Selman SH., Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E. (1997) Why drinking green tea could prevent cancer, *Nature*, 387, 561.

Jin J, Song M, Hourston DJ. (2004) Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties, *Biomacromolecules*, 5(1), 162–168.

Kanapczyk J. (1994) Some aspects of chitosan hydrogel ointment base formulation, in: *Chitin World*, Karnicki ZS, Brzeski MM, Bykowski PJ, Woytasz-Pajak A. (Eds), pp. 512–519.

Kanauchi O, Deuchi K, Imasato Y, Shizukuishi M, Kobayashi E. (1995) Mechanism for the inhibition of fat digestion by chitosan and for the synergistic effect of ascorbate, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 786–790.

Karewicz A, Zasada K, Szczubialka K, Zapotoczny S, Lach R, Nowakowska M. (2010) “Smart” alginate–hydroxypropylcellulose microbeads for controlled release of heparin, *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 163–169.

Kašpar O, Jakubec M, Štěpánek F. (2013) Characterization of spray dried chitosan–TPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles, *Powder Technology*, 240, 31–40.

Katiyar SK, Mukhtar H. (1997) Tea antioxidants in cancer chemoprevention, *Journal of Cell Biochemistry*, 67, 59–67.

Kawadkar J, Chauhan MK. (2012) Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: Preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* studies, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81, 563–572.

Kim CK, Lee EJ. (1992) The controlled release of blue dextran from alginate beads, *International Journal of Pharmaceutics*, 79, 11–19.

Kim HJ, Lee HC, Oh JS, Shin BA, Oh CS, Park RD, Yang KS, Cho CS. (1999) Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 10, 543–556.

Kim SJ, Shin SR, Lee YM, Kim SI. (2003) Swelling characterizations of chitosan and polyacrylonitrile semi-interpenetrating polymer network hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science*, 87, 2011–2015.

Knaul JZ, Hudson SM, Creber KAM. (1999) Improved Mechanical Properties of Chitosan Fibers, *Journal of Applied Polymer Science*, 72, 1721–1732.

Knežević -Jugović Z, Smelcerović A, Petronijević Ž. (2010) Chitin and chitosan from microorganisms. In: Se K-K (ed.) Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives, biological activities and applications. New York: Routledge Taylor @ Francis Group, pp. 25–36.

Koga D. (1998) Chitin enzymology – chitinase, in: R. Chen, H.C. Chen (Eds.), *Adv. Chitin Sci.*, vol. 3, pp. 16–23.

Kosaraju SL, D'ath L, Lawrence A. (2006) Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery, *Carbohydrate Polymers*, 64, 163–167.

Kosmidis K, Argyrakis P, Macheras P. (2003a) A reappraisal of drug release laws using Monte Carlo simulations: the prevalence of the Weibull function, *Pharmaceutical Research*, 20, 988–995.

Kosmidis K, Argyrakis P, Macheras P. (2003b) Fractal kinetics in drug release from finite fractal matrices, *Journal of Chemical Physics*, 119, 6373–6377.

Kotze AF, de Leeuw BJ, Lueßen HL, de Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. (1997) Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: *in vitro* evaluation of Caco-2 cell monolayers, *International Journal of Pharmaceutics*, 159, 243–253.

Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt, *International Dairy Journal*, 13, 3–13.

Kulišić T, Dragović-Uzelac V, Miloš. (2006) Antioxidant Activity of Herbal Tea Infusions, *Food Technology and Biotechnology*, 44 (4), 485–492.

Kulkarni AR, Soppimath KS, Aminabhavi TM, Dave AM, Mehta MH. (2000) Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application, *Journal of Controlled Release*, 63, 97–105.

Kwok KK, Groves MJ, Burgess DJ. (1989) Sterile microencapsulation of BCG in alginate-poly-L-lysine by an air spraying technique, *Proceedings - International Symposium of Controlled Release of Bioactive Materials*, 16, 170–171.

Kwok KK, Groves MJ, Burgess DJ. (1991) Production of 5–15 μm diameter alginate-polylysine microcapsules by an air atomization technique, *Pharmaceutical Research*, 8, 341–344.

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*, Brno, Czech Republic, pp. 118–125.

Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JRS, Halliwell B. (1991) Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives, *Biochemical Pharmacology*, 42, 1673–1681.

Lecour S, Lamont KT. (2011) Natural polyphenols and cardioprotection, *Mini Review of Medicine Chemistry*, 11, 1191–1199.

Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger HE. (1992) In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers, *International Journal of Pharmaceutics*, 78, 43–48.

Lehr CM. (1996) From sticky stuff to sweet receptors—achievements, limits and novel approaches to bioadhesion, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21, 139–148.

Lesschaeve I, Noble AC. (2005) Polyphenols: Factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 330S–335S.

Lim D-W, Song K-G, Yoon K-J, Ko S-W. (2002) Synthesis of acrylic acid-based superabsorbent interpenetrated with sodium PVA sulfate using inverse-emulsion polymerization, *European Polymer Journal*, 38, 579–586.

Liu X-D, Atarashi T, Furuta T, Yoshii H, Aishima S, Ohkawara M, Linko P. (2001) Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavours by spray drying, *Drying Technology*, 19, 1361–1374.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacogenetics Review*, 4, 118–126.

López CR, Portero A, Lemos M, Vila-Jato JL, Nuñez MJ, Riveiro P, López JM, Piso M, Alonso MJ. (2000) Chitosan microspheres for the specific delivery of amoxicillin to the gastric cavity, *STP Pharma Science*, 10, 69–76.

López CR, Portero A, Vila-Jato JL, Alonso MJ. (1998) Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 55, 143–152.

Lueßen HL, de Leeuw BJ, Langmeyër MWE, de Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. (1996) Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery: VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug busserelin in vivo, *Pharmaceutical Research*, 13, 1668–1672.

Luiz M, Biasutti A, Garcia N. (2002) Micellar effects on the scavenging of singlet molecular oxygen by hydroxybenzenes, *Redox Report*, 7(1), 23–28.

Lupo B, Maestro A, Gutierrez JM, González C. (2015) Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms, *Food Hydrocolloids*, 49, 25–34.

Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S. (2006) Flavour encapsulation and controlled release – a review, *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1–21.

Malaveille C, Hautefeuille A, Pignatelli B, Talaska G, Vineis P, Bartsch S. (1998) Antimutagenic dietary phenolics as antigenotoxic substances in urothelium of smokers, *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1–2), 219–224.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230S–242S.

Manojlovic V, Đonlagic J, Obradovic B, Nedovic V, Bugarski B. (2006) Investigations of Cell Immobilization in alginate: rheological and electrostatic extrusion studies, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 505-510.

Manojlovic V, Đonlagic J, Obradovic B, Nedovic V, Bugarski B. (2005) Effects of cell addition on immobilization by electrostatic droplet generation, *Scientific paper CI & CEQ*, 1(2), 79-84.

Manojlović V. (2008) Imobilizacija biološki aktivnih supstanci i ćelija u mikro- i nano-čestičnim sistemima, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.

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

McClements DJ. (2005) Food emulsions: Principles, practice, and techniques, second edition. Boca Raton: CRC Press, Florida.

Mi FL, Huang CT, Liang HF, Chen MC, Chiu YL, Chen CH, Sung HW. (2006) Physicochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of a chitosan film cross-linked by a naturally occurring cross-linking agent, aglycone geniposidic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3290-3296.

Mi FL, Shyu SS, Wong T, Jang SF, Lee ST, Lu KT. (1999) Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic cross-linking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate reagent, *Journal of Applied Polymer Science*, 74, 1093-1107.

Mi FL, Sung HW, Shyu SS, Su CC, Peng CK. (2003) Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genepin crosslinked chitosan gel beads, *Polymer*, 44, 6521-6530.

