

UNIVERZITET U BEOGRADU

TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Mina M. Volić

**NOVI HIDROGEL SISTEMI NA BAZI ALGINATA I
PROTEINA ZA KONTROLISANO OTPUŠTANJE
ETARSKIH ULJA**

Doktorska disertacija



Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Mina M. Volić

**NOVEL HYDROGEL SYSTEMS BASED ON
ALGINATE AND PROTEIN FOR CONTROLLED
RELEASE OF ESSENTIAL OILS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Mentor:

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

Članovi komisije:

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

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

Dr Ilinka Pećinar, docent
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Bojana Balanč, naučni saradnik
Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: _____, Beograd

Zahvalnica

Zahvaljujem se svom mentoru profesoru dr Branku Bugarskom na ukazanom poverenju, stručnim savetima tokom izrade disertacije i pruženim prilikama za usavršavanjem.

Zahvalnost dugujem i profesorki dr Zorici Knežević-Jugović na pomoći i dragocenim savetima od samog početka izrade ove disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem višem naučnom saradniku dr Verici Đorđević na podeljenom znanju, posvećenosti i zalaganju tokom izrade i pisanja disertacije.

Dragim članovima komisije, dr Ilinki Pećinar i dr Bojani Balanč zahvaljujem na pomoći i svim sugestijama koje su unapredile ovaj rad.

Kolegama dr Nataši Obradović i dr Predragu Petroviću hvala na podršci, čestim razmenama ideja i što su doprineli da rad na ovoj doktorskoj disertaciji bude još lepši. Hvala i ostalim dragim kolegama.

Veliko hvala prijateljima koji su me sve ove godine bodrili, slušali i podržavali.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici, kojoj posvećujem ovaj rad!

Hvala vam na beskrajnoj ljubavi.

Mina Volić

NOVI HIDROGEL SISTEMI NA BAZI ALGINATA I PROTEINA ZA KONTROLISANO OTPUŠTANJE ETARSKIH ULJA

REZIME

Etarska ulja predstavljaju smeše aromatičnih i lako isparljivih jedinjenja koja su poznata po svojim lekovitim svojstvima, zbog čega se mogu primeniti u lečenju raznih bolesti. Antimikrobna svojstva određenih vrsta etarskih ulja svrstavaju ih u alternativne izvore antimikrobnih lekova. Međutim, izazov koji se odnosi na stabilnost ovih ulja u toku proizvodnje i skladištenja ograničava njihovu širu primenu. Dodatno, usled promene pH vrednosti u gastrointestinalnom traktu može doći do gubitka biološke aktivnosti ulja. U skladu sa tim, velika pažnja se posvećuje zaštiti etarskih ulja u cilju obezbeđivanja njihove efikasnosti na mestu delovanja.

U doktorskoj disertaciji prikazan je postupak pripreme novih hidrogel sistema na bazi alginata i proteina soje za inkapsulaciju i kontrolisano otpuštanje etarskog ulja timijana (*Thymus vulgaris* L.). Najpre je urađena karakterizacija emulzionih sistema, ispitivanjem stabilnosti, odnosno praćenjem promene zeta potencijala (laserska difrakciona tehnika), određivanjem reoloških svojstava emulzija, a zatim i analizom strukturne organizacije molekula na ulje/voda granici faza (Ramanova spektroskopija).

U drugom delu rada sintetisani su hidrogel sistemi sa inkapsuliranim etarskim uljem, primenom tehnike elektrostatičke ekstruzije, a dodatno je urađena optimizacija postupka inkapsulacije variranjem koncentracija alginata i proteina soje (SPI). Zatim, ispitivani su dobijeni hidrogel sistemi u cilju određivanja interakcija između komponenata nosača, kao i nosača i inkapsuliranog ulja. Takođe, analizirani su profili bubrenja, veličina i oblik (optička mikroskopija) i površinska morfologija uzoraka (skenirajuća elektronska mikroskopija). Primenom metode kompresije testirana su mehanička svojstva hidrogel sistema, pri čemu je pokazano da povećanje koncentracija alginata i SPI ima pozitivan efekat na mehaničke karakteristike hidrogelova. Analizom uticaja temperature na hidrogel sisteme, u opsegu 50 - 100 °C, uočeno je značajno povećanje termičke stabilnosti inkapsuliranog ulja. Hidrogelovi na bazi alginata i proteina su zatim ispitani u cilju procene efikasnosti inkapsulacije ukupnih polifenola (spektrofotometrijskom metodom) i timola (tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom). Poseban deo rada posvećen je karakterizaciji sa aspekta potencijalne primene dobijenih sistema za kontrolisano otpuštanje etarskog ulja u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta (pH, T, enzimi, soli), kao i analizi uticaja pomenutih uslova na reološko ponašanje hidrogelova. Takođe, određena je antioksidativna (ABTS i CUPRAC metode) i antimikrobna (mikrodiluciona metoda) aktivnost inkapsuliranog ulja.

Treći deo rada obuhvata optimizaciju i karakterizaciju alginat/protein/lecitin sistema. Naime, sinergistički efekat proteina soje i lecitina na granici faza, potvrđen analizom stabilnosti emulzija, obezbedio je povećanje efikasnosti inkapsulacije i sporije otpuštanje timola u

simuliranom želudačnom fluidu. Dodatno, mehanička i termička stabilnost hidrogel sistema su poboljšane dodatkom lipidnog emulgatora.

Dobijeni rezultati ukazuju na veliki potencijal alginat/SPI i alginat/SPI/lecitin sistema za primenu u prehrambenoj i/ili farmaceutskoj industriji, sa posebnim akcentom na stabilnost i kontrolisano otpuštanje etarskog ulja.

Ključne reči: inkapsulacija, etarsko ulje timijana (*Thymus vulgaris* L.), alginat, proteini soje, lecitin, hidrogel sistemi, kontrolisano otpuštanje

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj:

NOVEL HYDROGEL SYSTEMS BASED ON ALGINATE AND PROTEIN FOR CONTROLLED RELEASE OF ESSENTIAL OILS

ABSTRACT

Essential oils are mixtures of aromatic and highly volatile compounds, which are known for their healing properties, and therefore can be used to control infectious and non-infectious diseases. The antimicrobial properties of some essential oils classify them as alternative sources of antimicrobial drugs. However, the challenge regarding the stability of these oils during production and storage limits their wider use. In addition, changes in pH values in the gastrointestinal tract may lead to a loss of biological activity of oils. In recent years, increasing attention has been paid to the protection of essential oils in order to ensure their efficiency at the site of action.

The presented doctoral thesis offers an approach for the formulation of novel hydrogel systems based on alginate and soy protein for encapsulation and controlled release of thyme essential oil (*Thymus vulgaris* L.). Firstly, the emulsion characterization was performed by examining the stability (Laser Diffraction Techniques) and rheological characteristics of emulsions, as well as by analyzing the structural organization of molecules at the oil/water interface (Raman spectroscopy).

In the second chapter of the dissertation, the hydrogel systems with encapsulated essential oil were synthesized using electrostatic extrusion technique. The encapsulation technique was further optimized using different concentrations of alginate and soy protein isolate (SPI). The hydrogels were characterized to show the interactions between carrier components and/or carrier-encapsulated oil (Fourier Transform Infrared spectroscopy). In addition, swelling behavior, particle size and shape (optical microscopy) and surface morphology (scanning electron microscopy) were analyzed.

The particular emphasis was put on mechanical properties of hydrogels, where an increase in the concentration of alginate and soy protein had a positive impact on the mechanical properties of the hydrogel systems. The analysis of the temperature effect on hydrogel systems, in the range 50 - 100 °C, showed a significant increase in the thermal stability of the encapsulated oil. Hydrogels based on alginate and protein were further tested for encapsulation efficiency of total polyphenols (spectrophotometric method) and thymol (liquid chromatography under high pressure). Subsequent analyses were focused on monitoring of the release kinetics in simulated conditions of the gastrointestinal tract (pH, T, enzymes, salts) and influence of the mentioned conditions on the rheological behavior of hydrogels. The antioxidant (ABTS and CUPRAC methods) and antimicrobial (microdilution method) activities of the encapsulated oil were also examined.

The third chapter of the thesis was dedicated to the optimization and characterization of alginate/protein/lecithin systems. Namely, the synergistic effect of soy protein and lecithin on the interface, which was confirmed by analysis of emulsion stability, has improved carrier

encapsulation efficiency and enabled slower release of thymol in the simulated gastric fluid. In addition, the mechanical and thermal stabilities of the hydrogels are improved by the addition of a lipid emulsifier.

Overall, the results of this study indicate a great potential of alginate/SPI and alginate/SPI/lecithin systems for application in the food and/or pharmaceutical industry, with special emphasis on the stability and controlled release of oils in simulated conditions of the gastrointestinal tract.

Keywords: encapsulation, thyme essential oil (*Thymus vulgaris* L.), alginate, soy proteins, lecithin, hydrogel systems, controlled release

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Biochemical engineering and biotechnology

UDC number:

SADRŽAJ

| | |
|-----------------------|---|
| U V O D | 1 |
| C I L J R A D A | 2 |

TEORIJSKI DEO

| | |
|---|----|
| 1. ETARSKA ULJA | 5 |
| 1.1. ETARSKO ULJE TIMIJANA (<i>THYMUS VULGARIS L.</i>) | 5 |
| 1.2. SASTAV ETARSKIH ULJA | 6 |
| 1.2.1. <i>Sastav etarskog ulja timijana</i> | 7 |
| 1.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST ETARSKIH ULJA | 9 |
| 1.3.1. <i>Antioksidativno dejstvo etarskih ulja</i> | 9 |
| 1.3.2. <i>Antibakterijsko dejstvo etarskih ulja</i> | 10 |
| 1.3.3. <i>Antigljivično dejstvo etarskih ulja</i> | 11 |
| 1.3.4. <i>Antivirusno dejstvo etarskih ulja</i> | 11 |
| 1.3.4. <i>Ostala dejstva etarskih ulja</i> | 12 |
| 2. INKAPSULACIJA | 13 |
| 2.1. TEHNIKE ZA INKAPSULACIJU ETARSKIH ULJA | 14 |
| 2.1.1. <i>Emulzifikacija</i> | 18 |
| 2.1.1.1. <i>Stabilnost emulzija</i> | 19 |
| 2.1.2. <i>Ekstruzione tehnike</i> | 20 |
| 2.1.2.1. <i>Elektrostatička ekstruzija</i> | 21 |
| 2.2. POLIMERNI MATERIJALI ZA INKAPSULACIJU ETARSKIH ULJA | 22 |
| 2.2.1. <i>Alginat kao materijal za inkapsulaciju</i> | 22 |
| 2.2.1.1. <i>Hemijska struktura alginata i formiranje hidrogela</i> | 22 |
| 2.2.1.2. <i>Karakteristike hidrogelova na bazi alginata</i> | 23 |
| 2.2.2. <i>Proteini</i> | 24 |
| 2.2.2.1. <i>Strukturne karakteristike proteina</i> | 24 |
| 2.2.2.2. <i>Proteini kao emulgatori</i> | 25 |
| 2.2.2.3. <i>Poboljšanje emulgjućih svojstava globularnih proteina</i> | 26 |
| 2.2.2.4. <i>Proteini soje</i> | 27 |
| 2.2.3. <i>Alginat-protein sistemi za inkapsulaciju</i> | 27 |
| 2.2.4. <i>Lecitin</i> | 28 |
| 2.2.4.1. <i>Strukturne i funkcionalne karakteristike lecitina</i> | 29 |
| 2.2.5. <i>Protein-lecitin interakcije</i> | 29 |
| 3. PRIMENA SISTEMA SA INKAPSULIRANIM ETARSKIM ULJIMA | 31 |

EKSPERIMENTALNI DEO

| | |
|------------------------------|----|
| 4. MATERIJALI I METODE | 34 |
|------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 4.1. MATERIJALI | 34 |
| 4.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA BIOAKTIVNIH KOMONENTI ETARSKOG ULJA | 34 |
| 4.2.1. <i>Određivanje ukupnih polifenola - FC metoda</i> | 34 |
| 4.2.2. <i>Određivanje timola - HPLC metoda</i> | 35 |
| 4.3. FORMULACIJA I KARAKTERIZACIJA EMULZIJA | 35 |
| 4.3.1. <i>Postupak izrade emulzija</i> | 36 |
| 4.3.2. <i>Određivanje stabilnosti emulzija</i> | 37 |
| 4.3.3. <i>Ramanova spektroskopija</i> | 37 |
| 4.3.4. <i>Ispitivanje viskoznosti rastvora polimera</i> | 37 |
| 4.4. PRIPREMA HIDROGELOVA SA INKAPSULIRANIM ETARSKIM ULJEM | 38 |
| 4.5. KARAKTERIZACIJA DOBIJENIH INKAPSULIRANIH SISTEMA | 39 |
| 4.5.1. <i>Bubrenje hidrogel čestica</i> | 39 |
| 4.5.2. <i>Optička mikroskopija i sferičnost čestica</i> | 39 |
| 4.5.3. <i>Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)</i> | 40 |
| 4.5.4. <i>ATR-FTIR spektroskopija</i> | 40 |
| 4.5.5. <i>Reološka svojstva hidrogel čestica</i> | 40 |
| 4.5.6. <i>Određivanje mehaničkih karakteristika hidrogel čestica</i> | 40 |
| 4.5.7. <i>Ispitivanje termičke stabilnosti nosača</i> | 41 |
| 4.6. ODREĐIVANJE STEPENA EFIKASNOSTI INKAPSULACIJE ETARSKOG ULJA | 41 |
| 4.6.1. <i>Efikasnost inkapsulacije ukupnih polifenola</i> | 41 |
| 4.6.2. <i>Efikasnost inkapsulacije timola</i> | 41 |
| 4.7. ISPITIVANJE KINETIKE OTPUŠTANJA ETARSKOG ULJA IZ HIDROGEL ČESTICA | 41 |
| 4.7.1. <i>Otpuštanje ukupnih polifenola ulja timijana</i> | 41 |
| 4.7.2. <i>Otpuštanje etarskog ulja - HPLC metoda</i> | 42 |
| 4.8. PRIMENA MATEMATIČKIH MODELA NA KINETIKU OTPUŠTANJA ETARSKOG ULJA | 42 |
| 4.9. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST | 42 |
| 4.9.1. <i>ABTS antiradikalska aktivnost</i> | 43 |
| 4.9.2. <i>CUPRAC redukciona moć</i> | 43 |
| 4.9.3. <i>Antioksidativna aktivnost termički tretiranih čestica sa inkapsuliranim etarskim uljem</i> .. | 43 |
| 4.10. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST | 43 |
| 4.11. STATISTIČKA ANALIZA | 44 |

REZULTATI I DISKUSIJA

| | |
|--|----|
| 5. KARAKTERIZACIJA EMULZIONIH SISTEMA | 46 |
| 5.1. NAELEKTRISANJE NA POVRŠINI ULJANIH KAPI | 46 |
| 5.2. REOLOŠKA SVOJSTVA EMULZIJA | 47 |
| 5.2.1. <i>Uticaj koncentracije alginata i proteina soje na reološka svojstva Na-AL/SPI/ulje emulzija</i> | 47 |
| 5.3. ANALIZA NA-AL/SPI/ULJE EMULZIJE I ČISTIH KOMPONENATA PRIMENOM RAMANOVE SPEKTROSKOPIJE | 48 |
| 6. KARAKTERIZACIJA ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEMA | 51 |

| | |
|---|----|
| 6.1. FTIR ANALIZA | 51 |
| 6.1.1. FTIR analiza čistih komponenti | 51 |
| 6.1.2. FTIR analiza alginat/SPI hidrogel sistema..... | 53 |
| 6.2. BUBRENJE ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEMA U SIMULIRANIM GI USLOVIMA..... | 54 |
| 6.3. UTICAJ SIMULIRANIH GI USLOVA NA REOLOŠKO PONAŠANJE ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEMA | 56 |
| 6.4. IZGLED I VELIČINA ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEMA..... | 57 |
| 6.5. SEM ANALIZA ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEMA | 61 |
| 6.6. MEHANIČKE KARAKTERISTIKE ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEMA | 62 |
| 6.6.1. Uticaj inkapsulacije etarskog ulja na mehanička svojstva hidrogelova | 63 |
| 6.6.2. Uticaj koncentracije alginata i proteina na mehanička svojstva hidrogelova | 63 |
| 6.7. TERMIČKA STABILNOST ULJA INKAPSULIRANOG U ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEME | 65 |
| 6.8. EFIKASNOST INKAPSULACIJE ETARSKOG ULJA U ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEME..... | 66 |
| 6.8.1. Efikasnost inkapsulacije ukupnih polifenola ulja timijana..... | 66 |
| 6.8.2. Efikasnost inkapsulacije timola | 67 |
| 6.9. OTPUŠTANJE INKAPSULIRANOG ETARSKOG ULJA IZ ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEMA U SIMULIRANIM GI USLOVIMA | 68 |
| 6.9.1. Otpuštanje ukupnih polifenola iz alginat/SPI hidrogel sistema | 68 |
| 6.9.2. Otpuštanje timola iz alginat/SPI hidrogel sistema..... | 70 |
| 6.10. MODELOVANJE KINETIKE OTPUŠTANJA ETARSKOG ULJA IZ ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEMA .. | 71 |
| 6.11. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST INKAPSULIRANOG ETARSKOG ULJA..... | 73 |
| 6.11.1. Antioksidativna aktivnost inkapsuliranog ulja nakon termičkog tretmana | 73 |
| 6.12. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST INKAPSULIRANOG ETARSKOG ULJA | 75 |
| 7. KARAKTERIZACIJA ALGINAT/SPI/LECITIN HIDROGEL SISTEMA | 77 |
| 7.1. FTIR ANALIZA ALGINAT/SPI/LECITIN HIDROGEL SISTEMA I ČISTIH KOMPONENTI | 77 |
| 7.2. SEM ANALIZA ALGINAT/SPI/LECITIN HIDROGEL SISTEMA | 78 |
| 7.3. MEHANIČKA SVOJSTVA ALGINAT/SPI/LECITIN HIDROGEL SISTEMA | 79 |
| 7.4. TERMIČKA STABILNOST ULJA INKAPSULIRANOG U ALGINAT/SPI/LECITIN HIDROGEL SISTEME ... | 81 |
| 7.5. EFIKASNOST INKAPSULACIJE TIMOLA U ALGINAT/SPI/LECITIN HIDROGEL SISTEME..... | 81 |
| 7.6. OTPUŠTANJE TIMOLA IZ ALGINAT/SPI/LECITIN HIDROGEL SISTEMA U SIMULIRANIM GI USLOVIMA | 82 |

ZAKLJUČNA RAZMATRANJA

| | |
|-------------------|-----|
| 8. ZAKLJUČAK..... | 85 |
| LITERATURA | 89 |
| BIOGRAFIJA..... | 105 |

U V O D

Po statistici Svetske zdravstvene organizacije (SZO, 2010), infekcije predstavljaju jedan od najvećih uzročnika bolesti i smrtnosti u svetu. Upotrebom antibiotika vrši se tretiranje infekcija, a dodatno se javlja i pozitivan uticaj na psihu ljudi kao posledica smanjenja bolesti izazvanih ovim uzročnicima. Međutim, zloupotreba ovih jedinjenja dovela je do porasta broja višestruko rezistentnih patogena (Angulo i sar. 2004), pri čemu se potencijal za njihovim postojanjem javlja i nakon izlaganja antimikrobnim agensima (Ahmad i Beg, 2001). Sa druge strane, korišćenje visokih koncentracija antimikrobnih lekova dovodi do neželjenih efekata u vidu toksičnosti. Ograničenost vezana za pronalaženje novih lekova koji bi imali efikasnije delovanje na suzbijanje infekcija alarmirala je nauku za pronalaženjem alternativnih izvora antimikrobnih lekova. Cilj je da se identifikuju i istraže nova jedinjenja sa antibakterijskim svojstvima bez toksičnog efekta na zdravlje ljudi (Ling i sar. 2015).

Biljke, odnosno njihovi sekundarni metaboliti, predstavljaju izvor jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću koja pružaju mogućnost novog, alternativnog izvora antimikrobnih lekova. Naime, etarska ulja dobijena ekstrakcijom biljaka svrstavaju se u jedne od najvažnijih prirodnih proizvoda. To su koncentrovana lipofilna jedinjenja koja se sastoje od aromatičnih, a istovremeno i lako isparljivih jedinjenja na sobnoj temperaturi. Skoro 3000 etarskih ulja proizvedeno je od najmanje 2000 biljnih vrsta, od kojih je oko 300 dobro pozicionirano na tržištu (Bassolé i Juliani, 2012). Etarska ulja i jedinjenja koja ulaze u njihov sastav pokazuju odlična lekovita svojstva, pa se stoga mogu koristiti za suzbijanje infektivnih i neinfektivnih bolesti (Raut i Karuppaiyil, 2014). Brojna naučna istraživanja pokazala su da etarska ulja ispoljavaju anti-mutageno, anti-alergijsko, anti-inflamatorno, anti-kancerogeno, anti-bakterijsko, anti-viralno, anti-insekticidno, antiangiogeno dejstvo (Nakatsu i sar. 2000), kao i mnoga druga. Određena etarska ulja imaju veliki učinak u borbi protiv slobodnih radikala (Miguel, 2010), pružajući na taj način potporu imunom sistemu.

Komponente etarskih ulja koje se ubrajaju u najzaslužnije za pozitivno dejstvo ovih ulja na zdravlje ljudi jesu timol i karvakrol (Ultee i sar., 2002; Bozin i sar., 2006). Međutim, ova fenolna jedinjenja, kao i većina drugih jedinjenja koja ulaze u sastav etarskih ulja, osetljiva su na svetlost, vlagu, prisustvo kiseonika i visoku temperaturu, kao i na varijacije pH u gastro-intestinalnom traktu, što može dovesti do gubitka biološke aktivnosti ulja (Turek i Stintzing, 2013; Bakry i sar., 2015). Zbog male bioraspoloživosti, a istovremeno specifičnog mesta delovanja biološki aktivnih jedinjenja (najčešće donji intestinalni trakt), neophodan je njihov unos u većim koncentracijama. U tom smislu, sve veća pažnja se posvećuje pronalaženju načina kojim bi se etarska ulja i njihove osetljive komponente zaštitile, a zatim i omogućila njihova optimalna koncentracija na ciljanom mestu. Inkapsulacija predstavlja jednu od najčešće korišćenih tehnologija koja omogućava zaštitu bioaktivnih supstanci. Do sada su se za inkapsulaciju etarskih ulja koristile različite tehnike, kao što su sprej-sušenje, liofilizacija, inkapsulacija na bazi superkritičnih fluida (Bakry i sar., 2015). Međutim, potreba za izvođenjem inkapsulacije pod blagim uslovima, u cilju zaštite aktivne komponente od degradacije, izdvojila je ekstruziju u odnosu na druge tehnike. Dodatno, ova tehnika, uz primenu elektrostatičkog potencijala, pruža mogućnost dobijanja čestica mikrometarskih veličina, uz jednostavnu kontrolu procesa (Nedović i sar. 2001). Sa druge strane, težnja za konzumacijom prirodnih, tzv. „zelenih“ proizvoda ukazala je na značaj biopolimernih materijala, pa su u skladu sa tim ovi materijali u prednosti. Među različitim biopolimerima koji su se do sada

koristili u cilju inkapsulacije, alginat je jedinstven u pogledu hemijske stabilnosti, pH osetljivosti, bioraspoloživosti i biokompatibilnosti (Ching i sar., 2017). Pored činjenice da su se alginatni hidrogelovi pokazali odličnim nosačima mnogih aktivnih supstanci, ograničenje primene ovog materijala u sistemima za kontrolisano otpuštanje posledica je izrazito hidrofilne prirode alginata. Kako bi se aktivna supstanca mogla smestiti u nosače na bazi alginata neophodno je izvršiti izmene u strukturi samog hidrogela, u ovom slučaju dodatkom amfifilnih molekula – proteina. Proteini su se do sada koristili za očvršćavanje alginatnih nosača za dostavu lekova (Zheng i sar., 2007), biljnih ekstrakata (Belščak-Cvitanović i sar., 2015) i probiotika (Liu i sar., 2018) i za dizajniranje filmova i vlakana u biomedicinske svrhe (Tansaz i sar., 2016; Wongkanya i sar., 2017), zbog velike biorazgradivosti, necitotoksičnosti i visoke termičke stabilnosti. Važne karakteristike proteina pripisuju se i sposobnosti zadržavanja vode, vezivanju ulja i emulgujućim svojstvima, dok su neke studije ukazale da kombinovanje sa polisaharidima može povećati sposobnost proteina soje za vezivanjem vode (Hua i sar., 2003). Iz navedenih razloga otvorila se mogućnost za formulisanjem novog sistema na bazi alginata i proteina soje u cilju inkapsulacije etarskog ulja. Kao model jedinjenje u ovoj doktorskoj disertaciji korišćeno je etarsko ulje timijana (*Thymus vulgaris* L.). Zahvaljujući visokom sadržaju timola i karvakrola, ulje timijana svrstava se među deset najkorišćenijih etarskih ulja u prehrambenoj industriji (Almanea i sar., 2019).

Svi ovi pokušaji predstavljaju začetak post-antibiotske ere, sa naznakom da iako je sada skoro nemoguće potpuno eliminisati sve uzročnike bolesti bez primene antibiotika, cilj je da se trenutnim istraživanjima dođe do zadovoljavajuće varijante, koja će možda budućim generacijama pružiti mogućnost za dalju nadogradnju ka tom cilju.

CILJ RADA

Predmet naučnog istraživanja u okviru predložene teme je formulisanje hidrogel sistema na bazi prirodnih polimera, alginata i proteina soje, za primenu u inkapsulaciji i kontrolisanom otpuštanju etarskog ulja timijana (*Thymus vulgaris* L.).

Prema dostupnim literaturnim podacima postoji ograničen broj radova na temu inkapsulacije etarskih ulja (odnosno karvakrola) u hidrogelove na bazi alginata i proteina (surutke), pri čemu su ovi sistemi nedovoljno ispitani i ograničeni na životinjsku upotrebu (Zhang i sar., 2014; Zhang i sar., 2015). U ovom radu, za inkapsulaciju etarskog ulja timijana u hidrogel čestice primenjena je tehnika emulzifikacije, praćena elektrostatičkom ekstruzijom i geliranjem u prisustvu kalcijumovih jona.

Osnovni cilj je bio da se ispita uticaj koncentracije alginata i proteina soje na fizičko-hemijske karakteristike dobijenih sistema, odnosno na efikasnost inkapsulacije, veličinu čestica, morfologiju, stabilnost i profil otpuštanja etarskog ulja. Ova istraživanja treba da doprinesu razumevanju mehanizma interakcija između inkapsuliranog etarskog ulja i nosača, kao i uticaja ovih interakcija na pomenute fizičko-hemijske karakteristike. Takođe, u ovom radu je objašnjeno kako smeše alginata i proteina soje u različitim proporcijama obezbeđuju različito strukturno uređenje i krutost nosača i kako utiču na karakteristike hidrogel sistema. Pored toga, objašnjena je molekularna organizacija alginatnih i proteinskih lanaca u sistemu i objašnjeni su fenomeni koji vode ka deformisanju čestica kao posledica specifične strukture i međusobnih

interakcija. Poseban akcenat je posvećen ulozi molekula proteina u interakciji sa inkapsuliranim materijalom.

Rezultati ovog rada u celini treba da daju naučni doprinos ispitivanju fenomena inkapsulacije etarskog ulja u čestice na bazi alginata i proteina soje, kao što su mehanizam nastajanja čestica, interakcije između nosača i inkapsuliranog etarskog ulja, kao i druge fenomene koji utiču na efikasnost inkapsulacije. Posebna pažnja je usmerena ka ispitivanju kinetike otpuštanja inkapsuliranog ulja i degradacije čestica, što je interpretirano kroz promene reoloških karakteristika hidrogelova u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima. Rezultati ovog rada treba da daju značajan praktičan doprinos razvoju sistema za inkapsulaciju etarskih ulja u različitim oblastima biotehnologije i farmacije. Kako je biološka aktivnost inkapsuliranog etarskog ulja važna za njegovu praktičnu primenu, ovaj rad je usmeren ka ispitivanju uticaja inkapsulacije na antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost etarskog ulja, primenom različitih metoda za analizu antioksidativne aktivnosti i određivanjem vijabilnosti mikroorganizama, respektivno.

Poseban deo rada posvećen je optimizaciji sistema alginat/protein/surfaktant za postizanje efikasnije inkapsulacije i sporijeg otpuštanja etarskog ulja, kao i analizi stabilnosti dobijenih sistema kroz interakcije lecitina i proteina na granici faza.

DEO I

Teorijski deo

Poglavlje 1 – etarska ulja

Poglavlje 2 – inkapsulacija

Poglavlje 3 – primena sistema sa inkapsuliranim etarskim uljima

1. ETARSKA ULJA

Etarska ulja i njihove komponente dobijaju sve važnije mesto u industriji hrane, poljoprivredi, tekstilnoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, zahvaljujući širokoj rasprostranjenosti među potrošačima i veoma različitim funkcionalnim svojstvima. Etarska (eterična, esencijalna) ulja predstavljaju složene smeše prirodnih isparljivih jedinjenja, koje biljkama daju karakteristične mirise i uobičajeni su izvor bioaktivnih sastojaka. Na sobnoj temperaturi ova lako isparljiva ulja se nalaze u obliku bezbojnih tečnosti, rastvornih u alkoholu, etru i baznim uljima, ali nerastvornih u vodi. Etarska ulja su poznata pod imenom biljke iz koje su izolovana, pri čemu je miris sličan onom delu biljke iz kojeg potiču, a ukus mnogo intenzivniji. Etarska ulja se mogu ekstrahovati iz različitih delova biljaka, uključujući celu biljku ili samo drvo/koru (cimet, sandalovina, ružino drvo), korenje (đumbir), lišće (eukaliptus, nana, timijan, žalfija), cveće (pomorandža, lavanda), plodove (fenel, anis) ili semenke (korijander) (Hyldgaard i sar. 2012; Dhifi i sar. 2016).

Zbog velike isparljivosti, destilacija vodenom parom predstavlja najsigurniju metodu ekstrakcije ovih supstanci iz aromatičnih biljaka. U slučaju veće rastvorljivosti pojedinih etarskih ulja u vodi, kao na primer ulja zdravca, ružinog ili lavandinog ulja, za ekstrakciju se pored destilacije može koristiti i proces poznat pod nazivom kohobacija. Ostali procesi uključuju maceraciju i enfleurage, kao i modernije tehnike u koje spadaju ekstrakcije rastvaračima ili nadkritičnim tečnostima. Maceracija se koristi u slučaju lošijeg prinosa nakon destilacije vodenom parom, dok su enfleurage i ekstrakcije rastvaračima pogodne za ekstrakciju veoma skupih i termički nestabilnih materijala (Chamorro i sar. 2012).

1.1. Etarsko ulje timijana (*Thymus vulgaris* L.)

Timijan (*Thymus vulgaris* L.) je višegodišnja polužbunasta biljka sa životnim vekom između 10-15 godina, koja pripada familiji Usnatica (Laminaceae). Etarsko ulje koje se dobija ekstrakcijom ove biljke poseduje slatko-aromatičan, oštro-ljutkast miris i bogato fenolni ukus. Suvi biljni materijal timijana sadrži 0.5-2.5% etarskog ulja (Bagamboula i sar., 2004).



Slika 1.1. Biljka timijan (*Thymus vulgaris* L.)
(izvor: Wikipedia)

Prinos etarskog ulja i hemijski sastav strogo zavise od vremena ubiranja timijana, pa su tako autori Omidbaigi i sar. (2008) u svojoj studiji pokazali da se najveći sadržaj etarskog ulja dobija na početku faze cvetanja. U zavisnosti od podneblja na kojem timijan raste, može se javiti čak do 13 različitih hemotipova koji su nazvani po dominantnim monoterpenima (Thompson i sar., 2003; Chizzola i sar., 2008). Neki od njih su geraniol, linalol, α -terpineol, eugenol, terpinen-4-ol, karvakrol i timol. Glavna razlika u hemotipovima jeste fenolna priroda timola i karvakrola, odnosno nefenolna priroda ostalih monoterpena, razlikujući se tako u jačini antioksidativne aktivnosti.

Ulje timijana spada u jedno od 10 najčešće korišćenih etarskih ulja u prehrambenoj industriji (Almanea i sar., 2019). Izuzetna antimikrobna i antioksidativna aktivnost ovog ulja dokazana je u mnogim studijama (Rota i sar., 2008; Fani i Kohanteb, 2017; Almanea i sar., 2019), zahvaljujući širokom spektru biološki aktivnih jedinjenja.

Fenolni hemotipovi, od kojih je timol jedini od komercijalne važnosti, zbog čega je korišćen u izradi eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije, ograničeni su na područja niske nadmorske visine, blizu Sredozemnog mora, dok je izvestan broj hemotipova karakterističan za područja sa hladnijim zimama (Granger i Passet, 1973; Thompson i sar. 2003). U našoj zemlji, timijan se uspešno gaji na području Vojvodine, Jablaničkom okrugu, kao i u Pomoravlju.

Pored uobičajenog timijana (*T. vulgaris*) javlja se još nekoliko vrsta, kao što je španski timijan (*T. zygis*), koji je po svom hemijskom sastavu veoma sličan timijanu, sa visokim sadržajem timola i divlji timijan (*T. serpyllum*) čijom ekstrakcijom se dobija 0.07-0.28% etarskog ulja (Verma i sar., 2011).

Prednosti kod upotrebe ulja timijana u proizvodnji hrane, zajedničke su za sva biljna ulja: (i) antimikrobnost, (ii) konzistentan kvalitet ukusa u skladu sa izvorom (biljnim materijalom), (iii) krajnji proizvod bez veštačkih boja i (iiii) jačina arome u prihvatljivim granicama. Sa druge strane, ovo ulje sadrži lako isparljiva jedinjenja, koja su sklona oksidaciji, a dodatno je i veoma koncentrovano što stvara probleme pri rukovanju i preciznom merenju (Stahl-Biskup i Venskutonis, 2012).

1.2. Sastav etarskih ulja

Etarska ulja su kompleksne smeše koje mogu da sadrže više od 300 različitih organskih jedinjenja (Sell, 2006), od kojih se većina nalazi delimično u stanju pare na sobnoj temperaturi (Pophof i sar. 2005). Predstavljaju smešu različitih jedinjenja: alkohola, etara, aldehida, ketona, estara, amina, amida, fenola, heterocikala. Osnovne komponente etarskih ulja su monoterpeni i seskviterpeni, koji čine 90-95% hemijskog sastava. Alkoholi, aldehidi i ketoni su odgovorni za širok spektar aromatičnih nota, kao što su voćne (E-nerolidol), cvetne (Linalol), citrusne (Limonen) (Dhifi i sar., 2016). Takođe, ova ulja sadrže i ne-terpenska jedinjenja, koja predstavljaju derivate fenilpropana, kao što su eugenol, cinamaldehyd i safrol.

Etarska ulja imaju značajne varijacije u svom sastavu, kako u kvalitativnom, tako i u kvantitativnom smislu. Različiti faktori utiču na ove promene, a svi oni se mogu svrstati u dve kategorije: a) unutrašnji faktori koji zavise isključivo od biljke, njenog gajenja, starosti i b) spoljašnji faktori koji su vezani za metodu ekstrakcije i uslove okruženja (Stahl-Biskup i Venskutonis, 2012).

Bakkali i sar. (2008) su ukazali da etarska ulja karakterišu dve ili tri glavne komponente, od prethodno navedenih, koje su u ulju prisutne u koncentracijama od 20 do 70%.

1.2.1. Sastav etarskog ulja timijana

Autori Stahl-Biskup i Venskutonis (2012), a zatim i Satyal i sar. (2016) sugerisali su da se u ulju timijana dominantni monoterpen (timol) javlja u opsegu 30-55%, sledi karvakrol (1-5%), kao i relativno visoki udeli prekursora- γ -terpinena (5-10%) i p-cimena (15-20%). Ostali monoterpeni prisutni u etarskom ulju timijana su linalol (1-5%) i u manjem procentu (do 1.5%) kamfor, mircen, borneol, α -pinen i terpinen-4-ol. Seskviterpeni nisu od velike važnosti u ulju timijana – izuzev β -kariofilena (1-3%).

U *Tabeli 1.1* dat je prikaz osnovnih komponenata koje ulaze u sastav ulja timijana, sa naznačenim udelima u uzorku.

Tabela 1.1. Osnovne komponente etarskog ulja timijana

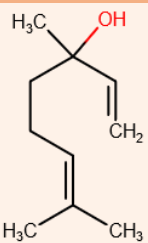
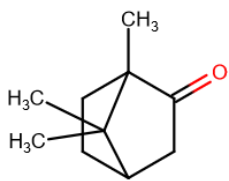
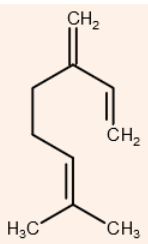
| Naziv jedinjenja | Hemijska formula | Strukturna formula | Molekulska masa (g/mol) | % u uzorku ^a | Osnovne biološke aktivnosti ^b |
|------------------|-----------------------------------|---|-------------------------|-------------------------|--|
| Linalol | C ₁₀ H ₁₈ O |  | 154.25 | 5.00 | Insekt-repelent, antikancerogenik, anti-inflamatorik, antimikrobik |
| Kamfor | C ₁₀ H ₁₆ O |  | 152.23 | 1.42 | Anti-spazmodik, sedativ, diuretik, antireumatik, anti-inflamatorik |
| Mircen | C ₁₀ H ₁₆ |  | 136.23 | 1.59 | Gastroprotektivni antioksidans |

Tabela 1.1. (nastavak)

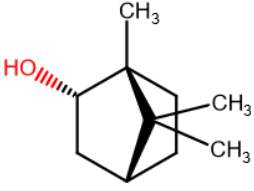
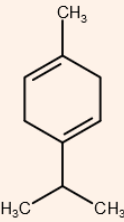
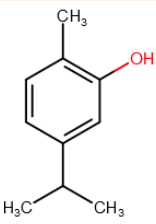
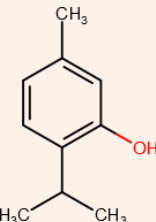
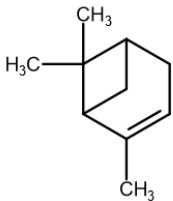
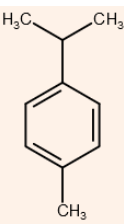
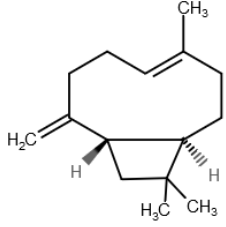
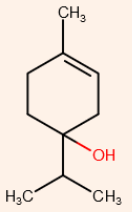
| Naziv jedinjenja | Hemijska formula | Strukturna formula | Molekulska masa (g/mol) | % u uzorku ^a | Osnovne biološke aktivnosti ^b |
|------------------|-----------------------------------|---|-------------------------|-------------------------|---|
| Borneol | C ₁₀ H ₁₈ O |  | 154.25 | 1.50 | Antimikrobik širokog spektra, antioksidans, antitumorik |
| γ-terpinen | C ₁₀ H ₁₆ |  | 136.23 | 9.03 | Antioksidans |
| Karvakrol | C ₁₀ H ₁₄ O |  | 150.22 | 3.24 | Jak antimikrobik i anti-inflamatorik |
| Timol | C ₁₀ H ₁₄ O |  | 150.22 | 47.06 | Jak antimikrobik, antiseptik i anti-inflamatorik |
| α-pinen | C ₁₀ H ₁₆ |  | 136.23 | 1.32 | Anti-inflamatorik, antioksidans |
| p-cimen | C ₁₀ H ₁₄ |  | 134.22 | 20.07 | Antifungalni agens, antioksidans |

Tabela 1.1. (nastavak)

| Naziv jedinjenja | Hemijska formula | Strukturna formula | Molekulska masa (g/mol) | % u uzorku ^a | Osnovne biološke aktivnosti ^b |
|---------------------|------------------|---|-------------------------|-------------------------|--|
| β -kariofilen | $C_{15}H_{24}$ |  | 204.35 | 1.79 | Anti-inflamatorik, antispazmodik, antikolitik |
| Terpinen-4-ol | $C_{10}H_{18}O$ |  | 154.25 | 1.25 | Insekticid, antimikrobik, antioksidans, antikancerogenik |

^a Procentualna vrednost jedinjenja u uzorku (Satyal i sar., 2016) i ^b Biološke aktivnosti jedinjenja (Asbahani i sar., 2015) su literaturni podaci.

Timol metil etar, karvakrol metil etar, sabinen-hidrat, α -terpineol, eukaliptol i limonen su jedinjenja koja se takođe mogu izolovati iz ovog etarskog ulja, ali u koncentracijama manjim od 1%, pa iz tog razloga nisu prikazani u *Tabeli 1.1*.

Ulje timijana predstavlja značajan izvor vitamina i minerala. Vitamin C prisutan u etarskom ulju timijana pruža otpornost na mikrobne infekcije i pomaže u borbi protiv štetnih slobodnih radikala. Dodatno, ovo ulje sadrži i vitamine A, E, K, folnu kiselinu i vitamin B6, koji ima ulogu u regulaciji stresa. Od važnih minerala prisutnih u timijanu izdvaja se kalijum, koji služi u regulaciji krvnog pritiska i mangan, ko-faktor superoksid dizmutaze, enzima koji utiče na stvaranje crvenih krvnih zrnaca (Almanea i sar. 2019).

Važno je naglasiti da iako sva ova jedinjenja ispoljavaju pozitivne biološke efekte, sinergistički efekat je uvek delotvorniji od pojedinačnih komponenti.

1.3. Biološka aktivnost etarskih ulja

Etarska ulja su jedna od najznačajnijih prirodnih proizvoda izolovanih iz biljaka zahvaljujući različitim biološkim svojstvima. Brojni podaci *in vitro* i *in vivo* ispitivanja ukazuju na efikasnost upotrebe etarskih ulja u lečenju brojnih infekcija i oboljenja (Hammer i sar. 1999; Inouye i sar. 2001; Gutierrez i sar. 2008; Fani i Kohanteb, 2017). Ova ulja poseduju antioksidativne, antibakterijske, antimikrobne, antiviralne, antikancerogene i druge aktivnosti, zbog čega sve veću upotrebu nalaze u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Nakatsu i sar. 2000).

1.3.1. Antioksidativno dejstvo etarskih ulja

Oksidativni stres koji nastaje kao rezultat prekomernog stvaranja slobodnih radikala uzrokuje oštećenje ćelijskih makromolekula (McCord, 2000). Na taj način izazvano ćelijsko

oštećenje može dovesti do raznih problema, kao što su starenje, moždane disfunkcije, kancer, srčane bolesti, respiratorne bolesti, pad imunog sistema i mnoge druge (Hart i sar., 2000). Jedinjenja koja imaju sposobnost da umanje štetu nastalu dejstvom slobodnih radikala nazivaju se antioksidansi.

Brojne studije dokazale su antioksidativnu aktivnost etarskih ulja (Miguel, 2010), koja uglavnom zavisi od njihovog sastava i funkcionalnih grupa prisutnih u aktivnim komponentama. Naime, ustanovljeno je da fenolna jedinjenja i sekundarni metaboliti sa konjugovanim dvostrukim vezama obično poseduju izvanrednu antioksidativnu aktivnost (Edris, 2007). Pomenuta jedinjenja imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, zaustavljanja lančane radikalske reakcije (Dhifi i sar., 2016), a pored toga mogu biti i metal helatori. Autori Bozin i sar. (2006) ustanovili su da oksigenizovana fenolna jedinjenja etarskog ulja *T.vulgaris* pokazuju najveću efikasnost u neutralizaciji DPPH radikala. Antioksidativna aktivnost takođe potiče i od alkohola, etara, aldehida, ketona i monoterpena: linalola, eukaliptola, geraniola, kao i α - i β -terpinena (Aruoma, 1998). U prilog tome, Kulisic i sar. (2004) dokazali su značajnu antioksidativnu moć etarskih ulja cimeta, origana, bosiljka, karanfilića i timijana.

1.3.2. Antibakterijsko dejstvo etarskih ulja

Biljni molekuli su veoma poznati po svojim antimikrobnim osobinama. Posebno se tu ubrajaju biljna etarska ulja, koja su pokazala širok spektar inhibitorne aktivnosti (Teixeira i sar., 2013). Antibakterijska aktivnost može da varira u zavisnosti od tipa ulja, ali i od tipa bakterija. Ispitujući mehanizam aktivnosti etarskih ulja, pokazano je da je većina aktivnija prema G(+) nego prema G(-) bakterijama (Lambert i sar., 2001). Slabija aktivnost prema Gram-negativnim bakterijama leži u prisustvu spoljašnje membrane koja se sastoji od hidrofилnih polisaharidnih lanaca koji predstavljaju barijeru hidrofobnim etarskim uljima (Burt, 2004). Etarska ulja biljnog porekla pokazala su i potencijal za razgradnju bakterijskih biofilmova (višećelijske zajednice pričvršćene za površinu), koji su inače otporni na antibiotike (Galvão i sar., 2012; Khan i sar., 2017).

Mehanizam delovanja etarskih ulja zasniva se na destabilizaciji ćelijske membrane. Naime, etarska ulja su lipofilnog karaktera što im omogućava lako prodiranje kroz ćelijski zid i ćelijsku membranu (Gustafson i sar., 1998). Interakcija etarskih ulja sa fosfolipidima, polisaharidima i masnim kiselinama uzrokuje veću propustljivost membrane, čime dolazi do gubitka jona i izlivanja ćelijskog sadržaja, što uzrokuje smrt ćelije (Carson i sar., 2002; Ultee i sar., 2002). Dodatno, ovaj mehanizam uključuje i denaturaciju citoplazmatičnih proteina kao i inaktivaciju ćelijskih enzima (Burt, 2004).

Nekoliko studija pokazalo je da najbolju antibakterijsku efikasnost poseduju etarska ulja sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja (Ultee i sar., 2002; Fani i Kohanteb, 2017). Hammer i sar. (1999) su pokazali da etarsko ulje timijana može da spreči rast bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* u koncentracijama od 0.03%, testirano mikrodilucionom metodom. U istoj koncentraciji, etarsko ulje cimeta ima potencijal za prevenciju rasta *Staphylococcus aureus*, dok recimo ulje origana tu aktivnost postiže u koncentraciji od 0.013% (Oussalah i sar., 2007).

1.3.3. Antigljiivično dejstvo etarskih ulja

Gljivične infekcije uzrokuju eukariotski organizmi, pa je iz tog razloga teže utvrditi njihovo prisustvo i primeniti odgovarajući terapijski tretman u odnosu na bakterijske infekcije (Routh i sar., 2011). Čelijski zid gljivica, zahvaljujući hitinskoj strukturi koja nije prisutna u ljudskim ćelijama, predstavlja glavni razlog za primenu selektivno toksičnih antifungalnih sredstava (Nazzaro i sar., 2017). Hemijski tretmani su u velikoj meri efikasni, ali mogu se javiti otporni sojevi i vrste. Etarska ulja imaju veliki potencijal u borbi protiv ovih mikroorganizama, tačnije mnoga biljna etarska ulja poseduju izražene antigljivične aktivnosti (Bakkali i sar., 2008). Tu spadaju etarska ulja bosiljka, citrusa, fenela, limunske trave, origana, ruzmarina i timijana (Ultee i Smid, 2001; Fu i sar. 2007). Ova ulja mogu smanjiti rast mikroba i razvoj biofilmova kroz posebne mehanizme. Među patogenim gljivicama, *Candida* vrste su najčešće vezane za formiranje biofilmova, pri čemu je *C. albicans* najpatogenija (Ramage i sar., 2005). Mehanizam delovanja etarskih ulja na gljivične patogene sličan je onom na bakterijske ćelije - zasniva se na svojstvima terpena koji zbog visoko lipofilne prirode i male molekulske mase mogu da poremete ćelijsku membranu, prouzrokuju smrt ili inhibiraju rast ćelije (kroz inhibiciju polimerizacije hitina) (Wu i sar., 2008). Dodatno, neka etarska ulja mogu da ispolje svoje dejstvo kroz inhibiciju protonske pumpe (H^+ -ATPaza) lokalizovane u plazminoj membrani, koja između ostalog reguliše unos nutrijenata u ćeliju (Nazzaro i sar., 2017). Ahmad i sar. (2013) su pokazali da su timol i eugenol odlični antifungalni agensi, sa izraženim dejstvom na gljivične mikroorganizme koji su rezistentni na azole. Sa druge strane, autori Bajpai i sar. (2011) su zaključili u *in vitro* studijama da terpeni, ukoliko se koriste kao pojedinačne komponente u borbi protiv gljivičnih patogena, pokazuju nedovoljno efektivne antifungalne aktivnosti u odnosu na etarska ulja u celosti. Monoterpeni, timol i karvakrol, su pokazali inhibiciju H^+ -ATPazne aktivnosti od 70-90%, ukazujući na snažan potencijal etarskog ulja timijana kao antigljivičnog agensa (Nazzaro i sar., 2017).

1.3.4. Antivirusno dejstvo etarskih ulja

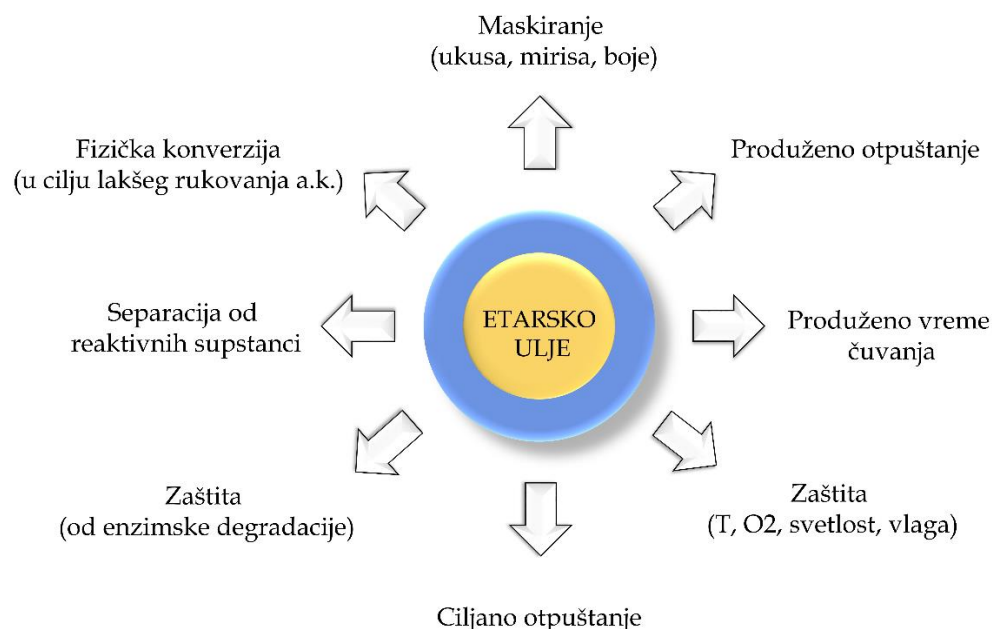
Virusne bolesti predstavljaju najveći problem za ljudsko zdravlje širom sveta. Nažalost, ograničen broj lekova ima izraženu antivirusnu aktivnost. Proizvodi na bazi biljaka i čiste bioaktivne komponente mogu predstavljati novi izvor antivirusnih lekova s obzirom da sadrže širok spektar hemijskih jedinjenja. Literaturni podaci ukazuju na antivirusno dejstvo etarskih ulja, sa posebnim akcentom na DNA i RNA viruse, kao što su herpes - tip 1 i tip 2 (DNA), poliovirus (RNA) i koksaki virus (RNA) (Reichling i sar., 2009; Raut i Karuppaiyil, 2014). Inhibicija replikacije virusa pomoću etarskih ulja zasniva se na prisustvu monoterpena, seskviterpena i fenilpropanoide (Astani i sar., 2011). Na većinu ovih virusa, etarska ulja origana i karanfilića pokazala su izražene inhibitorne aktivnosti (Reichling i sar., 2009). Takođe, etarska ulja timijana i đumbira pokazala su se kao efikasna protiv virusa herpesa, čak i u slučaju njegove rezistencije na aciklovir. Naime, aciklovir deluje tako što inhibira replikaciju virusa interakcijom sa DNA polimerazom unutar ćelije, dok etarska ulja verovatno inaktiviraju virus pre nego što uđe u ćeliju (Schnitzler i sar., 2007). Komponente etarskih ulja imaju sposobnost i da inhibiraju ranu ekspresiju gena u citomegalovirusu, sprečavajući njegovu aktivaciju (Pusztai i sar., 2013). Od svih jedinjenja koje ulaze u sastav etarskih ulja, autori Astani i sar. (2011) ukazali su na to da je α -kariofilen najbolji antivirusni agens.

1.3.4. Ostala dejstva etarskih ulja

Pored prethodno navedenih dejstava etarskih ulja, ne manje važna jeste i njihova uloga u prevenciji kancera. Naime, biljni molekuli mogu biti efikasni u prevenciji proliferacije kancerogenih ćelija (Edris, 2007). Tako su autori Bakkali i sar. (2008) dokazali da terpenoidi i polifenolni konstituenti biljnih etarskih ulja proliferaciju tumorskih ćelija zaustavljaju kroz nekrozu ili indukciju apoptoze. Ulje čajevca i njegov glavni monoterpenski alkohol, terpinen-4-ol, indukcijom apoptoze utiču na smanjenje pojave ljudskog melanoma (Calcabrini i sar., 2004). Takođe, etarska ulja na prevenciju nastanka tumorskih ćelija utiču i svojim antioksidativnim svojstvima. Pored toga, značajne anti-mutagene i anti-inflamatorne aktivnosti pripisuju se upravo biljnim uljima. Ove karakteristike zasnivaju se kako na njihovoj sposobnosti da inhibiraju penetraciju mutagena unutar ćelija i same mutagene, tako i da neutralizuju slobodne radikale nastale kao posledica istih i aktiviraju antioksidativne enzime (Sharma i sar., 2001; Ipek i sar., 2005; Miguel, 2010). Takođe, sinergistička kombinacija nekoliko ulja, kao što su cimet, origano, fenel i kumin, može dovesti do značajnih rezultata u prevenciji dijabetesa tipa II, povećanjem insulinske senzitivnosti, kao i smanjenjem koncentracije glukoze u krvi (Talpur i sar., 2005).

2. INKAPSULACIJA

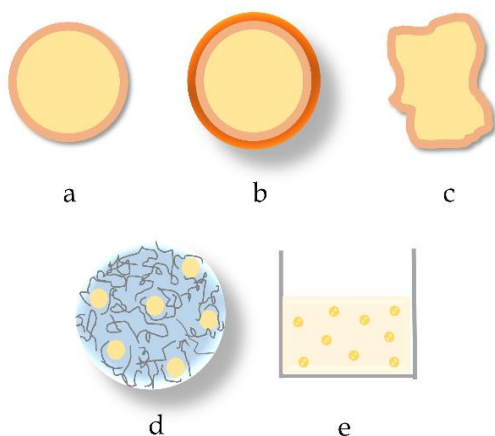
Potencijal biološki aktivnih jedinjenja za ispoljavanje niza pozitivnih efekata na zdravlje ljudi može umanjiti njihova velika osetljivost, odnosno degradacija pod uticajem različitih spoljašnjih faktora (svetlost, T i O₂). Ovo ne samo da može dovesti do pogoršanja senzornih i tehnoloških svojstava krajnjeg proizvoda, već može predstavljati i opasnost po zdravlje korisnika (Bakry i sar., 2015). U cilju zaštite ovakvih jedinjenja, a kako bi se osigurao njihov potpuni potencijal, inkapsulacija se uveliko smatra pogodnom tehnologijom (Asbahani i sar., 2015).



Slika 2.1. Prednosti inkapsulacije etarskih ulja

Naime, inkapsulacija predstavlja proces u kojem dolazi do smeštanja bioaktivne materije unutar materijala za inkapsulaciju (kapsula ili nosač), koji će izolovati aktivnu materiju i na taj način zaštititi je od nepovoljnih promena u okruženju ili prikriti senzorna svojstva koja nisu po ukusu potrošača.

Za inkapsulaciju etarskih ulja postoji nekoliko različitih tipova nosača i to: jezgro/rezervoar, multi-membrana, ne-sferični rezervoar, matrica i emulzija (*Slika 2.2*). U zavisnosti od materijala za inkapsulaciju i oblika nosača, veličina mikrokapsula može da varira od nekoliko submikrona do nekoliko milimetara (Ching i sar., 2017).



Slika 2.2. Šematski prikaz različitih tipova nosača za etarska ulja:

a) jezgro/rezervoar, b) multi-membrana, c) ne-sferični rezervoar, d) matrica i e) emulzija (Maes i sar., 2019).

Tehnike proizvodnje mikrokapsula u prehrambenoj industriji su značajno izazovnije u odnosu na farmaceutsku ili kozmetičku industriju, jer su matrice koje se koriste u proizvodnji hrane dosta složenije (Henrique Rodrigues do Amaral i sar., 2019). Dodatno, ovi proizvodi se moraju unositi oralno, odupreti se nepovoljnim uslovima gastro-intestinalnog trakta i posedovati mukoadhezivna svojstva. Sa druge strane, karakteristika ovakvih mikrokapsula je da se izolacija koju obezbeđuje materijal za inkapsulaciju degradira primenom odgovarajućih stimulusa (npr. određena pH vrednost, enzimi, temperatura), kontrolisano oslobađajući aktivnu supstancu na specifično ciljanom mestu (Silva i sar., 2014). Međutim, inkapsulacija je najčešće povezana sa dramatičnim povećanjem troškova proizvodnje, što može ograničiti ekonomsku održivost metode. Zbog svega navedenog, velika pažnja se posvećuje kako izboru tehnike, tako i izboru materijala za inkapsulaciju.

2.1. Tehnike za inkapsulaciju etarskih ulja

Postoji veliki broj tehnika kojima se može postići inkapsulacija aktivnih jedinjenja, ali s obzirom da su etarska ulja lako isparljive i termoosetljive supstance, nekoliko tehnika se izdvaja kao najoptimalnije. Ove tehnike uključuju emulzifikaciju, sprej-sušenje, ekstruziju, liofilizaciju, kompleksnu koacervaciju, *in situ* polimerizaciju, inkapsulaciju na bazi superkritičnih fluida i koaksijalni elektrosprej sistem, kao noviju tehniku (Bakry i sar. 2015; Đorđević i sar., 2015).

Pregled osnovnih tehnika inkapsulacije etarskih ulja, sa najznačajnijim karakteristikama, prikazan je u **Tabeli 2.1.**

Tabela 2.1. Pregled najčešće korišćenih tehnika za inkapsulaciju etarskih ulja

| Tehnika | Veličina čestica | Efikasnost inkapsulacije (%) | Tip nosača | Prednosti/mane | Inkapsulirano etarsko ulje / materijal za inkapsulaciju |
|----------------|--|------------------------------|-----------------------|--|---|
| Emulzifikacija | Mikroemulzije 5-50 nm Nanoemulzije 50–200 nm (Makro)emulzije 200 nm - 100 µm | 1-100% | Emulzija, Matrica | Jednostavna priprema i niska cena Adekvatne za termooosetljive komponente Fizička nestabilnost Limitirano kontrolisano otpuštanje | Origano, limun / sojin protein- guma akakia (Xue i sar., 2019). |
| Ekstruzija | 50 – 5000 µm | 20–50% | Matrica, rezervoar | Neinvazivna/bez organskih rastvarača i ekstremnih uslova temperature i/ili pH Jednostavna kontrola veličine čestica „Scale up“ procesa je teško izvesti Veoma viskozni polimeri se teško procesuiraju | Karanfilić, cimet, timijan / natrijum alginat (Soliman i sar., 2013). |
| Sprej-sušenje | 10-300 µm (prahovi) 2-3 mm (aglomerati) | 10-90% | Matrica | Jednostavna za rukovanje i „scale-up“ Dobra stabilnost inkapsulata Visoka ekonomičnost Neuniformna veličina čestica Neadekvatna za termooosetljive aktivne supstance | Ruzmarin / guma arabika (Fernandes i sar, 2013); Timijan / maltodekstrin (Tomazelli Júnior i sar., 2017) |

Tabela 2.1. (nastavak)

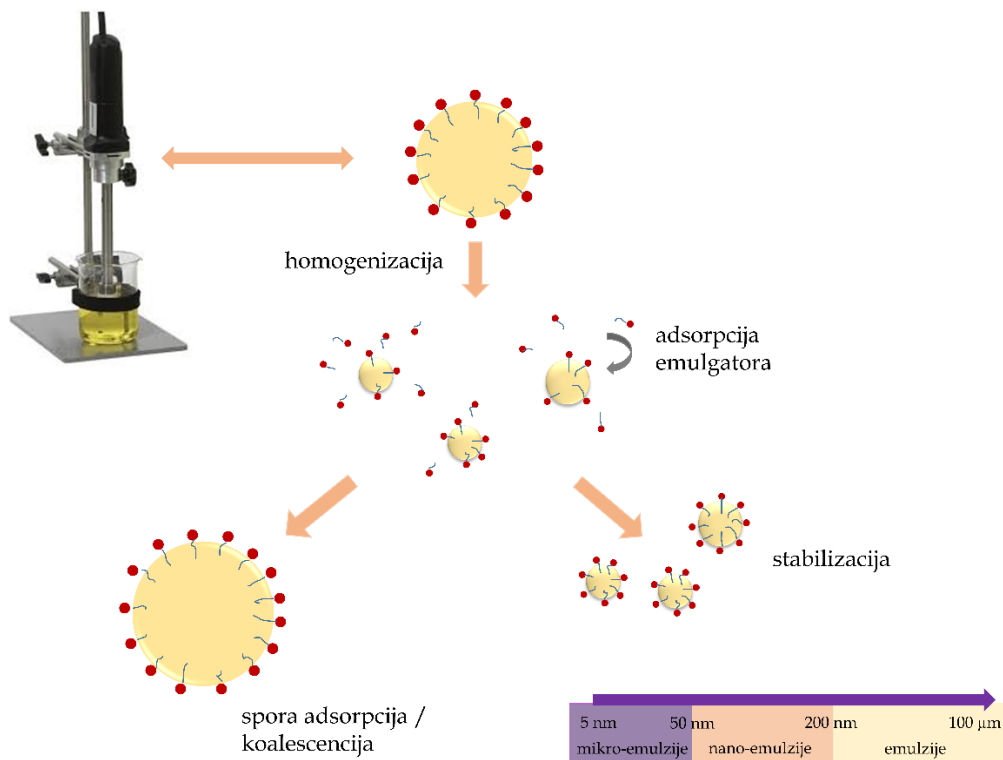
| Tehnika | Veličina čestica | Efikasnost inkapsulacije (%) | Tip nosača | Prednosti/mane | Inkapsulirano etarsko ulje / materijal za inkapsulaciju |
|-------------------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------|--|--|
| Sušenje smrzavanjem / liofilizacija | 20-5000 μm | do 100% | Matrica | Jednostavna za rukovanje Adekvatna za termoosetljive supstance Veliki utrošak energije i vremena (30-50% veći troškovi nego kod sprej sušenja) Veća poroznost čestica | Limunska trava / guma arabika ili maltodekstrin ili/i ksantan guma (Enciso i sar., 2018). |
| Kompleksna koacervacija | 1-500 μm | 40-90% | Rezervoar | Visoka cena procesa Kompleksan mehanizam Metoda osetljiva na uslove okruženja Upotreba organskih rastvarača Čestice otporne na visoke temperature Kontrolisano otpuštanje | Pepermint / Želatin, guma arabika (Dong i sar., 2011); Karanfilić / guar guma (Thimma i Tammishetti, 2003). |
| Koaksijalni elektrosprej sistem | 10 nm - 100 μm | do 100 % | Matrica, rezervoar | Jednostavna i brza metoda Jednostavan „scale up“ procesa Adekvatna za osetljive supstance Teška kontrola procesa | Pepermint / Alginat - pektin (Koo i sar., 2013). |

Tabela 2.1. (nastavak)

| Tehnika | Veličina čestica | Efikasnost inkapsulacije (%) | Tip nosača | Prednosti/mane | Inkapsulirano etarsko ulje / materijal za inkapsulaciju |
|---|------------------|------------------------------|------------|--|---|
| <i>In situ</i> polimerizacija | < 100 nm | do 75 % | Rezervoar | Polimerizacija se odvija samo u kontinualnoj fazi Dobra stabilnost dobijenog sistema Upotreba formaldehida koji može izazvati toksičan efekat | Timijan/formaldehid i melamin (Chung i sar., 2013) |
| Inkapsulacija na bazi superkritičnih fluida | 10–400 μm | 20–100% | Matrica | Niska cena (najčešće korišćeni rastvarači su CO ₂ , azot, itd.) Izbegava se upotreba organskih rastvarača Teška kontrola procesa Čestice imaju tendenciju aglomeracije | Origano/ pirinčani skrob ili želatin (Almeida i sar., 2013) |

2.1.1. Emulzifikacija

Ključni korak u inkapsulaciji etarskih ulja sastoji se od mešanja lipofilne aktivne supstance sa hidrofilnim materijalom za inkapsulaciju, pripremajući na taj način emulziju. Osnovna klasifikacija emulzija obuhvata dva tipa: ulje-u-vodi (U/V) i voda-u-ulju (V/U), u zavisnosti od sastava dispergovane faze. Emulzije se mogu koristiti kao gotovi proizvodi u tečnoj formi, za dostavu aktivnih supstanci u prehrambenim proizvodima (Appelqvist i sar., 2007), zatim kao predkoraci ekstruziji (Chan, 2011) ili sprej-sušenju i liofilizaciji (Zuidam i Shimoni, 2010), zbog čega se najčešće emulzifikacija svrstava u deo inkapsulacionog procesa. Poznavanje karakteristika emulzija ključna je za razumevanje daljih procesa inkapsulacije, kao i za analizu dobijenih inkapsulata. Tako, pored prirode emulgatora i reoloških karakteristika interfejsa i kontinualne faze, raspodela veličine čestica ulja određuje karakteristike emulzije. Emulzifikacija se može izvoditi uz korišćenje visoko- ili nisko- energetske tehnike (Santana i sar., 2013). Visoko-energetske tehnike karakteriše upotreba posebno dizajniranih mehaničkih uređaja („homogenizatora“) koji stvaraju snažne sile koje razbijaju i mešaju uljanu i vodenu fazu, formirajući na taj način fine uljane čestice. Najčešće korišćeni mehanički uređaji u prehrambenoj industriji su homogenizatori pod visokim pritiskom, mikrofluidizeri, sonikatori, rotor-stator homogenizatori (ultra turrax) i koloidni mlinovi (El Kinawy i sar., 2012).



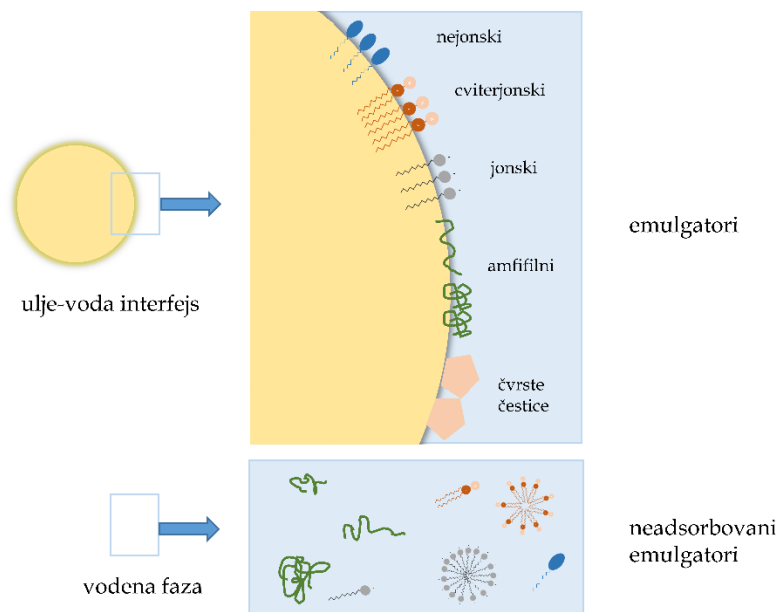
Slika 2.3. Homogenizacija i stabilizacija emulzije uz primenu ultra-turraxa i odgovarajućeg emulgatora

Kako od sastava emulzije, tako i od primenjene tehnike homogenizacije u velikoj meri zavisi veličina čestica emulzije, koja omogućava podelu na konvencionalne, nano- i mikro- emulzije. U pripremi emulzija koristeći rotor-stator, intenzitet homogenizacije (snaga) i vreme zadržavanja u polju smicanja, primarni su parametri za kontrolu veličine čestica emulzije (Maa

i Hsu, 1996). Ostali parametri koji mogu da utiču na performanse ovog homogenizatora su viskozitet emulzije, emulgator, dizajn uređaja i odnos zapremina dve faze. Maa i Hsu (1996) su takođe uočili da je promena veličine kapi emulzije kinetička, što znači da se smanjuje na početku homogenizacije, a zatim dostiže ravnotežnu vrednost.

2.1.1.1. Stabilnost emulzija

Glavna razlika između mikro- i komercijalnih emulzija je u termodinamičkoj stabilnosti. Prelaz iz mikro- u termodinamički nestabilne emulzije nastaje usled značajne promene u veličini kapi. S obzirom na tu činjenicu, kao i da emulzije teže nivou sa najnižom energijom, logično je da će u jednom trenutku doći do razdvajanja faza. Destabilizacija emulzija podeljena je na četiri nivoa: raslojavanje (*engl.* creaming), flokulacija, koalescencija i separacija faza. Međutim, u cilju dobijanja komercijalnog, kinetički stabilnog proizvoda, potrebno je da se između dve nemešljive tečnosti obezbedi dovoljna energetska barijera (McClements, 2012). Ulogu u formiranju emulzija imaju emulgatori i to omogućavajući početno formiranje lipidnih čestica u toku homogenizacije, a zatim i povećavajući stabilnost novonastalih lipidnih čestica (*Slika 2.3*). Uopšteno, za izradu emulzija mogu se koristiti različite površinski aktivne materije, niske ili visoke molekulske mase, kao što su konvencionalne (PAM), proteini ili polisaharidi (McClements, 2012; Berton-Carabin i sar., 2014). Razlika između ovih površinski aktivnih materija ogleda se u mehanizmu stabilizacije lipidnih čestica (*Slika 2.4*), pri čemu interakcije do kojih dolazi mogu biti elektrostatičke, sterne i/ili hidrofobne (van Nieuwenhuyzen i Szuhaj, 1998; Charoen i sar., 2011).



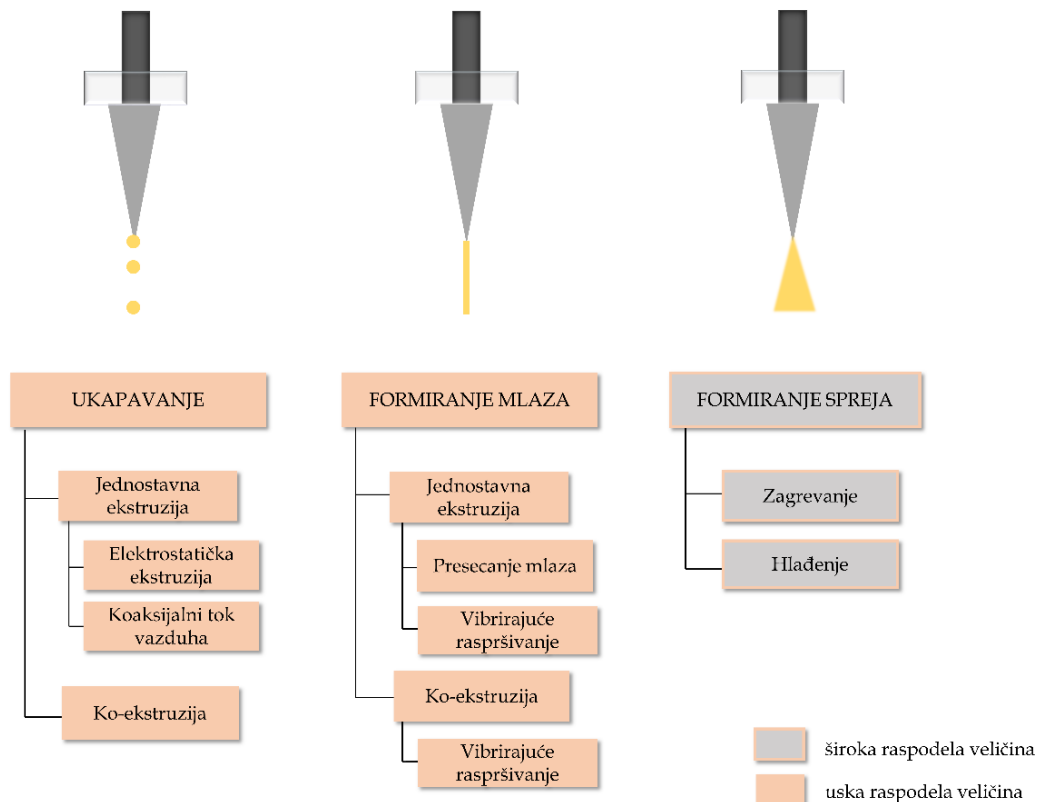
Slika 2.4. Mehanizam stabilizacije emulzija dejstvom različitih emulgatora

U nekim slučajevima emulgatori čak mogu promovisati agregaciju između lipidnih čestica stvaranjem privlačnih interakcija među njima, poput hidrofobnog privlačenja kada su im izloženi nepolarni regioni (Kim i sar., 2002) ili privlačenje između adsorbovanog i neadsorbovanog emulgatora (ukoliko je dodat u većoj količini) (Dickinson i Golding, 1997).

Međutim, ponekad se kombinacija dva ili više emulgatora, pre nego pojedinačni emulgator, koristi se za stabilizaciju emulzija. Dodatak pogodnog ko-emulgatora može da poveća fleksibilnost međupovršinskog filma, što se reflektuje u povećanoj stabilnosti emulzija (Klang i Valenta, 2011). Stabilnost emulzija (preko veličine i/ili površinskog naelektrisanja uljanih kapljica) najčešće se određuje specijalizovanim analitičkim metodama, koje se zasnivaju na rasipanju svetlosnih zraka, merenju broja čestica i/ili pomoću optičke mikroskopije.

2.1.2. Ekstruzione tehnike

Ekstruzione tehnike su poslednjih godina veoma zastupljene sa ciljem inkapsulacije raznih biološki aktivnih jedinjenja u mikročestice na bazi polimera. Jednostavna kontrola veličine čestica, neinvazivnost metode i niska cena, samo su neke od karakteristika pomenutih tehnika. Naime, ekstruzione tehnike se zasnivaju na ekstruziji (potiskivanju) smeše aktivne supstance i materijala za inkapsulaciju, kroz iglu ili kapilaru u rastvor za geliranje. U zavisnosti od brzine potiskivanja tečnosti javljaju se različiti režimi formiranja kapi (Martins i sar., 2017), pa je u skladu sa tim izvršena osnovna podela ekstruzionih tehnika na tehnike ukapavanja, tehnike formiranja mlaza i tehnike formiranja spreja (Slika 2.5).



Slika 2.5. Režimi formiranja kapi i tipovi ekstruzionih tehnika

Kao opšte pravilo, koristeći niske brzine potiskivanja tečnosti, formiranje kapi nastaje režimom ukapavanja. Kod ovog režima kapljica ekstrudirane tečnosti raste na vrhu kapilare/igle sve dok gravitaciona sila ne postane dovoljno velika da prevlada površinski napon, nakon čega dolazi do otkidanja kapljice (Chan, 2011). Veličina nastalih kapljica zavisi

od svojstava tečnosti koja se ukapava (viskoznosti, površinskog napona i gustine) i od prečnika igle (Chan i sar., 2009). Kod režima ukapavanja pod dejstvom gravitacione sile veličina kapljica može da iznosi i do 2-3 mm u prečniku, a čestice koje nastaju geliranjem nazivaju se milikapsule (Lidert, 2005). Ovaj tip kapsula se pored zaštite aktivne supstance koristi u aplikacijama gde je poželjna vizuelizacija kapsule. Međutim, značajnu redukciju veličine čestica ($\geq 50 \mu\text{m}$, mikrokapsule) (Manojlovic i sar., 2006) moguće je ostvariti korišćenjem sistema igala različitih prečnika i/ili uvođenjem električnog polja (Bugarski i sar., 1994).

Materijali koji se koriste za inkapsulaciju mogu biti polimerne prirode i to polisaharidi, proteini, kao i sintetički polimeri, mada se njihova primena sve više izbegava (Dias i sar., 2015). Takođe, veliki je izbor i nepolimernih materijala, kao što su inulin, maltodekstrin, ciklodekstrin, lecitini i drugi emulgatori, koji se koriste kao dodaci polimerima u cilju unapređenja svojstava nosača. Izbor materijala zavisi od mehanizma umrežavanja polimera i izabrane inkapsulacione tehnike.

Najčešće korišćeni polisaharidni materijal za inkapsulaciju je natrijum-alginat (0.6-4%), dok rastvor za ukapavanje u tom slučaju predstavlja kalcijum-hlorid (0.05-1.5 M). Geliranje u prisustvu Ca^{2+} jona je veoma lako kontrolisati, s obzirom da proces ne zahteva zagrevanje/hlađenje, kao u slučaju geliranja drugih polimera. Hidrogelovi na bazi kalcijum-alginata predstavljaju biopolimernu mrežu u koju mogu da se inkapsuliraju/imobilišu razna bioaktivna jedinjenja - arome na bazi ulja (Lević i sar., 2015), etarska ulja (Kokina i sar., 2019), enzimi (Knezevic i sar., 2002), probiotici (Obradovic i sar., 2019). Međutim, za alginatne hidrogelove je karakteristično da može doći do „curenja“ inkapsuliranog materijala usled velike poroznosti alginatne mreže. Iz tog razloga se u cilju unapređenja sistema za inkapsulaciju vrši kombinovanje alginata sa drugim biopolimerima (Natrajan i sar., 2015; Zhang i sar., 2015; Volić i sar., 2018).

2.1.2.1. Elektrostaticka ekstruzija

Elektrostaticka ekstruzija predstavlja noviju i unapređenu tehniku ekstruzije. Značaj ove tehnike ogleda se u primeni električnog polja, pomoću kojeg je moguće kontrolisati veličinu čestica, sa akcentom na mogućnost dobijanja čestica mikrometarskih veličina (Nedović i sar. 2001; Bugarski i sar. 2004).

Kod elektrostaticke ekstruzije pripremljena emulzija se potiskuje kroz iglu u prisustvu elektrostaticnog polja, pri čemu elektrostaticke sile deluju na tok tečnosti na vrhu kapilare i u odnosu na klasični proces ukapavanja pod dejstvom gravitacije, ove sile mnogo brže nadvladavaju površinski napon tečnosti. Formirane kapi se pod dejstvom elektrostaticnog polja izdužuju iz oblika sfere u oblik konusa, a zatim oslobađaju i padaju u rastvor u kojem dolazi do umrežavanja polimera. Sa daljim povećanjem jačine napona (iznad 6 kV) režim ukapavanja prelazi u režim spreja (Martins i sar. 2017), tečnost na vrhu kapilare dobija oblik vlakna, pri čemu se mogu dobiti čestice još manjeg prečnika, ali šire raspodele veličina. Kod elektrostaticke ekstruzije na veličinu čestica utiče nekoliko faktora. Pre svega, reološke karakteristike, odnosno viskozitet rastvora polimera nezavisno od tipa ekstruzije. Dalje, veličina čestica zavisi od protoka kojim se rastvor (emulzija) potiskuje, prečnika igle ili kapilare, rastojanja između elektroda i primenjenog napona (Bugarski i sar., 1994; Manojlovic i sar., 2006). Karakteristično je da sa povećanjem viskoznosti emulzije dolazi do izduživanja konusa na vrhu igle, pri čemu se formira se tanak „vrat“ koji predstavlja mesto otkidanja kapi. Pucanje

„vrata“ uzrokuje formiranje jedne veće kapi, ali i manjih kapljica, što ukupnu raspodelu čini neuniformnijom (Manojlovic i sar., 2006).

2.2. Polimerni materijali za inkapsulaciju etarskih ulja

Oralna administracija predstavlja najčešću putanju za dostavu lekovitih supstanci. Nažalost to povlači za sobom razne prepreke, kao što su nepotpuna apsorpcija, razgradnja u gastrointestinalnom traktu, metabolizam jetre i ograničena bioraspoloživost (Sathish i sar., 2011). Pored toga, s obzirom da je vreme zadržavanja konvencionalno unete supstance u gastrointestinalnom traktu relativno kratko, ova ruta predstavlja izazov u smislu produženog otpuštanja. Iz navedenih razloga izbor materijala predstavlja ključni faktor u razvoju sistema za kontrolisano otpuštanje aktivne supstance. U cilju inkapsulacije etarskih ulja taj izbor se sužava, kako zbog lipofilnosti aktivne supstance, tako i zbog tehnika inkapsulacije.

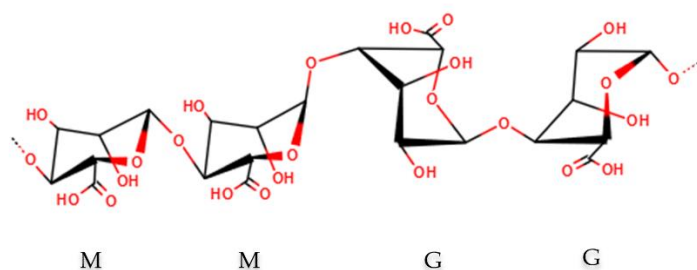
Najčešće korišćeni polimerni materijali za inkapsulaciju etarskih ulja su polisaharidi (alginat, gume, hitozan, pektin, skrob i njegovi derivati), proteini (kazein, proteini surutke i soje) i lipidi (fosfatidilholin, PLGA) (Vishwakarma i sar., 2016). Moguća je i kombinacija dva ili više polimera (u tom slučaju se inulin, k-kargenan i želatin često koriste u kombinacijama sa prethodno navedenim materijalima), kako bi se omogućilo postizanje višeg stepena inkapsulacije, produženo otpuštanje, kao i adekvatna mehanička i termička zaštita tokom skladištenja.

2.2.1. Alginat kao materijal za inkapsulaciju

Alginati su prirodni anjonski polimeri koji čine deo ćelijskih zidova smeđih algi, iz kojih se dobijaju ekstrakcijom. Predstavljaju jedan od najopširnije istraženih mukoadhezivnih materijala zbog izuzetne citokompatibilnosti i biokompatibilnosti, biorazgradivosti, sol-gel prelaznih svojstava i hemijske svestranosti koja omogućava dodatne modifikacije i prilagođavanje njegovih svojstava (Lee i Mooney, 2012). Iz tog razloga, alginat je korišćen za proizvodnju širokog spektra sistema za dostavu aktivnih supstanci (Sosnik, 2014). Za inkapsulaciju etarskih ulja do sada je korišćen čist alginat (Chang i Dobashi, 2003; Hosseini i sar., 2013; Benavides i sar., 2016) ili u kombinaciji sa indijskom gumom (De Oliveira i sar., 2014), hitozanom (Natrajan i sar., 2015; Dima i sar., 2016), želatinom (De Matos i sar., 2018).

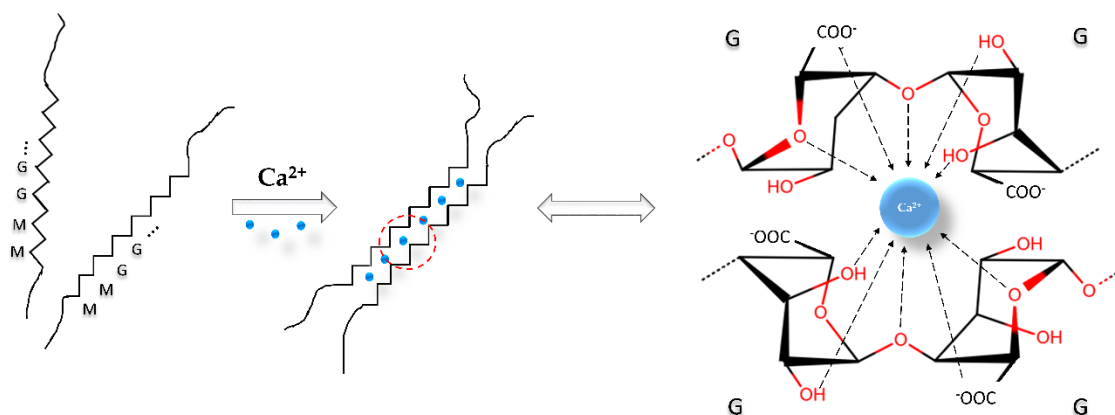
2.2.1.1. Hemijska struktura alginata i formiranje hidrogela

Alginati predstavljaju nizove prirodnih nerazgranatih polisaharida sastavljenih od ostataka β -D-manuronske (M) i α -L-guluronske (G) kiseline povezane 1 \rightarrow 4 glikozidnim vezama. Alginatni lanci podeljeni su na blokove i to homopolimerne (MMMM i GGGG) i heteropolimerne (MGMGMG, MMGGMM, itd.). U zavisnosti od izvora ekstrakcije i starosti alge, molekulska masa alginata može da varira od 32 do 400 kg/mol, sa različitim odnosima M/G jedinica i lančanim aranžmanima.