Mi FL, Sung HW, Shyu SS. (2000) Synthesis and Characterization of a Novel Chitosan-Based Network Prepared Using Naturally Occurring Crosslinker, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 38, 2804-2814.

Mi FL, Sung HW, Shyu SS. (2001) Release of Indomethacin from a Novel Chitosan Microsphere Prepared by a Naturally Occurring Crosslinker: Examination of Crosslinking and Polycation-Anionic Drug Interaction, *Journal of Applied Polymer Science*, 81, 1700-1711.

Mi FL, Sung HW, Shyu SS. (2002) Drug release from chitosan–alginate complex beads reinforced by a naturally occurring crosslinking agent, *Carbohydrate Polymers*, 48, 61–72.

Mihailovic-Stanojevic N, Belščak-Cvitanović A, Grujic-Milanović J, Ivanov M, Jovović Dj, Bugarski D, Miloradović Z. (2013) Antioxidant and antihypertensive activity of extract from *Thymus serpyllum* L. in experimental hypertension, *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 235–240.

Mishra RK, Mondal S, Datt M, Banthia AK. (2010) Development and characterization of chitosan and phosphomolybdic acid (PMA) based composites, *International Journal of Plasticity and Technology*, 14, 80–92.

Miyazaki S, Nakayama A, Oda M, Takada M, Attwood D. (1995) Drug release from oral mucosal adhesive tablets of chitosan and sodium alginate, *International Journal of Pharmaceutics*, 118, 257–263.

Mkaddem, MG, Romdhane M, Ibrahim H, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, Bouajila J. (2011) Essential oil of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. from Matmata Tunisia: Gas chromatography–mass spectrometry analysis and antimicrobial and antioxidant activities, *Journal of Medicinal Food*, 13, 1500–1504.

Moses LR, Dileep KJ, Sharma CP. (2000) Beta-cyclodextrin–insulinencapsulated chitosan–alginate matrix: oral delivery system, *Journal of Applied Polymer Science* 75, 1089–1096.

Moura MJ, Martins SP, Belmiro DPM. (2015) Production of chitosan microparticles cross-linked with genipin - identification of factors influencing size and shape properties, *Biochemical Engineering Journal*, 104, 82–90.

Mozafari MR, Khosravi-Darani K, Borazan GG, Cui J, Pardakhty A, Yurdugul S. (2008) Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology, *International Journal of Food Properties*, 11, 833–844.

Mozafari MR. (2006) Bioactive entrapment and targeting using nanocarrier technologies: an introduction. In M. R. Mozafari (Ed.), *Nanocarrier technologies: Frontiers of nanotherapy*, The Netherlands: Springer, pp. 1–16.

Mukhtar H, Ahmad N. (1999) Green tea in chemoprevention of cancer, *Toxicological Sciences*, 52, 117–117.

Mumper RJ, Hoffman AS, Puolakkainen P, Bouchard LS, Gombotz WR. (1994) Calcium-alginate beads for the oral delivery of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1): stabilization of TGF- β 1 by the addition of polyacrylic acid within acid treated beads, *Journal of Controlled Release*, 30, 241–251.

Muzzarelli R, Baldassare V, Conti F, Ferrara P, Biagini G, Gazzanelli G, Vasi V. (1988) Biological activity of chitosan: ultrastructure study, *Biomaterials*, 9, 247–252.

Muzzarelli RAA. (1997) Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives, *Cellular and Molecular Life Science*, 53, 131–140.

Nakane H, Ono K. (1989) Differential inhibition of HIV reversed transcriptase and various DNA and RNA polymerases by some catechin derivatives, *Nucleic Acids Symposium Series*, 21, 115–116.

No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. (2002) Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65–72.

Nychas GJE, Tassou CC, Skandamis P. (2003) Making the most of herbs, spices and their active components. In S. Roller (Ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Cambridge, England: Woodhead Publishing, pp. 176–200.

Obradović N, Krunić T, Trifković K, Bulatović M, Rakin M, Rakin M, Bugarski B. (2015) Influence of Chitosan Coating on Mechanical Stability of Biopolymer Carriers with Probiotic Starter Culture in Fermented Whey Beverages. *International Journal of Polymer Science*, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/732858>.

Ochi M, Ida J, Matsuyama T, Yamamoto H. (2015) Effect of synthesis temperature on characteristics of PNIPAM/alginate IPN hydrogel beads, *Journal of Applied Polymer Science*, 132, 41814 (1-8)

Ollanketo M, Peltoketo A, Hartonen K, Hiltunen R, Riekkola ML. (2002) Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts, *European Food Research and Technology*, 215, 158–163.

Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. (2008) Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults, *Journal of Nutrition*, 138, 562–566.

Pandey KB, Rizvi SI. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 270–278.

Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macherasa P. (2006) On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms, *International Journal of Pharmaceutics*, 309, 44–50.

Pasparakis G, Bouropoulos N. (2006) Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate - chitosan beads, *International Journal of Pharmaceutics*, 323, 34–42.

Pedro AC, Granato D, Deliberali Rosso N. (2016) Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modelling and assessing their reversibility and stability, *Food Chemistry*, 191, 12–20.

Peleg M. (1988) An empirical model for the description of moisture sorption curves, *Journal of Food Science*, 53, 1216–1217.

Peltoketo A, Dorman HJD, Yrjonen T, Laakso I, Vuorela H, Hiltunen R. (2001) Antioxidant properties of volatile oils and aqueous fractions of selected aromatic and medicinal plants. 3rd International Conference on Phytomedicine, Munich, Germany, *Phytomedicine*, Supplement II, 75.

Penbuditkul P, Yoshii H, Ruktanonchai U, Charinpanitkul T, Assabumrungrat S, Soottitantawat A. (2012) The loss of OSA-modified starch emulsifier property during the high-pressure homogeniser and encapsulation of multi-flavour bergamot oil by spray drying, *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2325–2333.

Penbuditkul P, Yoshii H, Ruktanonchai U, Charinpanitkul T, Soottitantawat A. (2011) Effect of feed liquid viscosity on flavour retention of bergamot oil encapsulated in spray-dried modified starch powder, Athens, Greece: International Congress on Engineering and Food, pp. 1-6.

Peppas NA, Sahlin JJ. (1989) A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation, *International Journal of Pharmaceutics*, 57, 169–172.

Peppas NA. (1985) Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60, 110–111.

Percival M. (1998) Antioxidants, *Clinical Nutrition Insight*, 31, 1–4.

Petti S, Scully C. (2009) Polyphenols, oral health and disease: A review, *Journal of Dentistry*; 37, 413–423.

Pham HH, Luo P, Génin F, Dash AK. (2002) Synthesis and characterization of hydroxyapatite-ciprofloxacin delivery systems by precipitation and spray drying technique, *AAPS PharmSciTech*, 3(1), E1-9.

Phromsopha T, Baimark Y. (2010) Chitosan microparticles prepared by the water-in-oil emulsion solvent diffusion method for drug delivery, *Biotechnology*, 9(1), 61-66.

Pietta P, Minoggio M, Bramati L. (2003) Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity, *Studies in Natural Products Chemistry*, 28, 257–312.

Pillai DS, Prabhasankar P, Jena BS, Anandharamakrishnan C. (2012) Microencapsulation of Garcinia cowa fruit extract and effect of its use on pasta process and quality, *International Journal of Food Properties*, 15, 590–604.

Pjanović R. (2010) Prenos mase aktivne komponente u heterogenim sistemima sa mikročesticama, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Polk A, Amsden B, Yao KD, Peng T, Goosen MF. (1994) Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 178–185.

Popa MI, Aelenei N, Popa VI, Andrei D. (2000) Study of the interaction between polyphenolic compounds and chitosan, *Reactive and Functional Polymers*, 45, 35–43.