Slika 2.7. Hemijska struktura manuronske (M) i guluronske (G) kiseline povezane 1 → 4 glikozidnom vezom i jedan od mogućih aranžmana u lancu

Jedna od najatraktivnijih karakteristika alginata je sposobnost jonotropnog umrežavanja vodenih rastvora mehanizmom prema kome se karboksilne kiseline G-blokova vezuju za divalentne katjone ($\text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$), formirajući 3D mrežu (Martins i sar., 2017). Što je veći broj G-blokova, veći je afinitet alginata prema katjonima. Tako, da bi došlo do formiranja stabilnih spojeva, potrebno je najmanje od 8 do 20 susednih G ostataka u lancu (Donati i Paoletti, 2009).



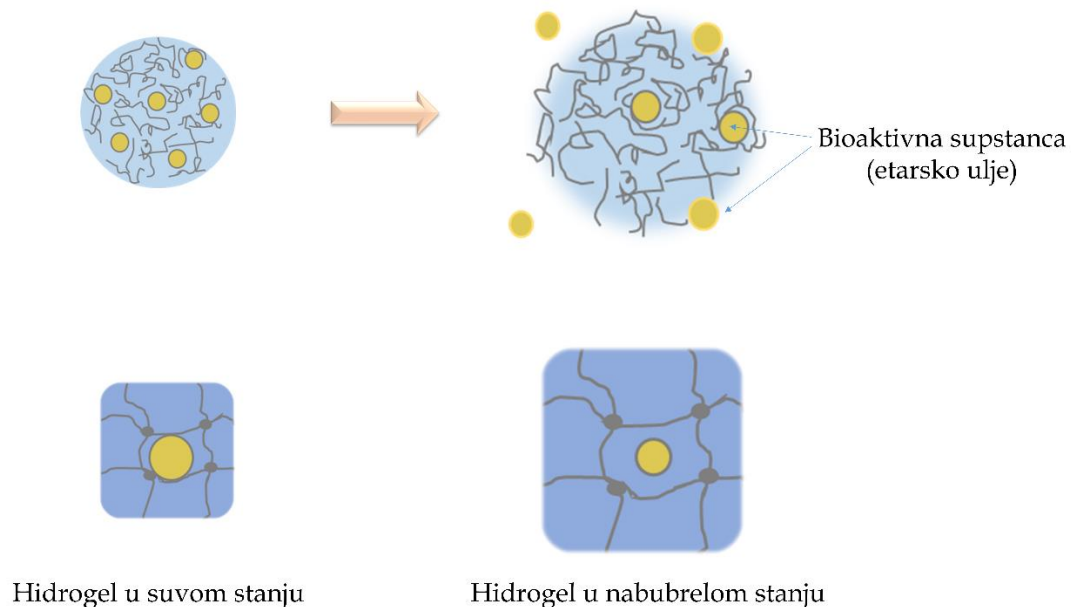
Slika 2.8. Umrežavanje alginata u prisustvu Ca^{2+} jona („egg-box“)

U mnogim aplikacijama Ca^{2+} je korišćen za umrežavanje zbog niske cene i netoksičnosti. Mehanizam umrežavanja poznat je pod nazivom „egg-box“ (Grant i sar., 1973), u kojem se dva ili više poliuronska lanaca vezuju stvarajući šupljine, poput onih u kutiji za jaja, u koje se smeštaju joni kalcijuma.

2.2.1.2. Karakteristike hidrogelova na bazi alginata

Reološka svojstva i karakteristike alginata kao nosača aktivnih supstanci zavise od molekulske mase, koncentracije, kao i M/G odnosa, pri čemu porast G delova dovodi do formiranja rigidnije i krtije matrice (Sosnik, 2014). Sa druge strane, čvrstina gela može da varira i u zavisnosti od koncentracije kalcijuma u gelu. Kada je koncentracija mala, ovi gelovi se ponašaju kao viskozne tiksotropne tečnosti, dok sa povećanjem koncentracije kalcijuma dolazi do formiranja trajnih mreža. Dodatno, čvrstina gelova zavisi i od vremena geliranja, s obzirom da je potrebno izvesno vreme da bi kalcijum difundovao sa površine u središnji deo matrice

(Martins i sar., 2017). Pored mehaničke stabilnosti, pokazano je da koncentracija kalcijuma ima uticaj i na poroznost gela, bubrenje, kao i biodegradabilnost (Manojlović, 2008). Alginatni hidrogelovi imaju tendenciju da erodiraju u neutralnim i baznim pH vrednostima, pre nego u kiselim uslovima. Ova karakteristika promovisala je njihovu upotrebu u hemijskoj stabilizaciji lekova i bioloških preparata za oralnu primenu koji su nestabilni u želudačnim fluidima (Chan i sar., 2007).



Slika 2.9. Bubrenje hidrogela na bazi alginata i otpuštanje etarskog ulja

Zbog hidrofилne prirode alginata, oslobađanje inkapsulirane supstance može da se odvija različitim mehanizmima: difuzijom, bubrenjem i/ili erozijom matrice. Supstance rastvorljive u vodi uglavnom se otpuštaju difuzijom, dok su bubrenje i erozija matrice karakteristični mehanizmi kod otpuštanja lipofilnih supstanci (Sosnik, 2014; Vishwakarma i sar., 2016). Otpuštanje malih molekula odvija se mnogo brže, zbog činjenice da nabubrele alginatne matrice imaju prečnik pora 5-200 nm (Andersen i sar., 1977; Ching i sar., 2017). Međutim, u cilju uklanjanja ovih nedostataka mogu se preduzeti različite modifikacije, kao što su fizičko ili hemijsko vezivanje aktivne supstance za mrežu i na taj način prolongirati otpuštanje.

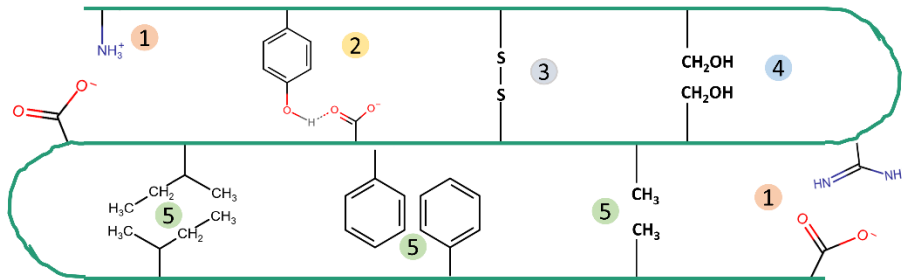
2.2.2. Proteini

Proteini su decenijama najčešće korišćeni sastojci u prehrambenoj industriji zahvaljujući prirodnom poreklu, netoksičnosti, pristupačnoj ceni i širokoj dostupnosti. Pored toga, funkcionalne karakteristike proteina, posebno u doba razvoja „zelenih“ proizvoda, učinile su ih idealnim sastojcima.

2.2.2.1. Strukturne karakteristike proteina

Proteini su linearni biopolimeri koji se sastoje od nizova aminokiselina kovalentno povezanih peptidnim vezama. Razlike u broju, tipu i sekvencama aminokiselina u polipeptidnom lancu određuju molekularne, fizičko-hemijske i funkcionalne karakteristike

proteina. Mnogi proteini sadrže mešavinu polarnih i nepolarnih aminokiselina, što ih čini amfifilnim molekulima koji imaju sposobnost vezivanja za ulje/voda granicu faza (Lam i Nickerson, 2013). Odnos polarnih i nepolarnih grupa izloženih na njihovoj površini odgovoran je za površinsku aktivnost proteina. Dodatno, većina proteina ima mešavinu anjonskih, neutralnih i katjonskih aminokiselina duž polipeptidnih lanaca, što određuje njihovo naelektrisanje pod različitim pH uslovima (Gumus, 2017).



Slika 2.10. Šematski prikaz stabilizirajućih veza u proteinu: 1. elektrostatičke interakcije, 2. vodonične veze, 3. disulfidne veze, 4. dipol-dipol interakcije i 5. hidrofobne interakcije.

Proteini mogu zauzeti različite konformacije u vodenim rastvorima i na ulje/voda granici faza, u zavisnosti od odnosa van der Valsovih sila, hidrofobnih interakcija, elektrostatičkih interakcija, vodoničnih i kovalentnih veza, sternog efekta i entropije (Zhai i sar., 2011; Lam i Nickerson, 2013). Ovaj odnos je predodređen uslovima sredine, kao što su pH, jonska jačina, dielektrična konstanta i temperatura. Sa promenom ovih uslova menja se i konformacija proteina u rastvoru i na interfejsu. Dve najčešće konformacije površinski aktivnih proteina koji se koriste kao emulgatori u prehrambenoj industriji su globularna i slučajna zavojnica (*engl.* random coil) (Dickinson, 2003). Globularni proteini (proteini surutke, soje, žumanceta) imaju kompaktnu sferoidalnu strukturu u kojima se većina nepolarnih grupa nalazi u unutrašnjosti, dok su polarne grupe prisutne sa spoljne strane. Nasuprot njima, proteini sa konformacijom slučajne zavojnice su otvorenije, fleksibilne strukture, među kojima su kao emulgatori najpoznatiji kazein i želatin (Tcholakova i sar., 2008).

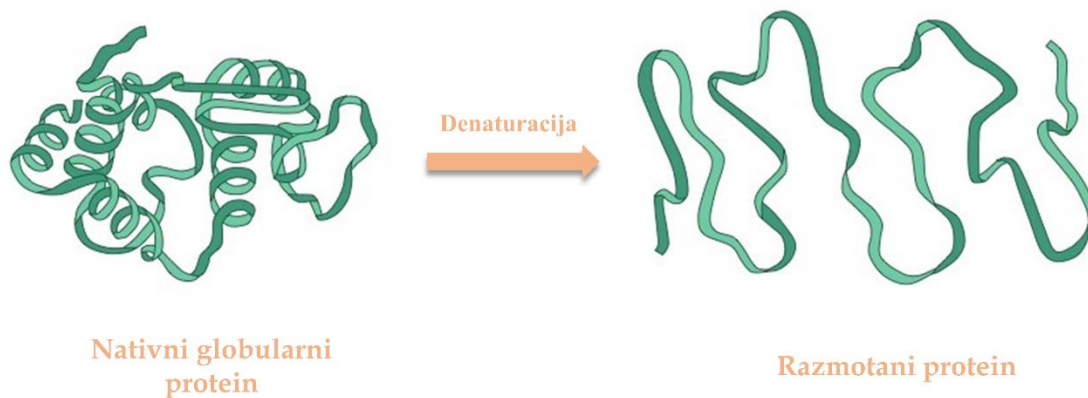
2.2.2.2. Proteini kao emulgatori

Da bi bili uspešni u svojoj primeni, proteini moraju posedovati nekoliko važnih karakteristika koje se tiču funkcionalnih svojstava. Karakteristike proteina da učestvuju u formiranju i stabilizaciji emulzija ključne su za mnoge aplikacije. Nasuprot emulgatorima male molekulske mase, koji difunduju velikom brzinom do u/v granice faza i tako omogućavaju stabilizaciju emulzija, proteini su veliki molekuli čija se difuzija odvija mnogo sporije (McClements, 2005). Kada dođu do interfejsa, struktura proteina postaje podložna promeni. Naime, nakon adsorpcije na površini uljanih kapi, globularni proteini se mogu delimično razmotati i izložiti svoje hidrofobne grupe koje se inače nalaze u njihovoj unutrašnjosti (**Slika 2.10**). Na taj način dolazi do stvaranja viskoelastičnih filmova (nalik gelu) oko kapljica ulja, koji se odupiru mehaničkom stresu i omogućavaju elektrostatičku (u zavisnosti od uslova rastvora) i sternu (u zavisnosti od proteina) stabilizaciju (Tcholakova i sar., 2006; Chen i sar., 2014).

Fizičko-hemijske karakteristike proteina predodređuju njihova emulgujuća svojstva. Tako, površinska hidrofobnost utiče na mogućnost proteina da se adsorbuje na površini uljane kapi, pri čemu veći stepen inkorporacije proteina unutar uljane faze ukazuje na bolji emulgujući kapacitet proteina. Sa druge strane, površinsko naelektrisanje proteina utiče na njegovu rastvorljivost u vodenoj fazi, pri čemu je dobra rastvorljivost neophodna za postizanje veće brzine difuzije do interfejsa (Lam i Nickerson, 2013). Nakon formiranja viskoelastičnog filma, uljane kapljice dobijaju pozitivno ili negativno naelektrisanje u zavisnosti od pH vrednosti emulzije i izoelektrične tačke proteina. Stabilnost emulzija u tom slučaju zavisi od elektrostatičkog odbijanja između kapljica; što je veće odbijanje (na pH vrednostima daljim od pI proteina) emulzija je stabilnija (McClements, 2005). U zavisnosti od veličine proteina, strukture i konformacije, globule ili zavojnice proteinskih segmenata koje čine izbačene hidrofилne aminokiseline, omogućavaju sternu stabilizaciju, tj. fizički sprečavaju čestice od aglomeracije (Chen i sar., 2014).

2.2.2.3. Poboljšanje emulgujućih svojstava globularnih proteina

Zbog gusto pakovanih globula, veličine molekula i konformacije u nativnom proteinu, funkcionalna svojstva globularnih proteina su limitirana (Chen i sar., 2014). Dodatno, stabilnost emulzija opada sa vremenom usled promena u konformaciji proteina kao dodatak termodinamičkom pogonu za odvajanjem faza. Da li će se proteini zadržati na interfejsu zavisi i od tipova veza koje su prisutne unutar proteinskog filma (npr. hidrofobne, van der Valsove itd.). U skladu sa tim, denaturacija se javlja kao način poboljšanja emulgujućih svojstava proteina i to fizičkim, hemijskim ili enzimskim metodama: povišenom temperaturom, visokim pritiskom, dejstvom kiselina ili baza i dejstvom enzima (Nishinari i sar., 2014).



Slika 2.11. Razmotavanje proteinskih globula denaturacijom

Denaturacijom globularnih proteina na temperaturama između 80-90 °C dolazi do znatnog poboljšanja površinske hidrofobnosti, kao i do formiranja disulfidnih veza između susednih molekula proteina, što utiče na poboljšanje stabilnosti emulzija (Kim i sar., 2002; Wang i sar., 2012). Zagrevanje rastvora proteina, pre emulzifikacije, dovodi do formiranja sitnijih lipidnih čestica stabilizovanih proteinima, u odnosu na one stabilizovane nativnim proteinima (Chen i sar., 2014). Ove karakteristike nastaju kao rezultat raskidanja veza koje drže sekundarnu, terciarnu i kvaternu strukturu kao celinu (Blanco i Blanco, 2017) i izlaganja hidrofobnih grupa i disulfidnih veza koje se nalaze u samoj unutrašnjosti strukture. Međutim, može se javiti

i negativan efekat na stabilnost emulzija ukoliko temperatura termalne denaturacije pređe 100 °C. Takođe, ako elektrostatičke ili druge odbojne sile u sistemu nisu dovoljno jake, dodatno izlaganje ovih grupa može dovesti do privlačenja između molekula proteina adsorbovanih na različitim kapljicama ulja i agregacije (Kim i sar., 2002).

Parcijalna hidroliza je takođe jedna od mogućnosti za poboljšanje emulgirajućih svojstava proteina. Na ovaj način, usled poboljšanja rastvorljivosti i redukcije molekulske mase, dokazano je da proteini, između ostalog, brže difunduju do interfejsa. Međutim, stepen hidrolize je ključan faktor za poboljšanje ovih karakteristika. Visok pritisak može uticati na delimično poboljšanje svojstava proteina, ali bolji efekti se postižu u kombinaciji pritiska i povišene temperature (Molina i sar., 2011). Studije su pokazale da se globulini mogu delimično denaturisati i pod ekstremnim pH vrednostima; usled smanjenja bočnih interakcija između lanaca postaju fleksibilniji, ali ipak ne dolazi do značajne promene u konformaciji (Goto i Fink, 1989).

2.2.2.4. Proteini soje

Proteini soje dostupni su kao komercijalni proizvodi i to u obliku sojinog brašna, koncentrata i izolata. Izolat sojinog proteina (*engl.* soy protein isolate, SPI) je najznačajniji proizvod, s obzirom da ima najveći sadržaj proteina ($\geq 90\%$) i oslobođen je lipida i ugljenih hidrata. Glavne komponente izolata predstavljaju frakcije 7S (β -konglicinin) i 11S (glicinin) (Albano i sar., 2018).

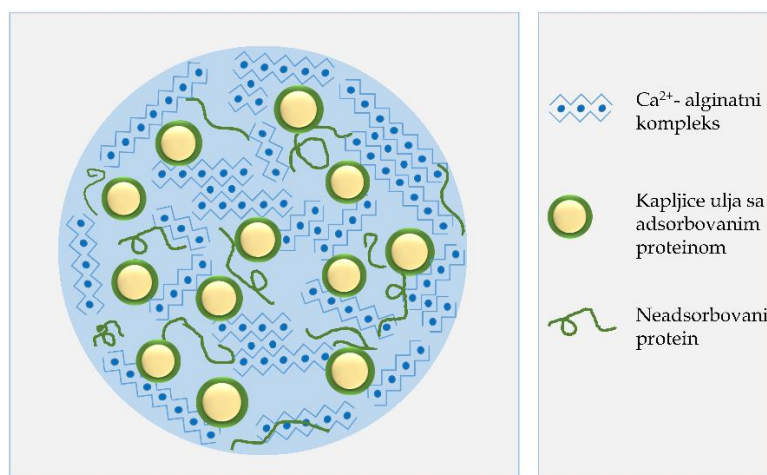
Proteini soje poznati su po svojim dobrim nutritivnim vrednostima, funkcionalnim svojstvima i pozitivnim uticajem na zdravlje ljudi (Friedman i Brandon, 2001). Dokazano je da aktivni peptidni fragmenti u proteinu soje imaju hiperholesterolemično, antikancerogeno, hipotenzivno, imunostimulatorno i antioksidativno dejstvo (Chen i sar., 2014). Pored fizioloških funkcija, ovi proteini imaju ulogu kao emulgatori i gelirajući agensi, a važna je i njihova uloga u zadržavanju vode (Chen i sar., 2013). Obe frakcije izolata proteina soje imaju funkcije emulgatora i stabilizatora, a najefektnije su na pH vrednostima daljim od izoelektrične tačke ($pI \sim 4-4.5$). Proteini soje pokazuju veliku rastvorljivost u baznoj sredini ($pH > 7$) (Renkema i sar., 2002), koja omogućava bržu difuziju proteina u emulzijama (Lam i Nickerson, 2013).

Dodatno, proteini soje adsorbovani na površini kapljica ulja dokazano sprečavaju lipidnu oksidaciju. Mehanizmi prema kojima se odigrava zaštita lipida mogu biti različiti, uključujući uklanjanje slobodnih radikala, helatizaciju, sterno ometanje i elektrostatičko odbijanje (Elias i sar., 2008; Waraho i sar., 2011). Inkorporacija proteina soje u mnoge formulacije u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji je u porastu, najpre sa stanovišta razvoja novih proizvoda sa jedinstvenim karakteristikama, kao što je kontrolisano otpuštanje aktivnih komponenti (Castro i sar., 2018), pri čemu je veoma značajna amfifilna priroda proteina soje koja daje mogućnost formulisanja proteinskih nosača za dostavu lipofilnih supstanci (Maltais i sar., 2009; Chen i sar., 2015; Deng i sar., 2016).

2.2.3. Alginat-protein sistemi za inkapsulaciju

Glavna sličnost između proteina i polisaharida ogleda se u tome da oba biopolimera predstavljaju stabilizatore emulzija; polisaharidi ulogu stabilizatora vrše geliranjem i modifikacijom viskoznosti, dok su proteini zaduženi za formiranje stabilnih filmova na površini uljanih kapi.

Dodatkom anjonskih polisaharida u emulzije stabilizovane globularnim proteinima može doći do formiranja rastvornih ili nerastvornih kompleksa; ovi kompleksi mogu uticati na stabilnost sistema u kojem flokulacija zavisi od pH vrednosti rastvora i koncentracije alginata (Dickinson, 2003; Sosa-Herrera i sar., 2012). Čak i u malim koncentracijama polisaharidi mogu napraviti veliku razliku kako u strukturnim, tako i u reološkim svojstvima uzrokujući velike promene u viskoznosti, konzistenciji i teksturi (Renard i sar., 2006). Ovaj efekat je posebno izražen dodatkom natrijum alginata, zbog sposobnosti ovog polisaharida za umrežavanjem u prisustvu kalcijumovih jona, pri čemu nastaje potpuno novi sistem u odnosu na tečnu emulziju.



Slika 2.12. Šematski prikaz alginat/protein hidrogel sistema sa inkapsuliranim etarskim uljem

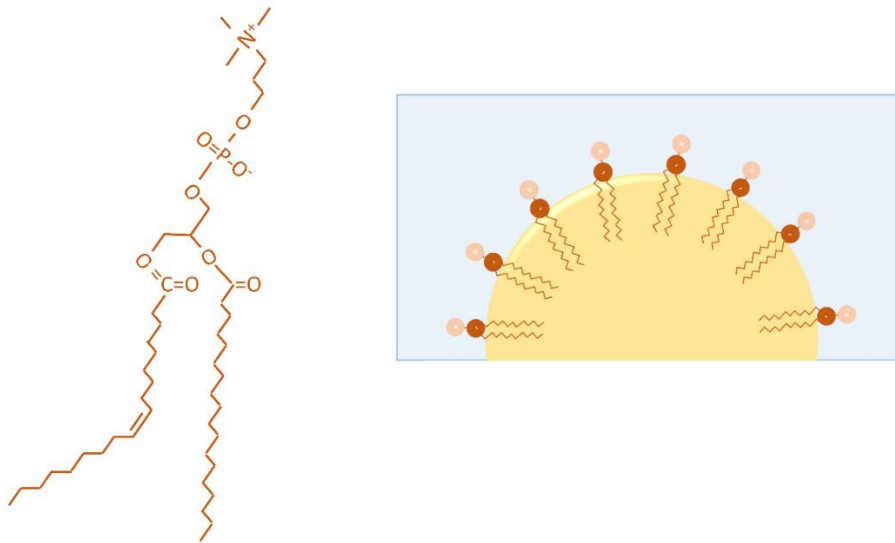
Hidrogelovi na bazi alginata i globularnih proteina ograničeno su do sada ispitivani u sistemima za kontrolisano otpuštanje (Zheng i sar., 2007; Zhang i sar., 2014). Kod sistema tipa alginat-protein, za inkapsulaciju etarskih ulja karakteristično je da nakon geliranja dolazi do potpune imobilizacije kapljica ulja na čijoj su površini adsorbovani proteini, unutar alginatne mreže. U kiseloj sredini ovi hidrogelovi imaju sposobnost kontrahovanja (Chan i sar., 2007) tako sprečavajući digestiju adsorbovanih proteina i neželjeno otpuštanje ulja. S obzirom da ispoljavaju pH osetljivo ponašanje, hidrogelovi na bazi alginata i proteina soje pogodni su za oralnu administraciju aktivnih supstanci (Zheng i sar., 2007).

2.2.4. Lecitin

Lecitin je decenijama možda najčešće korišćen emulgujući agens u industriji hrane. Danas, sve veću upotrebu dobija u kozmetici, farmaciji i biotehnologiji kao efikasno disperziono sredstvo i odličan emulgator (Klang i Valenta, 2011). Lecitini su prirodni amfifili koji predstavljaju smeše fosfolipida i kao glavne komponente ćelijskih membrana imaju važne funkcije u rastu i funkcionisanju ćelija. Mogu se dobiti iz različitih izvora. Na primer, žumance iz jajeta je primarni izvor lecitina životinjskog porekla, ali je veoma skup za industrijsku primenu. Sa druge strane, lecitin iz semena soje je veoma cenjen zahvaljujući svom prirodnom poreklu, višestrukoj funkcionalnosti, velikoj ponudi i niskoj ceni (Xu i sar., 2011). Njegovu sigurnost za upotrebu u ishrani potvrdila je i Svetska zdravstvena organizacija. Trenutno najkorišćeniji lecitin u industriji hrane jeste upravo sojin lecitin (Xu i sar., 2011).

2.2.4.1. Strukturne i funkcionalne karakteristike lecitina

Komercijalni lecitin (poreklom iz semena soje) je prirodna mešavina fosfolipidnih molekula (fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin i fosfatidilinozitol) i triglicerida, dok su u manjem procentu prisutni i glikolipidi, tokoferoli, fitosteroli i masne kiseline. Za fosfolipidne emulgatore dokazano je da stabilizuju emulzije delujući kao mehanička i elektrostatička barijera koalescenciji (Mirtallo i sar., 2010). Međutim, u zavisnosti od hemijske strukture fosfolipidi se različito ponašaju na ulje/voda granici faza. Glavna komponenta lecitina, fosfatidilholin, zahvaljujući sposobnosti formiranja lamelarne strukture sa dobro uređenim mono- i bi-slojevima najzaslužnija je za stabilizaciju emulzija (Klang i Valenta, 2011; Pichot i sar., 2013).



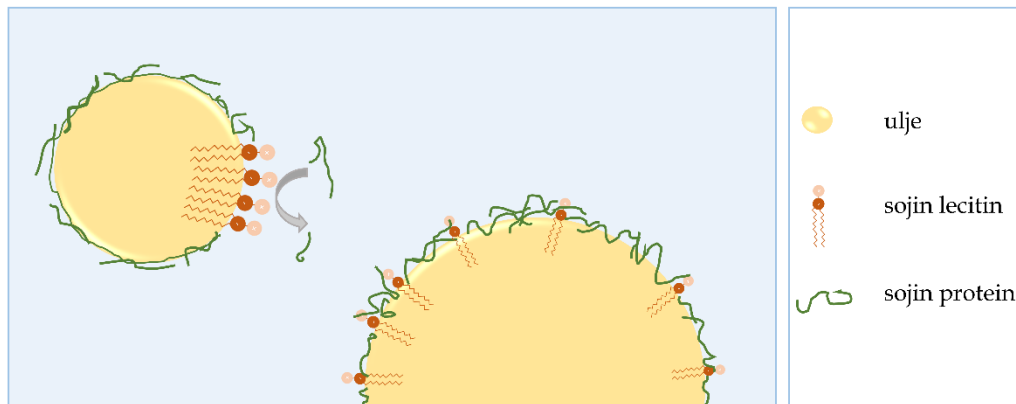
Slika 2.13. Hemijska struktura i površinska aktivnost fosfolipida

Fosfatidilholin se sastoji od polarne glave koja sadrži ostatke fosfoholina i glicerola. Takođe, sadrži i nepolarnu regiju sastavljenu od dva lanca masnih kiselina, koji mogu da variraju u broju ugljenikovih atoma i dvostrukih veza (*Slika 2.13*). Fosfati i delovi koji sadrže azot mogu biti jonizovani, tako predstavljajući negativno i pozitivno naelektrisane ostatke, respektivno. Efikasnost lecitina kao stabilizatora emulzija pripisuje se samoorganizovanju molekula na u/v granici faza i pojedinačnom formiranju gustog viskoelastičnog filma ojačanog vodoničnim vezama između fosfatnih grupa susednih molekula.

2.2.5. Protein-lecitin interakcije

Kao što je prethodno istaknuto, proteini i lecitini imaju zanimljiva površinski aktivna svojstva čija primena omogućava dobijanje stabilnih emulzija različitih proizvoda. Cilj primene proteina u kombinaciji sa lecitinom je da bi se postigao sinergistički efekat na stabilnost emulzija (van Nieuwenhuyzen i Szuhaj, 1998). Međutim, ponekad gubitak jedne od komponenti sa granice faza usled kompeticije (*Slika 2.14*) može izazvati antagonistički efekat. U skladu sa tim, neophodno je odabrati odgovarajuće uslove u pripremi i procesuiranju

emulgatora, kao i u redosledu dodavanja sastojaka tokom formulacije (Dickinson i Yamamoto, 1996), u cilju postizanja željenih karakteristika emulzija.



Slika 2.14. Interakcije između proteina i lecitina na u/v interfejsu

Interakcije između proteina i lecitina mogu dovesti do (i) smanjenja površinske aktivnosti, (ii) razmotavanja tercijarne strukture proteina, (iii) promene neto naelektrisanja, (iv) povećanja molekularne fleksibilnosti, (v) promene u viskoelastičnosti i (vi) inkorporacije proteina u micelle i vezikule surfaktanta (van Nieuwenhuyzen i Tomás, 2008).

Scuriatti i sar. (2003) su ispitivali uticaj interakcija između izolata sojinog proteina (u nativnom i denaturisanom stanju) i fosfatidilholina na stabilnost emulzija tipa u/v i došli do zaključka da je dodatak fosfatidilholina uzrokovao povećanje stabilnosti emulzija, koja se ogledala u smanjenom stvaranju krema. Međutim, uporednom analizom, dodatno niži stepen destabilizacije primećen je kod emulzija sa denaturisanim proteinima i fosfatidilholinom, sugerišući na jače interakcije između upravo ova dva emulgatora. Drugi autori su ove interakcije objasnili kao promenu konformacije 11S globulina u prisustvu fosfatidilholina, posebno u slučaju kada je sadržaj nasumičnog klupka (*engl.* random coil) u porastu u odnosu na β -ravan, usled denaturacije (Ohtsuru i Kito, 1983).

Od podjednakog značaja kada su u pitanju interakcije između proteina i lecitina jeste pH vrednost. S obzirom da proteini i fosfolipidi poseduju naelektrisanja i mogu biti jonizovani, tako pH može uticati na modifikaciju njihovih karakteristika kao površinski aktivnih materija i hidrodinamičkih interakcija između uljanih kapljica u emulziji (McClements, 1999). Autori Comas i sar. (2006) u svojoj studiji su pokazali da su sistemi sa denaturisanim proteinima i lecitinom stabilni na pH vrednostima daljim od izoelektrične tačke proteina, dok je kod nativnih proteina ta stabilizacija omogućena samo na nižim pH vrednostima. Uloga lecitina najverovatnije jeste doprinos površinskom naelektrisanju na interfejsu, pre nego u povećanju površinske aktivnosti. U skladu sa tim, može se smatrati da su razlike u ovim sistemima između proteina i lecitina uzrokovane upravo razlikama u naelektrisanju, kao i u strukturi proteina (Xu i sar., 2011).

3. PRIMENA SISTEMA SA INKAPSULIRANIM ETARSKIM ULJIMA

Inkapsulirana etarska ulja našla su razne primene u poljima prehrambene, farmaceutske, poljoprivredne i tekstilne industrije (Alikhani i Garmakhany, 2012; Chung i sar., 2013; Golja i sar., 2013; Ribeiro-Santos i sar., 2017).

Interesovanje potrošača značajno je poraslo za hranom obogaćenom sastojcima prirodnog porekla. Ipak, izazov u proizvodnji ovih namirnica koji se ogleda u stabilnosti proizvoda je veliki. Inkapsulirana etarska ulja korišćena su u *in vitro* i *in vivo* aplikacijama u hrani od strane velikog broja istraživača, kao prirodni konzervansi. Donsi i sar. (2011) koristili su nanoemulzije etarskog ulja čajevca kao dodatak sokovima pomorandže i kruške u cilju produženja roka trajanja. Slično tome, rastvor eugenola je korišćen za produženje roka trajanja mleka (Shah i sar., 2012).

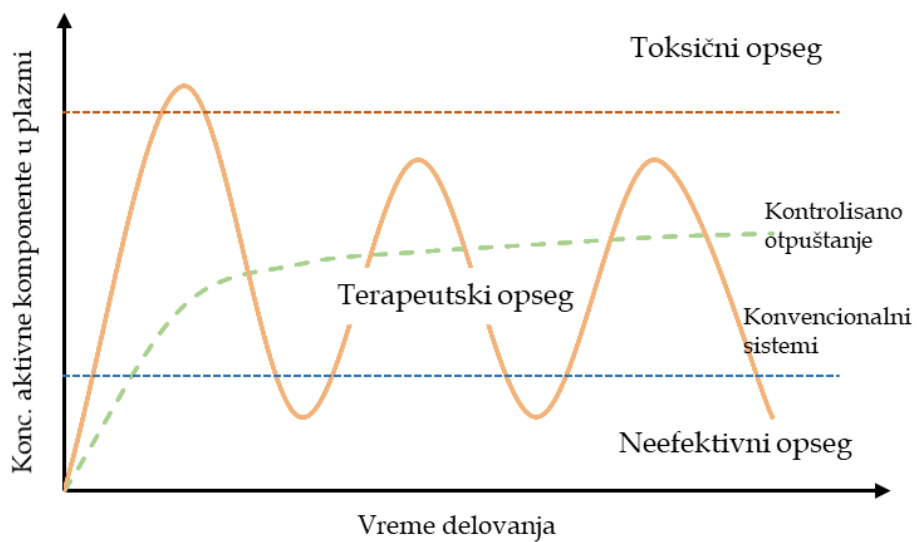
Novi načini zaštite hrane od spoljašnjih i unutrašnjih faktora podstakli su prehrambenu industriju za razvijanjem novog koncepta pakovanja. Naime, aktivna pakovanja (premazi ili filmovi) intereaguju sa proizvodom apsorbujući ili oslobađajući jedinjenja iz/u hranu. U tu svrhu kao materijali koriste se ugljeni hidrati, proteini i lipidi, sa inkapsuliranim etarskim uljima zahvaljujući širokom spektru antimikrobnih aktivnosti (Ribeiro-Santos i sar., 2017). Dodatno, *in vitro* primena inkapsuliranih etarskih ulja protiv *E. coli* (0.20-0.05%), *S. aureus* (0.10-0.05%) i *P. areuginosa* (0.20-0.10%) dovela je do smanjenja minimalne baktericidne koncentracije etarskog ulja origana za 2-4 puta u poređenju sa slobodnim uljem (Arana-Sánchez i sar., 2010).

U cilju kontrole virusa herpesa (HSP1), etarsko ulje drvenastog pelina inkapsulirano u lipozome pokazalo se kao adekvatna zamena za lek, pri čemu su lipozomi bili aktivni u duplo nižoj koncentraciji u poređenju sa slobodnim uljem (Sinico i sar., 2005).

Mikrokapsule na bazi kalcijum alginata sa inkapsuliranim karvakrolom korišćene su za kontrolu enteričkih bolesti kod svinja. Ispitivanje *in vitro* otpuštanja mikroinkapsuliranog karvakrola pokazalo je ograničeno otpuštanje u stomaku, sporo otpuštanje u tankom crevu i značajno otpuštanje u debelom crevu (Zhang i sar., 2015). Sličnu primenu inkapsulirani karvakrol našao je kao dodatak stočnoj hrani, sa kontrolisanim otpuštanjem u donjem intestinalnom traktu pilića u cilju eliminacije antibiotika (Zhang i sar., 2014).

Cilj dizajniranja sistema za kontrolisano otpuštanje jeste smanjenje učestalosti doziranja ili povećanje efikasnosti leka lokalizacijom na mestu dejstva, smanjenje potrebne doze ili obezbeđivanje uniformne dostave lekovite supstance. U sistemima za oralnu primenu najveća potreba je održavanje konstantne koncentracije lekovite supstance u krvnoj plazmi (Slika 3.1) tokom određenog perioda, kako bi se smanjila učestalost doziranja (Kaur i sar., 2018). Uprkos

napredovanju u drugim sistemima za dostavu lekovitih materija, oralni sistemi za kontrolisano otpuštanje dominiraju na tržištu.



Slika 3.1. Šematski prikaz profila otpuštanja aktivne komponente iz različitih sistema

DEO II

Eksperimentalni deo

Poglavlje 4 – materijali i metode

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

U eksperimentalnom delu rada korišćeno je etarsko ulje timijana (*Thymus vulgaris* L.) domaćeg proizvođača Prima kozmetika d.o.o. Beograd. Prirodni polimer korišćen za inkapsulaciju je natrijum-alginat (Alginic acid sodium salt, PanReac AppliChem, Nemačka), molekulske mase 10,000 g/mol do 600,000 g/mol i odnosa manuronskih i glukuronskih jedinica M/G=1.38. Kalcijum-hlorid di-hidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Analytika, Ltd., Češka) korišćen je kao izvor jona Ca^{2+} u rastvoru za geliranje. U postupku inkapsulacije, pored natrijum-alginata, korišćeni su izolat proteina soje (Brenntag, Irska) i sojin lecithin (Sojaprotein d.o.o, Bečej, Srbija). Natrijum hidroksid (NaOH) korišćen u postupku denaturacije proteina soje proizvod je kompanije Alfapanon, Srbija. Za pripremu fluida za simulaciju uslova gastrointestinalnog trakta korišćeni su pepsin (Sigma Aldrich, Nemačka), pankreatin (MP Biomedicals, LLC, Francuska), žučne soli (Biolife, Italija), kao i natrijum-hidrogen-karbonat (NaHCO_3) i natrijum-hlorid (NaCl) kompanije Centrohem, Beograd, Srbija. Hlorovodonična kiselina (HCl) je proizvod kompanije Fluka (Nemačka) i korišćena je za pripremu rastvora različitih pH vrednosti. Timol (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Nemačka), korišćen je kao analitički standard. Folin-Ciocalteu reagens, 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-katjon), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), bakar (II) hlorid (CuCl_2), neokuproin, kao i rastvarači HPLC čistoće - metanol i acetonitril su proizvodi kompanije Sigma Aldrich (St. Louis, SAD). Natrijum karbonat (Na_2CO_3) i natrijum citrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) su proizvodi kompanije Fisher Scientific, Velika Britanija. Bakteriološki agar i M17 bujon proizvodi su kompanije Torlak, Beograd, Srbija. Amonijum acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) je proizvod kompanije Centrohem, Stara Pazova, Srbija.

4.2. Određivanje sadržaja bioaktivnih komponenti etarskog ulja

4.2.1. Određivanje ukupnih polifenola - FC metoda

Sadržaj ukupnih polifenola u etarskom ulju timijana određen je spektrofotometrijski (UV-Vis 1800, Shimadzu spektrofotometar), korišćenjem FC reagensa (*engl.* Folin Ciocalteu's) prema modifikovanoj metodi Malićanin i sar. (2014). Naime, reakciona smeša sadržala je 100 μl uzorka u koji je dodato 900 μl rastvora methanol:voda (10:90), zatim 250 μl rastvora FC reagens:voda (1:2) i na kraju je dodato 750 μl rastvora natrijum-karbonata (5%). Ovako pripremljen uzorak čuvao se na tamnom mestu 2 h, nakon čega je podvrgnut spektrofotometrijskoj analizi. Apsorbance nastalog plavičastog obojenja očitavale su se na talasnoj dužini od 765 nm, a kao slepa proba koristila se slično napravljena reakciona smeša u koju je umesto uzorka dodato 100 μl destilovane vode, želudačnog ili pankreasnog fluida ili kalcijum hlorida, u zavisnosti od prirode uzorka. Sva merenja rađena su u triplicatu.

4.2.2. Određivanje timola – HPLC metoda

Etarsko ulje timijana podvrgnuto je analizi tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (*engl.* High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) u cilju kvantitativnog određivanja sadržaja timola. Za analizu je korišćen HPLC uređaj (Nexera X2, Shimadzu) opremljen RID 20A detektorom i Gemini NX-C18 hromatografskom kolonom (250 x 4,6 mm², 5µm veličina čestica). Mobilna faza sastojala se od acetonitrila i vode (u odnosu 50:50). U hromatografski sastav injektirano je 20 µl centrifugiranog uzorka, pri protoku od 1 ml/min i talasnoj dužini od 274 nm. Timol je identifikovan poređenjem vremena zadržavanja (Rt) izdvojenih pikova na hromatogramu sa vremenom zadržavanja standarda. Kvantitativna determinacija omogućena je korišćenjem kalibracione krive timola. Prikupljanje i obrada podataka dobijenih HPLC analizom omogućena je primenom posebnog računarskog programa Chem32 Chromatography Workstation. Sve analize su ponovljene po tri puta.

4.3. Formulacija i karakterizacija emulzija

U I fazi eksperimentalnog rada formulisana je serija emulzija tipa u/v, stabilizovana denaturisanim proteinima soje (INCI: *Soy protein isolate*, SPI). Kao masna faza korišćeno je etarsko ulje timijana (INCI: *Thymus vulgaris*). Emulzije su izrađene u prisustvu polimernog stabilizatora vodene faze (INCI: *Sodium Alginate*, Na-AL) u koncentracijama koje su predložene u literaturi, kako bi se ispitaio njegov uticaj na stabilnost sistema. Pored toga, serija emulzija izrađena je sa dodatkom cviterjonskog surfaktanta - sojinog lecitina (INCI: *Soy lecithin*, L). Za svaku formulaciju čiji je sastav prikazan u *Tabeli 4.1a* i *Tabeli 4.1b* uzorci su pripremljeni istim postupkom, sa ciljem da se utvrdi uticaj različitih koncentracija komponenata na stabilnost sistema i da se odabere optimalni odnos.

Tabela 4.1a. Sastav izrađenih emulzija – Tip I

| Formulacija | Alginat | Sojin protein | Ulje timijana |
|----------------|---------|---------------|---------------|
| | mas. % | mas. % | µl |
| Na-AL1/SP0 | 1 | / | 150 |
| Na-AL1/SP1 | 1 | 1 | 150 |
| Na-AL1/SP1.5 | 1 | 1.5 | 150 |
| Na-AL1.5/SP1 | 1.5 | 1 | 150 |
| Na-AL1.5/SP1.5 | 1.5 | 1.5 | 150 |
| Na-AL2/SP1 | 2 | 1 | 150 |
| Na-AL2/SP1.5 | 2 | 1.5 | 150 |
| Na-AL2.5/SP1 | 2.5 | 1 | 150 |
| Na-AL2.5/SP1.5 | 2.5 | 1.5 | 150 |

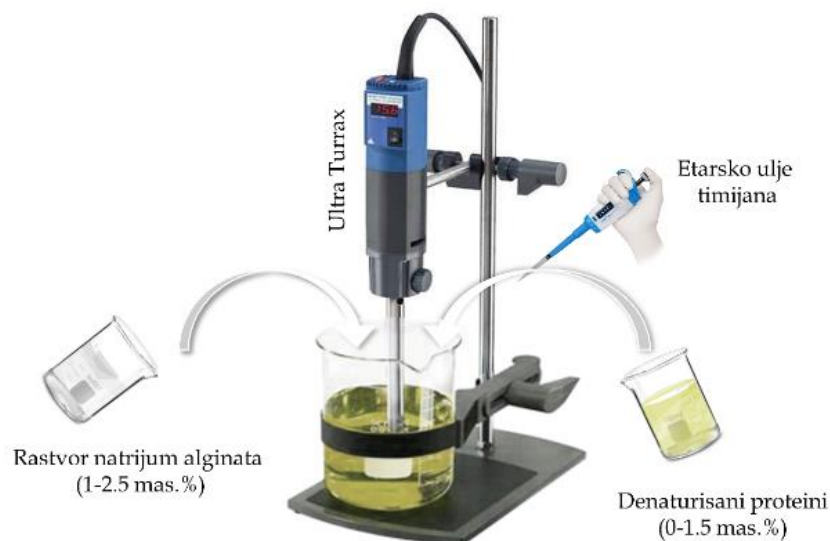
Tabela 4.1b. Sastav izrađenih emulzija – Tip II

| Formulacija | Alginat | Sojin protein | Ulje timijana | Lecitin |
|-----------------|---------|---------------|---------------|---------|
| | mas. % | mas. % | μl | mg |
| Na-A1/SP1 | 1 | 1 | 100 | / |
| Na-A1/SP1.5 | 1 | 1.5 | 125 | / |
| Na-A1.5/SP1 | 1.5 | 1 | 125 | / |
| Na-A1.5/SP1.5 | 1.5 | 1.5 | 150 | / |
| Na-A2/SP1 | 2 | 1 | 150 | / |
| Na-A2/SP1.5 | 2 | 1.5 | 175 | / |
| Na-A1/SP1/L | 1 | 1 | 100 | 250 |
| Na-A1/SP1.5/L | 1 | 1.5 | 125 | 313 |
| Na-A1.5/SP1/L | 1.5 | 1 | 125 | 313 |
| Na-A1.5/SP1.5/L | 1.5 | 1.5 | 150 | 375 |
| Na-A2/SP1/L | 2 | 1 | 150 | 375 |
| Na-A2/SP1.5/L | 2 | 1.5 | 175 | 437 |

4.3.1. Postupak izrade emulzija

Svi uzorci emulzija pripremljeni su identičnim postupkom. Alginat i protein u praškastom obliku, prethodno zadate koncentracije, rastvarani su u vodi u odvojenim posudama i uz blago mešanje. Nakon toga, vršen je postupak denaturacije proteina podešavanjem pH vrednosti rastvora (pH 8, NaOH), a zatim i zagrevanjem na 80 °C tokom 40 min. Tako pripremljeni rastvori na sobnoj temperaturi su pomešani sa uljem timijana i emulzifikacija je izvršena intenzivnim mešanjem pomoću Ultra-Turrax mešalice (*Slika 4.1*) na 12000 rpm, u trajanju od 3 min.

Postupak pripreme emulzija u prisustvu lecitina je vrlo sličan, sa izmenjenim redosledom dodavanja komponenata; lecitin se dodavao u smešu proteina i ulja, a zatim je dodat i rastvor alginata. Emulzifikacija je vršena mešanjem pri istim parametrima.



Slika 4.1. Postupak pripreme emulzija na bazi Na-alginata, SPI i ulja timijana

4.3.2. Određivanje stabilnosti emulzija

Veličina kapi i površinsko (zeta) naelektrisanje kapi ispitani su metodom laserske difrakcije pomoću uređaja čiji rad se zasniva na foton-korelacionoj spektroskopiji (Zetasizer Nano Series, Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Uzorci su razblaženi dejonizovanom vodom pre analiziranja. Merenja su vršena na sobnoj temperaturi, u triplikatu.

4.3.3. Ramanova spektroskopija

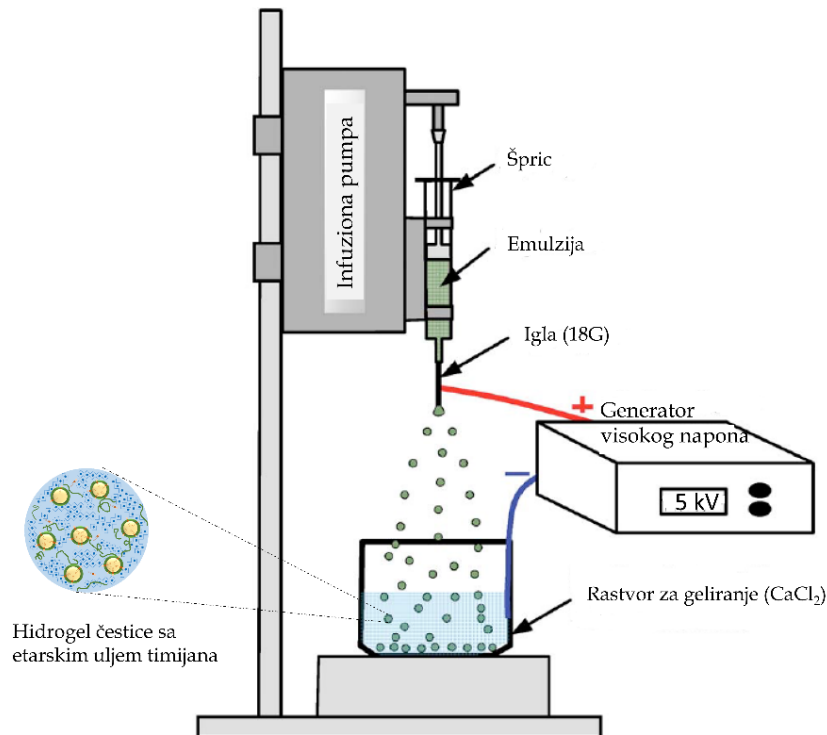
Ramanova spektroskopija primenjena je na čiste polazne komponente (natrijum alginat, SPI i ulje timijana), kao i na emulziju. Pripremljeni uzorci su snimani Raman mikroskopom XploRA (Horiba Jobin Yvon), na sobnoj temperaturi, primenom lasera Nd/YAG talasne dužine od 532 nm, sa rešetkom od 1200 zareza po 1 mm. Snimanje je vršeno u oblasti talasnih brojeva od 200 do 3250 cm^{-1} , pri čemu je region između 1800 i 2770 cm^{-1} bio isključen. Spektri su dobijeni pri izlaganju uzoraka laseru u trajanju od 5 s, a svaki uzorak je sniman 10 puta uz korišćenje 100% filtera. Snimanje je vršeno pri spektralnoj rezoluciji sa korakom od 4 cm^{-1} . Prikupljanje podataka dobijenih Raman analizom omogućeno je primenom LabSpec softvera 6.0 (Horiba Jobin Yvon), a dobijeni podaci su analizirani korišćenjem Origin Pro 8.6 softvera (OriginLab, Northampton, MA, USA).

4.3.4. Ispitivanje viskoznosti rastvora polimera

Ispitivanje viskoznosti rastvora natrijum-alginat/SPI (Na-AL/SP) u različitim masenim odnosima vršeno je pomoću Haake MARS reometra (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany) opremljenim sa dve paralelne ploče (PP35S, 35 mm prečnika). Sva merenja su izvedena na temperaturi od 25 °C, u tri ponavljanja.

4.4. Priprema hidrogelova sa inkapsuliranim etarskim uljem

Priprema hidrogelova sa inkapsuliranim uljem timijana obuhvatala je metodu ekstruzije sa primenom elektrostatičkog napona (elektrostatička ekstruzija) (Slika 4.2). Pojedini uzorci u cilju boje vizuelizacije pripremljeni su metodom jednostavnog ukapavanja. Uzorak (10 ml) prethodno izrađene emulzije je prebačen u plastični špric i istiskivan kroz iglu (18G) infuzionom pumpom (Razel, Scientific Instruments, Stamford, CT), stalnim zapreminskim protokom (39.3 ml/h). Kapi su sakupljane u 2% rastvoru kalcijum-hlorida (rastvor za geliranje) uz blago mešanje magnetnom mešalicom, pri čemu je dolazilo do očvršćavanja kapi u čestice sferičnog ili manje sferičnog oblika. Rastojanje između vrha igle i rastvora za ukapavanje iznosilo je 6 cm. U cilju dobijanja čestica manjeg prečnika iz generatora visokog napona (Model 30R, Bertan Associates, Inc., New York) izvedena je pozitivna elektroda i povezana sa iglom, a u rastvor kalcijum-hlorida uronjena je uzemljena elektroda. Na ovaj način se između vrha igle i gornjeg nivoa rastvora kalcijum-hlorida stvara određeno električno polje, pa se tečnost koja je potiskivana pumpom kroz špric do vrha igle otkida u obliku mlaza sitnih naelektrisanih kapljica pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile. Napon je iznosio 5 kV.



Slika 4.2. Šematski prikaz inkapsulacije etarskog ulja timijana u hidrogel čestice primenom tehnike elektrostatičke ekstruzije

Po završetku procesa ukapavanja čestice su u cilju očvršćavanja ostavljene u rastvoru kalcijum-hlorida narednih 15 min, uz blago mešanje (Manojlovic i sar. 2006). Nakon isteka zadatog vremena formirane čestice su izdvojene iz rastvora filtriranjem i izmerene na analitičkoj vagi. Ovako dobijene hidrogel čestice sadržale su etarsko ulje timijana.

4.5. Karakterizacija dobijenih inkapsuliranih sistema

Pripremljene čestice na bazi alginata i proteina soje sa inkapsuliranim uljem timijana su u daljim analizama korišćene ili odmah nakon pripreme (hidrogel) ili u suvom stanju. Suve čestice su dobijene sušenjem hidrogel čestica na sobnoj temperaturi u toku 24 h, kako bi se neutralisale posledice intenzivnog sušenja, tj. promena oblika čestica.

Obeležavanje dobijenih sistema vršeno je na sličan način kao i obeležavanje emulzija (*Tabela 4.1a, 4.1b*), s tim što nakon geliranja Na-alginata dolazi do izmene jona, pa su čestice dobijene geliranjem emulzije npr. Na-AL1.5/SP1.5 obeležene kao AL1.5/SP1.5.

4.5.1. Bubrenje hidrogel čestica

Bubrenje hidrogelova na bazi alginata i proteina soje ispitivano je gravimetrijski, u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima (GI).

Kako bi se u potpunosti simulirali uslovi u GI traktu, kao i prosečno vreme koje uneta hrana provodi u njemu, bubrenje hidrogelova je ispitivano na temperaturi od 37 °C, potapanjem sveže napravljenih hidrogel čestica (~ 3 g) u želudačni fluid, u vremenskom periodu od 1 h, da bi odmah nakon toga čestice bile prenete u pankreasni fluid, pri čemu je bubrenje praćeno narednih 4 h. Želudačni i pankreasni sokovi su sveže napravljeni pre svakog eksperimenta, po proceduri Wu i sar. (2017). Najpre, za pripremu želudačnog fluida, 4387.5 mg natrijum-hlorida (NaCl) i 157.5 mg natrijum-bikarbonata (NaHCO₃) rastvoreni su u 500 ml vode. Tako dobijenoj smeši vrednost pH podešena je na 1.6 dodavanjem 5.0 M HCl. Na kraju, 92.4 mg pepsina dodato je u napravljen rastvor zadate pH vrednosti, sprečavajući enzimsku deaktivaciju u prisustvu jake kiseline. Na sličan način pripremljen je pankreasni fluid, rastvaranjem 2250 mg NaHCO₃ i 851.4 mg žučnih soli u 500 ml vode. Dodatkom NaOH, pH vrednost rastvora podešena je na 6.2, a zatim je dodato 283.8 mg pankreatina. U toku izvođenja eksperimenata čestice u medijumu za bubrenje su blago mešane (150 obr/min) kako bi se simulirali pokreti u gastro-intestinalnom traktu.

Masa uzoraka hidrogelova je merena u unapred određenim vremenskim intervalima, a sva merenja su vršena tri puta. Step en bubrenja (%) računat je prema jednačini:

$$\eta = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

gde je m_t masa nabubrelog hidrogela u trenutku t , a m_0 početna masa hidrogela.

4.5.2. Optička mikroskopija i sferičnost čestica

U cilju određivanja veličine čestica i raspodele njihovih veličina, vršeno je snimanje čestica optičkim mikroskopom Olympus CX41RF, koji poseduje softver za analizu dobijenih mikrografija „CellA” (Olympus, Tokyo, Japan). Hidrogelovi su pod optičkim mikroskopom analizirani odmah nakon formiranja (polimerni lanci u relaksiranom stanju), a zatim i u suvom stanju. Analizirani su uzorci od 30 čestica iz svake formulacije. Dobijene mikrografije korišćene su za računanje faktora proporcionalnosti (*engl.* Aspect ratio, *AR*) i faktora sferičnosti (*SF*) hidrogel i suvih čestica prema jednačinama (Chan, 2011):

$$AR = \frac{d_{\max}}{d_{\min}} \quad (2)$$

$$SF = \frac{d_{\max} - d_{\min}}{d_{\max} + d_{\min}} \quad (3)$$

gdje je d_{\max} najveći, a d_{\min} najmanji prečnik čestice.

AR varira od 1 za savršenu sferu, do beskonačnosti, dok SF predstavlja faktor deformacije i varira od 0 do 1, pri čemu nula opisuje idealnu sferu.

4.5.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Površinska morfologija nosača ispitivana je pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (*engl.* Scanning Electron Microscopy, SEM) (Tescan Mira3 XMU, Cranberry Township, SAD). Uzorci hidrogelova analizirani su nakon sušenja na sobnoj temperaturi tokom 24 h. Neposredno pred SEM analizu, uzorci su napareni legurom zlata i platine u uslovima vakuuma, korišćenjem uređaja Polaron SC502.

4.5.4. ATR-FTIR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija sa Furijerovom transformacijom (FTIR) primenjena je na čiste polazne komponente i suve čestice, sa i bez inkapsuliranog etarskog ulja. Infracrveni spektri uzoraka snimljeni su tehnikom atenuirane totalne refleksije (ATR) na spektrometru Nicolet iS10 (ThermoScientific, Sweden), u rasponu talasnih brojeva od 4000-500 cm^{-1} .

4.5.5. Reološka svojstva hidrogel čestica

Reološka ispitivanja ponašanja hidrogel nosača izvedena su pomoću Haake MARS reometra (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany). Prilikom merenja korišćene su paralelne ploče (PP35S, 35 mm prečnika i 1 mm zazora). Odgovor materijala je zabeležen u opsegu 1-10 Hz pri naponu od 10 Pa (što odgovara viskoelastičnom ponašanju materijala). Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

4.5.6. Određivanje mehaničkih karakteristika hidrogel čestica

Mehaničke karakteristike hidrogel čestica su određene metodom kompresije, primenom uređaja za mehaničko ispitivanje materijala (*engl.* AG-Xplus Universal Testing Machine, Shimadzu, Japan) opremljenim sa mernom ćelijom od 100 N. Eksperimenti su izvedeni tako što su hidrogelovi (srednji prečnik 2 ± 0.2 mm) potapani u Petri-šolje sa destilovanom vodom, u cilju dobijanja što merodavnijih rezultata za ovaj tip uzoraka (Tomović i sar., 2015). Brzina kompresije i procenat deformacije uzoraka su unapred zadate veličine koje predstavljaju ključni faktoru u ispitivanju mehaničkih svojstava. Tako, brzina kompresije je iznosila 1 mm/min, pri deformaciji uzoraka do 30%, a sva testiranja su vršena na temperaturi od 25 °C. (Chan i sar., 2011; Obradović i sar., 2015). Vršeno je ispitivanje uticaja inkapsulacije, koncentracije polimera (alginata i proteina soje), kao i lecitina, na mehaničku stabilnost sistema. Za analizu prikupljenih eksperimentalnih podataka i definisanja polaznih parametara korišćen

je softver (Trapezium X 1.13, Shimadzu, Japan). Merenja su rađena na 30 uzoraka na sobnoj temperaturi.

4.5.7. Ispitivanje termičke stabilnosti nosača

Karakteristike nosača u pogledu zaštite inkapsuliranog etarskog ulja ispitivane su na temperaturama od 50, 75 i 100 °C. Pripremljene hidrogel čestice (5 g) raspoređene su podjednako u Petri-šolje i osušene na sobnoj temperaturi. Nakon 24 h izdvojen je 1 g čestica (kontrolni uzorak), a ostali uzorci su podvrgnuti termičkom tretmanu u prethodno zagrejanom laboratorijskom pećnici na definisanoj temperaturi. Po 1 g tretiranih čestica je uzorkovan na svakih 1 h, ukupno 4 h. Nakon uzorkovanja čestice su degradirane u smeši natrijum-citrat (3%): metanol (90:10), a rastvori su dalje podvrgnuti centrifugiranju. Alikvoti uzoraka (400 µl) pomešani su sa 750 µl natrijum-karbonata i 250 µl FC reagensa i nakon 2 h očitana je apsorbanca. Apsorbanca tretiranih uzoraka upoređena je sa apsorbancom kontrolnog uzorka. Rezultati su izraženi kao procenat ukupnih polifenola ulja timijana u česticama nakon termičkog tretmana, pri čemu je procenat (apsorbanca) kontrolnog uzorka 100% (1).

4.6. Određivanje stepena efikasnosti inkapsulacije etarskog ulja

4.6.1. Efikasnost inkapsulacije ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola (TPC) ulja timijana računata je prema modifikovanoj metodi autora Malićanin i sar. (2014), prethodno opisanoj u odeljku 4.2.1.

Efikasnost inkapsulacije (EE) je računata iz podataka o ukupnom sadržaju polifenola ulja timijana u česticama i teorijskom sadržaju polifenola, kao što je prikazano u jednačini (4):

$$EE (\%) = \frac{TPC_u}{TPC_i} \times 100 \quad (4)$$

gde je TPC_u ukupni sadržaj polifenola koji su inkapsulirani hidrogelove, a TPC_i je ukupni sadržaj polifenola u etarskom ulju timijana korišćenom za inkapsulaciju.

4.6.2. Efikasnost inkapsulacije timola

Efikasnost inkapsulacije (EE_t) računata je i na osnovu podataka o sadržaju timola u česticama. Za određivanje koncentracije inkapsuliranog timola korišćena je HPLC metoda, prethodno opisana u odeljku 4.2.2.

4.7. Ispitivanje kinetike otpuštanja etarskog ulja iz hidrogel čestica

Kinetika otpuštanja ulja timijana iz hidrogel čestica praćena je u uslovima koji simuliraju gastro-intestinalni trakt (pH, T, enzimi, soli), a procedura pripreme želudačnog i pankreasnog soka opisana je u odeljku 4.5.1.

4.7.1. Otpuštanje ukupnih polifenola ulja timijana

Količina otpuštenih polifenola ulja timijana u alikvotima je određena definisanjem TPC u njima, prema FC metodi, kao što je opisano u odeljku 4.2.1. Naime, 3 g hidrogel čestica potopljeno je u 50 ml želudačnog soka, a uzorkovanje (100 µl) je vršeno u tačno određenim

vremenskim intervalima. Zatim, čestice su prebačene u pankreasni sok (50 ml) i uzorkovanje je nastavljeno do potpune degradacije čestica. Nakon završenog uzorkovanja, alikvoti su pomešani sa prethodno pripremljenim rastvorima reagenasa i nakon 2 h vrednosti apsorbance su očitane na spektrofotometru, na talasnoj dužini od 765 nm.

4.7.2. Otpuštanje etarskog ulja - HPLC metoda

HPLC analiza (detaljno opisana u odeljku 4.2.2.) uzoraka dobijenih iz eksperimenata otpuštanja rađena je u cilju određivanja sadržaja timola. Praćenje otpuštanja timola u simuliranim uslovima GI trakta, odnosno uzorkovanje, vršeno je na isti način kao što je opisano u odeljku 4.7.1.

4.8. Primena matematičkih modela na kinetiku otpuštanja etarskog ulja

Eksperimentalno dobijeni profili otpuštanja upoređeni su sa jednostavnim nelinearnim populacionim modelom (s obzirom da je kinetika otpuštanja ulja u želudačnom i intestinalnom fluidu nelinearna), koji opisuje porast broja ili koncentracije nekih entiteta u uslovima različitih restriktivnih efekata. U ovom slučaju restriktivni efekti dolaze od difuzionih otpora unutar čestica nosača. Entiteti mogu biti veoma raznovrsni, od molekula, preko restriktivnog rasta ćelija, do različitih životinjskih vrsta.

Kinetika otpuštanja ulja može biti opisana logističkom jednačinom (Cambel, 1993):

$$\frac{\partial v(t)}{\partial t} = \mu v(t) - b v(t)^2 \quad (5)$$

gde je $v(t)$ zapremina otpuštenog ulja, μ predstavlja kinetičku konstantu (specifična brzina otpuštanja ulja), pri čemu je $\mu = 1/\tau_R$, a τ_R je relaksaciono vreme. Prvi izraz sa desne strane predstavlja kinetički termin, dok drugi objašnjava efekte otpora na oslobađanje ulja izazvane ulje-protein interakcijama. Model jednačina (5) može biti analitički rešena polazeći od početnih i graničnih uslova: (1) na $t=0$, zapremina otpuštenog ulja je $v(0)=v_0$ i (2) kada $t \rightarrow t_{eq}$, zapremina otpuštenog ulja dostiže ravnotežnu vrednost $v(t_{eq})=v_{eq}$ za odgovarajuće uslove okruženja.

Granični uslov ukazuje na odnos između parametara modela kao: $b = \mu/v_{eq}$.

Rešenje se može izraziti kao:

$$v(t) = \frac{v_{eq} v_0 e^{\mu t}}{v_{eq} - v_0 + v_0 e^{\mu t}} \quad (6)$$

4.9. Antioksidativna aktivnost

U cilju ispitivanja antioksidativne aktivnosti uzoraka, hidrogel čestice (1 g) su podvrgnute razgradnji rastvorom natrijum-citrata (2%), a zatim su dobijeni rastvori centrifugirani 5 min na 7000 rpm. Izdvojeni supernatant koji je sadržao ulje timijana korišćen je za dalju analizu. Antioksidativni kapacitet inkapsuliranog etarskog ulja timijana izražen je kao antioksidativni kapacitet ekvivalentan Trolox-u (*engl.* Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC).

4.9.1. ABTS antiradikalska aktivnost

TEAC je procenjen na osnovu testa obezbojavanja ABTS katjonskog radikala (Re i sar., 1999). Da bi došlo do nastanka $ABTS^{\bullet+}$, vodeni rastvor ABTS-a (0.38%, 5 ml) pomešan je sa vodenim rastvorom kalijum-persulfata (3.8%, 88 μ l) i reakciona smeša je skladištena oko 16 h u frižideru. Radni rastvor pripremljen je razblaživanjem osnovnog rastvora metanolom kako bi se postigla vrednost apsorbance od oko 0.700 ($A_{734nm}=0.700\pm 0.020$). Alikvoti uzoraka (30 μ l) pomešani su sa rastvorom ABTS radikala (2 ml) i apsorbance na 734 nm je očitana nakon 6 min. Smeša metanola (30 μ l) i rastvora ABTS radikala (2 ml) predstavljala je kontrolu. Za svaku formulaciju čestica izračunat je procenat neutralizacije ABTS radikala. Rezultati dobijeni iz tri merenja izraženi su kao μ mol Trolox $g_{\text{čestica}}^{-1}$.

4.9.2. CUPRAC redukciona moć

Sposobnost aktivnih komponenata inkapsuliranog etarskog ulja da redukuju metalne jone ispitana je na jonima bakra (Cu^{2+}), CUPRAC metodom (Apak i sar., 2007). Rastvori $CuCl_2$ (50 μ l, 10 mM), neokuproina (50 μ l, 7.5 mM) i CH_3COONH_4 pufer (60 μ l, 1 M, pH 7.0) pomešani su sa alikvotima uzoraka (100 μ l). Reakcione smeše su inkubirane 1 h u vodenom kupatilu na 30 °C. Apsorbance je merena na spektrofotometru, na 450 nm. Trolox je korišćen za konstrukciju standardne krive (0.03-0.25 mmol/l), a aktivnost uzoraka je izražena kao μ mol Trolox $g_{\text{čestica}}^{-1}$.

4.9.3. Antioksidativna aktivnost termički tretiranih čestica sa inkapsuliranim etarskim uljem

Nakon termičkog tretmana čestica, opisanog u odeljku 4.5.7., ispitivana je antioksidativna aktivnost i to ABTS antiradikalska aktivnost i CUPRAC redukciona moć, po procedurama opisanim u odeljcima 4.9.1. i 4.9.2. Rezultati su izraženi kao procenat antioksidativne aktivnosti čestica nakon tretiranja, pri čemu je apsorbance kontrolnog uzorka 100 (%).

4.10. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost hidrogel čestica sa inkapsuliranim uljem timijana je testirana na dva Gram-pozitivna soja *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Bacillus cereus* ATCC 11778, jedan Gram-negativni soj *Escherichia coli* ATCC 25922 i jedan soj kvasca *Candida albicans* ATCC 10259. Svi testirani sojevi pripadaju „American Type Culture Collection“ (ATCC, Manassas, VA, SAD).

Sterilne hidrogel čestice (alginat/SPI/ulje) su pažljivo dodate u erlenmajere, gde je 4 g čestica pomešano sa 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora (0.85% w/v NaCl) obogaćenog sa Tween 80 (polysorbate 80) emulgatorom u finalnoj koncentraciji od 0.5% (v/v) u cilju povećanja rastvorljivosti ulja timijana. Sadržaj erlenmajera je pažljivo promešan i inokuliran sa jednim od testiranih mikroorganizama (kulture nisu bile starije od 18h), tako da je inicijalni broj ćelija u suspenziji varirao u opsegu 10^5 - 10^6 CFU/ml. Nakon toga, erlenmajeri su inkubirani u vodenom kupatilu na 37 °C uz blago mešanje narednih 24 h. Istovremeno, alginat/SPI čestice bez etarskog ulja korišćene su kao kontrola. Nakon inkubacije od 24 h, 100 μ l tečnog uzorka je pažljivo pipetirano iz svakog erlenmajera i direktno preneto u Petri šolje. Zatim, serijska (desetostruka) razblaženja uzoraka pripremljena su u fiziološkom rastvoru pre nego što je 100

μ l odgovarajućeg razblaženja dodato u Petri šolju. Sadržaj u Petri šoljama homogenizovan je sa rastopljenim hranljivim agarom (1.5 mas.%, 55 °C) i inkubiran 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije, sve Petri šolje su vizuelno pregledane i one sa formiranim kolonijama su prebrojane. Eksperimenti su urađeni u duplikatu i broj živih ćelija izražen je kao CFU (*engl.* colony forming units).

4.11. Statistička analiza

Svi eksperimenti su ponavljani tri puta (osim u slučaju da je drugačije naglašeno), a rezultati su izraženi kao srednja vrednost sa standardnim devijacijama. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA ONE-WAY) u kombinaciji sa Tukey i Kruskal-Wallis testovima korišćena je 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).

DEO III

Rezultati i diskusija

Poglavlje 5 – karakterizacija emulzionih sistema

Poglavlje 6 – karakterizacija alginat/SPI hidrogel sistema

Poglavlje 7 – karakterizacija alginat/SPI/lecitin hidrogel sistema

5. KARAKTERIZACIJA EMULZIONIH SISTEMA

Kako u ovom radu emulzifikacija predstavlja pred-korak ekstruziji u cilju dobijanja čestica sa inkapsuliranim etarskim uljem, karakteristike emulzija, odnosno tečnih sistema u velikoj meri mogu ukazati na svojstva potencijalnih hidrogel sistema. Priprema, naelektrisanje na površini uljanih kapi, viskoznost emulzija i interakcije između komponenata veoma su važne sa aspekta stabilnosti emulzija, pa je stoga njihovo ispitivanje bitno za bolju karakterizaciju dobijenih hidrogelova.

5.1. Naelektrisanje na površini uljanih kapi

Određivanje ζ -potencijala, odnosno naelektrisanja na površini uljanih kapi daje uvid u stabilnost emulzija.

Reprezentativne formulacije emulzija, sa nativnim i denaturisanim proteinima u postupku pripreme, upoređene su sa ciljem procene uticaja denaturacije na njihovu stabilnost. Naime, dobijena vrednosti ζ -potencijala za emulzije stabilizovane nativnim proteinima je negativna i iznosi -19.1 ± 0.6 mV, dok je za emulzije stabilizovane denaturisanim proteinima ova vrednost još niža i iznosi -43.0 ± 0.3 mV, odmah nakon pripreme. Dobijene vrednosti ζ -potencijala u oba slučaja potiču od negativnog naelektrisanja proteina (kao i alginata) u neutralnim pH uslovima, na kojima je stabilnost emulzija ispitivana. Objašnjenje za dodatno nižu vrednost ζ -potencijala emulzija stabilizovanih denaturisanim proteinima leži u činjenici da denaturacija proteina dovodi do izlaganja hidrofobnih, negativno naelektrisanih grupa proteina, kao posledica razmotavanja proteinskih globula u čijoj se unutrašnjosti inače nalaze. Brojnim istraživanjima (Dickinson, 1992; Palazolo i sar., 2004; Dapuetto i sar., 2019) je takođe pokazano da denaturacijom proteina dolazi do povećanja stabilnosti emulzija. Naime, proteini, kada se koriste za stabilizaciju emulzija imaju tendenciju da formiraju naelektrisane i stabilne granice faza. Drugim rečima, oni stvaraju strukturne slojeve oko uljanih kapi koji se međusobno odbijaju (Derkach, 2009) i koji imaju ulogu u smanjenju flokulacije i koalescencije, stabilizujući na taj način emulziju.

Prethodno zapažanje se može potvrditi i vrednostima veličine uljanih kapi ispitivanih emulzija. Naime, rezultati ukazuju da su kapljice ulja stabilizovane denaturisanim proteinima (323 ± 10 , u prečniku) bile skoro tri puta manje od onih stabilizovanih nativnim proteinima (920 ± 45 , u prečniku). Prema Stokes-ovom zakonu, brzina kretanja kapljica proporcionalna je kvadratu njihovog poluprečnika, a veći prečnik ima veću tendenciju ka agregaciji što dovodi do veće verovatnoće sudara (McClements, 2005).

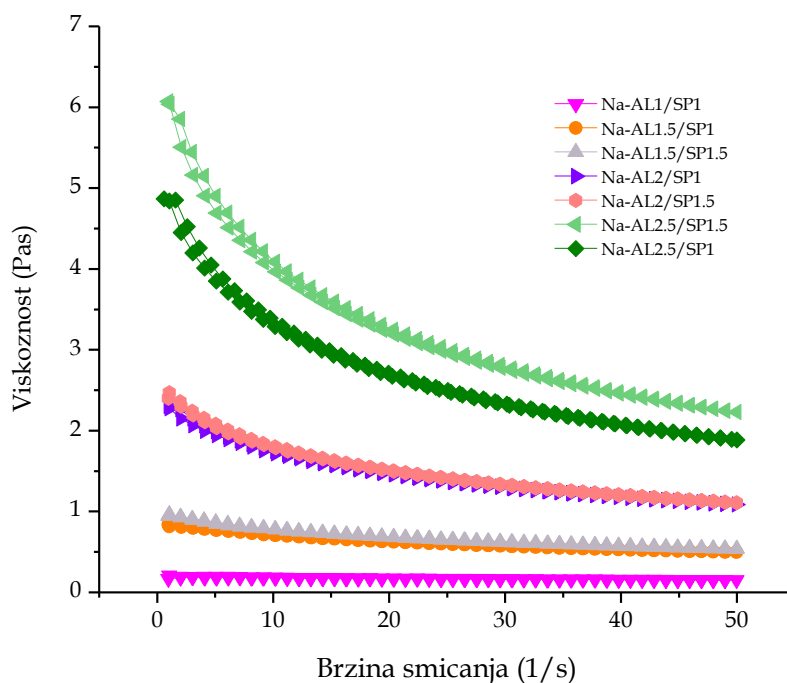
5.2. Reološka svojstva emulzija

Dostupna literatura koja se bavi ispitivanjem reoloških osobina emulzija bazira se na uticaju polimera, masne faze, emulgatora ili stabilizatora na reološko ponašanje. U velikom broju tih radova uticaj polimera (vrsta i koncentracija) ima značajnu ulogu u pojedinim senzornim karakteristikama proizvoda (Ilyin i sar., 2015; Carro i sar., 2017). Zbog toga je od velike važnosti u ovom radu bilo izvršiti procenu uticaja koncentracije alginata i proteina soje na reološke osobine, kao i vezu između reoloških karakteristika emulzija i fizičko-hemijskih i mehaničkih karakteristika dobijenih hidrogel čestica. S obzirom da su u ovim merenjima ispitivani sistemi sa konstantnom količinom ulja (Tip I), uticaj uljane faze se mogao zanemariti.

5.2.1. Uticaj koncentracije alginata i proteina soje na reološka svojstva Na-AL/SPI/ulje emulzija

Na *Slici 5.1* prikazana je zavisnost viskoznosti od brzine smicanja za različite proporcije natrijum alginata i proteina soje.

Optimizacija alginat/SPI hidrogel sistema obuhvata pripremu rastvora polimera različitih koncentracija. Promena u koncentraciji jednog ili oba polimera koja ulaze u sastav emulzija izazvala je manje ili veće promene u viskoznosti ispitivanih sistema. Naime, dobijene smeše rastvora Na-alginata od 1 i 1.5 mas.% pokazale su približno njutnovsko ponašanje, dok je dalji porast koncentracije ovog polimera doveo do pseudoplastičnog ponašanja i rastečnjavanja (*engl.* shear thinning) prilikom smicanja. Kao očekivani rezultat, povećanje koncentracije Na-alginata od 1 mas.% do 2.5 mas.%, pri istom sadržaju proteina, doveo je do značajnog povećanja viskoznosti.



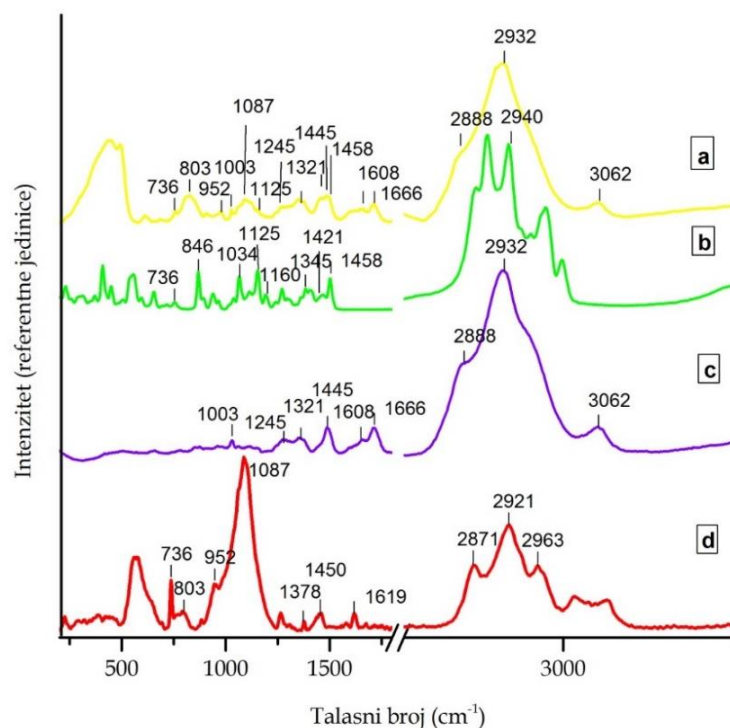
Slika 5.1. Viskoznost rastvora polimera (Na-alginata i SPI) u zavisnosti od brzine smicanja

Sa druge strane, efekat povećanja viskoznosti rastvora usled povećanja koncentracije proteina (sa 1 na 1.5 mas.%) je takođe primećen, ali statistički značajno samo u slučaju kada je koncentracija alginata iznosila 2.5 mas.%. Ovaj rezultat može biti posledica povećanog uplitanja polimernih lanaca i porasta obima inter- i intramolekulskih interakcija (tj. vodoničnih veza) alginatnih molekula (Voo i sar., 2015), kao i međusobnih interakcija alginata i proteina koje su opisane u nastavku teze.

5.3. Analiza Na-AL/SPI/ulje emulzije i čistih komponenata primenom Ramanove spektroskopije

Ramanova vibraciona spektroskopska analiza primenjena je na Na-alginat/SPI/ulje emulziju, kao i na čiste komponente (Na-alginat i SPI u prahu, etarsko ulje timijana), u cilju identifikacije karakterističnih Ramanovih traka koje odgovaraju hemijskoj strukturi ispitivanih uzoraka (*Slika 5.2*). Na taj način, prisustvo β -D manuronske (M) i α -L guluronske (G) kiseline, koje ulaze u sastav alginata, bilo je moguće identifikovati (*Slika 5.2a,b*). Karakteristične vibracije C-H rastezanja koje se javljaju u vidu široke trake najvećeg intenziteta u Ramanovom spektru, nalaze se na oko 2930 cm^{-1} talasne dužine. U spektralnom regionu od $1270\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ trake na pozicijama 1345 , 1421 i 1458 cm^{-1} se odnose na C - H i C - O - H deformacione vibracije. Dodatno, trake na oko 1125 i 1160 cm^{-1} ukazuju na prisustvo C - O, C - C i C - O - C istežućih vibracija, koje su karakteristične za G jedinice (Sartori i sar. 1997; Driskell i sar. 2005), s obzirom da se svaka traka može javiti kao posledica doprinosa dve ili više vrsta pokreta (Synytsya i sar. 2003; Cardenas-Jiron i sar. 2011). Region između 750 i 950 cm^{-1} je karakterističan za alginat i predstavlja tzv. „otisak prsta“ (*engl. fingerprint*) alginatnih uzoraka. U sklopu ovog regiona, traka na 846 cm^{-1} se odnosi na C - C skeletne istežuće vibracije, dok su trake ispod 700 cm^{-1} karakteristične za deformacije u piranoznih prstenova i C - O - C vibracije glikozidnih veza u alginatu. Prema nekim studijama (Sartori i sar., 1997; Pereira i sar., 2003; Pielesz, 2007), karakteristične grupe G i M jedinica u Ramanovom spektru pripadaju regionu od 1000 do 1100 cm^{-1} , dok je studija Cardenas-Jiron i sar. (2011) pokazala da se „*fingerprint*“ region nalazi između 800 i 960 cm^{-1} .

Ramanov spektar proteina soje prikazan je na *Slici 5.2c*. S obzirom da proteini emituju visoku fluorescenciju (Vandenabeele i sar., 2000) u spektralnom regionu od 1800 do 2770 cm^{-1} , taj region je isključen u prikazanom spektru. Analizom spektra emulzije zaključuje se da region od 1000 do 1666 cm^{-1} pripada proteinima (*Slika 5.2a*). Karakteristični region Ramanovog spektra za proteine („*fingerprint*“) u emulziji ukazuje na prisustvo C=O istežuće vibracije i N - H mahajućih vibracija (*engl. wagging*) u peptidnim vezama koje potiču od Amid I veze na 1666 cm^{-1} , zatim na CH₂ savijanje (*engl. bending*) na 1445 cm^{-1} i Amid III vezu na poziciji 1245 cm^{-1} , uzrokovane C - N istežućim vibracijama i N - H grupom (Alleavitch i sar., 1990; Lin-Vien i sar., 1991; Zhu i sar., 2011). Trake slabog intenziteta na 1003 cm^{-1} (oštar pik) i 1608 cm^{-1} potiču najverovatnije od ostataka fenilalanina u uzorku (Zhu i sar., 2011; Lee i sar., 2013), kao jedne od komponenata sirovog proteina soje.



Slika 5.2. Ramanovi spektri emulzije (a), kao i njenih komponentata (alginata (b), SPI (c) i ulja timijana (d)) u spektralnom regionu od 200 do 3250 cm^{-1}

Osnovne komponente etarskog ulja timijana su fenoli, odnosno timol, karvakrol, p-cimen (sa benzenovim prstenom u strukturi) i γ -terpinen koji se sastoji od prstena sa 6 ugljenikovih atoma i dve C=C veze (Tawaha i Hudaib, 2012). Ramanov spektar svih prethodno navedenih komponentata dostupan je kao literaturni podatak (Schulz i sar., 2003; Schulz i sar., 2005). Ramanov spektar etarskog ulja (*Slika 5.2d*) ukazuje na postojanje traka na sledećim pozicijama: 1619, 1450, 1378, 1087, 803 i 736 cm^{-1} , koje su karakteristične za ulje timijana. Detaljnije, traka na 1619 cm^{-1} potiče od istežanja aromatičnog prstena p-cimena. Karakteristična traka ulja timijana na 1450 cm^{-1} odnosi se na CH_3/CH_2 savijanje (*engl.* bending). Zatim, traka na 1378 cm^{-1} potiče od savijanja CH_3 grupe koja je povezana sa aromatičnim prstenom. Traka u regionu 1600-1000 cm^{-1} (1087 cm^{-1}) je pripisana C - H vibracijama savijanja unutar benzenovog prstena (Larkin i sar., 2011). Dodatno, traka veoma slabog intenziteta na 952 cm^{-1} ukazuje na deformacije benzenovog prstena poreklom od p-cimena, dok su signali na 736 i 803 cm^{-1} („out-of-plane“ C - H savijajućih vibracija) jačeg intenziteta i ukazuju na prisustvo timola (Schulz i sar., 2003; Schulz i sar., 2005; Schulz i Baranska, 2007; Vargas Jentsch i sar., 2015).

Analizom spektra emulzije (*Slika 5.2*) zaključuje se da su pojedine trake koji su karakteristične za etarsko ulje timijana i ovde prisutne (kao što su trake na 1087, 952 i 803 cm^{-1}), dok su drugi signali (npr. na 736 cm^{-1}) niskog intenziteta ili pak nisu detektovani. Sa druge strane, trake karakteristične za čist alginat (2940, 1160 i 846 cm^{-1}) su maskirane drugim trakama, dok su trake koje ukazuju na protein slabijeg intenziteta (2932 cm^{-1}) ili potpuno umanjene (1445 cm^{-1}) u spektru Na-alginat/SPI/ulje, ukazujući na interakcije između ovih komponentata, kao i na agregaciju molekula proteina (koja uključuje raskidanje vodoničnih veza). Dobijeni rezultati ukazuju da su komponente etarskog ulja najverovatnije okružene molekulima

proteina i u interakciji sa njima, zahvaljujući hidrofobnim karakteristikama denaturisanih proteina, dok se alginat nalazi u kontinualnoj fazi. Prema Rowley i sar. (1999) kovalentna (Amidna) veza može biti formirana između terminalnog amida u peptidnom molekulu i karboksilne grupe alginata. Drugi autori su zaključili da etarsko ulje, odnosno njegove komponente, kao što je karvakrol, podstiču aglomeraciju proteina (Arfa i sar., 2007; Arancibia i sar., 2014). Na osnovu analize FTIR spektroskopijom, Zheng i sar. (2007) ukazali su na postojanje vodoničnih veza između alginata i SPI u kompleksnim mikrosferama, dok su Wang i sar. (2006) izneli tvrdnju o dobroj kompatibilnosti između molekula alginata i izolata proteina soje.