Pravilović R. (2016) Difuzija polifenolnih jedinjenja iz mikročestica dobijenih različitim tehnikama inkapsulacije. Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Proestos C, Chorianopoulos N, Nychas GJE, Komaitis M. (2005) RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1190–1195.

Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. (2004) Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Research*, 339(16), 2693–2700.

Quispe-Condori S, Saldaña MDA, Temelli F. (2011) Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying, *LWT- Food Science and Technology*, 44, 1880-1887.

Raal A, Paaver U, Arak E, Orav A. (2004) Content and composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia, *Medicina (Kaunas)*, 40(8), 795-800.

Ramadas M, Paul W, Dileep KJ, Anitha Y, Sharma CP. (2000) Lipoinsulin encapsulated alginate–chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats, *Journal of Microencapsulation*, 17, 405–411.

Rampino A, Borgogna M, Blasi P, Bellich B, Cesàro A. (2013) Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability, *International Journal of Pharmaceutics*, 455, 219–228.

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 Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.

Record IR, Lane JM. (2001) Simulated intestinal digestion of green and black teas, *Food Chemistry*, 73, 481–486.

Reineccius GA. (2001) Multiple-core encapsulation: The spray drying of food ingredients. In: *Microencapsulation of food ingredients*, Ed. Vilstrup P., Leatherhead Food RA Publishing, London, pp. 151–185.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1996) Structure– antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 20, 933–956.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159.

Rice-Evans CA, Miller NJ. (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of foods, *Biochemical Society Transactions*, 24, 790–795.

Ritger PL, Peppas NA. (1987a) A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *Journal of Controlled Release*, 5, 23–36.

Ritger PL, Peppas NA. (1987b) A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices, *Journal of Controlled Release*, 5, 37–42.

Roberts GAF. (1992) *Chitin Chemistry*, vol. 1–110, The Mac Millan Press, London, pp. 274–315.

Roby MHH, Sarhan MA, Selim KA-H, Khalel KI. (2013) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts, *Industrial Crops and Products*, 43, 827–831.

Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wahala K, Williamson G, Cassidy A. (2003) Bioavailability of phyto-oestrogens, *British Journal of Nutrition*, 89(1), 838–852.

Ruf JC. (1999) Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis, *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 25(2–3), 125–131.

Safaei-Ghomi JH, Ebrahimabadi A, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. (2009) GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol, *Food Chemistry*, 115, 1524–1528.

Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H. (1999) Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 397–402.

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215S–217S.

Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 276–282.

Scalbert A, Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *Journal of Nutrition*, 130, 2073S–2085S.

Schini-Kerth VB, Auger C, Etienne-Selloum N, Chataigneau T. (2010) Polyphenol-induced endothelium-dependent relaxations role of NO and EDHF, *Advances in Pharmacological Sciences*, 60, 133–175.

Schipper NGM, Olsson S, Hoogstraate JA, deBoer AG, Varum KM, Artursson P. (1997) Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs: 2. Mechanism of absorption enhancement, *Pharmaceutical Research*, 14, 923–929.

Schnürch AB, Humenberger C, Valenta C. (1998) Basic studies on bioadhesive delivery systems for peptide and protein drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 165, 217–225.

Sebastian M, Ninan N, Haghi AK. (2012) *Nanomedicine and Drug Delivery*, Apple Academic Press., CRC Press, Taylor & Francis Group.

Segale L, Albertini B, Giovannelli L, Pattarino F. (2008) Empirical kinetic model of propafenone release from hot air coating microparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 353, 124–130.

Serra A, Macià A, Romero MP, Valls J, Bladé C, Arola L, Motilva M-J. (2010) Bioavailability of procyanidin dimmers and trimers and food matrix effect in vitro and in vivo models, *British Journal of Nutrition*, 103, 944–952.

Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE. (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements, *Journal of Nutrition*, 131, 1362S–1375S.

Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ. (1999) Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science and Technology*, 10, 37–51.

Shahidi F, Han XQ. (1993) Encapsulation of food ingredients, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501–547.

Shahidi F, Wanasundara RKJPD. (1992) Phenolic antioxidants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67–103.

Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. (2005) Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749–7759.

Sharma S, Sanpui P, Chattopadhyay A, Ghosh SS. (2012) Fabrication of antibacterial silver nanoparticle–sodium alginate–chitosan composite films, *RSC Advances*, 2, 5837–5843.

Shepherd R, Reader S, Falshaw A. (1997) Chitosan functional properties, *Glycoconjugate Journal*, 14, 535–542.

Shilpa A, Agrawal SS, Alok RR. (2003) Controlled Delivery of Drugs from Alginate Matrix, *Journal of Macromolecular Science Part C – Polymer Reviews*, C43, 187–221.

Shimoda J, Onishi H, Machida Y. (2001) Bioadhesive characteristics of chitosan microspheres to the mucosa of rat small intestine, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27, 567–576.

Shimoi K, Nakamura Y, Tomita I, Hara Y, Kada T. (1986) The pyrogallol related compounds reduce UV-induced mutations in Escherichia coli B/r, *Mutation Research*, 239–244.

Shin JE, Kim JM, Bae EA, Hyun YJ, Kim DH. (2005) In vitro inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of Helicobacter pylori, *Planta Medica*, 71, 197–201.

Shu XZ, Zhu KJ. (2000) A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release of drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 201, 51–58.

Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. (2013) Chitosan based nanomaterials: A state-of-the-art review, *International Journal Biological Macromolecules*, 59, 46–58.

Siddiqui IA, Malik A, Adhami VM, Asim M, Hafeez BB, Sarfaraz S, Mukhtar H. (2008) Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis, *Oncogene*, 27, 2055–2063.

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

Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. (2004) Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 274, 1–33.

Siripatrawan U, Harte B. (2010) Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan in corporate with green tea extract, *Food Hydrocolloids*, 24, 770–775.

Smith DM, Dou QP. (2001) Green tea polyphenol epigallocatechin inhibits DNA replication and consequently induces leukaemia cell apoptosis, *International Journal of Molecular Medicine*, 7, 645–652.

Soottitantawat A, Bigeard F, Yoshii H, Furuta T, Ohkawara M, Linko P. (2005) Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 107–114.

Souza AS, Borges SV, Magalhães NF, Ricardo HV, Cereda MP, Daiuto ER. (2009) Influence of spray drying conditions on the physical properties of dried pulp tomato, *Food Science and Technology (Campinas)*, 29, 291–294.

Steele CM, Lilies M, Ioannides C. (1985) Inhibition of the mutagenicity of aromatic amines by the plant flavonoid (+)-catechin, *Cancer Research*, 45, 3573–3577.

Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. (2004) Vascular protection by dietary polyphenols, *European Journal of Pharmacology*, 500, 299–313.

Stojanović R, Belščak-Cvitanović A, Manojlović V, Komes D, Nedovic V, Bugarski B. (2012) Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium-alginate beads, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 685–696.

Sugawara S, Imai T, Otagiri M. (1994) The controlled release of prednisolone using alginate gel, *Pharmaceutical Research*, 11, 272–277.

Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y. (2007) Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4604–4609.

Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E, Merrell MM, Selman HS, Jankun J. (1999) Angiostatic activity of synthetic inhibitors of urokinase type plasminogen, *Oncology Reports*, 6, 523–526.

Tedesco I, Russo M, Russo P, Iacomino G, Russo GL, Carraturo A, Faruolo C, Moio L, Palumbo R. (2000) Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 114–119.

Toda M, Okubo S, Ikigai H, Shimamura T. (1990) Antibacterial and anti-hemolysin activities of tea catechins and their structural relatives, *Nippon Saikingaku Zasshi*, 45, 561–566.