Na osnovu rezultata dobijenih primenom Ramanove spektroskopije može se potvrditi polazna teza da denaturisani proteini obrazuju film oko kapljica ulja, na način na koji to čine emulgatori, dok se alginat nalazi u okruženju, što je potvrđeno karakterističnim trakama datih komponenata u emulziji. Ovo saznanje olakšava razumevanje i karakterizaciju hidrogel sistema nastalih ekstruzijom polaznih emulzija.

6. KARAKTERIZACIJA ALGINAT/SPI HIDROGEL SISTEMA

Hidrogelovi, odnosno čestice na bazi alginata i proteina soje, prazne i sa inkapsuliranim uljem timijana, proizvedene su tehnikom elektrostatičke ekstruzije potiskivanjem prethodno pripremljenih emulzija u rastvor kalcijum hlorida. Tako dobijene hidrogel čestice korišćene su, odmah nakon pripreme ili u suvom stanju, u cilju njihove karakterizacije.

6.1. FTIR analiza

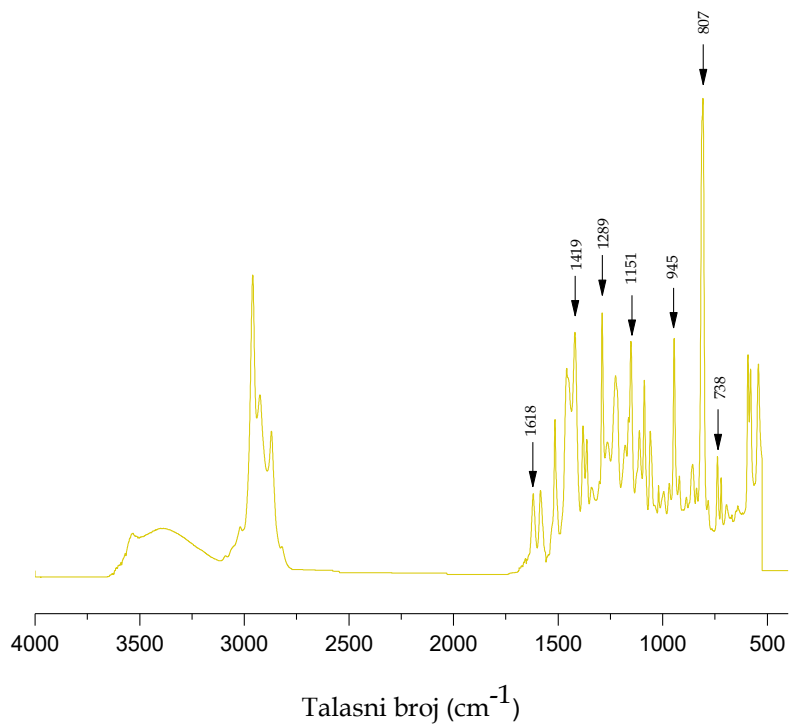
Analiza uzoraka pomoću FTIR spektroskopije primenjuje se u cilju identifikacije karakterističnih funkcionalnih grupa: veza nastalih u nosaču, odnosno interakcija alginat-proteini soje, a zatim i za identifikaciju veza uspostavljenih između inkapsuliranog ulja i polimernog nosača.

6.1.1. FTIR analiza čistih komponenti

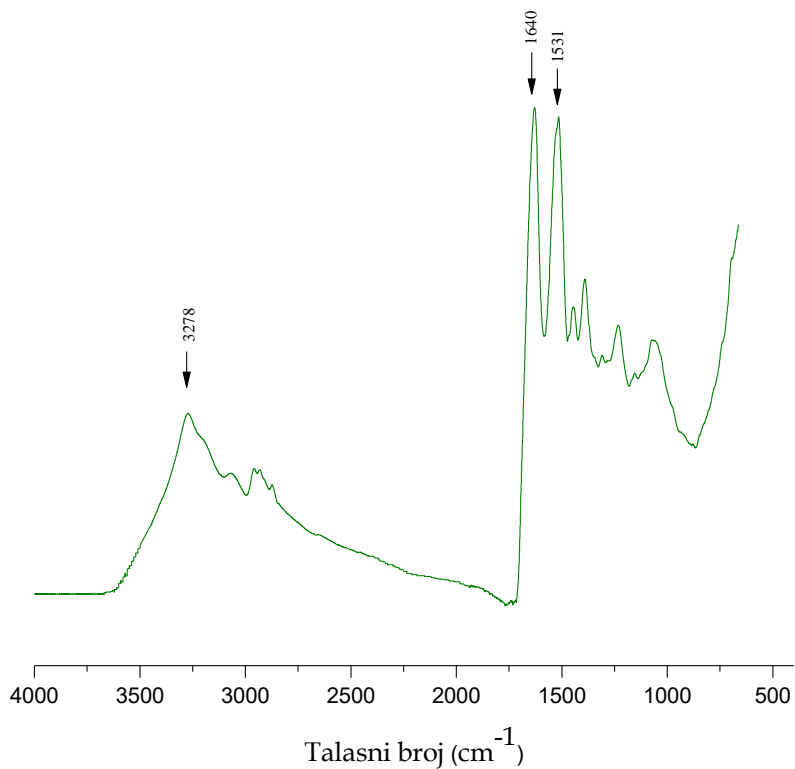
Na *Slikama 6.1-6.3.* prikazani su spektri čistih komponenti, odnosno ulja timijana, izolata proteina soje i Na-alginata sa očekivanim talasnim dužinama koje bi učestvovala u interakcijama.

FTIR spektri etarskih ulja ovog tipa najčešće obuhvataju region od 1800 do 600 cm^{-1} talasne dužine. Naznačena oblast talasnih dužina može se videti na *Slici 6.1.* Ovaj region ukazuje na prisustvo različitih komponenti u etarskom ulju, kao što su fenolna jedinjenja. U zavisnosti od načina ekstrakcije i hemijskog sastava, spektar jednog istog tipa ulja može se znatno razlikovati. IR spektar ispitivanog etarskog ulja timijana, s obzirom na visok sadržaj timola, veoma je sličan IR spektru koji odgovara etarskom ulju origana (timol tip), odnosno hemotipu bosiljka (Schulz i sar., 2003). Najintenzivniji pikovi na 807 i 738 cm^{-1} pripisani su upravo vibracijama timolovog prstena. Takođe, karakterističan region između 1370 i 1460 cm^{-1} talasne dužine, sa maksimumom na 1419 cm^{-1} , ukazuje na deformacije CH_2 - grupe.

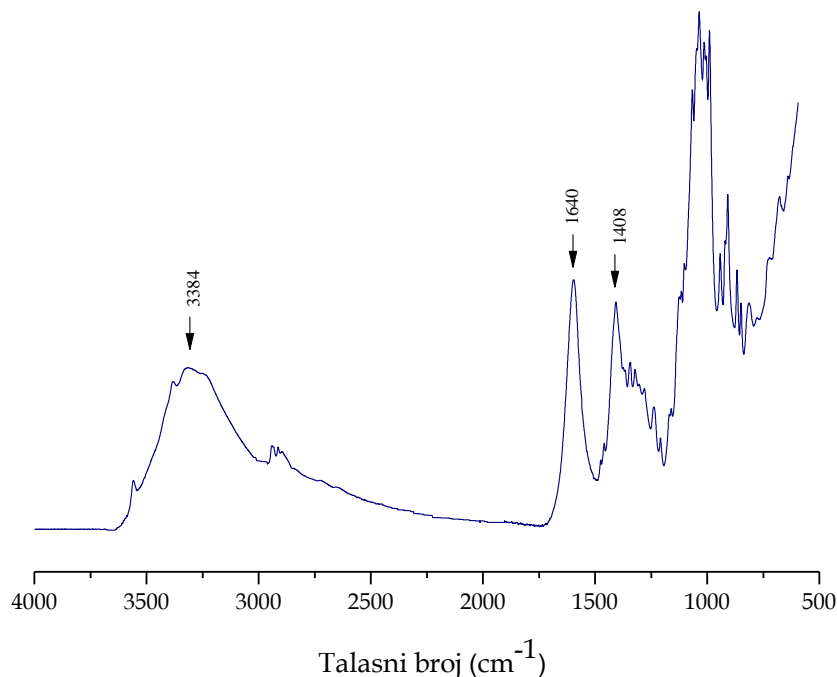
IR spektar izolata proteina soje prikazan je na *Slici 6.2.* Opseg talasnih dužina između 1600 i 1700 cm^{-1} , sa maksimumom na 1640 cm^{-1} , ukazuje na postojanje Amid I (Wang i sar., 2011) veze na kojoj se zasniva sekundarna struktura proteina (uglavnom β -ravni), odnosno koja predstavlja najintenzivniju apsorpcionu traku polipeptida. Pored pomenutog, sa spektra se može uočiti i traka na 1531 cm^{-1} (Amid II) (Zheng i sar., 2007), pri čemu obe intenzivne trake potiču od peptidne veze proteina. Dodatno, signal koji ukazuje na postojanje Amid A veze (NH istezanje) javlja u vidu široke trake na oko 3278 cm^{-1} talasne dužine (Kong i Yu, 2007).



Slika 6.1. ATR-FTIR analiza spektra etarskog ulja timijana



Slika 6.2. ATR-FTIR analiza spektra izolata proteina soje (SPI)



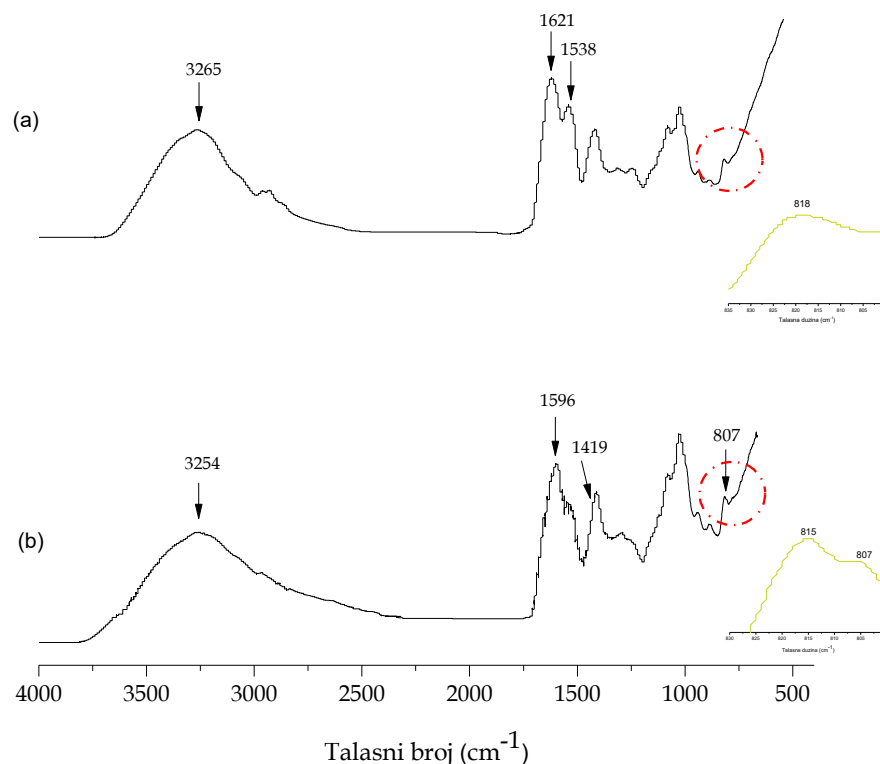
Slika 6.3. ATR-FTIR analiza spektra natrijum-alginata

U IR spektru natrijum-alginata (*Slika 6.3*), opseg talasnih dužina između 3700 i 3000 cm^{-1} , sa maksimumom na 3384 cm^{-1} , ukazuje na vibraciono istezanje O-H grupe alginata. Pored toga, sa spektra se mogu uočiti dve intenzivne apsorpcione trake, na 1600 i 1408 cm^{-1} talasne dužine, koje su posledica asimetričnih i simetričnih vibracionih istezanja karboksilne grupe, redom. Takođe, prisutni su signali u regionu između 1200 i 800 cm^{-1} koji se preklapaju, a koji većinom pripadaju C-O vezama šećernih monomera.

6.1.2. FTIR analiza alginat/SPI hidrogel sistema

ATR-FTIR spektri alginat/SPI čestica, praznih (P-A1.5/SP1.5) i sa inkapsuliranim etarskim uljem (A1.5/SP1.5), prikazani su na *Slici 6.4*.

U spektru čestica bez ulja (*Slici 6.4a*) apsorpcione trake koje pripadaju proteinima deluju kao najizraženije. U skladu sa izvršenom denaturacijom proteina u postupku pripreme emulzija, kao i usled interakcija razmotanih delova proteina sa alginatom (Silva i sar., 2014), apsorpciona traka koja potiče od Amid I veze proteina na 1640 cm^{-1} (C=O vibracije istezanja) pomerena je ka 1621 cm^{-1} talasne dužine. Karbonilna grupa alginata vidljiva je kao „rame” na traci koja pripada peptidnoj vezi, pri čemu nije najjasnije da li ima značajnog pomeranja ove grupe ili ne.



Slika 6.4. Uporedna ATR-FTIR analiza spektara (a) alginat/SPI i (b) alginat/SPI/ulje čestica

Nakon inkapsulacije praćene su promene u oblastima koje odgovaraju etarskom ulju timijana. Nasuprot spektru praznih čestica, sa *Slika 6.4b* može se uočiti prisustvo dva signala slabijeg intenziteta koja se vide kao „ramena” susednih traka, a koja pripadaju ulju: na ~ 807 cm^{-1} i 1419 cm^{-1} talasne dužine, ukazujući na ostvarenu inkapsulaciju ulja timijana u alginat/SPI hidrogel sisteme.

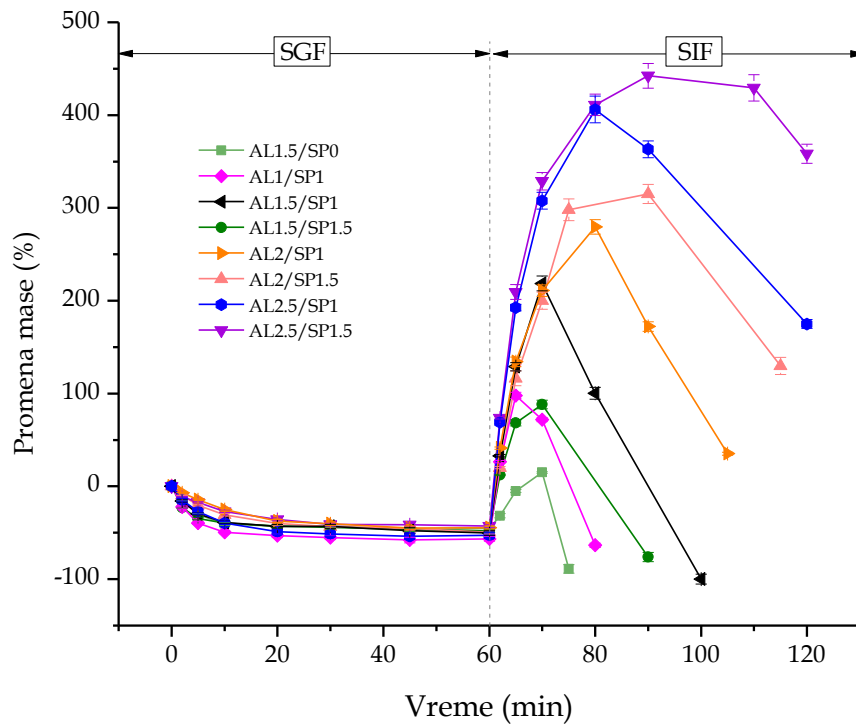
6.2. Bubrenje alginat/SPI hidrogel sistema u simuliranim GI uslovima

Kako otpuštanje etarskog ulja iz ispitivanih hidrogel sistema predstavlja proces koji se odigrava simultano sa procesom bubrenja, od velike je važnosti ispitati kinetiku bubrenja, tj. apsorpciju gastro-intestinalnih (GI) fluida u hidrogelove.

Na *Slici 6.5* prikazano je dinamičko bubrenje praćeno na osnovu promene mase hidrogel čestica u simuliranim GI uslovima (37 $^{\circ}\text{C}$, pH, enzimi, soli). Naime, bubrenje hidrogelova se najpre odigravalo u simuliranom želudačnom fluidu (SGF) u vremenskom periodu od 1 h, a zatim su čestice prenete u simulirani intestinalni fluid (SIF) gde je proces bubrenja praćen narednih 2 h, odnosno do degradacije čestica.

U SGF-u, primećeno je kontrahovanje hidrogel čestica u prvih 20 min, uglavnom usled gubitka negativnog naelektrisanja karboksilnih grupa u kiseloj sredini, što za posledicu ima slabljenje elektrostatičkog odbijanja između alginatnih lanaca (Pasparakis i Bouropoulos, 2006). Dodatni razlog za gubitak mase je taj što je jedan deo proteinskih molekula otpušten i hidrolizovan pod dejstvom pepsina (Zhang i sar., 2016; Zhang i sar., 2017). U skladu sa tim,

kod uzoraka je primećen gubitak mase od ~40%, što se poklapa sa podacima koji se odnose na stepen kontrahovanja alginata u SGF-u (Pasparakis i Bouropoulos, 2006). Nakon ovog vremenskog intervala, čestice su ostale dalje nepromenjene usled elektrostatičkih interakcija između protonovanih $-NH_3^+$ grupa proteina ($pI=4.6$) i nejonizovanih $-COOH$ grupa alginata.



Slika 6.5. Bubrenje hidrogel čestica na bazi alginata i proteina soje u SGF-u i SIF-u

Nakon što su prebačene u SIF, došlo je do apsorpcije fluida i bubrenja čestica. Stepenn bubrenja za sve ispitivane uzorke iznosio je od 60 do 240% njihove početne mase, što je zatim praćeno raspadom i rastvaranjem hidrogelova u vremenskom intervalu od 5 do 25 minuta, u zavisnosti od formulacije. Drugim rećima, nakon ovog vremena u SIF-u došlo je do potpune degradacije čestica, pa time i do gubitka mase, što je predstavljeno krajnjim taćkama na dijagramu.

Mehanizam bubrenja alginata mođe se objasniti jonskom razmenom monovalentnih Na^+ jona iz simuliranog intestinalnog fluida, sa Ca^{2+} jonima prisutnim u polimanuronskim i poliguluronskim blokovima alginatnih lanaca. Kao rezultat navedenog, dolazi do smanjenja gustine umreženih lanaca uglavnom usled redukovanog elektrostatičkog privlaćenja između naelektrisanih karboksilnih grupa alginata i manje gusto naelektrisanih hidratisanih natrijumovih jona. Istovremeno, molekuli proteina soje su difundovali kroz hidrogel čestice i digestirani. Autori Zhang i sar. (2016) su zaključili da se difuzija molekula proteina surutke iz alginatnih mikrogelova u baznoj sredini odigrava brže nego što je to slučaj u kiseloj sredini. U drugoj studiji, Zhang i sar. (2017) došli su do zaključka da molekuli proteina surutke zarobljeni u alginatnoj matrici bivaju lakše digestirani u intestinalnom medijumu nego u stomaku, zbog činjenice da se veličina pora alginatnih hidrogelova znaćajno povećava, tako prevazilazeći

dimenzije digestivnih enzima (Sarkar i sar., 2015). Ta činjenica omogućava proteazama da se lagano kreću kroz biopolimerni matriks.

Maksimalna vrednost bubrenja, izražena u procentima, u zavisnosti od koncentracije natrijum-alginata iznosila je 90% za AL1.5/SP1.5, 320% za AL2/SP1.5 i 420% za AL2.5/SP1.5. Pored toga, porast koncentracije alginata u formulacijama ima uticaj na vreme dostizanja kritične tačke bubrenja nakon koje čestice prelaze u fazu raspada. Autori Bajpai i Sharma (2004) dokazali su da kiselo-tretirani alginatni gelovi manje bubre u odnosu na netretirane gelove iz razloga što se alginatni matriks, kada je izložen niskim pH vrednostima, konvertuje u alginatnu kiselinu što rezultuje smanjenjem stepena umreženosti i otuda bržoj degradaciji. Naime, kada se kiselo-tretirane čestice prebace u pufer pH 7.4 tada bubre većom brzinom, ali ne postižu veću vrednost unosa tečnosti zbog slabo vezane strukture čestica koja je u nemogućnosti da zadrži veliku količinu vode unutar matrice. Sa *Slike 6.5* može se uočiti da proteini doprinose većoj brzini apsorpcije fluida. Intenzivnija apsorpcija fluida, kao rezultat veće gustine alginatno-proteinske mreže, može se objasniti činjenicom da su u SIF-u digestirani proteini i molekuli alginata povratili svoja negativna naelektrisanja (pH je daleko iznad pKa vrednosti anjonskih karboksilnih grupa), što za posledicu ima elektrostatičko odbijanje između njih, odnosno bubrenje alginatno-proteinske matrice.

Potrebno je naglasiti da se ovi rezultati odnose samo na promenu mase čestica, međutim, informacije o eroziji uzoraka usled degradacije ne smeju se izvoditi zasebno, s obzirom da se proces bubrenja može odvijati istovremeno sa oslobađanjem proteina i promenom mikrostrukture.

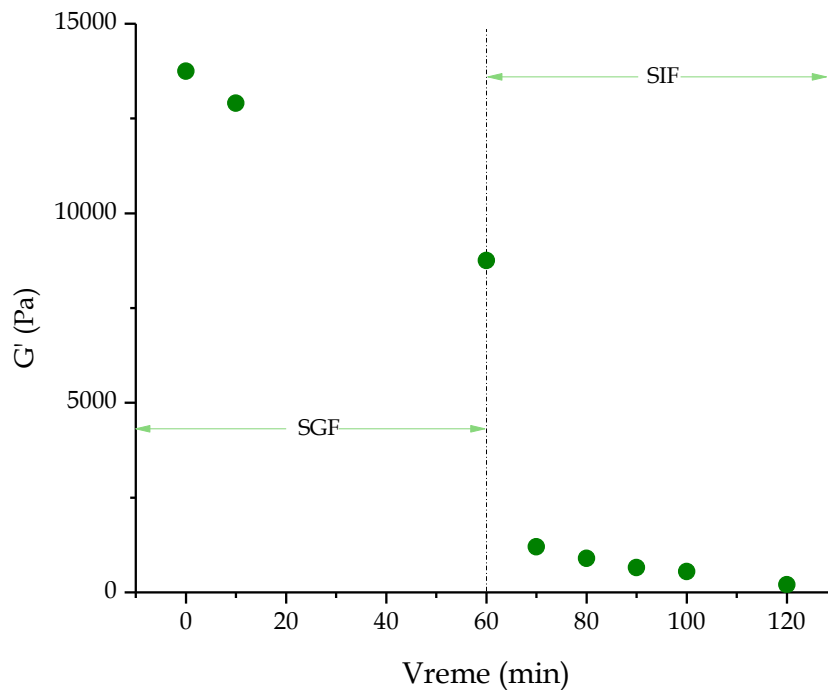
6.3. Uticaj simuliranih GI uslova na reološko ponašanje alginat/SPI hidrogel sistema

Analiza reololoških svojstava alginat/SPI nosača, na osnovu dobijenih vrednosti dinamičkih modula, pruža bolji uvid u ponašanje ovog tipa nosača u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima (SGF-u i SIF-u). Dobijene vrednosti za modul elastičnosti (G') u simuliranim uslovima ukazuju na krutost materijala čije smanjenje je proporcionalno smanjenju stepena elastičnosti. Do slabljenja nosača dolazi isključivo zbog uslova u kojima se ispituju reološka svojstava, što za posledicu ima hidrolizu alginata i proteina soje.

Sa *Slike 6.6*, koja predstavlja promenu modula elastičnosti sa vremenom, može se uočiti postepeno smanjenje krutosti alginat/SPI nosača tokom celog perioda u SGF-u, iako je promena mase zaustavljena nakon 20 min (*Slika 6.5*), kao i otpuštanje ulja (*Slika 6.13*). Slabljenje (smanjenje krutosti) nosača nastaje kao posledica relaksacije alginatnih lanaca usled smanjene gustine pakovanja, odnosno smanjenog međusobnog elektrostatičkog privlačenja, a zatim i usled odbijanja pozitivno naelektrisanih molekula proteina (pI 4.6). Kao rezultat navedenog procesa, dolazi do ekspanzije, odnosno širenja hidrogel matrice, što omogućava slobodan pristup H^+ jonima i enzimima (pepsinu) u čijem prisustvu dolazi do hidrolize alginata i proteina soje.

U skladu sa izvršenom denaturacijom proteina u postupku pripreme emulzija, hidroliza ovakvih molekula se odvija mnogo brže nego što bi to bilo u slučaju nativnih proteina (O'Loughlin i sar., 2012). Sa druge strane, interakcije između lanaca polisaharida i pepsina su

intenzivnije ukoliko je prisutan veći broj glikozidnih veza u lancima polisaharida, kao i ukoliko je vrednost izoelektrične tačke polisaharida (α -L-guluronske kiseline 3,65; β -D-manuronske kiseline 3,38) niža, što je slučaj upravo kod alginata.



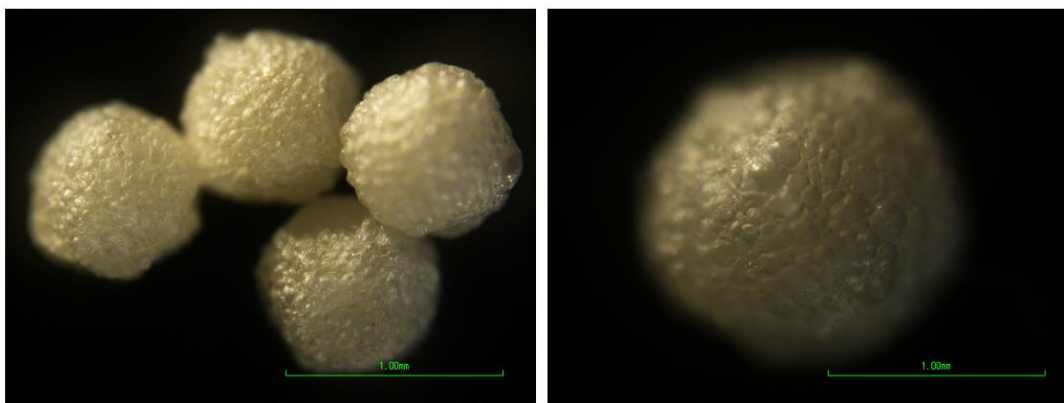
Slika 6.6. Uticaj GI uslova na vrednosti modula elastičnosti (G') za hidrogel čestice (AL1.5/SP1.5) u vremenskom intervalu od 2 h.

Nakon transfera čestica u SIF, dolazi do naglog pada modula elastičnosti u prvih 10 min, što je u korelaciji sa njihovim najintenzivnijim bubrenjem (*Slika 6.5*) i otpuštanjem ulja (*Slika 6.13*), dok je do daljeg slabljenja nosača dolazilo postepeno.

6.4. Izgled i veličina alginat/SPI hidrogel sistema

Veličina inkapsuliranih sistema ima značajnu ulogu sa aspekta bubrenja nosača, a zatim i otpuštanja etarskog ulja. Takođe, veličina i oblik imaju važnu ulogu kada se govori o primeni ovih sistema u prehrambenoj industriji. Naime, potrebno je pronaći balans između velikih čestica, koje su neophodne za postizanje produženog otpuštanja i čestica manje veličine i pravilnijeg oblika koje su poželjne sa aspekta teksturnih i senzornih karakteristika prehrambenih proizvoda, sa ciljem da se zadovolje želje potrošača.

Na *Slici 6.7* prikazane su mikrofografije reprezentativnog uzorka čestica (AL1.5/SP1.5) dobijene elektronskim mikroskopom.



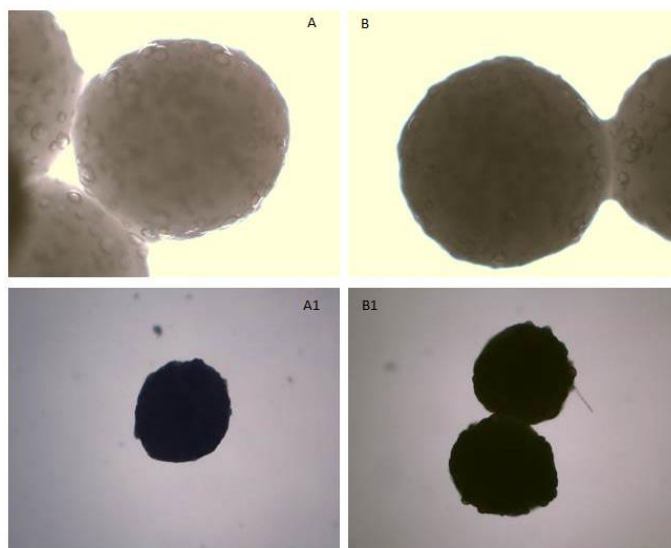
Slika 6.7. Elektronske mikrofografije suvih AL1.5/SPI1.5 čestica

Pored toga što su svi uzorci proizvedeni tehnikom elektrostatičke ekstruzije, pod identičnim uslovima, značajno se razlikuju u veličini i obliku (*Tabela 6.1*). Veličina hidrogel čestica varira između ~ 1.3 mm i ~ 2.4 mm u prečniku, dok su suve čestice redukovane veličine u poređenju sa svojim hidrogel analogima (0.6-1.4 mm u prečniku). Oblik čestica prikazan je preko veličina kao što su faktor proporcionalnosti (*engl.* aspect ratio, AR) i faktor sferičnosti (*engl.* sphericity factor, SF). Prema autorima Chan i sar. (2009), faktor proporcionalnosti dobro opisuje velike deformacije, dok faktor sferičnosti opisuje relativnu promenu oblika mnogo efikasnije.

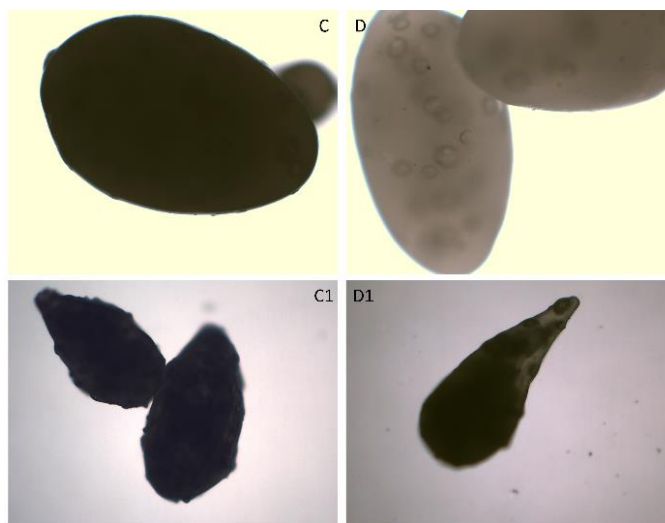
Kao što se može videti iz *Tabele 6.1*, kompleksni hidrogel sistemi sa koncentracijom alginata do 1.5 mas.% mogu se smatrati sferičnim ($SF \leq 0.05$). Dalji porast koncentracije alginata dovodi do deformacije čestica, dok smeše sa koncentracijom iznad 2.5 mas.% nije bilo moguće pripremiti korišćenjem aparature prikazane u ovom radu. Ovaj rezultat posledica je povećanja viskoznosti Na-AL/SPI smeša rastvora i pseudoplastičnog ponašanja sa porastom koncentracije alginata iznad 2 mas.%, što je detaljnije opisano u odeljku 5.2. Na osnovu podataka dostupnih u literaturi, ekstruzija polimernih rastvora velike viskoznosti dovodi do proizvodnje deformisanih čestica oblika nalik jajetu (Prüsse i sar., 2008; Lević i sar. 2015). Naime, veća koncentracija polimera dovodi do intenzivnijih inter- i intra- lančanih interakcija što može uticati na mobilnost i izazvati stvaranje manje ili više izduženih kapljica u toku ekstruzije (*Slika 6.8b*). Sistemska zavisnost između koncentracije SPI i oblika čestica nije primećena, što je u skladu sa dobijenim vrednostima za viskoznost formulacija sa 1.5 mas.% i 2 mas.% alginata (*Slika 5.1*). Bitno je naglasiti da deformacija i orijentacija proteinskih klastera, kao i konformacione promene alginatnih lanaca indukovane elektrostatičkom i gravitacionom silom zavise od nekoliko faktora, tj. od prirode inter- i intra-lančanih interakcija, naelektrisanja po zapremini kapljica, koncentracije polimera i njihovih uzročno-posledičnih odnosa.

Analizom rezultata koji se odnose na uticaj proteina soje na veličinu čestica, primećena je značajna redukcija veličine sa povećanjem sadržaja proteina, pri istoj koncentraciji alginata. Tansaz i sar. (2016) su takođe pokazali da dodatak proteina soje utiče na redukciju alginat/SPI hidrogel mikrokapsula, ali su njihove čestice proizvedene tehnikom pneumatske ekstruzije. Moguće objašnjenje proizilazi iz činjenice da denaturisani i razmotani proteinski klasteri mogu takođe da se umrežavaju sa Ca^{2+} jonima (Abae i sar., 2017), pri čemu je čvrstina nosača

proporcionalna sadržaju proteina. Nakon dehidracije primećeno je smanjenje sferičnosti čestica kao posledica procesa skupljanja matrice.



Slika 6.8a. Optičke mikrografije čestica: AL1/SP1 A) hidrogel, A1) suve i AL1.5/SP1 B) hidrogel, B1) suve.



Slika 6.8b. Optičke mikrografije čestica: AL2/SP1 C) hidrogel, C1) suve i AL2.5/SP1 D) hidrogel, D1) suve.

Tabela 6.1. Veličina i sferičnost čestica dobijenih ekstruzijom emulzija Tipa I

| Formulacija | Hidrogel čestice | | Suve čestice | | AR | | SF | |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | $d_{\min}(\mu\text{m})$ | $d_{\max}(\mu\text{m})$ | $d_{\min}(\mu\text{m})$ | $d_{\max}(\mu\text{m})$ | AR_H | AR_s | SF_H | SF_s |
| AL1.5/SP0 | 1627±55 ^a | 1629±56 ^b | 577±34 ^d | 623±44 ^e | 1.001 | 1.080 | 0.001 | 0.038 |
| AL1/SP1 | 1312±32 ^{bc} | 1330±45 ^c | 720±45 ^{bc} | 838±54 ^d | 1.014 | 1.164 | 0.007 | 0.076 |
| AL1/SP1.5 | 1256±51 ^{cd} | 1295±42 ^c | 780±13 ^b | 896±55 ^d | 1.031 | 1.149 | 0.015 | 0.069 |
| AL1.5/SP1 | 1631±51 ^a | 1752±23 ^b | 829±23 ^{ab} | 1000±67 ^d | 1.074 | 1.206 | 0.036 | 0.093 |
| AL1.5/SP1.5 | 1419±39 ^b | 1576±13 ^b | 730±65 ^b | 920±64 ^d | 1.111 | 1.260 | 0.052 | 0.115 |
| AL2/SP1 | n.d. | n.d. | 923±24 ^a | 1746±102 ^b | n.d. | 1.892 | n.d. | 0.308 |
| AL2/SP1.5 | 1250±75 ^{cd} | 1570±87 ^b | 570±40 ^d | 750±44 ^e | 1.256 | 1.316 | 0.113 | 0.136 |
| AL2.5/SP1 | n.d. | n.d. | 620±38 ^{cd} | 1880±113 ^a | n.d. | 3.032 | n.d. | 0.504 |
| AL2.5/SP1.5 | 1130±70 ^d | 2016±134 ^a | 550±43 ^d | 1450±112 ^c | 1.784 | 2.636 | 0.282 | 0.450 |

¹Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti ($p < 0.05$; Tukey test).

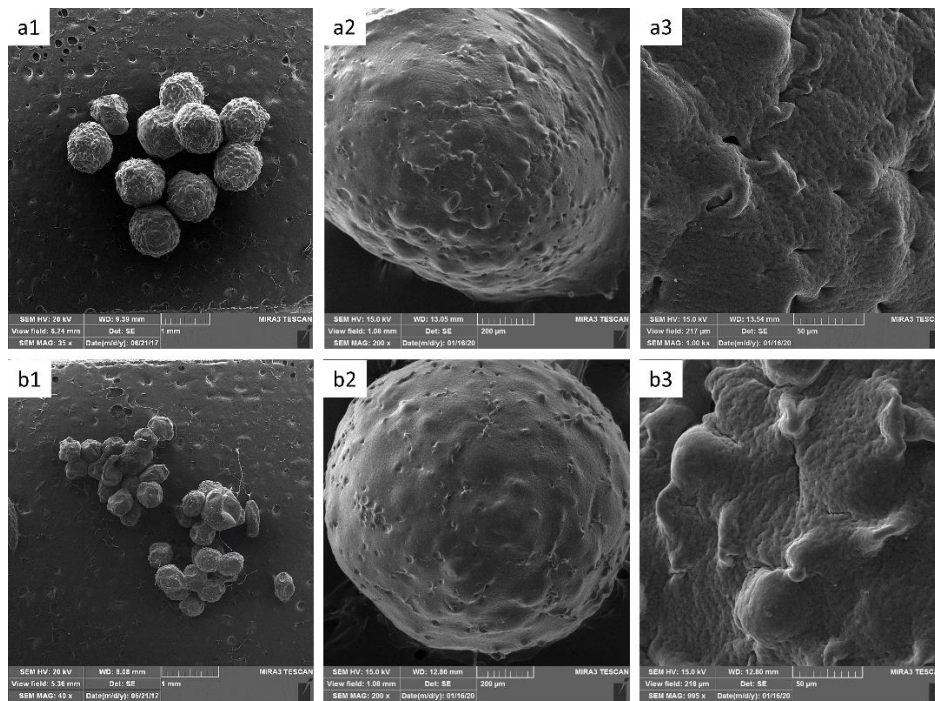
² d_{\min} i d_{\max} – minimalni i maksimalni prečnik; AR_H i AR_s – faktor proporcionalnosti, SF_H i SF_s – faktor sferičnosti (hidrogel i suvih čestica, redom).

³n.d. - nije detektovano.

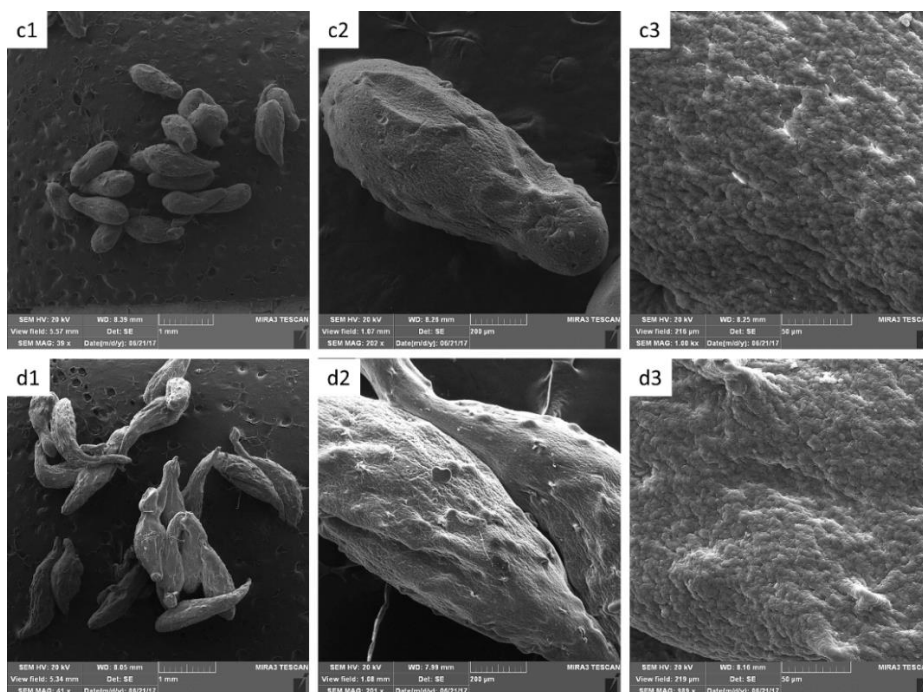
6.5. SEM analiza alginat/SPI hidrogel sistema

Primenom SEM-a analizirana je površinska morfologija uzoraka koji su prethodno optimizovani variranjem koncentracija polimera - alginata i proteina soje. Proučavanje površinske morfologije je važno kako bi se stekao uvid u poroznost nosača, što je kod razmatranja potencijalne primene ovakvih sistema veoma značajno.

Na *Slikama 6.9a i 6.9b* prikazane su mikrofografije suvih čestica, kao i odgovarajućih površina pod različitim uvećanjem. Primetna je razlika u obliku čestica u zavisnosti od koncentracije alginata, o čemu je u odeljku 6.4. detaljnije diskutovano. Čestice sa 1 i 1.5 mas.% alginata mogu se smatrati sferičnim (što je u skladu sa faktorom sferičnosti ($SF \leq 0.05$; *Tabela 6.1*), dok dalji porast koncentracije ovog polimera uzrokuje pojavu izduženog oblika ili čak formiranje „repa“ što je karakteristično za formulaciju AL2.5/SP1.5.



Slika 6.9a. SEM mikrofografije suvih AL1/SP1 (a1, a2, a3) i AL1.5/SP1 (b1, b2, b3) čestica; 35x, 200x i 1000x uvećanje, redom.



Slika 6.9b. SEM mikrografije suvih AL2.5/SP1 (c1, c2, c3) i AL2.5/SP1.5 (d1, d2, d3) čestica; 35x, 200x i 1000x uvećanje, redom.

U pogledu morfoloških karakteristika, uticaj procesa sušenja vidljiv je kroz nastanak manjih udubljenja na površini čestica, iako je ova posledica brzog isparavanja vode minimizirana sušenjem čestica na sobnoj temperaturi, u vremenskom periodu od 24 h. Površina svih čestica je hrapava i nehomogena, međutim kada se iste posmatraju pod većim uvećanjem (*Slika 6.9 a3-d3*), primetna je razlika između uzoraka označenih kao AL2.5/SP1 i AL2.5/SP1.5 i ostala dva uzorka, što ukazuje da koncentracija alginata ima značajniji efekat na površinsku morfologiju alginat/SPI čestica u odnosu na koncentraciju proteina. Autori Belščak-Cvitanović i sar. (2015) su u svojoj studiji takođe primetili robusnu i nehomogenu površinu alginat/protein (protein surutke, albumin iz goveđeg seruma, kalcijum kazeinat, proteini soje, proteini konoplje) čestica u koje je inkapsuliran ekstrakt zelenog čaja, ali su oni to pripisali globularnoj strukturi (posmatrano pod veoma velikim uvećanjem) proteina, navodeći da je površinska morfologija određena kovalentnim vezivanjem proteinskih amida za alginat, pri čemu ove veze zavise od peptidne sekvence (tj. vrste proteina).