Tonon RV, Grosso CRF, Hubinger MD. (2011) Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying, *Food Research International*, 44, 282–289.

Trifković K, Đorđević V, Balanč B, Kalušević A, Lević S, Bugarski B, Nedović V. (2016) Chapter 9: Novel approaches in nanoencapsulation of aromas and flavors, In: Encapsulations, Volume 2, Ed. Alexandru Mihai Grumezescu. Elsevier, ISBN 978-0-12-804307-3, pp. 363-419.

Trifković K, Milašinović N, Djordjević V, Zdunić G, Kalagasidis Krušić M, Knežević-Jugović Z, Šavikin K, Nedović V, Bugarski B. (2015) Chitosan crosslinked microparticles

with encapsulated polyphenols: water sorption and release properties, *Journal of Biomaterials Application*, 30(5), 618-631.

Trifković KT, Milašinović NZ, Djordjević VB, Kalagasidis Krušić MT, Knežević-Jugović ZT, Nedović VA, Bugarski BM. (2014) Chitosan microbeads as carriers for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols, *Carbohydrate Polymers*, 111, 901-907.

Trifković KT, Milašinović NZ, Isailović BD, Kalagasidis Krušić MT, Đorđević VB, Knežević-Jugović ZD, Bugarski BM. (2012) Encapsulation of *Thymus Serpyllum* L. aqueous extract in chitosan and alginate-chitosan microbeads, 6th Central European Congress on Food 2012, pp.1052-1058, ISBN 978-86-7994-027-8.

Tzu-Yang H., Gregory LR. (1995) Effects of Acylation and Crosslinking on the Material Properties and Cadmium Ion Adsorption Capacity of Porous Chitosan Beads, *Separation Science and Technology*, 30(12), 2455-2475.

Urban D, Takamura K. (2002) *Polymer Dispersions and Their Industrial Applications*. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266, 37-56.

Vandenberg GW, De La Noüe J. (2001) Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation, *Journal of Microencapsulation*, 18, 433-441.

Vanderhoff JW, Bradford EB, Tarkowski HL, Shaffer JB, Wiley RM. (1962) Inverse Emulsion Polymerization, In: *Polymerization And Polycondensation Processes*; Ed. Platzer, N. Advances in Chemistry; American Chemical Society: Washington, DC.

Viana M, Barbas C, Bonet B, Bonet MV, Castro M, Fraile MV, Herrera E. (1996) In vitro effects of a flavonoid-rich extract on LDL oxidation, *Atherosclerosis*, 123, 83-91.

Vidović BB, Milašinović NZ, Kotur-Stevuljević JM, Dilber SP, Kalagasidis Krušić MT, Đorđević BI, Knežević-Jugović ZD. (2016) Encapsulation of α -lipoic acid into chitosan and alginate/gelatin hydrogel microparticles and its in vitro antioxidant activity, *Hemijska industrija*, 70, 49-58.

Vijaya Y, Popuri SR, Boddu VM, Krishnaiaha A. (2008) Modified chitosan and calcium alginate biopolymer sorbents for removal of nickel (II) through adsorption, *Carbohydrate Polymers*, 72, 261-271.

Walke S, Srivastava G, Nikalje M, Doshi J, Kumar R, Ravetkar S, Doshi P. (2015) Fabrication of chitosan microspheres using vanillin/TPP dual crosslinkers for protein antigens encapsulation, *Carbohydrate Polymers*, 128, 188–198.

Walton DE. (2000) The morphology of spray-dried particles a qualitative view, *Drying Technology*, 18, 1943-1986.

Williamson G, Manach C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 243S-255S.

Williamson G. (2003) The use of flavonoid aglycones in in vitro systems to test biological activities: based on bioavailability data, is this a valid approach? *Phytochemistry Review*, 1, 215–222.

Wilson LD, Xue C. (2013) Macromolecular sorbent materials for urea capture, *Journal of Applied Polymer Science*, 128, 667–675.

Wojdyło A, Oszmianski J, Czemerys R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food Chemistry*, 105, 940–949.

Wollgast J, Anklam E. (2000) Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification, *Food Research International*, 33, 423–447.

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

Wong TW, Chan LW, Kho SB, Heng PWS. (2002) Design of controlled release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave, *Journal of Controlled Release*, 84, 99–114.

Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. (2005) Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate, *International Journal of Pharmaceutics*, 295(1-2), 235–245.

Wuolijoki E, Hirvelä T, Ylitalo P. (1999) Decrease in serum LDL cholesterol with microcrystalline chitosan, *Methods Find in Experimental Clinical Pharmacologic*, 21, 357–361.

Yam TS, Shah S, Hamilton-Miller JMT. (1997) Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components, *FEMS Microbiology Letters*, 152, 169–174.

Yamak HB. (2013) Emulsion Polymerization: Effects of Polymerization Variables on the Properties of Vinyl Acetate Based Emulsion Polymers, Polymer Science, Ed. Faris Yilmaz, InTech, DOI: 10.5772/51498.

Yamamoto Y, Matsunaga K, Friedman H. (2004) Protective effects of green tea catechins on alveolar macrophages against bacterial infections, *Biofactors*, 21, 119–121.

Yao KD, Peng T, Feng HB, He YY. (1994) Swelling kinetics and release characteristic of crosslinked chitosan–polyether polymer network (semiIPN) hydrogels, *Journal of Polymer Science, Part A, Polymer Chemistry*, 32, 1213–1223.

Yen GC, Duh PD. (1994) Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active oxygen species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 629–632.

Yoksan R, Jirawutthiwongchai J, Arpo K. (2010) Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes, *Colloids and Surfaces B*, 76, 292–297.

Young IS, Woodside JV. (2001) Antioxidants in health and disease, *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176–186.

Zhang H, Oh M, Allen C, Kumacheva E. (2004) Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacromolecules*, 5(6), 2461–2468.

Zhang H, Tsao R. (2016) Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects, *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42.

Zhang L, Kosaraju SL. (2007) Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants, *European Polymer Journal*, 43, 2956–2966.

Zhang Y, Yu Y, Shi X, Zhao S, Chen A, Huang D, Niu D, Qin Z. (2013) Study on the preparation of genipin crosslinked chitosan microspheres of resveratrol and in vitro release, *Journal of Polymer Research*, 20, 175–184.

Zheng LY, Zhu JF. (2003) Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydrate Polymers*, 54, 527–530.

Zuidam NJ, Shimoni E. (2010) Overview of microencapsulation use in food products or processes and methods to make them. In: Encapsulation technique for active food ingredients and food processing, Eds. Zuidam NJ, Nedovic VA, Springer, NewYork, pp. 3–29.

Žuža MG, Obradović BM, Knežević-Jugović ZD. (2011) Hydrolysis of penicillin G by penicillin G acylase immobilized on chitosan microbeads in different reactor systems, *Chemical Engineering and Technology*, 34, 1706–1714.

Spisak slika

<i>Slika 1.1.</i> Klasifikacija polifenola.....	11
<i>Slika 1.2.</i> Biljka majčina dušica (<i>Thymus serpyllum</i> L.).....	19
<i>Slika 1.3.</i> Šematski prikaz različitih morfologija inkapsulata: (a) matrica; (b) jezgro/ljuska (rezervoar); (c) multi-membrana; (d) multi-jezgro; (e) fosfolipidni dvosloj i (f) molekularna inkluzija. (<i>Đorđević i sar. 2015</i>).....	28
<i>Slika 1.4.</i> Šematski prikaz ekstruzionih tehnika za dobijanje polimernih mikročestica: a) tehnika presecanja mlaza; b) tehnika vibrirajućeg raspršivača; c) tehnika raspršivanja uz pomoć rotirajućeg diska; d) tehnika ukapavanja uz dejstvo koaksijalnog toka vazduha; e) tehnika elektrostatičke ekstruzije.	35
<i>Slika 1.5.</i> Mehanizam formiranja kapljica na vrhu igle pri ekstruziji rastvora Na-alginata koncentracije 1,5 mas.% a) bez primene elektrostatičkog polja i sa primenom elektrostatičkog potencijala od 4 do 5 kV: b) formiranje meniska; c) formiranje vlakna polimera; d) izduživanje vlakna polimera; e) otkidanje kapljica. (<i>Bugarški i sar. 1994</i>) .	37
<i>Slika 1.6.</i> Mehanizam procesa emulziona polimerizacije. (<i>Yamak, 2013</i>).....	40
<i>Slika 1.7.</i> Proces inverzne emulziona polimerizacije. (<i>Vanderhoff i sar. 1962</i>)	41
<i>Slika 1.8.</i> Izgled mikročestica hitozana dobijenih inverznom emulzionom polimerizacijom pod: a) optičkim mikroskopom u stanju relaksacije i b) SEM mikroskopom nakon rehidratacije i dostizanja ravnotežnog stepena bubrenja u vodi 25°C („bar“ 500 μm). (<i>Milašinović i sar., rad u pripremi</i>)	43
<i>Slika 1.9.</i> Šematski prikaz sprej-sušača.....	44
<i>Slika 1.10.</i> Hemijska struktura hitozana.....	50
<i>Slika 1.11.</i> a) Hemijska struktura glutaradehida; b) Proces umrežavanja hitozana glutaraldehidom. (<i>Gonçalves i sar. 2005</i>).....	53
<i>Slika 1.12.</i> a) Hemijska struktura TPP-a; b) Proces umrežavanja hitozana TPP-om. (<i>Kašpar i sar. 2013</i>).....	54
<i>Slika 1.13.</i> Hemijska struktura a) genipina i b) genipozida.....	55
<i>Slika 1.14.</i> Reakcije umrežavanja koje uključuju genipin (<i>Butler i sar. 2003</i>).....	56
<i>Slika 1.15.</i> Struktura natrijum alginata (G – guluronska kiselina; M – manuronska kiselina).....	58

<i>Slika 1.16.</i> Vezivanje jona kalcijuma za ostatke guluronske kiseline međusobno povezane 1,4-glikozidnom vezom, tzv. „egg-box“ model.	59
<i>Slika 1.17.</i> Profili otpuštanja aktivne komponente korišćenjem konvencionalnih sistema i sistema za kontrolisano otpuštanje.	65
<i>Slika 2.1.</i> Reakcija polifenola s Folin-Ciocalteu reagensom.	73
<i>Slika 2.2.</i> Reakcija ABTS reagensa sa polifenolima.	75
<i>Slika 2.3.</i> Šematski prikaz eksperimentalne aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije.	78
<i>Slika 2.4.</i> Dobijanje mikročestica hitozana umreženih GA metodom inverzne emulzije polimerizacije.	80
<i>Slika 2.5.</i> Proces dobijanja mikročestica hitozana metodom sprej-sušenja.	82
<i>Slika 3.1.</i> HPLC hromatogram ekstrakta majčine dušice, pri čemu se pikovi odnose na: 1 - ukupne flavonoide (TF); 2 - kafeinsku kiselinu (CA); 3 - ukupne flavonoide (TF); 4 - ukupne flavonoide (TF); 5 - ukupne fenolne kiseline (TPA); 6 - ukupne flavonoide (TF); 7 - ruzmarinsku kiselinu (RA); 8 - ukupne fenolne kiseline (TPA).	96
<i>Slika 3.2.</i> Bubrenje mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom u uslovima simuliranog gastro-intestinalnog trakta.	103
<i>Slika 3.3.</i> Bubrenje mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom u vodi, na 25°C: a) uticaj koncentracije glutaraldehyda, i b) uticaj koncentracije hitozana.	105
<i>Slika 3.4.</i> Udeo apsorpcije vode (izražene kao M_t/M_{∞} , pri čemu se leva ordinata odnosi na jednačine (3)-(4) i (6)-(10), odnosno kao $M_t/M_{dry\ gel}$, gde se desna ordinata odnosi na jednačinu (11)) za uzorak M_{GA4} u funkciji vremena.	110
<i>Slika 3.5.</i> FTIR spektri mikročestica alginate-hitozan: I - prazne mikročestice; II - mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice; III - mikročestice nakon otpuštanja polifenola.	111
<i>Slika 3.6.</i> FTIR spektri praznih mikročestica hitozana različitog sastava.	113
<i>Slika 3.7.</i> FTIR spektri MGA5 mikročestica: I - prazne mikročestice; II - mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima majčine dušice; III - mikročestice nakon otpuštanja polifenola.	114
<i>Slika 3.8.</i> FTIR spektri čistog hitozana, TPP-a, liofilizovanog ekstrakta, i mikročestica hitozana M_{TPP3a} praznih i sa inkapsuliranim polifenolima.	116
<i>Slika 3.9.</i> FTIR spektri čistog hitozana i mikročestica hitozana umreženih genipinom.	117

<i>Slika 3.10.</i> Optičke mikro-fotografije čestica alginat-hitozan a) sa inkapsuliranim polifenolima i b) nakon otpuštanja polifenola („bar“ 500 μm) i c) njihovi prečnici.	119
<i>Slika 3.11.</i> Veličina mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom kao funkcija masenog odnosa GA/Ch (x) i koncentracije hitozana. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm STDEV (n=3). Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite ($p \leq 0,05$).....	121
<i>Slika 3.12.</i> Mikro-fotografije uzorka M _{GA5} a) u formi hidrogela, b) aglomerata suvih čestica, i c) rehidriranih mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima („bar“ 500 μm).	122
<i>Slika 3.13.</i> Raspodela veličina mikročestica M _{GA5} , praznih i sa inkapsuliranim polifenolima.	123
<i>Slika 3.14.</i> SEM mikrografije suvih mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom: a) M _{GA5} mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima ($\times 496$); b) M _{GA3} prazna mikročestica – površina ($\times 2000$); c) M _{GA5} prazna mikročestica – površina ($\times 2000$); d) M _{GA6} mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima – površina ($\times 2000$). ...	129
<i>Slika 3.15.</i> SEM mikrografije mikročestica hitozana sa različitim stepenom umreženja: a) M _{GA6} i b) M _{GA8}	131
<i>Slika 3.16.</i> SEM mikrografije praznih mikročestica hitozana umreženih TPP-om..	132
<i>Slika 3.17.</i> SEM mikrografije mikročestica hitozana umreženih TPP-om sa inkapsuliranim polifenolima.	133
<i>Slika 3.18.</i> SEM mikrografije mikročestica hitozana umreženih genipinom sa inkapsuliranim polifenolima.	135
<i>Slika 3.19.</i> SEM mikrografija preseka suve M _{GA5} mikročestice sa inkapsuliranim polifenolima ($496\times$); inset: ($30,000\times$).....	138
<i>Slika 3.20.</i> XRD difraktogrami a) čistog hitozana i MGA4 mikročestica b) praznih i c) sa inkapsuliranim polifenolima.	142
<i>Slika 3.21.</i> a) Testiranje čestice alginat-hitozan u vodi; b) čestica pre i nakon testiranja.....	143
<i>Slika 3.22.</i> Zavisnost deformacije od primenjene sile za mikročestice alginat-hitozan.	144
<i>Slika 3.23.</i> Ukupan sadržaj polifenola (TPC) mikročestica hitozana umreženih glutaradlehidom kao funkcija koncentracije hitozana i GA/Ch masenog odnosa: a) 3D površina i b) konturni dijagram (n=3, SD < 11%).	150