6.6. Mehaničke karakteristike alginat/SPI hidrogel sistema

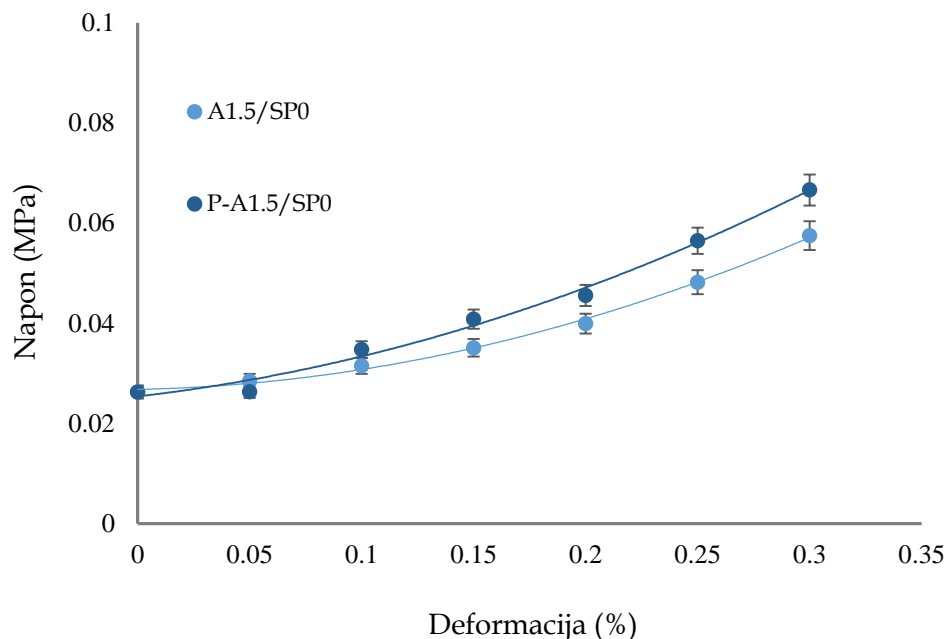
Mehaničke karakteristike hidrogel sistema su od velikog značaja za njihovu primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, kao i biomedicinskom inženjerstvu. Naime, u toku proizvodnog procesa, hidrogelovi mogu biti izloženi različitim mehaničkim opterećenjima, pa je u cilju bolje zaštite inkapsuliranog ulja potrebno obezbediti dobru mehaničku stabilnost. Lakše rukovanje u procesu dalje obrade takođe zahteva određenu čvrstinu ovih sistema. Uzimajući u obzir strukturu hidrogelova, mehaničku stabilnost je moguće proceniti primenom statičkih ili dinamičkih testova kompresije (Wang i sar., 2006; Moresi i Bruno, 2007.). U ovom

radu procena mehaničkih svojstava vršena je metodom kompresije između dve ravne ploče pomoću uređaja AG-Xplus (Shimadzu, Japan), kao što je opisano u odeljku 4.5.6.

6.6.1. Uticaj inkapsulacije etarskog ulja na mehanička svojstva hidrogelova

Čisti alginatni gelovi smatraju se relativno nestabilnim zbog prirode jonskih veza između alginatnih ostataka. U fiziološkim uslovima, dvovalentni joni se zamenjuju monovalentnim (proces suprotan geliranju), smanjujući mehaničku otpornost alginatnog nosača. Uvođenje dodatne komponente u sistem ili variranje koncentracija postojećih komponenata u velikoj meri može uticati na promenu mehaničkih svojstava sistema.

Promene vrednosti napona za čiste Ca-alginatne hidrogel nosače (koncentracije 1.5 mas.%), sa i bez inkapsuliranog etarskog ulja, prikazane su na *Slici 6.10*.



Slika 6.10. Dijagram zavisnosti napona od deformacije za Ca-alginatne hidrogel nosače: prazne (P-A1.5/SP0) i sa inkapsuliranim uljem (A1.5/SP0)

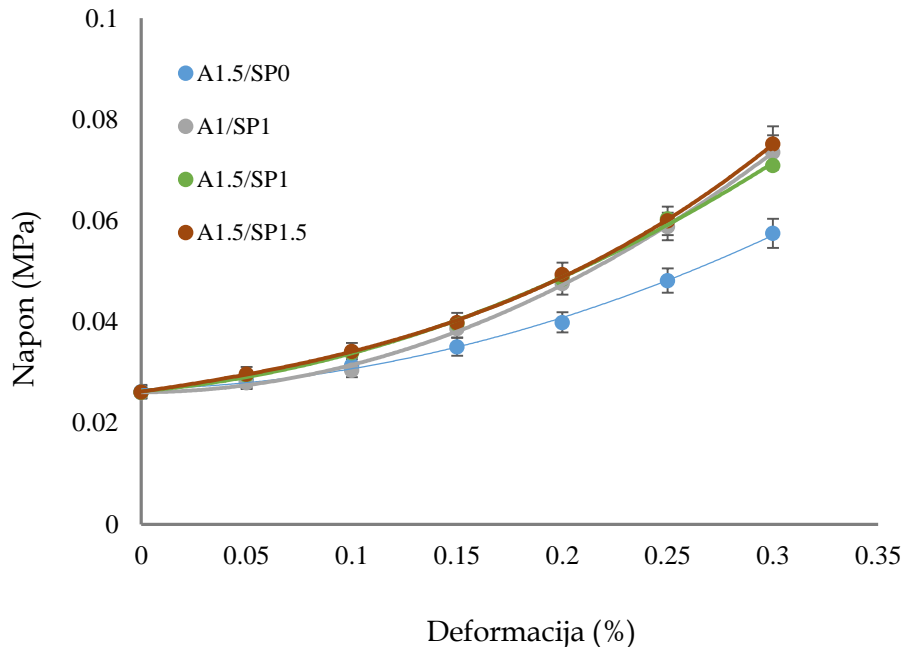
U odnosu na prazne čestice, utvrđeno je da dodatkom etarskog ulja dolazi do značajnog smanjenja mehaničke čvrstoće i modula elastičnosti. Dodatak komponenti ovog tipa obično dovodi do slabljenja matrice kao rezultat diskontinuiteta u njenoj strukturi. Naime, ulje timijana je tečno na sobnoj temperaturi i može se lako deformisati povećavajući osetljivost strukture na potisak. Ovo slabljenje alginatne matrice uzrokovano uljanom fazom uočeno je i ranije u mnogim studijama (Rojas-Graü i sar., 2007; Benavides i sar., 2012).

6.6.2. Uticaj koncentracije alginata i proteina na mehanička svojstva hidrogelova

U cilju povećanja otpornosti hidrogel čestica sa inkapsuliranim uljem izvršena je optimizacija nosača variranjem koncentracije alginata i/ili proteina.

Na *Slici 6.11* prikazani su rezultati za vrednosti napona u zavisnosti od deformacije uzoraka, pri čemu su koncentracije alginata i proteina soje varirale od 1 do 2 mas.% i od 0 do 1,5 mas.%,

respektivno. Može se zaključiti da su sve krive dobijene testiranjem uzoraka imale isti trend. Za postizanje deformacije od 30%, za pojedine formulacije uzoraka bilo je potrebno primeniti veći napon, što ukazuje na njihovu bolju mehaničku stabilnost. Primećeno je da porast koncentracije alginata uzrokuje veću čvrstinu hidrogelova, kao i povećanje modula elastičnosti (*Slika 6.12*), što se objašnjava većom gustinom umreženih lanaca. Autori Aarstad i sar. (2017) su takođe uočili ovo povećanje čvrstine različitih tipova alginatnih gelova u zavisnosti od koncentracije alginata.

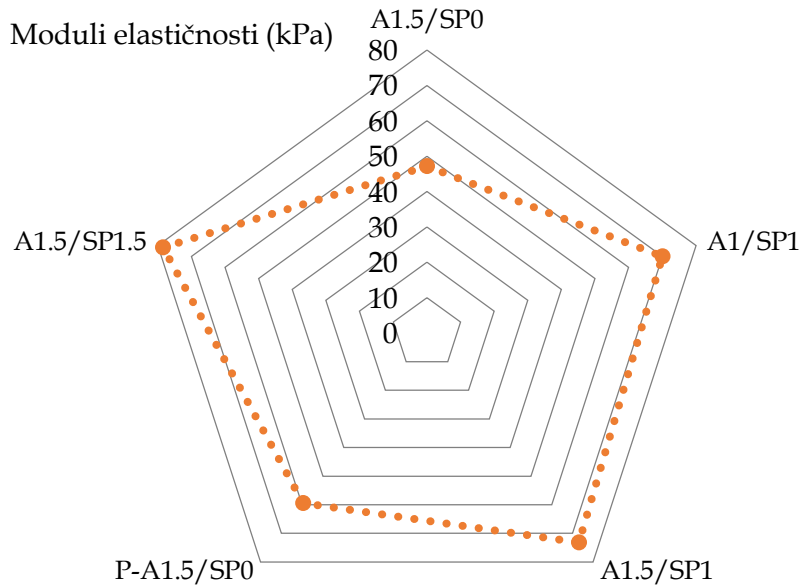


Slika 6.11. Dijagram zavisnosti napona od deformacije za alginat i alginat/SPI hidrogel sisteme

Sa druge strane, najveći doprinos povećanju čvrstoće alginatnih gelova uočen je dodatkom izolata proteina soje. Dodatak proteina doveo je do jačanja matrice (statistički značajno za A1.5/SP1 prema A1.5/SP0), što se može pripisati povećanju intramolekularnih vodoničnih i elektrostatičkih interakcija između suprotno naelektrisanih polielektrolita. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnom studijom (Wang i sar., 2006), u kojoj je utvrđeno da proteini soje (u koncentraciji do 10 mas.%) obezbeđuju veću zateznu čvrstoću i izduženje materijala pri pucanju kod alginat/SPI vlakana. Pored toga, proteini mogu da formiraju guste višeslojne filmove oko kapljica ulja, koji sa jedne strane sprečavaju koalescenciju kapljica elektrostatičkim ili sternim odbijanjem, a sa druge strane povećavaju otpornost uljanih kapi na kompresiju. Dodatno, pozitivan uticaj proteina soje potiče i od afiniteta ovog proteina za formiranjem gela u prisustvu Ca^{2+} jona, posebno ako je prethodno izvršena denaturacija proteina (Maltais i sar., 2005; Li Tay i sar., 2006).

S obzirom da ispitivani hidrogel sistemi poseduju viskoelastično ponašanje, moduli elastičnosti su izračunati iz nagiba inženjerskih krivih (*Slike 6.10 i 6.11*) u oblasti koja odgovara elastičnom ponašanju ispitivanog materijala. Ova oblast krivih (za deformacije u opsegu 5-15 %) je određena na osnovu rezultata relaksacije materijala nakon kompresije, kao i literaturnih

podataka (Chan i sar., 2011; Tomovic i sar., 2015). Merenjem sile potrebne za kompresiju čestica pri konstantnoj brzini su određeni moduli, pri čemu važi pravilo da što je modul elastičnosti veći, to je materijal otporniji na kompresiju. Shodno tome, sa *Slike 6.12* se može videti da se vrednosti modula elastičnosti kreću se u rasponu između 47.1 i 78.4 kPa.



Slika 6.12. Vrednosti modula elastičnosti za alginat i alginat/SPI hidrogel sisteme pri deformaciji od 30%

6.7. Termička stabilnost ulja inkapsuliranog u alginat/SPI hidrogel sisteme

S obzirom da je za pripremu alginat/SPI hidrogel sistema korišćena tehnika elektrostatičke ekstruzije, proces inkapsulacije je izvršen na sobnoj temperaturi i u skladu sa tim etarsko ulje je termički zaštićeno. Međutim, dobijeni hidrogelovi se mogu dalje tretirati u cilju dobijanja funkcionalnih proizvoda, što može dovesti do gubitka biološke aktivnosti inkapsuliranog ulja. Termička analiza vršena je sa ciljem procene uticaja inkapsulacije na stabilnost etarskog ulja, na temperaturama od 50, 75 i 100 °C, tokom vremenskog intervala od 3 h.

Tabela 6.2. Promena apsorbance (A^*) slobodnog i inkapsuliranog ulja timijana tokom izlaganja povišenim temperaturama u periodu od 3h.

| | | 50°C | | | 75°C | | | 100°C | | |
|-----------|---------------|------|------|------|------|------|---|-------|---|---|
| Vreme (h) | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| A^* | Ulje timijana | 0.82 | 0.64 | 0.35 | 0.62 | 0.06 | 0 | 0.04 | 0 | 0 |
| | A1.5/SP1.5 | 1 | 1 | 0.86 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

U *Tabeli 6.2* prikazani su rezultati promene apsorbance slobodnog i inkapsuliranog ulja timijana, nakon termičkog tretmana, u odnosu na početnu vrednost apsorbance (100%, odnosno 1). Sadržaj ukupnih polifenola ulja na 50 °C umanjen je za 35% nakon tretmana od 3 h, dok je ovo umanjenje bilo još izraženije na višim temperaturama. Promene u polifenolnom sadržaju mogu se pripisati isparavanju, pre nego degradaciji polifenola, s obzirom da se termička oksidacija timola dešava na temperaturi od 148 °C (Trivedi i sar., 2015).

Sa druge strane, reprezentativni uzorak (A1.5/SP1.5) pokazao je efikasnost u povećanju termičke stabilnosti inkapsuliranog ulja timijana, pri čemu je nakon 3 h na 50 °C umanjenje apsorbance iznosilo 14%. Na višim temperaturama, zanimljivo, nisu zabeležene promene u vrednosti apsorbance u odnosu na početnu vrednost. Moguće objašnjenje za ovakav rezultat je da su prvobitno parcijalno denaturisani proteini, nakon izlaganja temperaturama od 75 i 100 °C, podlegli dodatnoj denaturaciji, agregaciji i umrežavanju, što je doprinelo formiranju kompaktnijeg zaštitnog filma oko kapljica ulja. Preciznije, na 75 °C disosovane subjedinice β -konglicinina su najverovatnije razmotane, agregirane i međusobno umrežene, dok je na 100 °C očekivana disocijacija glicininskih jedinica (Liu i sar., 2004). Naime, rastvorljivost, odnosno emulgujuća svojstva proteina rastu sa denaturacijom proteina (Tang, 2015). Literaturni podaci takođe ukazuju na poboljšanje termičke stabilnosti polifenola u prisustvu proteina. Tako su na primer, autori Chen i sar. (2015) uočili da kompleksi nastali između SPI i kurkumina utiču na povećanje stabilnosti (nakon 4 h na 95 °C) inkapsuliranog, u poređenju sa slobodnim kurkuminom. Takođe, Tsai i She (2006) zaključili su da više temperature utiču na veći kapacitet vezivanja fenolnih jedinjenja sa proteinima.

6.8. Efikasnost inkapsulacije etarskog ulja u alginat/SPI hidrogel sisteme

Efikasnost inkapsulacije etarskog ulja timijana u hidrogel čestice značajan je parametar koji u velikoj meri utiče na finalne karakteristike sistema i mogućnost njihove dalje primene. Iz tog razloga potrebno je utvrditi najoptimalniji odnos alginata i proteina soje koji će ukazati na sistem sa potencijalno najboljom primenom.

6.8.1. Efikasnost inkapsulacije ukupnih polifenola ulja timijana

Efikasnost inkapsulacije ukupnih polifenolnih jedinjenja u hidrogel čestice varirala je u uskom opsegu, 75.5-80%, u zavisnosti od formulacije, dok je stepen inkapsulacije za čiste alginatne čestice iznosio 72% (*Tabela 6.3*). Očekivani efekat jeste da efikasnost inkapsulacije zavisi isključivo od koncentracije alginata i proteina, s obzirom da je količina ulja u postupku pripreme emulzija tipa I bila konstantna. Međutim, sistemska zavisnost je u ovom slučaju izostala. Primetno je da je dodatak proteina uticao na povećanje stepena inkapsulacije (statistički značajno za AL1/SP0 prema AL1/SP1 i AL1/SP0 prema AL1/SP1.5). Međutim, povećanje koncentracije proteina sa 1 na 1.5 mas.% nije dovelo do značajne promene.

Sa druge strane, Soliman i sar. (2013) su objavili povećanje stepena inkapsulacije etarskih ulja cimeta, bosiljka i timijana od 70-80% za 1 mas.% alginata, do 90% za 2 mas.% alginata. Naime, sa porastom koncentracije alginata dolazi do formiranja guste mreže sa kohezivnim

slobodnim mestima u koje se smeštaju kapljice ulja. Međutim, efekat koncentracije alginata u ovom radu se može primetiti samo u slučaju AL1/SP1 prema AL1.5/SP1.

Tabela 6.3. Efikasnost inkapsulacije (EE) ukupnih polifenola za hidrogel čestice različitih formulacija

| Formulacija | EE (%) |
|-------------|------------|
| AL1/SP0 | 72 ± 1.5 |
| AL1/SP1 | 76 ± 2.0 |
| AL1/SP1.5 | 80 ± 2.0 |
| AL1.5/SP1 | 80 ± 1.1 |
| AL1.5/SP1.5 | 79 ± 1.3 |
| AL2/SP1 | 77 ± 1.5 |
| AL2/SP1.5 | 76 ± 2.0 |
| AL2.5/SP1 | 75.5 ± 1.6 |
| AL2.5/SP1.5 | 77 ± 2.6 |

Dobijeni rezultati bliski su literaturnim podacima vezanim za inkapsulaciju etarskih ulja u sisteme na bazi alginata. Tako su na primer, autori Natrajan i sar. (2015) u svojoj studiji objavili efikasnost inkapsulacije ukupnog kurkuminog ulja od 71.1% i ulja limunske trave od 86.9%, u alginat-hitozan nanokapsule.

6.8.2. Efikasnost inkapsulacije timola

Ispitivanje efikasnosti inkapsulacije, pored ukupnih polifenola, može proceniti i na osnovu pojedinačnih komponenti, u ovom slučaju timola. Efikasnost inkapsulacije ispitivana je za hidrogel sisteme dobijene elektrostatičkom ekstruzijom emulzija tipa II, pri čemu je sadržaj ulja varirao u zavisnosti od koncentracije polimera (*Tabela 4.1b*).

Na osnovu rezultata prikazanih u *Tabeli 6.4*, ispitivani hidrogel sistemi pokazali su statistički značajne razlike u efikasnosti inkapsulacije timola.

Kao očekivani rezultat, najviši stepen inkapsulacije timola je pokazao sistem sa najvećim sadržajem alginata i proteina, A2/SP1.5 (75.5%), dok je sa druge strane sistem označen kao A1/SP1 pokazao suprotan učinak, sa stepenom inkapsulacije od 70.04%. Poređenjem sistema sa jednakim sadržajem alginata (npr. A2/SP1 prema A2/SP1.5) može se zaključiti da povećanje koncentracije proteina utiče na efikasnost inkapsulacije timola, što je u skladu sa njihovom osnovnom ulogom u sistemu (više proteina-bolje emulgovanje). Alginat je pokazao sličan efekat, koji je najizraženiji u formulacijama u kojima je sadržaj proteina konstantan (npr. A1/SP1.5 prema A2/SP1.5).

Tabela 6.4. Efikasnost inkapsulacije (EE_t) timola za hidrogel čestice različitih formulacija

| Formulacija | EE_t (%) |
|-------------|-------------|
| A1/SP0 | 65.20 ± 1.1 |
| A1/SP1 | 70.04 ± 0.1 |
| A1/SP1.5 | 70.85 ± 0.2 |
| A1.5/SP1 | 72.9 ± 0.4 |
| A1.5/SP1.5 | 73.3 ± 0.2 |
| A2/SP1 | 74.9 ± 0.6 |
| A2/SP1.5 | 75.5 ± 0.1 |

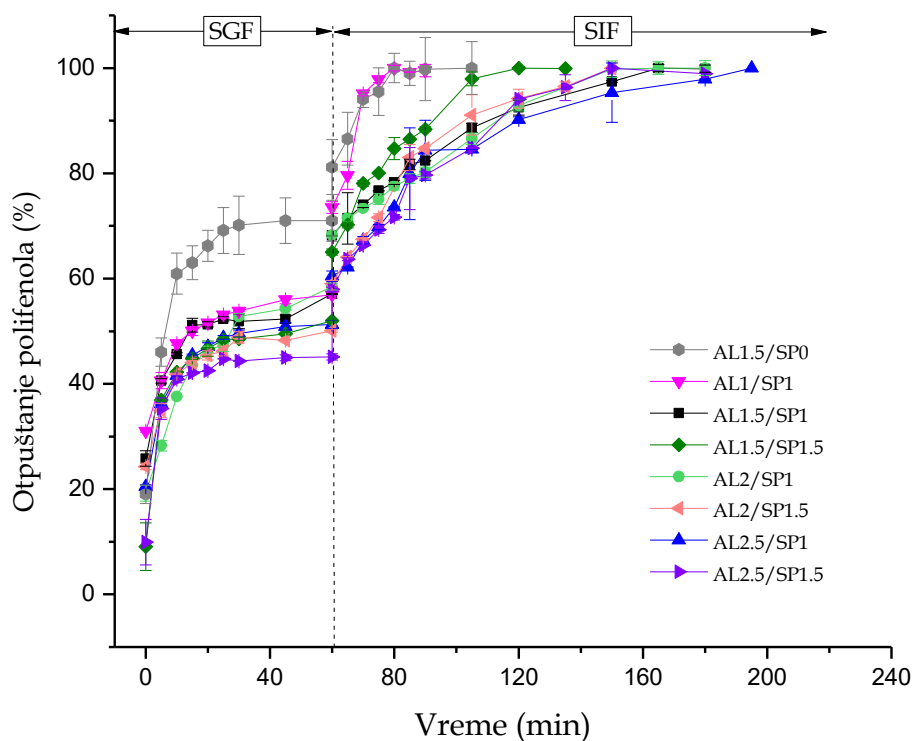
6.9. Otpuštanje inkapsuliranog etarskog ulja iz alginat/SPI hidrogel sistema u simuliranim GI uslovima

U cilju procene mogućnosti oralne primene, praćenje kinetike otpuštanja inkapsuliranog etarskog ulja iz hidrogel sistema na bazi alginata i proteina soje je veoma značajno. Otpuštanje lipofilnih jedinjenja iz hidrogelova na bazi alginata uslovljeno je uglavnom bubrenjem i erozijom matrice, pre nego difuzijom kroz polimernu mrežu u okolni medijum (Sosnik, 2014). Naime, difuzija je karakterističan mehanizam otpuštanja uljanih kapljica koje se nalaze na površini matrice. Iz ovih razloga cilj je bio utvrditi zavisnost kinetike otpuštanja od bubrenja matrice, opisanog u odeljku 6.2. Otpuštanje etarskog ulja iz alginat/SPI hidrogelova analizirano je praćenjem sadržaja polifenola, kao i pojedinačne komponente, timola, u simuliranim gastro-intestinalnim fluidima (pH, T, soli, enzimi).

6.9.1. Otpuštanje ukupnih polifenola iz alginat/SPI hidrogel sistema

Profil otpuštanja ukupnih polifenolnih jedinjenja ulja timijana iz čestica na bazi alginata i proteina soje u SGF-u i SIF-u na 37 °C, prikazan je na [Slici 6.13](#).

Otpuštanje polifenola u želudačnom fluidu okarakterisano je brzim početnim otpuštanjem (u prvih 10 min), nakon čega krive otpuštanja dostižu plato. Inicijalni, tzv. „burst“ efekat posledica je uglavnom brze difuzije neinkapsuliranog ulja sa površine polimerne matrice (Huang i Brazel, 2001). Procenat otpuštenog ulja u SGF-u iznosi 42-55%, u zavisnosti od formulacije, dok je ostatak inkapsuliranih polifenola oslobođen u SIF-u sa produženim otpuštanjem do 2.5 h (sa izuzetkom AL1/SP1), što ukazuje na to da alginat/SPI sistem poseduje funkciju kontrolisanog/ciljanog otpuštanja u donjem intestinalnom traktu.



Slika 6.13. Otpuštanje ukupnih polifenola etarskog ulja timijana iz alginat/SPI hidrogel sistema u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog trakta

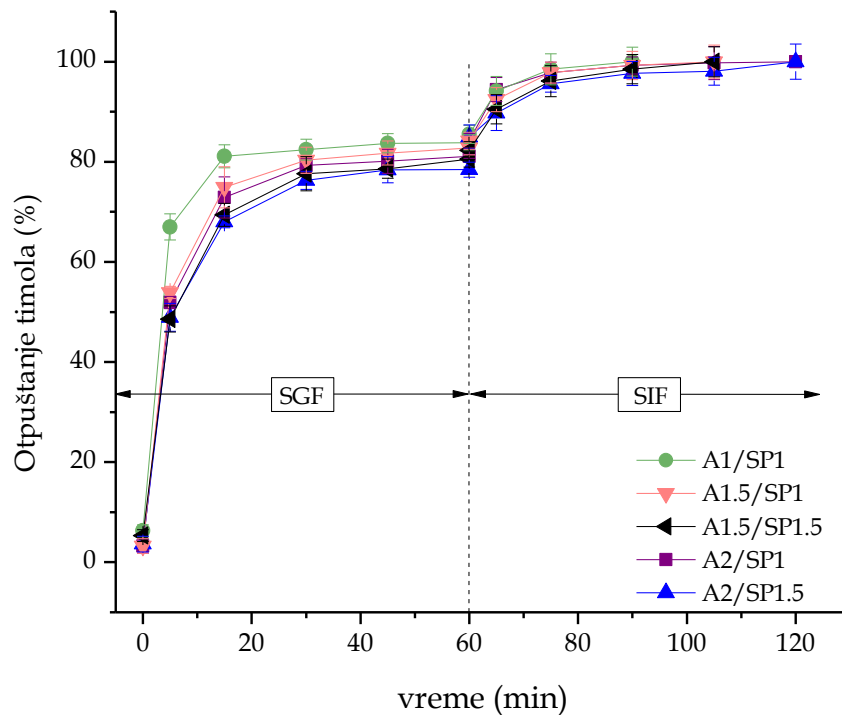
Čiste alginatne čestice karakteriše brza degradacija pri čemu se ravnotežno stanje dostiže nakon 75 min. Slično tome, Zheng i sar. (2007) ispitivali su kompleksne mikrosfere na bazi alginata (3 mas.%) i proteina soje (25-75% ukupne mase) kao nosača lekova (teofilin je korišćen kao aktivna supstanca). Mikrosfere koje su ispitivali otpustile su do 15% leka u želudačnom, zatim do 45% u intestinalnom fluidu i do 80% u fluidu koji simulira uslove debelog creva. Međutim, u njihovom radu praćenje otpuštanja vršeno je u fluidima bez enzima i na sobnoj temperaturi, simulirajući jedino pH uslove GIT-a. Sa *Slike 6.13* može se uočiti da porast koncentracije alginata dovodi do smanjenog otpuštanja polifenola ulja timijana (statistički značajno za AL1.5/SP1 prema AL1/SP1 sa $p < 0.0001$, AL2/SP1 prema AL1/SP1 sa $p < 0.0001$, AL2/SP1.5 prema AL1.5/SP1.5 sa $p = 0.02$ i AL2.5/SP1.5 prema AL1.5/SP1.5 sa $p = 0.0006$). Druge studije su takođe ukazale na smanjeno i produženo otpuštanje sa porastom koncentracije polimera u alginatnim formulacijama, pored činjenice da su formulacije sa većim sadržajem alginata imale veći stepen bubrenja (Coppi i sar., 2002; Soni i sar. 2010), što je rezultat takođe ostvaren ovde (*Slika 6.5*). Smanjena stopa otpuštanja pripisuje se većoj gustini matrice sa porastom koncentracije polimera.

Sa druge strane, fenomen uticaja proteina soje i dalje nije u potpunosti razjašnjen. Evidentno je da protein doprinosi produženom otpuštanju kada se uporede sistemi sa čistim alginatom (AL1.5/SP0) i AL1.5/SP1 ili AL1.5/SP1.5; međutim čini se da iznad 1 mas.% efekat SPI postaje suprotan, tj. više proteina znači brže otpuštanje (statistički značajno za AL1.5/SP1 prema AL1.5/SP1.5). Očigledno, krive otpuštanja se ne poklapaju sa krivama bubrenja (*Slika 6.5*). Pretpostavka je da su uljane kapljice nehomogeno raspoređene unutar polimerne matrice, sa interfacijalnim slojevima proteina. Takođe, zaključuje se da je efekat koncentracije proteina na

otpuštanje ulja određen suprotnim tendencijama; jedna je intenziviranje otpuštanja sa porastom sadržaja proteina usled bubrenja, a drugi restrikcija otpuštanja sa porastom sadržaja proteina usled hidrofobnih ulje-protein interakcija (denaturisani proteini su hidrofobniji od nativnih). Autori Liu i sar. (2014) su zaključili da sojino ulje u SPI emulzijama ima visoku tendenciju za flokulacijom. Sa druge strane, proces bubrenja u SIF-u uglavnom zavisi od elektrostatičkih interakcija između alginata i proteina soje.

6.9.2. Otpuštanje timola iz alginat/SPI hidrogel sistema

Profil otpuštanja timola iz alginat/SPI čestica u SGF-u i SIF-u na 37 °C, prikazan je na *Slici 6.14*.



Slika 6.14. Otpuštanje timola iz alginat/SPI hidrogel sistema u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog trakta

Intenzivno inicijalno otpuštanje (*Slika 6.14*) povezano je sa oslobađanjem mikro- i makromolekula iz polimernih sistema usled difuzije molekula koji se nalaze na površini matrice. Uporedno dolazi do brzog skupljanja alginatnog matriksa u želudačnom fluidu jer umreženi joni kalcijuma dislociraju iz alginatne mreže, a karboksilni ostaci alginata bivaju protonovani, pri čemu dolazi do formiranja algininske kiseline koja je rastvorljiva u vodi ($pK \approx 3.5$). Kao doprinos fenomenu kontrahovanja, alginatni i proteinski molekuli se međusobno privlače na niskim pH vrednostima (rastvor proteina soje je pozitivan ispod izoelektrične tačke ~ 4.5), što usporava otpuštanje ulja i digestiju proteina nakon inicijalne faze.

Uticaj koncentracije alginata i proteina soje na otpuštanje timola primećen je u želudačnom fluidu. Naime, sa porastom koncentracije proteina (sa 1 mas.% na 1.5 mas.%) otpuštanje timola se odigrava sporije. Razlog tome može biti promena u gustini polimerne matrice, kao posledica viška proteina u kontinualnoj fazi (neadsorbovani protein) (Faraji i sar., 2004). Dodatno, veći sadržaj proteina utiče na bolju emulzifikaciju (Delahaije i sar., 2015), što doprinosi većoj stabilnosti emulzija i hidrogel čestica. Međutim, uticaj alginata je dominantan. Sa porastom koncentracije alginata (sa 1 na 2 mas.%) polimerni lanci postaju gušće pakovani i na taj način sprečavaju brzo „curenje“ inkapsuliranog ulja. Na osnovu *Slike 6.14*, nakon izlaganja simuliranoj intestinalnoj fazi došlo je do potpunog otpuštanja timola pošto su i digestirani proteini i molekuli alginata povratili svoja negativna naelektrisanja, što je rezultiralo intenzivnim bubrenjem (*Slika 6.5*) i prolaskom digestivnih enzima u gelove.

Dalje, poređenjem kinetike otpuštanja timola i ukupnih polifenola ulja timijana uočava se isti trend, ali različito inicijalno otpuštanje aktivne komponente. Pored pozitivnog uticaja povećanja koncentracije polimera na kinetiku otpuštanja timola, izraženiji „burst“ efekat (*Slika 6.14*) u poređenju sa otpuštanjem ukupnih polifenola (*Slika 6.13*) se može objasniti različitim postupkom pripreme hidrogel čestica, kao i pretpostavkom da se timol kao jedno od aktivnih jedinjenja najverovatnije brže oslobađa u odnosu na neke druge komponente koje su prisutne u ulju timijana (pa i u odnosu na ukupne polifenole), a koje takođe ostvaruju veze sa polimernim nosačem (što je potvrđeno FTIR analizom). Naime, u ranijim istraživanjima je takođe ukazano na različite brzine otpuštanja polifenola u zavisnosti od molekulske mase i hemijske strukture (Trifković, 2016).

6.10. Modelovanje kinetike otpuštanja etarskog ulja iz alginat/SPI hidrogel sistema

Kriva koja predstavlja kinetiku otpuštanja ukupnih polifenola ulja timijana u SGF-u i SIF-u analizirana je korišćenjem nelinearnog populacionog modela koji je opisan logističkim jednačinama (5) i (6). Parametri modela za različite formulacije čestica su prezentovani u *Tabeli 6.5*, gde parametar $X_{s/n}$ predstavlja maseni odnos SPI i alginata.

Zapremina otpuštenog ulja u želudačnom i pankreasnom fluidu upoređena je sa vrednostima dobijenim predviđanjem matematičkog modela. Predviđena zapremina ulja izračunata je korišćenjem jednačine (6), a jedan reprezentativni skup podataka prikazan je na *Slici 6.15*. Naime, vrednosti modela koje se odnose na zapreminu otpuštenog ulja su u korelaciji sa eksperimentalnim podacima, sa relativnom greškom od 5%. Optimalni parametri modela dobijeni fitovanjem, a koji omogućavaju najbolje poređenje sa eksperimentalnim podacima, prikazani su u *Tabeli 6.5*.

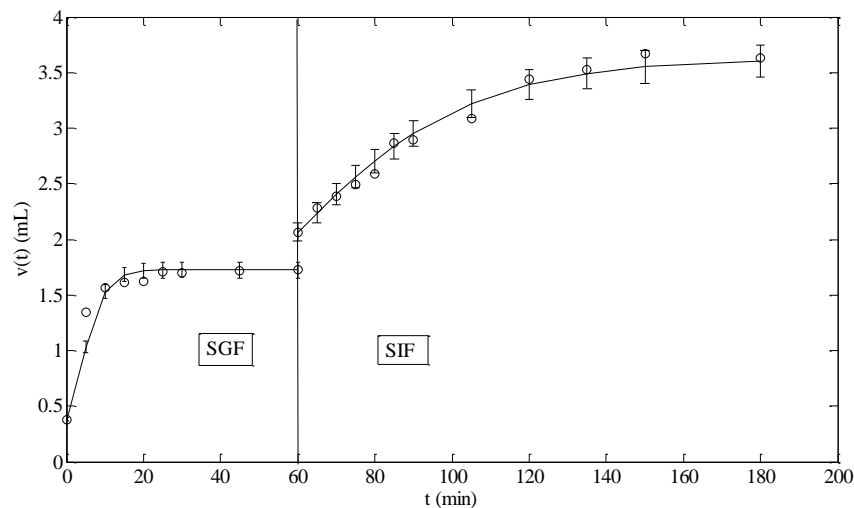
Parametri modela dati su u kontekstu karakterističnih vremena, tj. relaksacionih vremena za prilagođavanje sistema uslovima sredine. Specifična brzina otpuštanja ulja, μ jednaka je $\mu = 1/\tau_R$. Bezdimenzioni kriterijum formulisan je kao $Y = \mu_G/\mu_P = \tau_{RP}/\tau_{RG}$, da bi se uporedile specifične brzine otpuštanja u SGF-u i SIF-u. Eksperimentalni podaci pokazuju da je specifična brzina otpuštanja u SGF-u 3 do 5 puta veća nego u SIF-u ($Y=3-5$), što je posledica „burst“ efekta na početku procesa otpuštanja.

Tabela 6.5. Relaksaciona vremena u želudačnom (τ_{RG}) i pankreasnom (τ_{RP}) fluidu za alginat/SPI hidrogel sisteme različite formulacije okarakterisane $X_{s/a}$ parametrom.

| Formulacija | $X_{s/a}$ | τ_{RG} (min) | τ_{RP} (min) |
|-------------|-----------|------------------------|----------------------|
| AL1.5/SP0 | 0 | 4±0.5 ^a | 7±0.3 ^a |
| AL1/SP1 | 1 | 7.2±0.5 ^{b,c} | 6.8±0.5 ^a |
| AL1.5/SP1 | 0.67 | 7.3±0.5 ^{b,c} | 31±1 ^e |
| AL1.5/SP1.5 | 1 | 6.5±0.3 ^b | 17±0.5 ^b |
| AL2/SP1 | 0.5 | 7.5±0.5 ^{b,c} | 31±1 ^e |
| AL2/SP1.5 | 0.75 | 6.4±0.3 ^b | 21±0.5 ^c |
| AL2.5/SP1 | 0.4 | 6.7±0.3 ^b | 34±1 ^f |
| AL2.5/SP1.5 | 0.6 | 8±0.3 ^c | 25±0.5 ^d |

*Vrednosti označene različitim slovom u svakoj koloni pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0.05$; Tukey test)

Uzorci sa većom koncentracijom alginata (pri jednakom sadržaju proteina) pokazali su duže vreme relaksacije u SIF-u (statistički značajno za AL1/SP1 prema AL1.5/SP1 prema AL2.5/SP1 i za AL1.5/SP1.5 prema AL2/SP1.5 prema AL2.5/SP1.5), dok u SGF-u uticaj koncentracije alginata nije bio dosledan. Sa druge strane, pri istoj koncentraciji alginata, 1.5 mas. % ili 2 mas. %, relaksaciono vreme u SGF-u i SIF-u je opadalo sa porastom koncentracije proteina. Izuzetak od pravila „više proteina-kraće relaksaciono vreme“ može se primetiti pri koncentraciji alginata od 2.5 mas. % (AL2.5/SP1.5 prema AL2.5/SP1), ali samo u SGF-u.

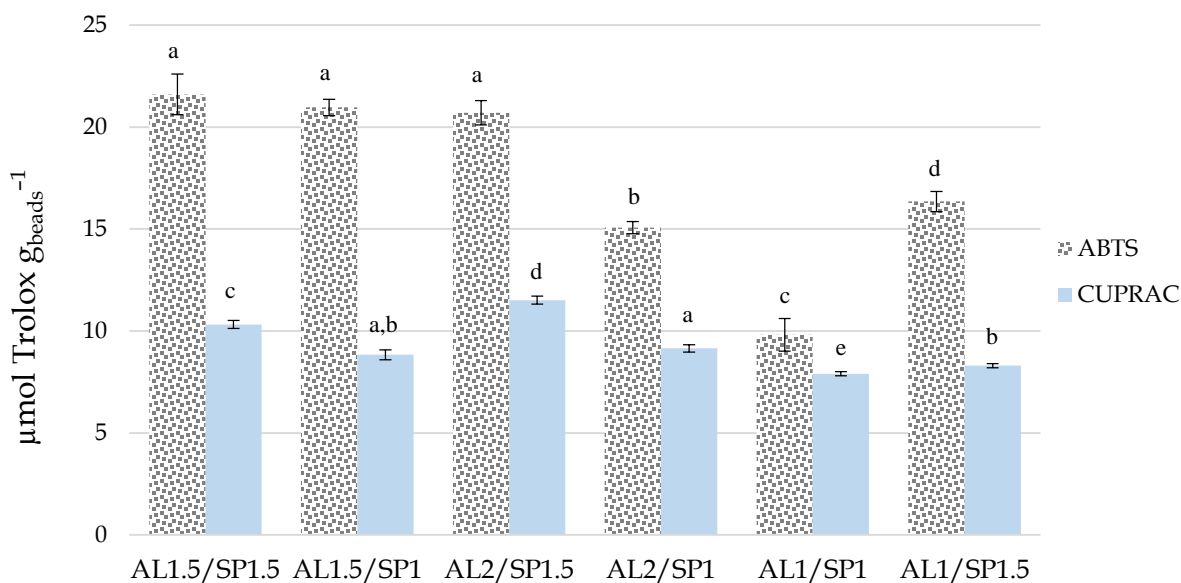


Slika 6.15. Otpuštanje ukupnih polifenola iz AL2.5/SP1.5 čestica: eksperimentalni podaci (tačke) i predviđanje modela (kriva) prema jednačini (6).

6.11. Antioksidativna aktivnost inkapsuliranog etarskog ulja

Antioksidativna aktivnost čestica sa inkapsuliranim etarskim uljem procenjena je dvema metodama – sposobnošću neutralizacije slobodnih radikala (ABTS) i redukcije teških metala (CUPRAC).

Prema rezultatima obe metode (izraženim u odnosu na masu hidrogel čestica), antioksidativna aktivnost je najniža za čestice sa najnižim sadržajem alginata i proteina soje (AL1/SP1). Nasuprot tome, najveća aktivnost redukcije Cu^{2+} postignuta je za formulacije čestica sa najvećom gustinom mreže (AL2/SP1.5). Prema CUPRAC metodi, porast sadržaja proteina pri istoj koncentraciji alginata uzrokuje veću antioksidativnu aktivnost; ovo se takođe odnosi na antiradikalnu aktivnost, statistički značajno za formulacije sa 1 i 2 mas.% alginata (Slika 6.16). Dobijeni rezultati antioksidativne aktivnosti su u skladu sa sadržajem ukupnih polifenola (Tabela 6.3). Međutim, aktivnost u ovom slučaju ne zavisi isključivo od ukupnih polifenolnih komponenti ulja, već treba imati u vidu da parcijalno denaturisani proteini unutar polimerne matrice takođe poseduju antioksidativni potencijal (Faraji i sar., 2004.).



Slika 6.16. Poređenje antioksidativne aktivnosti čestica različite formulacije

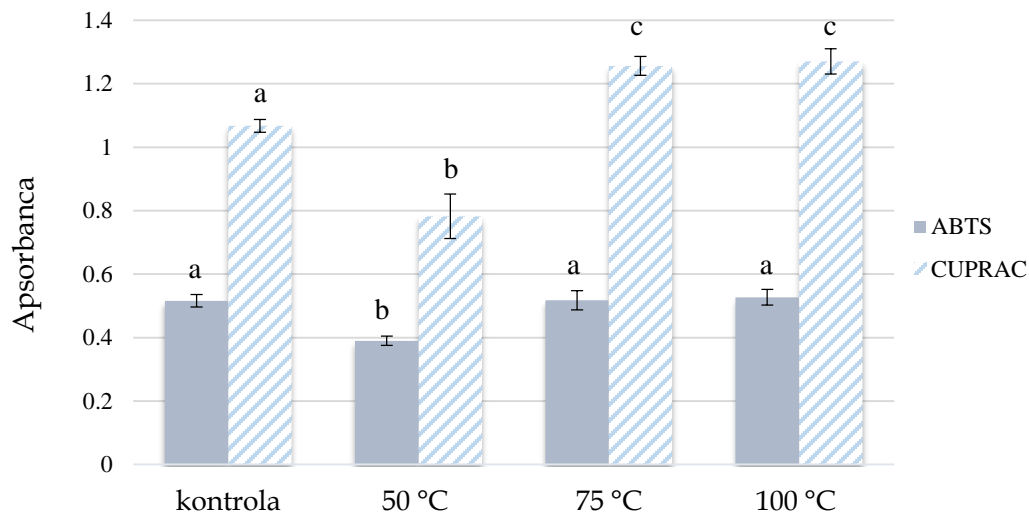
Antioksidativnu aktivnost čestica sa inkapsuliranim uljem nije bilo moguće odrediti *in vivo*, najverovatnije usled smetnje enzima primenjenim metodama. Inače, enzimaska hidroliza proteina takođe povećava izloženost aminokiselina sa antioksidativnim kapacitetom, odnosno povećava antioksidativnu aktivnost čestica (Penta-Ramos i Xiong, 2002).

6.11.1. Antioksidativna aktivnost inkapsuliranog ulja nakon termičkog tretmana

Suve hidrogel čestice podvrgnute su termičkom tretmanu na 50, 75 i 100 °C u cilju procene njihove antioksidativne aktivnosti nakon tretmana od 4 h. Obe metode, ABTS i CUPRAC,

primenjene su kako bi se pokazao uticaj nosača (reprezentativni uzorak čestica AL1.5/SP1.5) na očuvanje antioksidativnog potencijala inkapsuliranog etarskog ulja timijana.

Rezultati su izraženi kao apsorbanca jedinjenja koja su reagovala sa slobodnim radikalima/ionima metala, u poređenju sa početnom apsorbancom, odnosno apsorbancom kontrolnog uzorka (Slika 6.17).



Slika 6.17. Antioksidativni potencijal termički tretiranih čestica

Nakon tretmana na 50 °C, u vremenskom periodu od 4 h, antioksidativni kapacitet čestica (prema ABTS i CUPRAC metodama) je niži od početnog, što ukazuje na smanjenje biološke aktivnosti inkapsuliranog ulja timijana pod dejstvom temperature. Ova promena u antioksidativnoj aktivnosti javlja se kao posledica isparavanja polifenola, s obzirom da su autori Trivedi i sar. (2015) zaključili da se proces degradacije ostvaruje na višim temperaturama. Interesantno je da je na temperaturama od 75 i 100 °C antiradikalna aktivnost sačuvana, dok je sa druge strane zabeležen porast u sposobnosti redukcije bakra. Na ovim temperaturama proteini podležu dodatnoj denaturaciji (o čemu je prethodno diskutovano u odeljku 6.7) i raskidanju terciarne strukture, što povećava dostupnost amino-kiselina sa antioksidativnim potencijalom. Takođe, kada se proteini koriste u cilju stabilizacije u/v emulzija, jedna frakcija se adsorbuje na površini uljanih kapljica, dok se ostatak nalazi u kontinualnoj fazi. Prema autorima Yang i Xiong (2015), proteini koji su adsorbovani na interfejsu ispoljavaju antioksidativne karakteristike tako što inhibiraju lipidnu oksidaciju, dok drugi autori ovaj potencijal pripisuju proteinima soje u kontinualnoj fazi emulzije (Faraji i sar., 2004). Dodatno, isti autori su zaključili da izolati proteina soje mogu delovati kao antioksidanti uklanjanjem slobodnih radikala i helatizacijom metala usled prisustva određenih aminokiselina i drugih jedinjenja, kao što je izoflavin.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da je efekat helatizacije metala od strane ispitivanih hidrogel sistema dominantan.

6.12. Antimikrobna aktivnost inkapsuliranog etarskog ulja

U cilju ispitivanja praktične primene čestica sa inkapsuliranim uljem timijana, antimikrobna aktivnost hidrogel čestica izučavana je u suspenzijama ćelija *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* i *C. albicans*, u fiziološkom rastvoru sa 0.5% emulgatora Tween 80, kako bi se obezbedilo bolje rastvaranje etarskog ulja.

Rezultati antimikrobne aktivnosti prikazani su za reprezentativne čestice tipa A1.5/SP1.5, sa ukupnom koncentracijom ulja od 4.5 $\mu\text{l/ml}$ (Tabela 6.6). Naime, mikrobicidni efekat postignut je samo za *C. albicans* (čije kolonije nisu detektovane u medijumu nakon 24 h), dok je kod ostalih vrsta primećena redukcija broja ćelija i to višeg (pad koncentracija *E. coli* i *B. cereus* za dva reda veličine) ili nižeg (*S. aureus*) stepena.

Iz očiglednih razloga, pripremljena je druga formulacija čestica (A1.5/SP1.5*), sa istim sastavom nosača, ali većom koncentracijom ulja i na taj način dobijena je stvarna koncentracija ulja od 20 $\mu\text{l/ml}$. Primena čestica nove formulacije izazvala je značajno smanjenje populacije *S. aureus* (sa 10^6 na 10^1 CFU/ml) u odnosu na formulaciju A1.5/SP1.5.

Ovde treba naglasiti da, za razliku od ulja timijana, oslobođeni proteini podstiču proliferaciju ćelija zbog proteolitičke aktivnosti bakterija, o čemu donekle svedoči povećanje ćelija u kontrolnim uzorcima (čestice bez etarskog ulja). U cilju optimizacije formulacije koja će imati baktericidni efekat, sadržaj proteina je smanjen (0.25%) uz zadržanu istu koncentraciju ulja, pri čemu je unapređena formulacija (A1.5/SP1.5**) u potpunosti je inaktivirala dva od tri testirana patogena. Zapaža se da je soj *B. cereus* manje osetljiv od ostalih, iako je njegova početna veličina inokuluma bila najmanja.

Tabela 6.6. Antimikrobna aktivnost hidrogel sistema različitih formulacija

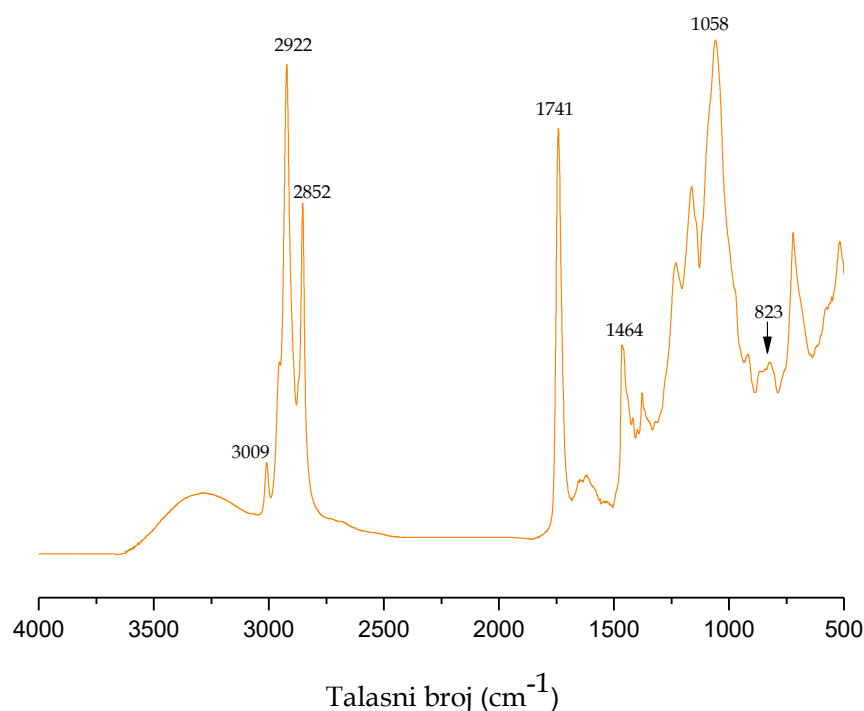
| | Početni broj ćelija (CFU/ml) | | | | Broj ćelija nakon 24h inkubacije (CFU/ml) | | | |
|------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|-------------------|-------------------|--------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>B. cereus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>B. cereus</i> | <i>C. albicans</i> |
| Kontrolni uzorak | 1.78×10^6 | 1.32×10^6 | 7.58×10^4 | 1.14×10^4 | 8.2×10^6 | 8.6×10^6 | 3.6×10^7 | 1×10^4 |
| A1.5/SP1.5 | 1.78×10^6 | 1.32×10^6 | 7.58×10^4 | 1.14×10^4 | 1.5×10^6 | 4.8×10^4 | 1×10^2 | 0 |
| A1.5/SP1.5* | 3.3×10^5 | 1.9×10^6 | 7.6×10^3 | n.o. | 2×10^1 | 2×10^1 | 1.6×10^2 | n.o. |
| A1.5/SP0.25** | 3.1×10^5 | 1.8×10^6 | 6.1×10^3 | n.o. | 0 | 0 | 9.4×10^2 | n.o. |

*n.o. nije određivano

7. KARAKTERIZACIJA ALGINAT/SPI/LECITIN HIDROGEL SISTEMA

7.1. FTIR analiza alginat/SPI/lecitin hidrogel sistema i čistih komponenti

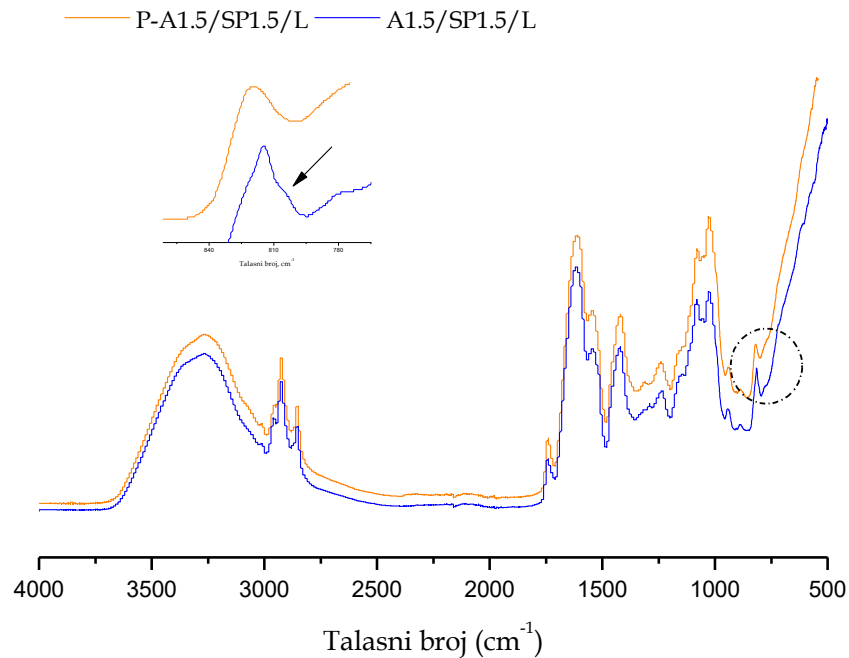
Na *Slici 7.1* prikazan je ATR-FTIR spektar lecitina, dok su spektri Na-alginata, izolata proteina soje i ulja timijana prikazani na *Slikama 6.1-6.3*, sa očekivanim talasnim dužinama koje bi učestvovala u interakcijama.



Slika 7.1. ATR-FTIR analiza spektra sojinog lecitina

Na IR spektru lecitina najintenzivniji signali su oni koji pripadaju (i) alkalnim trakama, koje se odnose na simetrično CH₂, antisimetrično CH₂, antisimetrično CH₃ rastezanje i CH₂ vibracije koje dovode do raskidanja veze, na 2852, 2922, 2956 i 1464 cm⁻¹ talasne dužine (Kuligowski i sar. 2008), redom, (ii) vibraciji karbonilnog istežanja na 1741 cm⁻¹ i (iii) visoko preklapajućim PO₂- i P-O-C infracrvenim aktivnim vibracijama u regionu između 1200 i 970 cm⁻¹, sa karakterističnom trakom na oko 1058 cm⁻¹ talasne dužine. Shodno tome, prisustvo lecitina u A1.5/SP1.5/L česticama (*Slika 7.2*) potvrđeno je prisustvom karakterističnih alkalnih traka, kao i trake na 1741 cm⁻¹ talasne dužine. Dodatno, na spektru lecitina se mogu uočiti vrlo slabi signali na 823 i 1417 cm⁻¹ talasne dužine koji su bliski „fingerprint” trakama ulja timijana (807 i 1419 cm⁻¹). Rezultat toga jeste njihovo delimično preklapanje u spektru, pa se nakon inkapsulacije, traka na 807 cm⁻¹ vidi kao „rame” susedne trake na 823 cm⁻¹ (koja je u ovom spektru čak

izraženija). U poređenju sa IR spektrom čestica bez lecitina (*Slika 6.4*), Amidna I traka je pomerenka ka talasnoj dužini od 1635 cm^{-1} , najverovatnije usled nastalih elektrostatickih interakcija između komponenata.

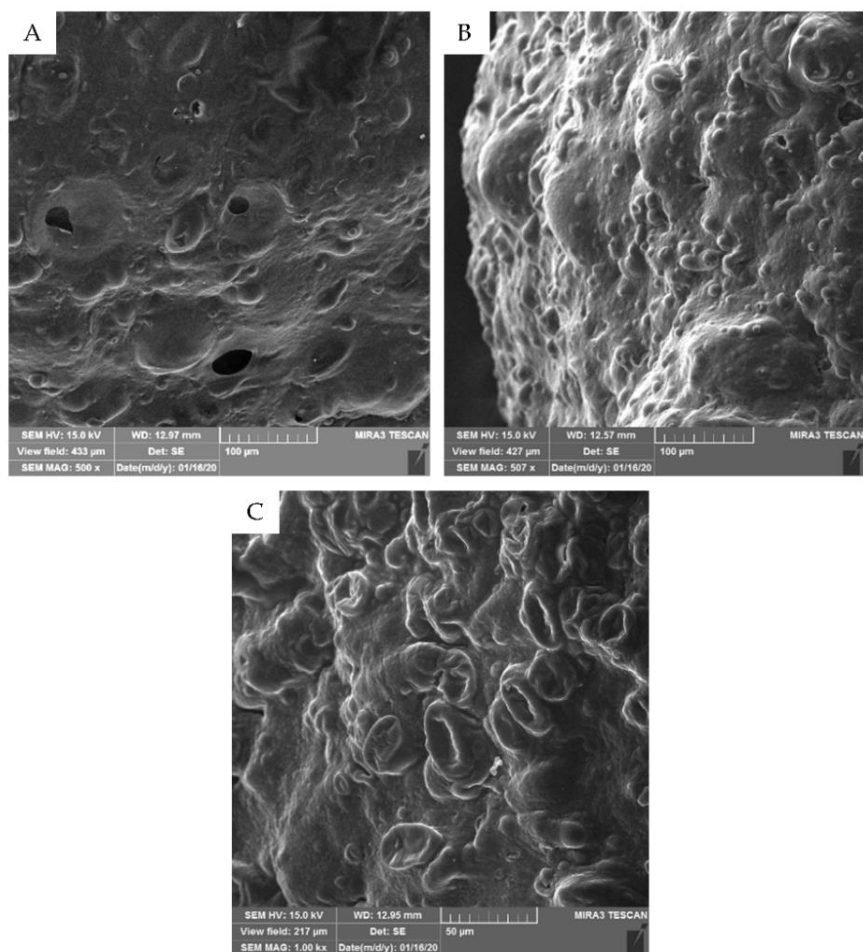


Slika 7.2. Uporedni prikaz ATR-FTIR spektara alginat/SPI/lecitin čestica, pre i nakon inkapsulacije etarskog ulja

7.2. SEM analiza alginat/SPI/lecitin hidrogel sistema

Na *Slici 7.3* prikazane su SEM mikrografije suvih alginat/SPI/lecitin čestica različite formulacije. Ono što je na prvi pogled karakteristično jeste da postoji razlika između površinske morfologije čestica bez lecitina (*Slika 6.9a*) i sa dodatkom istog. U odnosu na prethodno postojanje nehomogene, porozne strukture, u prisustvu lecitina (posebno kod formulacija A1.5/SP1/L i A1.5/SP1.5/L) dolazi do smanjenja poroznosti, odnosno do zatvaranja površine, uz nastanak većih zakrivljenja.

Isti uticaj dodatka lecitina u emulzije stabilizovane proteinima primetili su i autori Wang i sar. (2017). Objašnjenje se može naći u činjenici da je lecitin popunio ne samo male praznine na površini uljanih kapi, koje su prisutne i nakon adsorpcije proteina (Wilde i sar., 2004), već i praznine u strukturi matrice formirajući fosfolipidne micelle (Chang i sar., 2016) kao posledica viška lecitina u kontinualnoj fazi.

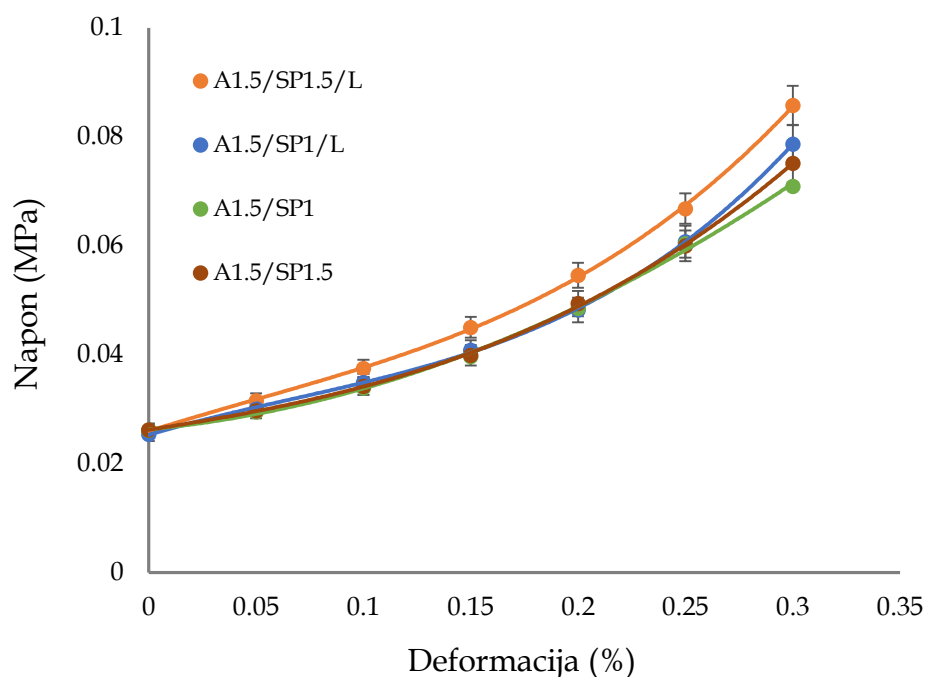


Slika 7.3. SEM mikrografije A) A1/SP1/L, B) A1.5/SP1/L i C) A1.5/SP1.5/L

7.3. Mehanička svojstva alginat/SPI/lecitin hidrogel sistema

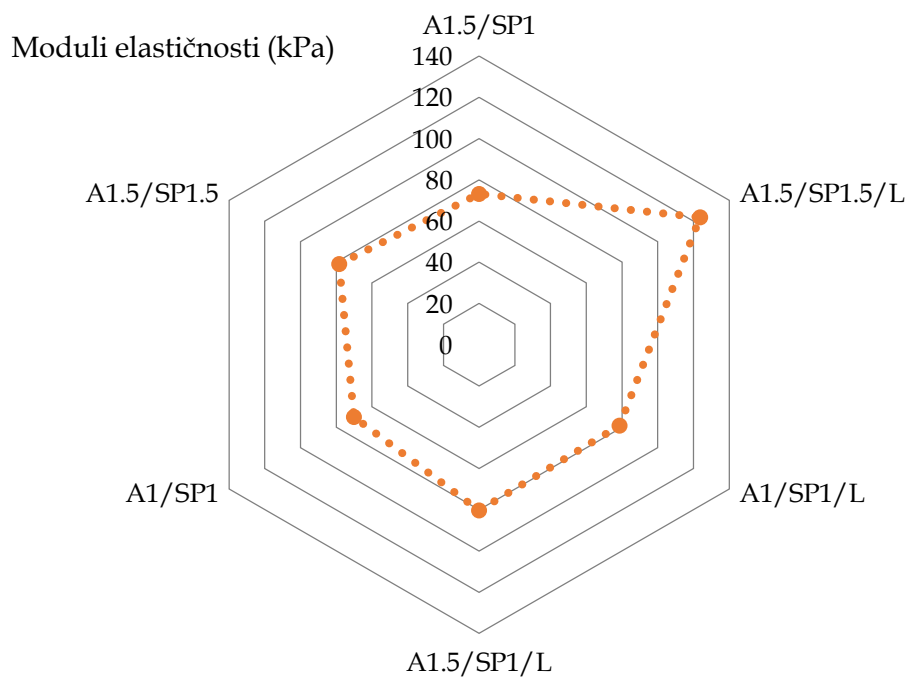
Mehaničke karakteristike alginat/SPI hidrogel nosača promjenjene su u prisustvu lipidnog emulgatora. Lecitinom obogaćeni uzorci posедуju bolju mehaničku stabilnost u poređenju sa istim uzorcima bez lecitina (statistički značajno za A1.5/SP1.5 prema A1.5/SP1.5/L) (*Slika 7.4*). Ovaj rezultat se može objasniti prisustvom elektrostatičkog privlačenja između negativno naelektrisanih fosfatnih grupa lecitina i pozitivno naelektrisanih amino grupa proteina soje, u kontinualnoj fazi i na površini uljanih kapljica. Elektrostatičke interakcije između komponenata potvrđene su rezultatima dobijenim pomoću FTIR spektroskopije (*Slika 7.2*).

Pozitivan uticaj lecitina na mehanička svojstva proteinskih gelova potvrdili su i drugi autori, takođe ukazujući na interakcije između globularnih proteina i lecitina (Dickinson i Yamamoto, 1996). Pored toga, višak lecitina dovodi do formiranja micela (*Slika 7.3*) što može uticati na čvrstinu nosača, s obzirom da su promene u strukturi primetne i na SEM mikrografijama nosača.



Slika 7.4. Poređenje zavisnosti napona od deformacije za alginat/SPI i alginat/SPI/lecitin hidrogel nosače

Sa Slike 7.5 se može videti da su vrednosti modula elastičnosti za alginat/SPI/lectin hidrogel nosače u rasponu od 78.6-123.7 kPa, što je značajno povećanje modula u odnosu na iste formulacije čestica bez lecitina (70.1-78.4 kPa).



Slika 7.5. Poređenje vrednosti modula elastičnosti za alginat/SPI i alginat/SPI/lecitin hidrogel nosače pri deformaciji od 30%

7.4. Termička stabilnost ulja inkapsuliranog u alginat/SPI/lecitin hidrogel sisteme

Termička stabilnost alginat/SPI/lecitin nosača za inkapsulaciju etarskog ulja timijana je analizirana praćenjem promene apsorbance na temperaturama od 50, 75 i 100 °C, tokom vremenskog perioda od 3h, kao u slučaju alginat/SPI nosača. U *Tabeli 7.1* su prikazani rezultati apsorbance slobodnog i inkapsuliranog ulja timijana, nakon termičkog tretmana. U odnosu na alginat/SPI čestice, sadržaj ukupnih polifenola ulja ostao je nepromenjen na svim temperaturama, nakon tretmana od 3h. Naime, dobijeni rezultati se mogu diskutovati u skladu sa morfološkim karakteristikama čestica, pri čemu je lecitin doprineo formiranju zatvorene strukture i manjoj poroznosti nosača (*Slika 7.3*). Dodatak još jednog emulgatora u sistem prouzrokovao je stvaranje kompaktnijeg filma oko uljanih kapljica, povećavajući na taj način njihovu stabilnost na povišenim temperaturama.

Tabela 7.1. Promena apsorbance (A^*) slobodnog i inkapsuliranog ulja timijana tokom izlaganja povišenim temperaturama, u periodu od 3h.

| | | 50°C | | | 75°C | | | 100°C | | |
|-----------|---------------|------|------|------|------|------|---|-------|---|---|
| Vreme (h) | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| A^* | Ulje timijana | 0.82 | 0.64 | 0.35 | 0.62 | 0.06 | 0 | 0.04 | 0 | 0 |
| | A1.5/SP1.5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Prema autorima Sun i sar. (2018) dodatak sojinog lecitina može promeniti termička svojstva proteina surutke izazivajući izlaganje skrivenih hidrofobnih proteinskih grupa, odnosno razmotavanje globula. Dodatno, Weete i sar. (1994) uočili su da zagrevanje dovodi do izmene svojstava lecitina kao emulgatora, kroz promenu njegovog sastava, odnosno smanjenjem fosfatida i povećanjem diglicerida.

7.5. Efikasnost inkapsulacije timola u alginat/SPI/lecitin hidrogel sisteme

Efikasnost inkapsulacije timola ispitivana je za alginat/SPI/lecitin hidrogel sisteme dobijene ekstruzijom emulzija tipa II (*Tabela 4.1b*).

Na osnovu rezultata prikazanih u *Tabeli 7.2*, ispitivani hidrogel sistemi pokazali su statistički značajne razlike, sa stepenom inkapsulacije u opsegu 82.2-85.9%, u zavisnosti od formulacije. Dodatak lecitina značajno je doprineo povećanju efikasnosti inkapsulacije u odnosu na iste formulacije bez lecitina (*Tabela 6.4*), usled kompetitivne adsorpcije proteina soje i lecitina koja doprinosi stvaranju stabilnije emulzije. Naime, ζ -potencijal emulzija stabilizovanih samo proteinima pokazuje negativne vrednosti (-43.0 ± 0.3 mV) (o čemu je diskutovano u odeljku 5.1), dok su vrednosti ζ -potencijala za emulzije stabilizovane SPI i lecitinom još niže (-50.1 ± 1.2 mV).

Dobijeni rezultat se može objasniti činjenicom da je lecitin u stvari smeša fosfatidilholina i fosfatidiletanolamina koji su nenaelektrisani u fiziološkim pH vrednostima, dok sa druge strane, manje količine kiselih lipida (fosfatidilinozitol, fosfatidilserin i fosfatidilglicerol) takođe

moгу biti prisutne i jonizovane na pH 7.0, indukujući negativno površinsko naelektrisanje kapljica emulzija. Sličan rezultat pokazali su autori Comas i sar. (2006) ističući da lecitin doprinosi većoj stabilnosti emulzija (suncokretovo ulje- u- vodi stabilizovano nativnim ili denaturisanim SPI i lecitinom) usled doprinosa naelektrisanja.

Tabela 7.2. Efikasnost inkapsulacije (EE_t) timola za alginat/SPI/lecitin hidrogel čestice različitih formulacija

| Formulacija | EE_t (%) |
|--------------|------------|
| A1/SP1/L | 82.2±0.4 |
| A1/SP1.5/L | 85.1±0.2 |
| A1.5/SP1/L | 84.0±0.5 |
| A1.5/SP1.5/L | 85.9±0.2 |

Međutim, drugi fenomeni takođe mogu doprineti sinergističkom efektu SPI i lecitina u emulzijama. Prema literaturnim podacima, lecitin uzrokuje razmotavanje proteinske strukture na interfejsu, pri čemu dolazi do izlaganja negativno naelektrisanih proteinskih ostataka (García-Moreno i sar., 2014; Xue i Zhong, 2014), što je dokazano smanjenjem vrednosti ζ -potencijala. Dodatno, elektrostatičko privlačenje između negativno naelektrisanih fosfatnih grupa lecitina i pozitivno naelektrisanih aaminskih grupa SPI (rezultati dobijeni FTIR analizom) je takođe jedno od mogućih objašnjenja za ostvaren rezultat.

Autori Sünder i sar. (2001) su u svojoj studiji ukazali na formiranje kompleksa između proteina surutke i lecitina, zasnovanom na dinamičkim merenjima površinske aktivnosti emulgatora na ulje/voda interfejsu. Pored toga, Wang i sar. (2017) su došli do zaključka da je sinergistički efekat dva emulgatora pozitivno uticao na efikasnost inkapsulacije ulja semenki božura u mikrokapsule na bazi proteina surutke, koje su proizvedene tehnikom sprej-sušenja.

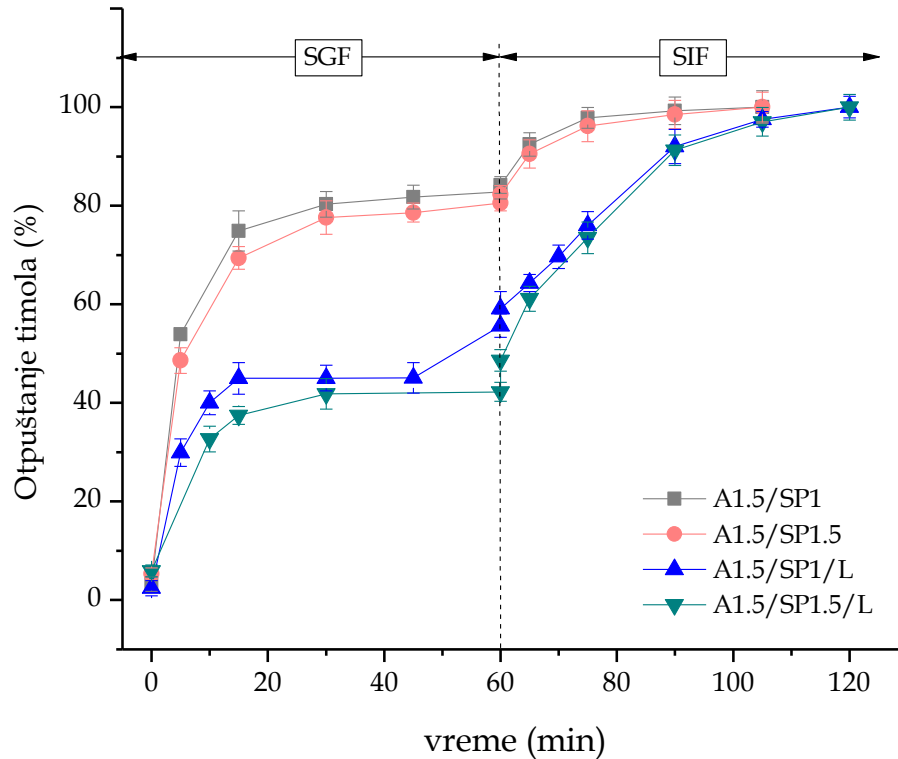
7.6. Otpuštanje timola iz alginat/SPI/lecitin hidrogel sistema u simuliranim GI uslovima

Kinetika otpuštanja praćena je iz alginat/SPI/lecitin hidrogel sistema u simuliranim gastrointestinalnim uslovima, pri čemu je sadržaj otpuštenog timola određen HPLC metodom. Da bi se ostvario uvid u efekat dodatka lecitina, krive otpuštanja (*Slika 7.7*) prikazane su za A1.5/SP1 prema A1.5/SP1/L i A1.5/SP1.5 prema A1.5/SP1.5/L.

Sa *Slike 7.7* može se uočiti značajna razlika u kinetici otpuštanja između ispitivanih hidrogel sistema različitih formulacija. Procenat otpuštenog timola u želudačnom fluidu iznosi 40-55%, odnosno 75-80%, iz čestica sa i bez lecitina u njihovom sastavu, respektivno.

Dobijeni rezultati ukazuju da je zatvorena površinska morfologija alginat/SPI/lecitin sistema (*Slika 7.3*) otpornija na razgradnju u prisustvu enzima u želudačnom fluidu, što je dovelo do značajno sporijeg otpuštanja. Zatim, prisustvo lecitina u formulacijama dovodi do

stvaranja kompaktnijeg filma oko uljanih kapi (Wilde i sar., 2004), što dodatno utiče na povećanje njihove zaštite.



Slika 7.7. Otpuštanje timola iz alginat/SPI/lecitin hidrogel sistema u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog trakta

Do istog zaključka su došli autori Wang i sar. (2017) za mikročestice dobijene sprej sušenjem emulzija u čijem su sastavu lecitin i proteini surutke, ali su oni simulirali samo pH uslove tankog creva, bez enzima. Takođe i kod alginat/SPI/lecitin formulacija zabeleženo je sporije otpuštanje timola sa povećanjem koncentracije proteina, a pri istom sadržaju alginata i lecitina.



DEO IV

Zaključna razmatranja

Poglavlje 8 – zaključak

8. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da hidrogel sistemi na bazi alginata i proteina soje mogu služiti za inkapsulaciju i kontrolisano/produženo otpuštanje etarskog ulja timijana (*Thymus vulgaris* L.).

Prvi deo doktorske disertacije posvećen je pripremi i karakterizaciji emulzionih sistema. Dobijeni rezultati pokazali su sledeće:

- Pozitivan uticaj denaturacije proteina na stabilnost emulzija potvrđen je vrednostima zeta potencijala emulzija sa nativnim i denaturisanim proteinima, neposredno nakon pripreme.
- Na osnovu reoloških ispitivanja, pokazano je da porast koncentracije alginata i/ili proteina dovodi do povećanja viskoznosti emulzija.
- Ramanova spektroskopska analiza emulzija pružila je dobar uvid u strukturnu organizaciju molekula na u/v granici faza. Dobijeni rezultati su ukazali da su kapljice etarskog ulja okružene i u interakciji sa molekulima proteina zahvaljujući njihovim hidrofobnim karakteristikama, dok se alginat nalazi u kontinualnoj fazi.

U drugom delu doktorske disertacije vršena je priprema i karakterizacija hidrogelova. Hidrogel čestice su sintetisane ekstruzijom polazne emulzije u rastvor kalcijum-hlorida, uz primenu elektrostatičkog napona. Ovako pripremljeni hidrogel sistemi su dalje podvgnuti karakterizaciji i izvedeni su sledeći zaključci:

FTIR analizom je potvrđena interakcija između alginata i proteina, odnosno između nosača i inkapsuliranog etarskog ulja.

Kako bi se razumeo proces otpuštanja ulja u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog trakta, bilo je neophodno ispitati mehanizme bubrenja hidrogelova.

- U uslovima simuliranog želudačnog fluida (u prvih 20 min) je primećeno kontrahovanje hidrogel čestica, praćeno gubitkom mase usled gubitka negativnog naelektrisanja karboksilnih grupa u kiseloj sredini i hidrolize jednog dela proteinskih molekula. Nakon ovog vremenskog perioda nije zabeležen dalji gubitak mase ispitivanih uzoraka.
- U uslovima simuliranog intestinalnog fluida, hidrogelovi na bazi alginata i proteina bubre. Step en bubrenja za sve ispitivane uzorke iznosio je od 60 do 240% njihove početne mase.
- Koncentracija alginata u česticama proporcionalna je njihovom bubrenju, ali i dostizanju kritične tačke bubrenja nakon koje čestice prelaze u fazu raspada.

Analizom reoloških svojstava alginat/SPI hidrogelova, na osnovu dobijenih vrednosti dinamičkih modula, ostvaren je bolji uvid u ponašanje ovog tipa nosača u simuliranim gastro-

intestinalnim uslovima. Ispitivanjem je primećeno da se slabljenje nosača odigrava postepeno tokom celog perioda u SGF-u, dok je u SIF-u ovaj efekat intenzivniji. Smanjenje krutosti nosača posledica je procesa u kojem dolazi do relaksacije alginatnih lanaca usled smanjenog međusobnog elektrostatičkog privlačenja, a zatim i usled odbijanja pozitivno naelektrisanih proteina (pI 4.6).

Sferičnost sintetisanih čestica je u funkciji njihovog sastava; hidrogel sistemi sa koncentracijom alginata do 1.5 mas.% mogu se smatrati sferičnim, dok se smanjenje vrednosti faktora sferičnosti moglo primetiti u formulacijama sa 2 i 2.5 mas.% alginata. Usled kontrahovanja u toku procesa sušenja, gubitak sferičnosti zabeležen je kod svih ispitivanih uzoraka.

Veličina sferičnih čestica u formi hidrogela je ~1400-1750 μm u prečniku, dok su suve čestice redukovane veličine, sa prečnikom ~600-1000 μm . Dimenzije nesferičnih čestica sa 2 i 2.5 mas.% alginata prelazile su 2000 μm za hidrogel, odnosno 1800 μm za suve, pri čemu je odnos $\text{š}/\text{d}$ za pojedine formulacije iznosio 3.

Primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) analizirana je površinska morfologija uzoraka. SEM mikrografije su potvrdile da koncentracija alginata ima značajniji efekat na površinsku morfologiju alginat/SPI čestica u odnosu na koncentraciju proteina.

Inkapsulacijom dolazi do smanjenja mehaničke čvrstoće i modula elastičnosti kao rezultat diskontinuiteta u strukturi matrice. Porast koncentracije alginata uzrokuje veću čvrstinu hidrogelova, kao i povećanje modula elastičnosti, što se objašnjava većom gustinom umreženih lanaca. Najveći doprinos povećanju čvrstoće alginatnih gelova uočen je dodatkom izolata proteina soje, što se može pripisati povećanju intramolekularnih vodoničnih i elektrostatičkih interakcija između suprotno naelektrisanih polielektrolita, kao i formiranju gustih višeslojnih filmova oko kapljica ulja, koji, između ostalog, povećavaju otpornost uljanih kapi na kompresiju.

Hidrogel sistemi su pokazali efikasnost u povećanju termičke stabilnosti ulja timijana nakon inkapsulacije. Na višim ispitivanim temperaturama (75 i 100 $^{\circ}\text{C}$) nosači na bazi alginata i proteina soje su obezbedili potpunu zaštitu ulja u vremenskom intervalu od 3 h, kao rezultat dodatne denaturacije proteina i formiranja kompaktnijeg zaštitnog filma oko uljanih kapljica.

Efikasnost inkapsulacije je složena funkcija nekoliko parametara, kao što su parametri emulzifikacije, hidrofobnost proteina, poroznost polimerne matrice i interakcije između ulja i nosača.

- Koncentracija alginata i/ili proteina utiče na efikasnost inkapsulacije timola. Sa porastom koncentracije jednog polimera (pri konstantnoj koncentraciji drugog) dolazi do povećanja stepena inkapsulacije kao posledica formiranja guste alginatne mreže sa kohezivnim slobodnim mestima u koje se smeštaju kapljice ulja i površinske aktivnosti denaturisanih proteina (više proteina-bolje emulgovanje). Sa druge strane, sistemska zavisnost koncentracije alginata i/ili proteina na stepen inkapsulacije ukupnih polifenola nije primećena.

Otpuštanje inkapsuliranog ulja je praćeno u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog trakta (T, pH, enzimi, soli) kako bi se stekao uvid u potencijal hidrogelova na bazi alginata i proteina soje za primenu u sistemima za kontrolisanu/ciljanu dostavu aktivnih supstanci.

- Profil otpuštanja za sve formulacije karakteriše „burst“ efekat, odnosno brzo inicijalno otpuštanje kao posledica difuzije neinkapsuliranog ulja sa površine čestica. Dalje otpuštanje ulja okolni medijum (SGF) se odvijalo ravnotežno.
- Uočeno je da porast koncentracije alginata i/ili proteina dovodi do sporijeg otpuštanja ulja.
- Različite brzine zabeležene su praćenjem otpuštanja ukupnih polifenola i timola. Naime, otpuštanje polifenola se odigravalo u vremenskom periodu do 2,5 h, dok je vreme otpuštanje timola bilo kraće i iznosilo do 2 h, u zavisnosti od formulacije. Ovaj rezultat posledica je različite pripreme emulzija (tip I i tip II) i činjenice da polifenolna jedinjenja u zavisnosti od molekulske mase i hemijske strukture ostvaruju različite brzine otpuštanja.
- U SGF-u otpuštanje je variralo u opsegu 40-55% za ukupne polifenole, odnosno 75-80% za timol, dok je u SIF-u ovaj proces nastavljen do potpune degradacije čestica.
- Primenom nelinearnog populacionog modela na eksperimentalno dobijene profile otpuštanja ukupnih polifenola ulja, došlo se do zaključka da je specifična brzina otpuštanja u želudačnom fluidu 3 do 5 puta veća nego u pankreasnom, što je posledica „burst“ efekta. Uzorci sa većom koncentracijom alginata (pri istom sadržaju proteina) ostvarili su duže vreme relaksacije u SIF-u, dok je nasuprot tome vaţilo pravilo „više proteina-kraće relaksaciono vreme“ pri istom sadržaju alginata (1.5 mas.% ili 2 mas.%).

Antioksidativna aktivnost uzoraka nakon inkapsulacije pokazana je ABTS i CUPRAC metodama. Dobijeni rezultati su u skladu sa sadržajem ukupnih polifenola; najveću antioksidativnu aktivnost pokazao je sistem sa najvećom koncentracijom alginata i proteina i suprotno. Dodatno, ispitivanjem antioksidativne aktivnosti uzoraka nakon termičkog tretmana ostvareni su bolji rezultati na 75 i 100 °C, u odnosu na 50 °C, što je u skladu sa termičkom stabilnošću nosača na ispitivanim temperaturama.

Mikrobicidni efekat inkapsuliranog etarskog ulja (formulacija A1.5/SP1.5) postignut je za *C. albicans* (čije kolonije nisu detektovane u medijumu nakon 24h). Optimizacijom sistema, koja je uključivala smanjenje sadržaja proteina i povećanje koncentracije ulja, kao i primenom novih formulacija čestica, došlo je do inaktivacije bakterijskih sojeva *E. coli* i *S. aureus*.

Na kraju, poseban deo doktorske disertacije odnosi se na pripremu i karakterizaciju alginat/SPI/lecitin sistema. Hidrogelovi su sintetisani tehnikom ekstruzije, sa ciljem da se utvrdi doprinos lecitina na karakteristike alginat/SPI hidrogelova.

FTIR analizom, na osnovu pomeranja karakterističnih alkalnih traka potvrđeno je prisustvo lecitina u česticama, a zatim su potvrđene i interakcije između proteina i lecitina na osnovu pomeranja Amid I trake. Ostvarena je inkapsulacija ulja što je dokazano prisustvom najintenzivnije trake ulja na 807 cm⁻¹, u spektru alginat/SPI/lecitin čestica nakon inkapsulacije.

Na osnovu SEM mikrografija uočeno je da u prisustvu lecitina dolazi do formiranja manje porozne strukture, odnosno zatvaranja površine, uz nastanak većih zakrivljenja. Ostvareni

rezultat je posledica formiranja kompaktnijeg filma oko kapljica ulja, kao i popunjavanja praznina u strukturi matrice formiranjem fosfolipidnih micela.