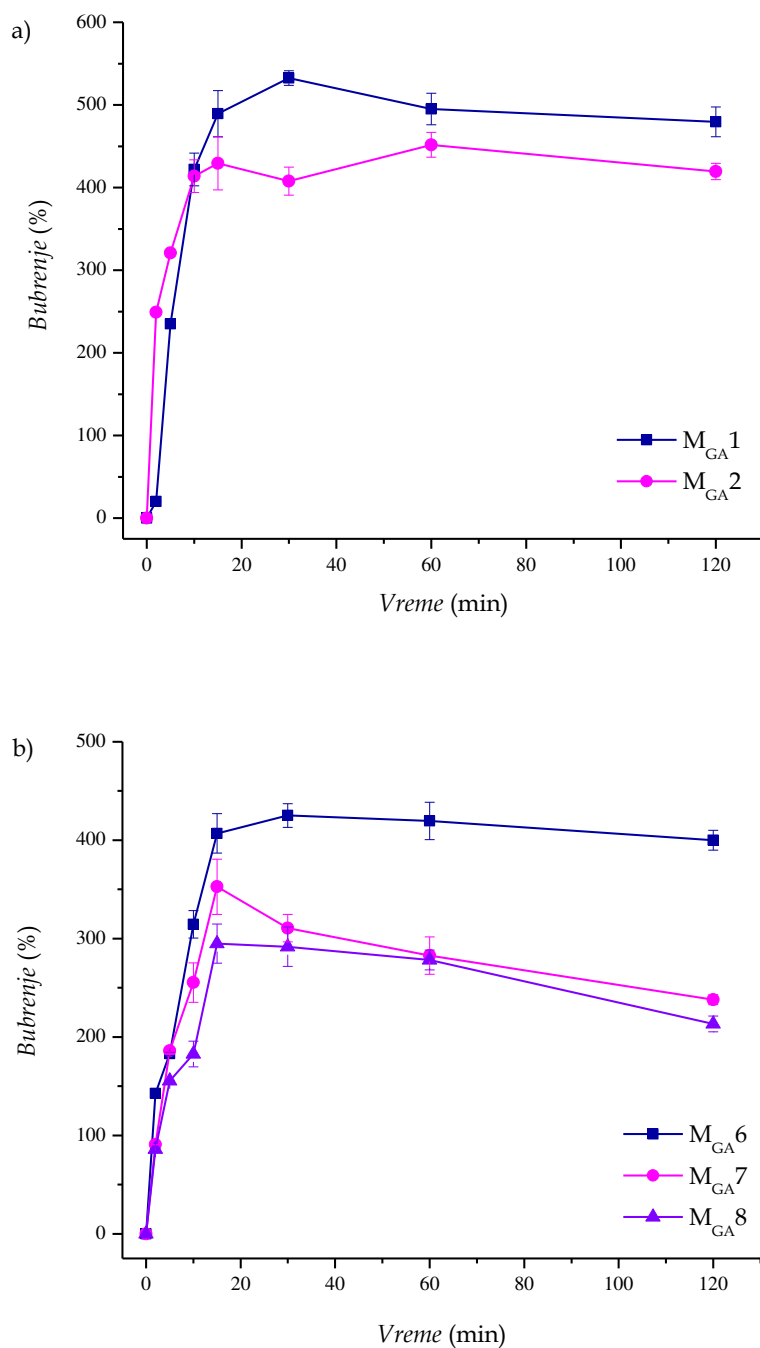
- Slika 3.24.* Kinetika otpuštanja polifenola iz mikročestica alginat-hitozan i parametri Weibull-ovog modela (simboli označavaju eksperimentalno dobijene podatke, dok se linija odnosi na Weibull-ov model). 155
- Slika 3.25.* Otpuštanje polifenola majčine dušice iz mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom a) u vodi i b) u SGF-SIF..... 157
- Slika 3.26.* Procenat otpuštenih polifenola iz mikročestica hitozana umreženih glutaraldehydom a) u vodi i b) u SGF-SIF..... 159
- Slika 3.27.* Kinetika otpuštanja kafeinske kiseline (CA), ruzmarinske kiseline (RA), ukupnih flavonoida (TF) i ukupnih polifenola (TPC) iz mikročestica hitozana M_{GA5} : a) u vodi i b) u uslovima SGF-SIF. Leva ordinata se odnosi na otpuštanje CA, RA i TF, dok se desna ordinata odnosi na TPC. 161
- Slika 3.28.* Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih TPP-om u vodi, pri čemu je inkapsulacija polifenola vršena a) „*in-situ*“ postupkom i b) „*post-loading*“ postupkom. 163
- Slika 3.29.* Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih TPP-om u simuliranim uslovima GI trakta, pri čemu je inkapsulacija polifenola vršena a) „*in-situ*“ postupkom i b) „*post-loading*“ postupkom. 165
- Slika 3.30.* Otpuštanje polifenola iz mikročestica hitozana umreženih genipinom a) u vodi i b) u simuliranim uslovima GI trakta. 168
- Slika 3.31.* Kinetika otpuštanja polifenola (M_t/M_∞) za mikročestice M_{GA5} : a) u vodi (donja apcisa se odnosi na vreme otpuštanja kafeinske (CA) i ruzmarinske (RA) kiseline, a gornja apcisa se odnosi na vreme otpuštanja ukupnih polifenola (TPC) i ukupnih flavonoida (TF)) i b) u uslovima SGF-SIF. Simboli se odnose na eksperimentalne podatke, dok se linije odnose na primenu Weibull-ovog modela. . 170
- Slika 3.32.* Antioksidativna aktivnost polifenola inkapsuliranih u mikročestice hitozana umrežene glutaraldehydom. 173

Spisak tabela

<i>Tabela 1.1.</i> Najzastupljenija polifenolna jedinjenja u vodenom ekstraktu majčine dušice, njihovi nazivi po IUPAC-u, formule, molekulske mase i mase prisutne u uzorku.....	21
<i>Tabela 1.2.</i> Pregled najčešćih tehnika inkapsulacije (<i>Dorđević i sar. 2015</i>).....	29
<i>Tabela 1.3.</i> EkspONENT n (jednačina (3)) i različiti mehanizmi difuzije. (<i>Ritger i Peppas, 1987b</i>)	68
<i>Tabela 2.1.</i> Mikročestice hitozana umrežene GA – skraćenice i sastav.....	79
<i>Tabela 2.2.</i> Mikročestice hitozana umrežene TPP – skraćenice i sastav.....	81
<i>Tabela 2.3.</i> Mikročestice hitozana umrežene genipinom – skraćenice i sastav.....	83
<i>Tabela 3.1.</i> Ukupan sadržaj polifenola u ekstraktu majčine dušice.....	94
<i>Tabela 3.2.</i> Sadržaj pojedinačnih komponenata u ekstraktu majčine dušice određen HPLC metodom.....	97
<i>Tabela 3.3.</i> Antioksidativni kapacitet ekstrakta majčine dušice.....	97
<i>Tabela 3.4.</i> Sadržaj minerala u ekstraktu majčine dušice.....	99
<i>Tabela 3.5.</i> Parametri i koeficijenti dobijeni primenom različitih modela za simulaciju profila bubrenja uzorka M_{GA4}	108
<i>Tabela 3.6.</i> Srednji prečnik (D), faktor sferičnosti (SF) i faktor skupljanja (k_{SF}) za hidrogel, suve i mikročestice nakon rehidratacije u puferu pH vrednosti $2,20 \pm 0,01$. ..	120
<i>Tabela 3.7.</i> Hidrodinamički prečnici mikročestica hitozana umreženih TPP-om. ..	125
<i>Tabela 3.8.</i> Hidrodinamički prečnici mikročestica hitozana umreženih genipinom.	126
<i>Tabela 3.9.</i> ζ -potencijal mikročestica hitozana umreženih TPP-om.....	136
<i>Tabela 3.10.</i> ζ -potencijal mikročestica hitozana umreženih genipinom.....	137
<i>Tabela 3.11.</i> Parametri poroznosti mikročestica hitozana M_{GA5} . [S_p - specifična površina; V_{total} - ukupna zapremina pora; V_{meso} - zapremina mezo-pora (veličina pora između 1,7 i 300 nm); V_{micro} - zapremina mikro-pora; D_{sr} srednji prečnik pora].	139
<i>Tabela 3.12.</i> Parametri poroznosti mikročestica hitozana umreženih TPP-om. [S_p - specifična površina; V_{total} - ukupna zapremina pora; V_{meso} - zapremina mezo-pora (veličina pora između 1,7 i 300 nm); V_{micro} - zapremina mikro-pora; D_{sr} srednji prečnik pora].	140

<i>Tabela 3.13.</i> Parametri poroznosti mikročestica hitozana umreženih genipinom. [S_p - specifična površina; V_{total} - ukupna zapremina pora; V_{meso} - zapremina mezo-pora (veličina pora između 1,7 i 300 nm); V_{micro} - zapremina mikro-pora; D_{sr} srednji prečnik pora].	141
<i>Tabela 3.14.</i> Mehaničke karakteristike mikročestica alginat-hitozan, pri deformaciji od 30%.....	145
<i>Tabela 3.15.</i> Ukupan sadržaj polifenola (TPC) i efikasnost inkapsulacije (EE) za mikročestice alginat-hitozan.....	146
<i>Tabela 3.16.</i> Efikasnost inkapsulacije (EE) i sadržaj ukupnih polifenola (TPC) mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom sa inkapsuliranim polifenolima.	148
<i>Tabela 3.17.</i> Efikasnost inkapsulacije (EE) i sadržaj ukupnih polifenola (TPC) mikročestica hitozana umreženim TPP sa inkapsuliranim polifenolima.	152
<i>Tabela 3.18.</i> Vrednosti parametara c , k_{10} i d i statistički parametri dobijeni primenom jednačine (10) na eksperimentalno dobijene rezultate otpuštanja.	171

PRILOG

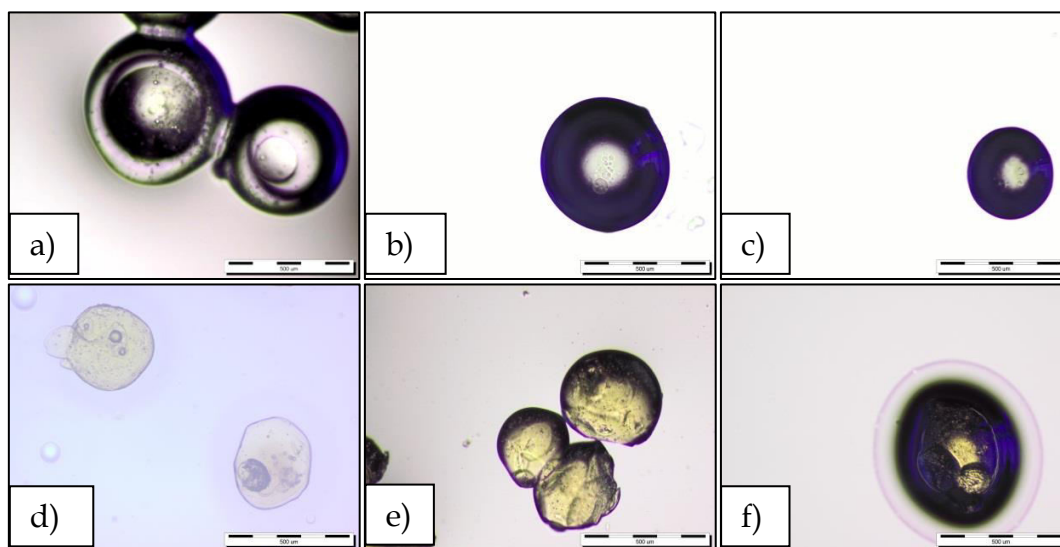


Slika P1. Bubrenje mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom koji sadrže a) 1,5 mas.% hitozana i b) 3,0 mas.% hitozana, u vodi na 25°C.

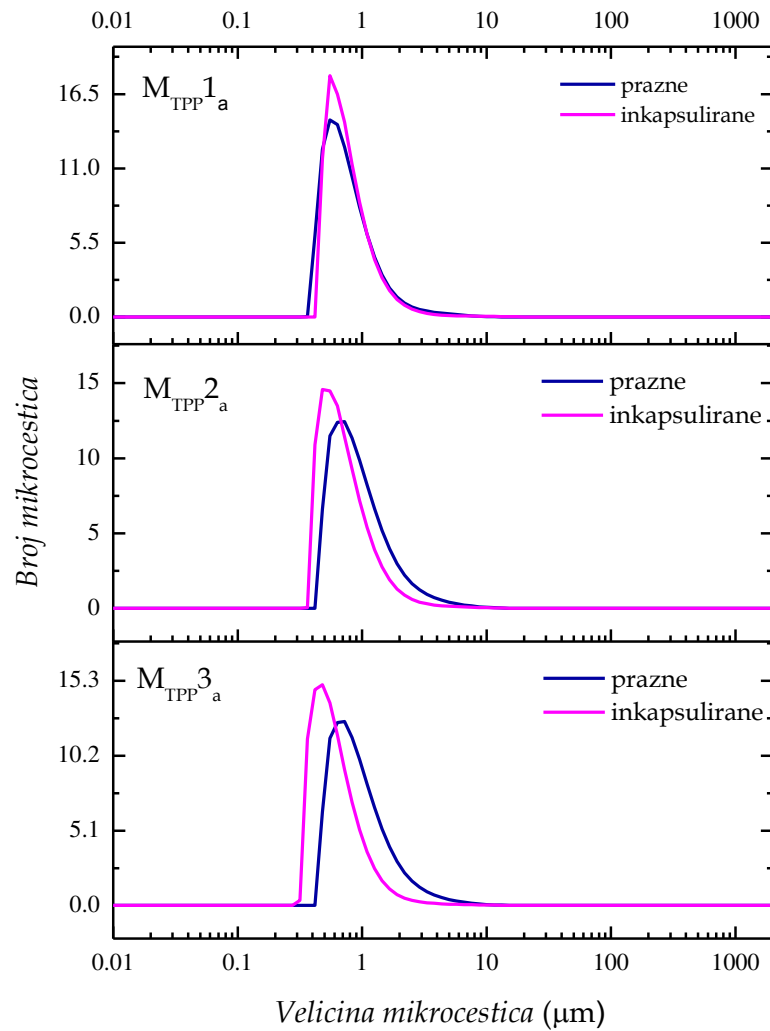
Tabela P1. Faktor sferičnosti (SF) suvih mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom.

Suve mikročestice	SF ^a
M _{GA1}	0,097
M _{GA2}	/
M _{GA3}	0,046
M _{GA4}	0,026
M _{GA5}	0,093
M _{GA6}	0,325
M _{GA7}	0,206
M _{GA8}	/

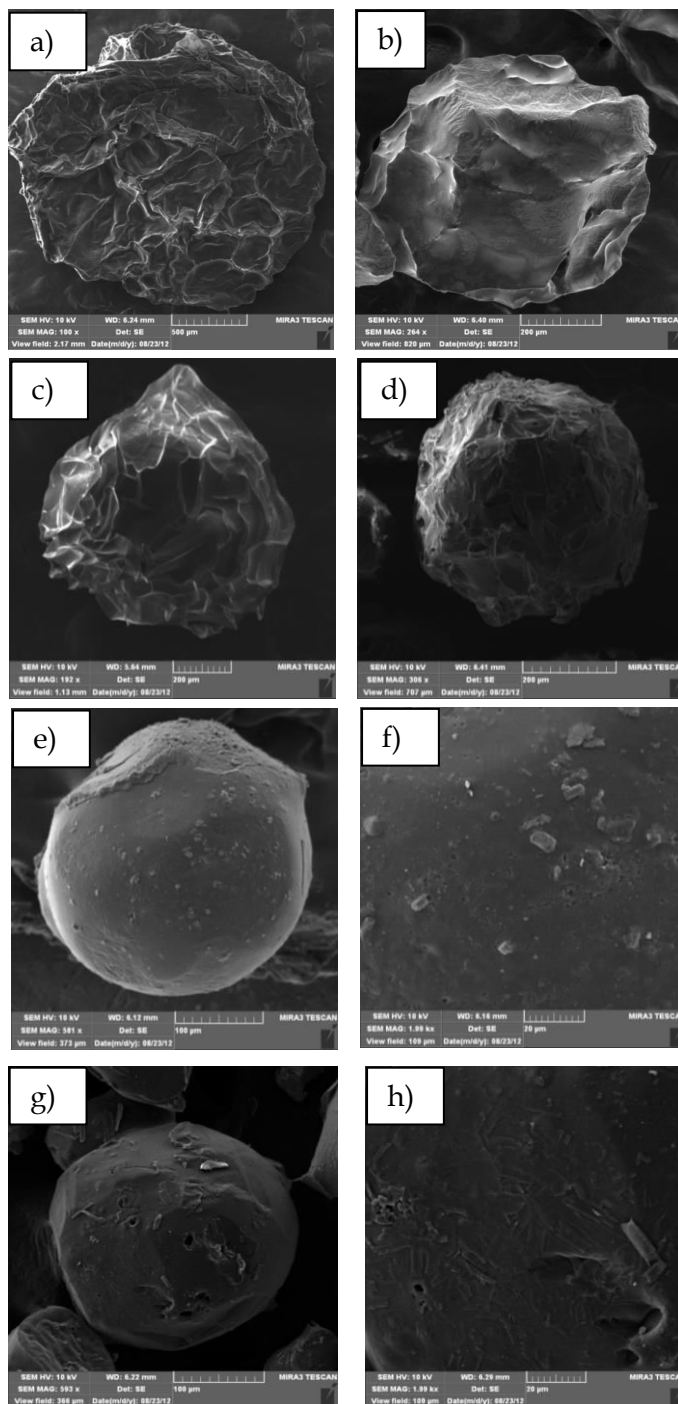
^aSrednja vrednost standardne devijacije je manja od 32% (n=30)



Slika P2. Mikro-fotografije mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom, i to nakon sinteze (stanje relaksacije polimera) a) M_{GA2}, b) M_{GA6}, c) M_{GA7}, i rehidriranih d) M_{GA4}, e) M_{GA7}, f) M_{GA8} („bar“ 500 μm).



Slika P3. Raspodela velicina mikrocestica hitozana umreženih TPP-om, praznih i sa inkapsuliranim polifenolima.



Slika P4. SEM mikrofografije mikročestica hitozana umreženih glutaraldehidom, i to: odmah nakon sinteze a) M_{GA6} (×100), b) M_{GA7} (×264) i c) M_{GA5} (×192); zatim nakon rehidratacije d) M_{GA5} (×306); i na kraju nakon inkapsulacije polifenola e) M_{GA7} (×581) i f) M_{GA7} površina (×1990), g) M_{GA8} (×593) i h) M_{GA8} površina (×1990).

Biografija

Kata T. Trifković, diplomirani inženjer tehnologije, rođena je 01.03.1986. godine u Priboju, Republika Srbija, gde je stekla osnovno i srednje obrazovanje (Gimnazija, prirodno-matematički smer). Godine 2005. upisala je Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, a diplomirala je 2010. godine na smeru Farmaceutsko inženjerstvo sa prosečnom ocenom 8,67, odbranivši diplomski rad na temu „Optimizacija tehnika imobilizacije u cilju kontrolisanog otpuštanja polifenola“ sa ocenom 10.

Doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija, upisala je školske 2010/2011. godine. U oktobru 2012. odbranila je završni rad pod nazivom „Inkapsulacija polifenola u hitozanske mikročestice“ sa ocenom 10. U okviru doktorskih studija položila je sve ispite predviđene studijskim programom, sa prosečnom ocenom 9,8.

Od februara 2011. godine zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta kao istraživač-pripravnik, a od 2014. dobija zvanje istraživač-saradnik. Angažovana je na projektu integralnih i interdisciplinarnih istraživanja iz oblasti poljoprivrede i hrane: „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (ev. broj projekta III 46010). Pored ovog Kata T. Trifković bila je učesnik jednog inovacionog projekta („Modularni sistem za dobijanje obnovljive energije iz otpadnih voda i otpada u industriji piva“), zatim član akcije FA1001 u okviru COST Evropske kooperacije za nauku i tehnologiju, kao i učesnik u FP7 projektu (FP7-REGPOT 2009-1 Project Nanotech FTM, n°245916). Trenutno, učesnik je dva bilateralna projekta: sa Republikom Hrvatskom („Razvoj minkroinkapsulisanih sistema i jestivih filmova sa bioaktivnim komponentama za primenu u proizvodnji i pakovanju funkcionalnih prehrambenih proizvoda“ i „Povećanje stabilnosti i bioraspoloživosti aktivnih jedinjenja izolovanih iz

biljaka primenom različitih sistema za njihovu isporuku u organizmu i matematičko modelovanje ponašanja dobijenih preparata u in vitro simulaciji gastrointestinalnog sistema“, 2016-2017) i Republikom Italijom („Mikroinkapsulisani ekstrakti šafrana kao inovativni sastojci zdrave i funkcionalne hrane“, 2016-2018). Takođe, učestvovala je u Erasmus+ projektu Srbija - Grčka (Higher Education – KA107 International Mobility, 2016).

Kata Trifković je angažovana na matičnom fakultetu u izvođenju vežbi i nastave iz predmeta Osnovi farmaceutskog inženjerstva (od školske 2014-2015), zatim iz predmeta Projektovanje procesa u farmaceutskoj industriji (od školske 2013-2014), kao i u izvođenju nastave na master studijama na Tehnološkom fakultetu u Zvorniku, Univerzitet u Istočnom Sarajevu, iz predmeta Optimizacija biotehnoških procesa (od školske 2013-2014).

Kata Trifković do sada je bila autor ili koautor trinaest (13) radova u međunarodnim časopisima, i to: četiri (4) rada u kategoriji međunarodnih časopisa izuzetne vrednosti (M21a), pet (5) radova u kategoriji vrhunskih međunarodnih časopisa (M21), kao i četiri (4) rada u kategoriji međunarodnih časopisa (M23). Pored ovoga Kata Trifković je bila autor ili koautor dva (2) poglavlja u knjigama međunarodnog značaja (M13). Takođe, publikovala je i sedam (7) saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih u celini (M33), petnaest (15) saopštenja na međunarodnim skupovima štampanih u izvodu (M34), kao i jedno (1) saopštenje na skupu nacionalnog značaja štampano u celini (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ката Трифковић

број индекса 4039/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 23. 11. 2016.

Трифковић Ката

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Ката Трифковић

Број индекса: 4039/2010

Студијски програм: Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада: Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола

Ментор: проф. др. Бранко Бугарски

Потписани/а Ката Трифковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 23. 11. 2016.

Трифковић Ката

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Хидрогелови на бази хитозана за контролисано отпуштање полифенола

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 23. 11. 2016.

Јулијана Т. Трафковић