Lecitinom obogaćeni uzorci poseduju bolju mehaničku stabilnost u poređenju sa istim uzorcima bez lecitina.

Termička stabilnost uzoraka, u odnosu na iste formulacije bez lecitina, potvrđena je nepromenjenim sadržajem ukupnih polifenola ulja na svim ispitivanim temperaturama. Ostvareni rezultat je u skladu sa morfološkim karakteristikama čestica, s obzirom da je lecitin doprineo smanjenju poroznosti nosača.

Prisustvo lecitina u alginat/SPI/lecitin česticama omogućilo je postizanje efikasnije inkapsulacije u odnosu na alginat/SPI sisteme, do 12.5% (A1.5/SP1.5 prema A1.5/SP1.5/L).

Otpuštanje inkapsuliranog timola iz alginat/SPI/lecitin sistema odvija se po istom mehanizmu kao i iz alginat/SPI sistema. Sa druge strane, procenat otpuštenog timola u želudačnom fluidu iznosi 40-55%, što je za ~30% niže nego u slučaju alginat/SPI sistema. Dobijeni rezultati ukazuju da je zatvorena površinska morfologija alginat/SPI/lecitin sistema otpornija na razgradnju u prisustvu enzima u želudačnom fluidu, što je dovelo do značajno sporijeg otpuštanja.

Ova doktorska disertacija ima naučni doprinos u vidu razvoja i karakterizacije novih sistema za inkapsulaciju i kontrolisano otpuštanje etarskog ulja. Dodatno, rezultati koji su proistekli iz disertacije daju uvid industrijskom sektoru o potencijalu ovih sistema za širu primenu, s obzirom da bi njihov dodatak mogao da obezbedi kako dugotrajnost proizvoda kontrolisanim otpuštanjem, tako i efikasnost na ciljanom mestu.

L I T E R A T U R A

- Aarstad, O., Heggset, E., Pedersen, I., Bjørnøy, S., Syverud, K., & Strand, B. (2017). Mechanical properties of composite Hydrogels of alginate and cellulose Nanofibrils. *Polymers*, 9(12), 378.
- Abaee, A., Mohammadian, M., & Jafari, S. M. (2017). Whey and soy protein-based hydrogels and nano-hydrogels as bioactive delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 70, 69-81.
- Ahmad, A., Khan, A., & Manzoor, N. (2013). Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1-2), 80-86.
- Ahmad, I., & Beg, A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2), 113-123.
- Albano, K. M., Cavallieri, Â. L., & Nicoletti, V. R. (2018). Electrostatic interaction between proteins and polysaccharides: Physicochemical aspects and applications in emulsion stabilization. *Food Reviews International*, 35(1), 54-89.
- Alikhani, M., & Garmakhany, A. D. (2012). Effect of microencapsulated essential oils on storage life and quality of strawberry (*Fragaria ananassa* CV. Camarosa). *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 4(2), 106-112.
- Alleavitch, J., Turner, W. A., Finch, C. A., Elvers, B., Rounsaville, J. F., & Schulz, G. (1990). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (3rd ed., p. 307). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Almanea, A., El-Aziz, G. S., & Ahmed, M. M. (2019). The potential gastrointestinal health benefits of thymus vulgaris essential oil: A review. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(04), 1793-1799.
- Almeida, A. P., Rodríguez-Rojo, S., Serra, A. T., Vila-Real, H., Simplicio, A. L., Delgadillo, I., Beirão da Costa, S., Beirão da Costa, L., Nogueira, I. D., & Duarte, C. M. (2013). Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 140-145.
- Andersen, I. L., Skipnes, O., Smidsrod, O., Ostgaard, K., & Hemmer, P. C. (1977). Some biological functions of matrix components in benthic algae in relation to their chemistry and the composition of seawater. In *Cellulose chemistry and technology* (pp. 361-381). Jett, C. A. J., American Chemical Society, U.S.
- Angulo, F. J., Baker, N. L., Olsen, S. J., Anderson, A., & Barrett, T. J. (2004). Antimicrobial use in agriculture: Controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15(2), 78-85.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Çelik, S. E. (2007). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413-419.
- Appelqvist, I. A., Golding, M., Vreeker, R., & Zuidam, N. J. (2007). Emulsions as delivery systems in foods. In Lakkis, J.M. (Ed.) *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (pp. 129-172). John Wiley & Sons.

- Arana-Sánchez, A., Estarrón-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E., Padilla-Camberos, E., Silva-Vázquez, R., & Lugo-Cervantes, E. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, 50(6), 585-590.
- Arancibia, M. Y., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2014). Release of volatile compounds and biodegradability of active soy protein lignin blend films with added citronella essential oil. *Food Control*, 44, 7-15.
- Arfa, A. B., Chrakabandhu, Y., Preziosi-Belloy, L., Chalier, P., & Gontard, N. (2007). Coating papers with soy protein isolates as inclusion matrix of carvacrol. *Food Research International*, 40(1), 22-32.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199-212.
- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., Mousadik, A. E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F., & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243.
- Astani, A., Reichling, J., & Schnitzler, P. (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-8.
- Bagamboula, C., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and P-cymene towards shigella sonnei and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21(1), 33-42.
- Bajpai, S., & Sharma, S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers*, 59(2), 129-140.
- Bajpai, V. K., Kang, S., Xu, H., Lee, S., Baek, K., & Kang, S. (2011). Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: A review. *The Plant Pathology Journal*, 27(3), 207-224.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2015). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143-182.
- Bassolé, I. H., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- Belščak-Cvitanović, A., Đorđević, V., Karlović, S., Pavlović, V., Komes, D., Ježek, D., Bugarski, B., & Nedović, V. (2015). Protein-reinforced and chitosan-pectin coated alginate microparticles for delivery of flavan-3-ol antioxidants and caffeine from green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 51, 361-374.
- Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., & Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using Ionic gelation. *Food Chemistry*, 204, 77-83.
- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., & Reyes, J. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 232-239.

- Berton-Carabin, C. C., Ropers, M., & Genot, C. (2014). Lipid oxidation in oil-in-Water emulsions: Involvement of the interfacial layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 945-977.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Proteins. In *Medical Biochemistry* (pp. 21-71). Elsevier.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., & Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1822-1828.
- Bugarski, B., Li, Q., Goosen, M. F., Poncelet, D., Neufeld, R. J., & Vunjak, G. (1994). Electrostatic droplet generation: Mechanism of polymer droplet formation. *AIChE Journal*, 40(6), 1026-1031.
- Bugarski, B. M., Obradovic, B., Nedovic, V. A., & Poncelet, D. (2004). Immobilization of cells and enzymes using electrostatic droplet generation. *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*, 277-294.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Calcabrini, A., Stringaro, A., Toccaceli, L., Meschini, S., Marra, M., Colone, M., Arancia, G., Molinari, A., Salvatore, G., & Mondello, F. (2004). Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca Alternifolia* (Tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(2), 349-360.
- Cambel, A. B. (1993). *Applied chaos theory: A paradigm for complexity*. Boston/London/New York: Academic Press, Inc.
- Cardenas-Jiron, G., Leal, D., Matsuhira, B., & Osorio-Roman, I. O. (2011). Vibrational spectroscopy and density functional theory calculations of poly-D-mannuronate and heteropolymeric fractions from sodium alginate. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42(4), 870-878.
- Carro, S., Gonzalez-Coronel, V. J., Castillo-Tejas, J., Maldonado-Textle, H., & Tepale, N. (2017). Rheological properties in aqueous solution for Hydrophobically modified polyacrylamides prepared in inverse emulsion polymerization. *International Journal of Polymer Science*, 2017, 1-13.
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Castro, M. A. A., Alric, I., Brouillet, F., Peydecastaing, J., Fullana, S. G., & Durrieu, V. (2018). Soy protein Microparticles for enhanced oral ibuprofen delivery: Preparation, characterization, and in vitro release evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 19(3), 1124-1132.
- Chamorro, E.R., Zambón, S.N., Morales, W.G., Sequeira, A.F., Velasco, G.A. (2012). Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography. In: Salih, B., Çelikbıçak, Ö. (Eds.), *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. InTech, Rijeka, pp. 307-324.
- Chan, E. (2011). Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers*, 84(4), 1267-1275.

- Chan, E., Lee, B., Ravindra, P., & Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of Ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), 63-72.
- Chan, E., Lim, T., Voo, W., Pogaku, R., Tey, B. T., & Zhang, Z. (2011). Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. *Particuology*, 9(3), 228-234.
- Chan, L. W., Ching, A. L., Liew, C. V., & Heng, P. W. (2007). Mechanistic study on hydration and drug release behavior of sodium alginate compacts. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 33(6), 667-676.
- Chang, C. P., & Dobashi, T. (2003). Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32(3), 257-262.
- Chang, C., Varankovich, N., & Nickerson, M. (2016). Microencapsulation of Canola oil by lentil protein isolate-based wall materials. *Food Chemistry*, 212, 264-273.
- Charoen, R., Jangchud, A., Jangchud, K., Harnsilawat, T., Naivikul, O., & McClements, D. J. (2011). Influence of Biopolymer emulsifier type on formation and stability of rice bran oil-in-Water emulsions: Whey protein, gum Arabic, and modified starch. *Journal of Food Science*, 76(1), E165-E172.
- Chen, F., Li, B., & Tang, C. (2015). Nanocomplexation between curcumin and soy protein isolate: Influence on curcumin stability/Bioaccessibility and in vitro protein digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3559-3569.
- Chen, N., Zhao, M., Sun, W., Ren, J., & Cui, C. (2013). Effect of oxidation on the emulsifying properties of soy protein isolate. *Food Research International*, 52(1), 26-32.
- Chen, W., Li, X., Rahman, R. T., Al-Hajj, N. Q., Dey, K. C., & Raqib, S. M. (2014). Review: Emulsification properties of soy bean protein. *Nusantara Bioscience*, 6(2), 196-202.
- Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1133-1152.
- Chizzola, R., Michitsch, H., & Franz, C. (2008). Antioxidative properties of thymus vulgaris leaves: Comparison of different extracts and essential oil Chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6897-6904.
- Chung, S. K., Seo, J. Y., Lim, J. H., Park, H. H., Yea, M. J., & Park, H. J. (2013). Microencapsulation of essential oil for insect repellent in food packaging system. *Journal of Food Science*, 78(5), E709-E714.
- Comas, D., Wagner, J., & Tomás, M. (2006). Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: Influence of pH on soybean protein-lecithin interaction. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 990-996.
- Coppi, G., Iannuccelli, V., Leo, E., Bernabei, M. T., & Camerini, R. (2002). Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles. *Journal of Microencapsulation*, 19(1), 37-44.
- Dapueto, N., Troncoso, E., Mella, C., & Zúñiga, R. N. (2019). The effect of denaturation degree of protein on the microstructure, rheology and physical stability of oil-in-water (O/W) emulsions stabilized by whey protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 263, 253-261.

- De Matos, E. F., Scopel, B. S., & Dettmer, A. (2018). Citronella essential oil microencapsulation by complex coacervation with leather waste gelatin and sodium alginate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 1989-1994.
- De Oliveira, E. F., Paula, H. C., & Paula, R. C. (2014). Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 146-151.
- Delahaije, R. J., Gruppen, H., Giuseppin, M. L., & Wierenga, P. A. (2015). Towards predicting the stability of protein-stabilized emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219, 1-9.
- Deng, X., Zhang, N., & Tang, C. (2016). Soy protein isolate as a nanocarrier for enhanced water dispersibility, stability and bioaccessibility of β -carotene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(7), 2230-2237.
- Derkach, S. R. (2009). Rheology of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 151(1-2), 1-23.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25.
- Dias, M. I., Ferreira, I. C., & Barreiro, M. F. (2015). Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food & Function*, 6(4), 1035-1052.
- Dickinson, E. (1992). Faraday research article. Structure and composition of adsorbed protein layers and the relationship to emulsion stability. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 88(20), 2973.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 25-39.
- Dickinson, E., & Golding, M. (1997). Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 11(1), 13-18.
- Dickinson, E., & Yamamoto, Y. (1996). Viscoelastic properties of heat-set whey protein-stabilized emulsion gels with added lecithin. *Journal of Food Science*, 61(4), 811-816.
- Dima, C., Pătrașcu, L., Cantaragiu, A., Alexe, P., & Dima, Ș. (2016). The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules. *Food Chemistry*, 195, 39-48.
- Donati, I., & Paoletti, S. (2009). Material properties of alginates. *Alginates: Biology and Applications*, 1-53.
- Dong, Z., Ma, Y., Hayat, K., Jia, C., Xia, S., & Zhang, X. (2011). Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *Journal of Food Engineering*, 104(3), 455-460.
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1908-1914.
- Driskell, J. D., Kwarta, K. M., Lipert, R. J., Porter, M. D., Neill, J. D., & Ridpath, J. F. (2005). Low-level detection of viral pathogens by a surface-enhanced Raman scattering based immunoassay. *Analytical Chemistry*, 77(19), 6147-6154.
- 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 Reviews*, 7(4), 452-490.

- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308-323.
- El Kinawy, O. S., Petersen, S., Helmdach, L., & Ulrich, J. (2012). Parameter selection of emulsification processes: Conditions for nano- and Macroemulsions. *Chemical Engineering & Technology*, 35(9), 1604-1608.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441.
- Enciso, E., Borrás-Enriquez, A., Ventura-Canseco, L., Gutiérrez-Miceli, F., Dendooven, L., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M., Ruíz-Valdiviezo, V., & Abud-Archila, M. (2018). Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (Dc) Stapf) essential oil encapsulation by freeze-drying. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(2), 407-420.
- Fani, M., & Kohanteb, J. (2017). In vitro antimicrobial activity of thymus vulgaris essential oil against major oral pathogens. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(4), 660-666.
- Faraji, H., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-Water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4558-4564.
- Fernandes, R. V., Borges, S. V., Botrel, D. A., Silva, E. K., Costa, J. M., & Queiroz, F. (2013). Microencapsulation of Rosemary essential oil: Characterization of particles. *Drying Technology*, 31(11), 1245-1254.
- Friedman, M., & Brandon, D. L. (2001). Nutritional and health benefits of soy Proteins†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1069-1086.
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and Rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21(10), 989-994.
- Galvão, L. C., Furletti, V. F., Bersan, S. M., Da Cunha, M. G., Ruiz, A. L., Carvalho, J. E., Sartoratto, A., Rehder, V. L., Figueira, G. M., Teixeira Duarte, M. C., Ikegaki, M., De Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2012). Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-12.
- García-Moreno, P. J., Horn, A. F., & Jacobsen, C. (2014). Influence of casein-phospholipid combinations as emulsifier on the physical and oxidative stability of fish oil-in-Water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(5), 1142-1152.
- Golja, B., Šumiga, B., & Forte Tavčer, P. (2013). Fragrant finishing of cotton with microcapsules: Comparison between printing and impregnation. *Coloration Technology*, 129(5), 338-346.
- Goto, Y., & Fink, A. L. (1989). Conformational states in .beta.-lactamase: Molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry*, 28(3), 945-952.
- Granger, R., & Passet, J. (1973). Thymus vulgaris spontane de France: Races chimiques et chemotaxonomie. *Phytochemistry*, 12(7), 1683-1691.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1), 195-198.

- Gumus, C. (2017). Utilization of natural emulsifiers and their derivatives to formulate emulsion-based delivery systems for hydrophobic nutraceuticals. Doctoral Dissertation. University of Massachusetts Amherst.
- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J., Bell, H. C., Wyllie, S. G., & Warmington, J. R. (1998). Effects of tea tree oil on escherichia coli. *Letters in Applied Microbiology*, 26(3), 194-198.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91-97.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
- Hart, P., Brand, C., Carson, C., Riley, T., Prager, R., & Finlay-Jones, J. (2000). Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*, 49(11), 619-626.
- Henrique Rodrigues do Amaral, P., Lopes Andrade, P., & Costa de Conto, L. (2019). Microencapsulation and its uses in food science and technology: A review. *Microencapsulation - Processes, Technologies and Industrial Applications*.
- Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., Khosravi-Darani, K., Shojaee-Aliabadi, S., Dehghan, S., & Khaksar, R. (2013). Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/Ionic gelation process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 582-588.
- Hua, Y., Cui, S. W., & Wang, Q. (2003). Gelling property of soy protein-gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17(6), 889-894.
- Huang, X., & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2-3), 121-136.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12).
- Ilyin, S. O., Kulichikhin, V. G., & Malkin, A. Y. (2015). Rheological properties of emulsions formed by polymer solutions and modified by nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, 293(6), 1647-1654.
- Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 565-573.
- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B. A., Kurkcuoglu, M., & Baser, K. H. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93(3), 551-556.
- Kaur, G., Grewal, J., Jyoti, K., Jain, U. K., Chandra, R., & Madan, J. (2018). Oral controlled and sustained drug delivery systems. In Grumezescu, A.M. (Ed.) *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems* (pp. 567-626). William Andrew Inc.
- Khan, S. T., Khan, M., Ahmad, J., Wahab, R., Abd-Elkader, O. H., Musarrat, J., Alkathlan, H. Z., & Al-Kedhairi, A. A. (2017). Thymol and carvacrol induce autolysis,

- stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by streptococcus mutans. *AMB Express*, 7(1).
- Kim, H., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2002). Impact of protein surface Denaturation on droplet flocculation in Hexadecane oil-in-Water emulsions stabilized by β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7131-7137.
- Klang, V., & Valenta, C. (2011). Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), 55-76.
- Knezevic, Z., Bobic, S., Milutinovic, A., Obradovic, B., Mojovic, L., & Bugarski, B. (2002). Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. *Process Biochemistry*, 38(3), 313-318.
- Kokina, M., Kalušević, A., Nedović, V., Nikšić, M., Shamtsyan, M., Šavikin, K., Pljevljakušić, D., Pantić, M., Lević, S., & Salević, A. (2019). Characterization, antioxidant and antibacterial activity of essential oils and their encapsulation into biodegradable material followed by freeze drying. *Food technology and biotechnology*, 57(2), 282-289.
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.
- Koo, S. Y., Cha, K. H., Song, D., Chung, D., & Pan, C. (2013). Microencapsulation of peppermint oil in an alginate-pectin matrix using a coaxial electrospray system. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(3), 733-739.
- Kuligowski, J., Quintás, G., Esteve-Turrillas, F., Garrigues, S., & De la Guardia, M. (2008). On-line gel permeation chromatography-attenuated total reflectance-fourier transform infrared determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements. *Journal of Chromatography A*, 1185(1), 71-77.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85(4), 633-640.
- Lam, R. S., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975-984.
- Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P., & Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
- Larkin, P. (2011). General Outline and Strategies for IR and Raman Spectral Interpretation. In *Infrared and Raman Spectroscopy* (pp. 117-133). Elsevier.
- Lee, H., Cho, B., Kim, M. S., Lee, W., Tewari, J., Bae, H., Sohn, S., & Chi, H. (2013). Prediction of crude protein and oil content of soybeans using Raman spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185, 694-700.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126.
- Lević, S., Pajić Lijaković, I., Đorđević, V., Rac, V., Rakić, V., Šolević Knudsen, T., Pavlović, V., Bugarski, B., & Nedović, V. (2015). Characterization of sodium alginate/D-limonene emulsions and respective calcium alginate/D-limonene beads produced by electrostatic extrusion. *Food Hydrocolloids*, 45, 111-123.
- Li Tay, S., Yao Tan, H., & Perera, C. (2006). The coagulating effects of cations and anions on soy protein. *International Journal of Food Properties*, 9(2), 317-323.

- Lidert, Z. (2005). Microencapsulation: An overview of the technology landscape. In Rosen, M.R. (Ed.) *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products* (pp. 181-190). William Andrew Inc.
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., Mueller, A., Schäberle, T. F., Hughes, D. E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V. A., Cohen, D. R., Felix, C. R., Fetterman, K. A., Millett, W. P., Nitti, A. G., Zullo, A. M., ... Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455-459.
- Lin-Vien, D., Colthup, N., Fateley, W., & Grasselli, J. (1991). *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules* (p. 502). Academic Press. San Diego.
- Liu, F., Chen, Z., & Tang, C. (2014). Microencapsulation properties of protein isolates from three selected Phaseolus legumes in comparison with soy protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 74-82.
- Liu, H., Gong, J., Chabot, D., Miller, S. S., Cui, S. W., Zhong, F., & Wang, Q. (2018). Improved survival of lactobacillus zeae LB1 in a spray dried alginate-protein matrix. *Food Hydrocolloids*, 78, 100-108.
- Liu, Z., Chang, S. K., Li, L., & Tatsumi, E. (2004). Effect of selective thermal denaturation of soybean proteins on soymilk viscosity and tofu's physical properties. *Food Research International*, 37(8), 815-822.
- Maa, Y., & Hsu, C. (1996). Liquid-liquid emulsification by rotor/stator homogenization. *Journal of Controlled Release*, 38(2-3), 219-228.
- Maes, C., Bouquillon, S., & Fauconnier, M-L. (2019). Encapsulation of essential oils for the development of Biosourced pesticides with controlled release: A review. *Molecules*, 24(14), 2539.
- Malićanin, M., Rac, V., Antić, V., Antić, M., Palade, L. M., Kefalas, P., & Rakić, V. (2014). Content of antioxidants, antioxidant capacity and oxidative stability of grape seed oil obtained by ultra sound assisted extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(6), 989-999.
- Maltais, A., Remondetto, G. E., Gonzalez, R., & Subirade, M. (2005). Formation of soy protein isolate cold-set gels: Protein and salt effects. *Journal of Food Science*, 70(1), C67-C73.
- Maltais, A., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2009). Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1647-1653.
- Manojlovic, V., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2006). Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: A model system for potential application in medicine. *International Journal of Nanomedicine*, 1(2), 163-171.
- Manojlović, V. (2008). Imobilizacija biološki aktivnih supstanci i ćelija u mikro- i nanočestičnim sistemima. Doktorska disertacija. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Martins, E., Poncelet, D., Rodrigues, R. C., & Renard, D. (2017). Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: Applications and drawbacks. *Journal of Microencapsulation*, 34(8), 754-771.
- McClements, D. J. (1999). Emulsion Ingredients. In *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques* (pp. 83-124). CRC Press. Boca Raton.

- McClements, D. J. (2005). *Food emulsions: Principles, practice and techniques*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Taylor & Francis Group.
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719-1729.
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 108(8), 652-659.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 291-312.
- Mirtallo, J. M., Dasta, J. F., Kleinschmidt, K. C., & Varon, J. (2010). State of the art review: Intravenous fat emulsions: Current applications, safety profile, and clinical implications. *Annals of Pharmacotherapy*, 44(4), 688-700.
- Molina, E., Papadopoulou, A., & Ledward, D. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*, 15(3), 263-269.
- Moresi, M., & Bruno, M. (2007). Characterisation of alginate gels using quasi-static and dynamic methods. *Journal of Food Engineering*, 82(3), 298-309.
- Nakatsu, T., Lupo, A. T., Chinn, J. W., & Kang, R. K. (2000). Biological activity of essential oils and their constituents. *Bioactive Natural Products (Part B)*, 571-631.
- Natrajan, D., Srinivasan, S., Sundar, K., & Ravindran, A. (2015). Formulation of essential oil-loaded chitosan-alginate nanocapsules. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 560-568.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. D. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.
- Nedović, V. A., Obradović, B., Leskošek-Čukalović, I., Trifunović, O., Pešić, R., & Bugarski, B. (2001). Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast. *Process Biochemistry*, 37(1), 17-22.
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., & Phillips, G. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301-318.
- Obradovic, N., Pajic-Lijakovic, I., Krunic, T., Belovic, M., Rakin, M., & Bugarski, B. (2019). Effect of encapsulated probiotic starter culture on rheological and structural properties of natural Hydrogel carriers affected by fermentation and gastrointestinal conditions. *Food Biophysics*, 15(1), 18-31.
- Obradović, N. S., Krunić, T. Ž., Trifković, K. T., Bulatović, M. L., Rakin, M. P., Rakin, M. B., & Bugarski, B. M. (2015). Influence of Chitosan coating on mechanical stability of Biopolymer carriers with probiotic starter culture in fermented whey beverages. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 1-8.
- Ohtsuru, M., & Kito, M. (1983). Association of phosphatidylcholine with soybean 11S globulin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(8), 1907-1908.
- Omidbaigi, R., Kazemi, S., & Daneshfar, E. (2008). Harvest time effecting on the essential oil content and compositions of *Thymus vulgaris*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(2), 162-167.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *staphylococcus aureus* and *listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 414-420.

- O'Loughlin, I. B., Murray, B. A., Kelly, P. M., FitzGerald, R. J., & Brodkorb, A. (2012). Enzymatic hydrolysis of heat-induced aggregates of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19), 4895-4904.
- Palazolo, G. G., Sorgentini, D. A., & Wagner, J. R. (2004). Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(7), 625-632.
- 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(1-2), 34-42.
- Penta-Ramos, E., & Xiong, Y. (2002). Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *Journal of Food Science*, 67(8), 2952-2956.
- Pereira, L., Sousa, A., Coelho, H., Amado, A. M., & Ribeiro-Claro, P. J. (2003). Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 223-228.
- Pichot, R., Watson, R., & Norton, I. (2013). Phospholipids at the interface: Current trends and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11767-11794.
- Pielesz, A. (2007). Raman Spectroscopy as a Tool for Analysing Dye Distribution in Alginate Hydrogels. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 15(5-6), 64-65.
- Pophof, B., Stange, G., & Abrell, L. (2005). Volatile organic compounds as signals in a plant-herbivore system: Electrophysiological responses in olfactory sensilla of the moth *Cactoblastis cactorum*. *Chemical Senses*, 30(1), 51-68.
- Prüsse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., Lewińska, D., Manojlovic, V., Massart, B., Nastruzzi, C., Nedovic, V., Poncelet, D., Siebenhaar, S., Tobler, L., Tosi, A., Vikartovská, A., & Vorlop, K. (2008). Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers*, 62(4).
- Pusztai, R., Hohmann, J., Gang, G., & Molnár, J. (2013). Inhibition of human cytomegalovirus IE gene expression by the extract of *Glycyrrhiza uralensis*. *Planta Medica*, 79(13).
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., & López-Ribot, J. L. (2005). Candida Biofilms: An update: FIG. 1. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 633-638.
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264.
- 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 and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties - an overview. *Complementary Medicine Research*, 16(2), 79-90.
- Renard, D., Van de Velde, F., & Visschers, R. W. (2006). The gap between food gel structure, texture and perception. *Food Hydrocolloids*, 20(4), 423-431.
- Renkema, J. M., Gruppen, H., & Van Vliet, T. (2002). Influence of pH and Ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to Denaturation and their protein compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6064-6071.

- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., & Sanches-Silva, A. (2017). Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Current Opinion in Food Science*, 14, 78-84.
- Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O., Pan, Z., & McHugh, T. H. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–Apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81(3), 634-641.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of thymus vulgaris, thymus zygis and thymus hyemalis essential oils. *Food Control*, 19(7), 681-687.
- Routh, M. M., Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2011). Dual properties of Anticancer agents: An exploratory study on the in vitro anti-candida Properties of thirty drugs. *Chemotherapy*, 57(5), 372-380.
- Rowley, J. A., Madlambayan, G., & Mooney, D. J. (1999). Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20(1), 45-53.
- Santana, R. C., Perrechil, F. A., & Cunha, R. L. (2013). High- and low-energy emulsifications for food applications: A focus on process parameters. *Food Engineering Reviews*, 5(2), 107-122.
- Sarkar, A., Juan, J., Kolodziejczyk, E., Acquistapace, S., Donato-Capel, L., & Wooster, T. J. (2015). Impact of protein gel porosity on the digestion of lipid emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(40), 8829-8837.
- Sartori, C., Finch, D. S., Ralph, B., & Gilding, K. (1997). Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy. *Polymer*, 38(1), 43-51.
- Sathish, D., Himabindu, S., Shravan Kumar, Y., Shayeda, & Madhusudan Rao, Y. (2011). Floating drug delivery systems for prolonging gastric residence time: A review. *Current Drug Delivery*, 8(5), 494-510.
- Satyal, P., Murray, B., McFeeters, R., & Setzer, W. (2016). Essential oil characterization of thymus vulgaris from various geographical locations. *Foods*, 5(4), 70.
- Schnitzler, P., Koch, C., & Reichling, J. (2007). Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(5), 1859-1862.
- Schulz, H., & Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43(1), 13-25.
- Schulz, H., Quilitzsch, R., & Krüger, H. (2003). Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 661-662, 299-306.
- Schulz, H., Özkan, G., Baranska, M., Krüger, H., & Özcan, M. (2005). Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 39(2), 249-256.
- Scuriatti, M. P., Tomás, M. C., & Wagner, J. R. (2003). Influence of soybean protein isolates-phosphatidylcholine interaction on the stability on oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(11), 1093-1100.
- Sell, C. S. (2006). *The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer* (2nd ed.). The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK. p.329

- Shah, B., Ikeda, S., Michael Davidson, P., & Zhong, Q. (2012). Nanodispersing thymol in whey protein isolate-maltodextrin conjugate capsules produced using the emulsion-evaporation technique. *Journal of Food Engineering*, 113(1), 79-86.
- Sharma, M., Kishore, K., Gupta, S. K., Joshi, S., & Arya, D. S. (2001). Cardioprotective potential of *Ocimum sanctum* isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 225(1/2), 75-83.
- Silva, P. T., Fries, L. L., Menezes, C. R., Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., Bastos, J. D., & Silva, C. D. (2014). Microencapsulation: Concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44(7), 1304-1311.
- Sinico, C., De Logu, A., Lai, F., Valenti, D., Manconi, M., Loy, G., Bonsignore, L., & Fadda, A. M. (2005). Liposomal incorporation of *artemisia arborescens* L. essential oil and *in vitro* antiviral activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(1), 161-168.
- Soliman, E. A., El-Moghazy, A. Y., El-Din, M. S., & Massoud, M. A. (2013). Microencapsulation of essential oils within alginate: Formulation and *in Vitro* Evaluation of Antifungal activity. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 03(01), 48-55.
- Soni, M. L., Kumar, M., & Namdeo, K. P. (2010). Sodium alginate microspheres for extending drug release: Formulation and *in vitro* evaluation. *International Journal of Drug Delivery*, 2(1), 64-68.
- Sosa-Herrera, M., Lozano-Esquivel, I., Ponce de León-Ramírez, Y., & Martínez-Padilla, L. (2012). Effect of added calcium chloride on the physicochemical and rheological properties of aqueous mixtures of sodium caseinate/sodium alginate and respective oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 175-184.
- Sosnik, A. (2014). Alginate particles as platform for drug delivery by the oral route: State-of-the-Art. *ISRN Pharmaceutics*, 2014, 1-17.
- Stahl-Biskup, E., & Venskutonis, R. (2012). Thyme. In *Handbook of Herbs and Spices*, pp. 499-525.
- Sun, X., Wang, C., & Guo, M. (2018). Interactions between whey protein or polymerized whey protein and soybean lecithin in model system. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 9680-9692.
- Synytsya, A., Copikova, J., Matejka, P., & Machovic, V. (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 97-106.
- Sünder, A., Scherze, I., & Muschiolik, G. (2001). Physico-chemical characteristics of oil-in-water emulsions based on whey protein-phospholipid mixtures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21(1-3), 75-85.
- Talpur, N., Echard, B., Ingram, C., Bagchi, D., & Preuss, H. (2005). Effects of a novel formulation of essential oils on glucose- insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: A pilot study. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 7(2), 193-199.
- Tang, C. (2015). Emulsifying properties of soy proteins: A critical review with emphasis on the role of conformational flexibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), 2636-2679.
- Tansaz, S., Durmann, A., Detsch, R., & Boccaccini, A. R. (2016). Hydrogel films and microcapsules based on soy protein isolate combined with alginate. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(4).

- Tawaha, K. A., & Hudaib, M. M. (2012). Chemical composition of the essential oil from flowers, flower buds and leaves of *Thymus capitatus* Hoffmanns. & link from Jordan. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(6), 988-996.
- Tcholakova, S., Denkov, N. D., Ivanov, I. B., & Campbell, B. (2006). Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123-126, 259-293.
- Tcholakova, S., Denkov, N. D., & Lips, A. (2008). Comparison of solid particles, globular proteins and surfactants as emulsifiers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(12), 1608.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587-595.
- Thimma, R. T., & Tammishetti, S. (2003). Study of complex coacervation of gelatin with sodium carboxymethyl guar gum: Microencapsulation of clove oil and sulphamethoxazole. *Journal of Microencapsulation*, 20(2), 203-210.
- Thompson, J. D., Chalchat, J., Michet, A., Linhart, Y. B., & Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4), 859-880.
- Tomazelli Júnior, O., Kuhn, F., Padilha, P. J., Vicente, L. R., Costa, S. W., Boligon, A. A., Scapinello, J., Nesi, C. N., Dal Magro, J., & Castellví, S. L. (2017). Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Biology*, 78(2), 311-317.
- Tomovic, N., Trifkovic, K., Rakin, M., Rakin, M., & Bugarski, B. (2015). Influence of compression speed and deformation percentage on mechanical properties of calcium alginate particles. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 21(3), 411-417.
- Trifković, K. (2016). Hidrogelovi na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola. Doktorska disertacija. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Trivedi, M. K., Patil, S., Mishra, R. K., & Jana, S. (2015). Structural and physical properties of biofield treated thymol and menthol. *Journal of Molecular Pharmaceutics & Organic Process Research*, 3(2), 127.
- Tsai, P., & She, C. (2006). Significance of Phenol-Protein interactions in modifying the antioxidant capacity of peas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8491-8494.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40-53.
- Ultee, A., Bennik, M. H., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568.
- Ultee, A., & Smid, E. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 373-378.
- Van Nieuwenhuyzen, W., & Szuhaj, B. F. (1998). Effects of lecithins and proteins on the stability of emulsions. *Lipid - Fett*, 100(7), 282-291.
- Van Nieuwenhuyzen, W., & Tomás, M. C. (2008). Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 472-486.

- Vandenabeele, P., Wehling, B., Moens, L., Edwards, H., De Reu, M., & Van Hooydonk, G. (2000). Analysis with micro-Raman spectroscopy of natural organic binding media and varnishes used in art. *Analytica Chimica Acta*, 407(1-2), 261-274.
- Vargas Jentsch, P., Ramos, L., & Ciobotă, V. (2015). Handheld Raman spectroscopy for the distinction of essential oils used in the cosmetics industry. *Cosmetics*, 2(2), 162-176.
- Verma, R., Chauhan, A., Verma, R., & Yadav, A. (2011). Seasonal variation in essential oil content and composition of thyme, *thymus serpyllum* L. cultivated in Uttarakhand hills. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2), 233.
- Vishwakarma, G. S., Gautam, N., Babu, J. N., Mittal, S., & Jaitak, V. (2016). Polymeric encapsulates of essential oils and their constituents: A review of preparation techniques, characterization, and sustainable release mechanisms. *Polymer Reviews*, 56(4), 668-701.
- Volić, M., Pajić-Lijaković, I., Djordjević, V., Knežević-Jugović, Z., Pećinar, I., Stevanović-Dajić, Z., Veljović, Đ., Hadnadjev, M., & Bugarski, B. (2018). Alginate/soy protein system for essential oil encapsulation with intestinal delivery. *Carbohydrate Polymers*, 200, 15-24.
- Voo, W., Lee, B., Idris, A., Islam, A., Tey, B., & Chan, E. (2015). Production of ultra-high concentration calcium alginate beads with prolonged dissolution profile. *RSC Advances*, 5(46), 36687-36695.
- Wang, C., Jiang, L., Wei, D., Li, Y., Sui, X., Wang, Z., & Li, D. (2011). Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate. *Procedia Engineering*, 15, 4819-4827.
- Wang, J., Xia, N., Yang, X., Yin, S., Qi, J., He, X., Yuan, D., & Wang, L. (2012). Adsorption and Dilatational rheology of heat-treated soy protein at the oil-water interface: Relationship to structural properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3302-3310.
- Wang, Q., Du, Y., Hu, X., Yang, J., Fan, L., & Feng, T. (2006). Preparation of alginate/soy protein isolate blend fibers through a novel coagulating bath. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(1), 425-431.
- Wang, S., Shi, Y., Tu, Z., Zhang, L., Wang, H., Tian, M., & Zhang, N. (2017). Influence of soy lecithin concentration on the physical properties of whey protein isolate-stabilized emulsion and microcapsule formation. *Journal of Food Engineering*, 207, 73-80.
- Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(1), 3-13.
- Weete, J. D., Betageri, S., & Griffith, G. L. (1994). Improvement of lecithin as an emulsifier for water-in-oil emulsions by thermalization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(7), 731-737.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., & Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 63-71.
- Wongkanya, R., Chuysinuan, P., Pengsuk, C., Techasakul, S., Lirdprapamongkol, K., Svasti, J., & Nooeaid, P. (2017). Electrospinning of alginate/soy protein isolated nanofibers and their release characteristics for biomedical applications. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 2(3), 309-316.
- Wu, P., Bhattarai, R. R., Dhital, S., Deng, R., Chen, X. D., & Gidley, M. J. (2017). In vitro digestion of pectin- and mango-enriched diets using a dynamic rat stomach-duodenum model. *Journal of Food Engineering*, 202, 65-78.

- Wu, X., Cheng, A., Sun, L., & Lou, H. (2008). Effect of pligiochin E, an antifungal macrocyclic bis(bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in candida albicans. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(12), 1478-1485.
- Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z., & Shii, T. (2011). Soybean-based surfactants and their applications. In Ng T-B. (Ed.) *Soybean - Applications and Technology*. (pp. 341-364). *InTech Open*.
- Xue, F., Gu, Y., Wang, Y., Li, C., & Adhikari, B. (2019). Encapsulation of essential oil in emulsion based edible films prepared by soy protein isolate-gum acacia conjugates. *Food Hydrocolloids*, 96, 178-189.
- Xue, J., & Zhong, Q. (2014). Thyme oil Nanoemulsions Coemulsified by sodium Caseinate and lecithin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9900-9907.
- Yang, J., & Xiong, Y. L. (2015). Inhibition of lipid oxidation in oil-in-Water emulsions by interface-adsorbed Myofibrillar protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(40), 8896-8904.
- Zhai, J., Wooster, T. J., Hoffmann, S. V., Lee, T., Augustin, M. A., & Aguilar, M. (2011). Structural rearrangement of β -lactoglobulin at different oil-water interfaces and its effect on emulsion stability. *Langmuir*, 27(15), 9227-9236.
- Zhang, Y., Gong, J., Yu, H., Guo, Q., Defelice, C., Hernandez, M., Yin, Y., & Wang, Q. (2014). Alginate-whey protein dry powder optimized for target delivery of essential oils to the intestine of chickens. *Poultry Science*, 93(10), 2514-2525.
- Zhang, Y., Wang, Q. C., Yu, H., Zhu, J., De Lange, K., Yin, Y., Wang, Q., & Gong, J. (2015). Evaluation of alginate-whey protein microcapsules for intestinal delivery of lipophilic compounds in pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(8), 2674-2681.
- Zhang, Z., Zhang, R., Zou, L., & McClements, D. J. (2016). Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. *Food Hydrocolloids*, 58, 308-315.
- Zhang, Z., Zhang, R., & McClements, D. J. (2017). Control of protein digestion under simulated gastrointestinal conditions using biopolymer microgels. *Food Research International*, 100, 86-94.
- Zheng, H., Zhou, Z., Chen, Y., Huang, J., & Xiong, F. (2007). PH-sensitive alginate/soy protein microspheres as drug transporter. *Journal of Applied Polymer Science*, 106(2), 1034-1041.
- Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., & Wan, X. (2011). Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(3), 1187-1195.
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In Zuidam N.J., Nedovic V.A (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing* (pp. 3-29). *Springer, Dordrecht*.

BIOGRAFIJA

Mina M. Volić rođena je 17.06.1988. godine u Čačku, Republika Srbija. Osnovne i master akademske studije pohađala je na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu (studijski program Hemijska tehnologija, studijsko područje Farmaceutsko inženjerstvo), u periodu od 2007. do 2012. godine sa prosečnom ocenom tokom studiranja 8,49 odnosno 9,63 na master studijama. U toku master studija bila je na stručnom usavršavanju u Švajcarskoj (kompanija BussChemTech AG, Pratteln). Doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu upisala je 2012. godine na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija, pod mentorstvom prof. dr Branka Bugarskog. Položila je sve programom predviđene ispite i odbranila završni rad na temu „Mikro i nano emulzioni sistemi za kontrolisano otpuštanje biološki aktivnih supstanci“ sa ocenom 10.

Od aprila 2015. godine, zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta, u okviru projekta 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 (III 46010). U zvanje istraživač saradnik izabrana je 29. avgusta 2019. godine.

Učestvovala je u realizaciji dva inovaciona projekta “Proizvodnja novih dijetetskih formulacija na bazi prirodnih proteina sa antioksidativnim i antitumorskim dejstvom” i “Kapsule zdravlja u ledenom čaju”. U periodu od 01.04. do 01.07.2016. godine bila je učesnik Erasmus + programa, u saradnji sa Poljoprivrednim Univerzitetom u Atini (Higher Education – KA107 International Mobility). Takođe, imala je učešće u Bilateralnom projektu između Srbije i Hrvatske pod nazivom „Inkapsulacija ekstrakata matičnjaka (*Melisa officinalis*) i trave iva (*Teucrium montanum*) u emulzije i lipozome s ciljem dobijanja funkcionalnih dodataka prehrani“ (2019/2020). Član je IFT-a (Institute of Food Technologists).

U toku svog dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada objavila je 1 rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a), 1 rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M22) i 3 rada saopštena na skupovima međunarodnog ili nacionalnog značaja štampanih u celini ili izvodu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Мина Волић

Број индекса: 4010/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

НОВИ ХИДРОГЕЛ СИСТЕМИ НА БАЗИ АЛГИНАТА И ПРОТЕИНА ЗА КОНТРОЛИСАНО ОТПУШТАЊЕ ЕТАРСКИХ УЉА

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Мина Волић

Број индекса: 4010/2012

Студијски програм: Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада: Нови хидрогел системи на бази алгината и протеина за контролисано отпуштање етарских уља

Ментор: проф. др Бранко Бугарски

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

НОВИ ХИДРОГЕЛ СИСТЕМИ НА БАЗИ АЛГИНАТА И ПРОТЕИНА ЗА КОНТРОЛИСАНО ОТПУШТАЊЕ ЕТАРСКИХ УЉА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације **„Нови хидрогел системи на бази алгината и протеина за контролисано отпуштање етарских уља“**, аутора **Мине М. Волић, мастер инж. технологије**, констатујем да утврђено подударање текста износи 10%. Овај степен подударности претежно је последица употребљених личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, назива коришћених аналитичких метода и реагенаса, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 17.09.2020. године

Ментор

Др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет