



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

# **PRIPREMA NANOČESTICA ZEINA I NJIHOVA PRIMENA KAO FUNKCIONALNIH KOLOIDA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Jaroslav Katona

Kandidat:

mast. inž. tehnol. Ljiljana Spasojević

Novi Sad, 2021

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Ljiljana Spasojević
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	dr Jaroslav Katona, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada:	Priprema nanočestica zeina i njihova primena kao funkcionalnih koloida
Jezik publikacije (pismo):	Srpski ( <u>  latinica  </u> ) ili (navesti ćirilica ili latinica) _____
Fizički opis rada:	Uneti broj: Stranica: 134 Poglavlja: 6 Referenci: 142 Tabela: 9 Slika: 57
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Koloidna hemija
Ključne reči / predmetna odrednica:	Nanočestice, zein, proteinski filmovi, biopolimeri, lateksi, nanokapsulacija.
Rezime na jeziku rada:	Biljni proteini, odnosno belančevine izolovane iz različitog biljnog materijala, poseduju odličan potencijal za primenu u proizvodnji, ali i pakovanju hrane. Oni poseduju različite funkcionalne osobine, kao što su sposobnost emulgovanja, stabilizovanja pene, geliranja, formiranja omotača i filmova itd., što im omogućava primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Zein je biljni protein, koji se može naći u žitaricama, a osnovni izvor ovog proteina je kukuruz ( <i>Zea mays</i> ). Zein nije rastvoran u vodi, a za njegovo rastvaranje najčešće se koristi razblaženi etanol. Smanjenjem koncentracije etanola u rastvoru zeina, bilo da se to postiže dodatkom nerastvarača ili uklanjanjem etanola (isparavanjem), zein može formirati različite koloidne strukture, koje pokazuju veliki potencijal za primenu u prehrambenoj industriji. Osobine ovih struktura zavise od načina pripreme, ali se na njih može uticati i dodatkom drugih materija u toku procesa pripreme. Stoga, osnovni cilj istraživanja u okviru ove disertacije bio je da se ispita mogućnost i uslovi formiranja

nanočestica zeina i kompozitnih nanočestica zein/prirodna smola, kao i mogućnost primene takvih nanočestica za inkapsulaciju lipofilne aktivne supstance, odnosno za formiranje filmova zeina.

Nanočestice (NČ) zeina (Z) i kompozitne nanočestice zein/šelak (Z/Š) i zein/kalafonijum (Z/K) pripremane su metodom (ko)precipitacije usled smanjenja rastvorljivosti, gde su se etanolni rastvori makromolekula mešali sa vodom kao nerastvaračem. Ispitani su uslovi pripreme nanočestica zeina na njihove koloidne osobine. Pripremljene nanočestice karakterisane su primenom različitih metoda (dinamičko rasipanje svetla, elektroforetska pokretljivost, SEM). Takođe, ispitane su interakcije gume arabike (GA) sa Z i Z/K nanočesticama, upotrebom različitih tehnika, kao što su dinamičko rasipanje svetla i izotermalna mikrokolorimetrija. Ispitana je mogućnost inkapsulacije lipofilne aktivne supstance u Z i Z/K nanočesticama, primenom metode koprecipitacije usled smanjenja rastvorljivosti, na isti način kao što su pripremane same nanočestice. Filmovi zeina pripremani su izlivanjem disperzija nanočestica zeina i sušenjem na povišenoj temperaturi. Pripremljeni su filmovi iz disperzija sa nanočesticama različitog prosečnog prečnika ZDNČ90 i ZDNČ180 bez plastifikatora, kao i uz dodatak plastifikatora ZDPGNČ90 i ZDPGNČ180. U svrhu poređenja osobina filmova, pripremani su i filmovi iz rastvora zeina bez plastifikatora, ZR, i sa dodatkom plastifikatora, ZRPG filmovi. Ispitan je uticaj veličine čestica zeina kao i uticaj plastifikatora na morfologiju, barijerna i optička svojstva filmova (rastvorljivost, propustljivost vodene pare, boju, itd.).

Utvrđeno je da se metodom precipitacije u nerastvaraču mogu dobiti zeinske i kompozitne nanočestice zein/smola. Na veličinu nanočestica može se uticati koncentracijom etanolnog rastvora biopolimera. Takođe, pH vrednost disperzije nanočestica utiče na njihov zeta potencijal, površinsku gustinu naelektrisanja, veličinu i stabilnost. Dodatak GA, u disperziju NČ utiče na zeta potencijal i veličinu nanočestica, odnosno nastalih aglomerata nanočestica. Mikrokolorimetrijskim merenjima utvrđeno je da su interakcije Z i Z/K nanočestica sa GA egzotermne, te da su najintenzivnije na  $\text{pH} = 4$ . Merenja su pokazala da do zasićenja površine kod Z/K NČ dolazi pri masenom odnosu GA/NČ od 0,7. Kod Z NČ promena entalpije postaje konstantna nakon masenog odnosa GA/NČ 1. Takođe, utvrđeno je da se moguće pripremiti kontinualne zeinske filmove iz disperzija nanočestica, sušenjem na vazduhu. U poređenju sa filmovima dobijenim iz rastvora zeina, filmovi dobijeni iz disperzija su bili hrapaviji i krtiji. Takođe, hrapavost površine ZDNČ180 filmova bila je veća nego kod ZDNČ90 filmova. Dodatkom propilen-glikola kao plastifikatora smanjuje se krtost i hrapavost ZDNČ filmova. Svi ispitivani filmovi su, u ispitivanim uslovima, apsorbovali manje od 8% vlage, dok je rastvorljivost i  $Z_r$  i  $Z_d$  filmova u vodi bila je ispod 5%. Propustljivost vodene pare se nije značajno razlikovala ( $p < 0,05$ ) za ZR, ZD i ZDPG filmove, nezavisno od veličine

	<p>čestica. Optička zamućenost ZD filmova bila je veća nego kod ZR filmova, dok je najmanja bila kod ZDPG filmova, s obzirom da je dodatak plastifikatora uticao na smanjenje optičke zamućenosti. Pokazano je da udeo bele u boji filmova raste po redosledu <math>ZR &lt; ZRPG &lt; ZDPG &lt; ZD</math>. Takođe je utvrđeno da žuta boja preovlađuje kod svih ispitivanih filmova. Statistička analiza pokazala je da ne postoji značajna razlika u mehaničkim svojstvima između filmova izlivenih iz disperzija nanočestica i filmova izlivenih iz etanolnog rastvora zeina.</p>
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	31.01.2018.
Datum odbrane: (Popunjava odgovarajuća služba)	
Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	<p>Predsednik: dr Lidija Petrović, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad  Član (mentor): dr Jaroslav Katona, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad  Član: dr Slavica Savić, naučni savetnik, Univerzitet u Novom Sadu, Institut Biosens</p>
Napomena::	/

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Ljiljana Spasojević
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	dr Jaroslav Katona, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad
Thesis title:	Preparation of zein nanoparticles and their application as functional colloids
Language of text (script):	Serbian language ( <u>latin</u> ) or (cyrillic or latin script) _____ language
Physical description:	Number of: Pages: 134 Chapters: 6 References:142 Tables: 9 Illustrations: 57
Scientific field:	Technological Engineering
Scientific subfield (scientific discipline):	Colloid Chemistry
Subject, Key words:	Nanoparticles, zein, protein films, biopolymers, latex, nanoencapsulation.
Abstract in English language:	<p>Plant proteins, i.e. proteins isolated from various plant materials, have excellent potential for use in food production, but also in food packaging. They possess various functional properties, such as emulsifying, foam stabilizing, gelling, coating, and film-forming properties, which allow them to be used in the food and pharmaceutical industries. Zein is a plant protein, which can be found in cereals, and the main source of this protein is corn (<i>Zea mays</i>). Zein is not soluble in water, and dilute ethanol is most often used to dissolve it. By reducing the concentration of ethanol in the zein solution, whether this is achieved by adding non-solvents or removing ethanol (evaporation), zein can form various colloidal structures, which show great potential for use in the food industry. The properties of these structures depend on the method of preparation, but they can also be influenced by the addition of other substances during the preparation process. Therefore, the main goal of the research within this dissertation was to examine the possibility and conditions of formation of zein nanoparticles and zein/natural resin composite nanoparticles, as well as the possibility of using such nanoparticles for encapsulation of lipophilic active</p>

substance, as well as for zein film formation.

Zein (Z) nanoparticles and zein/shellac (Z/Š) and zein/rosin (Z/K) composite nanoparticles were prepared by the antisolvent (co)precipitation method, where ethanolic solutions of macromolecules were mixed with water as a non-solvent. The influence of the zein nanoparticles' preparation parameters on their colloidal properties was examined. Prepared nanoparticles were characterized by the application of different methods (dynamic light scattering, electrophoretic mobility, scanning electron microscopy). Also, interactions of gum arabic (GA) with Z and Z/K nanoparticles were investigated, using various techniques, such as dynamic light scattering and isothermal microcalorimetry. The possibility of encapsulation of lipophilic active substance in Z and Z/K nanoparticles was investigated, using the method of antisolvent coprecipitation in the same way as the nanoparticles themselves were prepared. Zein films were prepared by casting dispersions of zein nanoparticles and air drying. Films were prepared from dispersions with nanoparticles of different average diameters ZDNČ90 and ZDNČ180 without plasticizers, as well as with the addition of plasticizers ZDPGNČ90 and ZDPGNČ180. In order to compare their properties, films were also prepared from a solution of zein without a plasticizer, ZR, and with the addition of a plasticizer, ZRPG films. The influence of zein particle size, as well as the influence of plasticizers on morphology, barrier properties, and optical properties of films (solubility, water vapor permeability, color, etc.), were examined.

It has been found that zein and composite zein/resin nanoparticles can be obtained by the antisolvent precipitation method. Nanoparticle size can be affected by the concentration of ethanol biopolymer solution. Also, the pH value of the dispersion of nanoparticles affects their zeta potential, surface charge density, size, and stability. The addition of GA to the dispersion of NP affects the zeta potential and size of nanoparticles, i.e. the formed agglomerates of nanoparticles. Microcalorimetric measurements showed that the interactions of Z and Z/K nanoparticles with GA are exothermic and that they are most intense at pH = 4. Measurements showed that surface saturation of Z/K NP occurs at a GA/NP mass ratio of 0.7. For Z NP, the change in enthalpy becomes constant after the mass ratio GA / NC 1. Also, it was found that it is possible to prepare continuous zein films from nanoparticle dispersions, by air drying. Compared with films obtained from zein solution, films obtained from dispersions were rougher and more brittle. Also, the surface roughness of ZDNČ180 films was higher than that of ZDNČ90 films. The addition of propylene-glycol as a plasticizer reduces the brittleness and roughness of ZDNČ films. All tested films, absorbed less than 8% of moisture, under the tested conditions, while the solubility of both Zr and Zd films in water was below 5%. Water vapor permeability did not differ significantly (p

	<p>&lt;0.05) for ZR, ZD, and ZDPG films, regardless of the particle size. The opacity of ZD films was higher than that of ZR films, while the lowest was in ZDPG films, since the addition of plasticizers had the effect of reducing opacity. It was shown that the share of white in the color of films increases in the order ZR &lt; ZRPG &lt; ZDPG &lt; ZD. It was also determined that yellow color predominates in all examined films. Statistical analysis showed that there was no significant difference in mechanical properties between films cast from nanoparticle dispersions and films cast from ethanol zein solution.</p>
Accepted on Scientific Board on:	31.01.2018.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: dr Lidija Petrović, full professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad  Member (supervisor): dr Jaroslav Katona, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad  Member: dr Slavica Savić, principal research fellow, University of Novi Sad, BioSense Institute</p>
Note:	/

**Sadržaj:**

1. UVOD .....	5
1.1. Cilj disertacije .....	6
2. TEORIJSKI DEO SA PREGLEDOM LITERATURE.....	8
2.1. Biopolimeri .....	8
2.1.1. Biljni proteini .....	9
2.1.1.1. Struktura i klasifikacija proteina .....	9
2.1.1.2. Izvori biljnih proteina.....	13
2.1.1.3. Funkcionalna svojstva biljnih proteina .....	16
2.1.1.4. Značaj biljnih proteina .....	18
2.1.1.5. Zein .....	19
2.1.2. Hidrokoloidi .....	26
2.1.2.1. Guma arabika .....	27
2.1.3. Prirodne smole .....	29
2.1.3.1. Šelak.....	29
2.1.3.2. Kalafonijum .....	30
2.2. Biopolimerne nanočestice.....	33
2.2.1. Priprema biopolimernih nanočestica.....	33
2.2.2. Primena biopolimernih čestica.....	37
2.2.3. Koloidne osobine biopolimernih nanočestica .....	38
2.2.3.1. Električne osobine i stabilnost čestica.....	38
2.2.3.2. Veličina nanočestica .....	43
2.2.4. Interakcije nanočestica i polimera.....	47
2.2.4.1. Izotermalna titraciona kalorimetrija.....	48
2.2.5. Nanokapsulacija .....	50
2.3. Biopolimerni filmovi .....	51
2.3.1. Metode pripreme biopolimernih filmova .....	52
2.3.2. Metode nanošenja biopolimernih premaza .....	54
2.3.3. Formiranje biopolimernih filmova iz lateksa.....	57
2.3.4. Osobine biopolimernih filmova .....	60
2.3.5. Biopolimeri za pripremu filmova.....	63
3. MATERIJAL I METODE .....	66
3.1. Materijal.....	66



3.2. Priprema rastvora .....	67
3.3. Priprema nanočestica .....	68
3.4. Priprema nanokapsula .....	68
3.5. Priprema zeinskih filmova .....	69
3.6. Određivanje veličine i raspodele veličina nanočestica.....	69
3.7. Električne osobine nanočestica .....	70
3.7.1. Određivanje zeta potencijala .....	70
3.7.2. Određivanje površinske gustine naelektrisanja nanočestica .....	70
3.8. Izotermalna titraciona kalorimetrija.....	71
3.9. Skenirajuća elektronska mikroskopija i mikroskopija atomskih sila .....	72
3.10. Debljina filmova .....	73
3.11. FTIR spektroskopija.....	73
3.12. Otpuštanje karvakrola iz nanokapsula .....	73
3.13. Barijerna svojstva zeinskih filmova .....	74
3.13.1. Apsorpcija vlage .....	74
3.13.2. Rastvorljivost u vodi .....	74
3.13.3. Propustljivost vodene pare .....	75
3.14. Optička svojstva zeinskih filmova .....	76
3.14.1. Zamućenost .....	76
3.14.2. Boja.....	76
3.14.3. Mehanička svojstva.....	77
3.15. Statistička analiza.....	77
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	78
4.1. Koloidne osobine nanočestica.....	78
4.1.1. Nanočestice zeina.....	78
4.1.2. Nanočestice šelaka i kalafonijuma .....	82
4.1.3. Kompozitne nanočestice zein/šelak i zein/kalafonijum .....	86
4.1.4. Površinska gustina naelektrisanja Z i Z/K nanočestica.....	93
4.2. Interakcije zeinskih i kompozitnih čestica zein/kalafonijum sa gumom arabikom.....	95
4.2.1. Uticaj GA na zeta potencijal Z i Z/K nanočestica.....	95
4.2.2. Uticaj GA na veličinu Z i Z/K nanočestica .....	96
4.2.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija .....	98
4.2.4. Izotermalna titraciona kalorimetrija .....	99
4.3. Nanokapsulacija karvakrola u zeinskim i kompozitnim nanočesticama.....	102
4.4. Dobijanje i karakterizacija zeinskih filmova.....	105

4.4.1. Morfološke osobine.....	107
4.4.2. FTIR spektroskopija.....	110
4.4.3. Barijerna svojstva.....	111
4.4.4. Optičke osobine.....	112
4.4.5. Mehanička svojstva.....	114
5. ZAKLJUČAK.....	116
6. LITERATURA .....	121

# 1. UVOD

Uporedo sa porastom i razvojem svetske populacije, javlja se sve veća potreba za poboljšanjem kvaliteta i održivosti hrane. Na to ukazuje i činjenica da se na globalnom nivou količina bačene hrane meri u milionima tona, dok i dalje postoje delovi sveta u kojima vlada nestašica osnovnih životnih namirnica. Shodno tome, naučna istraživanja, na polju očuvanja i poboljšanja kvaliteta namirnica koje efikasno stižu do konzumenata, više su nego potrebna. Drugi izazov koji tržište postavlja jeste funkcionalnost samih namirnica, odnosno potreba da hrana ne bude isključivo izvor energije i nutrijenata, već da poseduje i druga benefitna svojstva (npr. jačanje imuniteta, prevencija bolesti, duži rok trajanja i sl.). Hrana koju danas proizvodi prehrambena industrija, dobrim delom je funkcionalna hrana, čije komponente sa aspekta koloidne hemije, mogu predstavljati izuzetno kompleksne koloidne sisteme (višefazni sistemi, emulzije, čvrste pene, mikrokapsulirane aktivne supstance, itd.), za čiju pripremu se koriste različiti propisani aditivi (emulgatori, stabilizatori, modifikatori viskoziteta i sl.), koji su često sintetskog porekla. S druge strane, svest potrošača o uticaju hrane na njihovo zdravlje bitno je porasla poslednjih godina, te je potražnja za namirnicama isključivo prirodnog porekla u konstantnom porastu. Formulisanje savremenih, funkcionalnih proizvoda primenom isključivo prirodnih komponenti veliki je izazov, pre svega u pogledu pronalaženja prirodnih jedinjenja odgovarajućih funkcionalnih karakteristika. Različiti biljni materijali

predstavljaju odličan izvor funkcionalnih jedinjenja, dok istovremeno zadovoljavaju potrebe po pitanju dostupnosti i obnovljivosti sirovina.

Biljni proteini, odnosno belančevine izolovane iz različitog biljnog materijala, poseduju odličan potencijal za primenu u proizvodnji funkcionalne hrane, s obzirom da mogu posedovati različite funkcionalne osobine, kao što su sposobnost emulgovanja, stabilizovanja pene, geliranja, formiranja omotača i filmova itd. Sirovine za izolovanje biljnih proteina mogu biti direktno same biljke ili poluproizvodi, pa čak i nus–proizvodi različitih grana industrije, čime se dodatno povećava iskoristivost sirovina, kao i pozitivan uticaj na životnu okolinu. Na taj način, smanjuje se količina otpada ne samo prehrambene, već i drugih grana industrije, koje se bave preradom biljaka. Prednosti biljnih proteina u odnosu na one životinjskog porekla jesu daleko manja mogućnost pojave alergijske reakcije, prilagođenost proizvoda potrošačima sa restriktivnom ishranom, kao i niža cena.

Zein je biljni protein, koji se može naći u žitaricama, a osnovni izvor ovog proteina je kukuruz (*Zea mays*). U kukuruzu se zein nalazi isključivo u endospermu, gde predstavlja osnovni izvor rezervnih hranljivih materija u toku razvoja zrna. Obuhvata najveći deo ukupnih proteina zrna, oko 60%. Prema podeli, izvršenoj na osnovu rastvorljivosti proteina, zein spada u prolamine – proteine rastvorne u alkoholu. Njegova rastvorljivost uslovljena je većom zastupljenošću nepolarnih aminokiselina, od kojih su najprisutnije glutaminska kiselina i leucin. Značajan udeo u molekulu zeina imaju još i prolin, alanin, serin i tirozin. Zein nije rastvoran u vodi, a za njegovo rastvaranje najčešće se koristi razblaženi etanol. Smanjenjem koncentracije etanola u rastvoru zeina, bilo da se to postiže dodatkom nerastvarača ili uklanjanjem etanola (isparavanjem), zein može formirati različite koloidne strukture, koje pokazuju veliki potencijal za primenu u prehrambenoj industriji. Osobine ovih struktura zavise od načina pripreme, ali se na njih može uticati i dodatkom drugih materija u toku procesa pripreme.

### **1.1. Cilj disertacije**

Osnovni cilj istraživanja u okviru ove disertacije bio je da se ispita mogućnost i uslovi formiranja nanočestica zeina i kompozitnih nanočestica zein/prirodna smola, kao i mogućnost primene takvih nanočestica za inkapsulaciju lipofilne aktivne supstance, odnosno za formiranje filmova zeina, iz vodenih disperzija nanočestica zeina. U skladu s tim, nanočestice

su pripremane metodom (ko)precipitacije usled smanjenja rastvorljivosti, gde su se etanolni rastvori makromolekula mešali sa vodom kao nerastvaračem. Ispitani su uslovi pripreme nanočestica zeina na koloidne osobine nanočestica. Pripremljene nanočestice karakterisane su primenom različitih metoda (dinamičko rasipanje svetla, elektroforetska pokretljivost, skenirajuća elektronska mikroskopija), te se očekuje razlika u osobinama nanočestica pripremljenih sa i bez smole, kao što su izoelektrična tačka, zeta potencijal, veličina i raspodela veličina čestica, rastvorljivost, itd., u zavisnosti od pH vrednosti suspenzije. Takođe, ispitane su interakcije gume arabike sa nanočesticama zeina i kompozitnim nanočesticama zein/smola upotrebom različitih tehnika, kao što su dinamičko rasipanje svetla i izotermalna mikrokalorimetrija. Ispitana je mogućnost inkapsulacije lipofilne aktivne supstance u zeinskim i kompozitnim nanočesticama, primenom metode koprecipitacije usled smanjenja rastvorljivosti, na isti način kao što su pripremane same nanočestice. Filmovi zeina pripremani su izlivanjem suspenzija nanočestica zeina i sušenjem na povišenoj temperaturi. Ispitan je uticaj veličine čestica zeina kao i uticaj plastifikatora na morfologiju, barijerna svojstva i optička svojstva filmova (rastvorljivost, propustljivost vodene pare, boja, itd.).

Predložen način dobijanja i karakterizacije kompozitnih nanočestica zeina i prirodnih smola, kao i njihov potencijal za primenu u prehrambenoj industriji do sada je nedovoljno ispitan i veoma malo zastupljen u naučnoj literaturi. U disertaciji je prikazan, po prvi put, postupak za dobijanje kompozitnih nanočestica zeina i prirodnih smola, šelaka i kalafonijuma, o čemu nema literaturnih navoda. Istovremeno, u dostupnoj naučnoj literaturi ne postoje publikovani podaci o ispitivanju interakcija biopolimernih nanočestica sa prirodnim polielektrolitima, što je takođe obuhvaćeno ovom doktorskom disertacijom. Doktorska disertacija je po prvi put pokazala mogućnost nanokapsulacije karvakrola u kompozitnim česticama zein/kalafonijum, te ukazala na mogućnost promene osobina zeinskih nanokapsula pripremom kompozitnih kapsula sa kalafonijumom. Ovom doktorskom disertacijom je praktično prvi put ukazano na mogućnost primene etablirane (pseudo)lateks tehnologije za pripremu jestivih filmova od hidrofobnih biopolimernih nanočestica, za potrebe prehrambene industrije. Inovativnost predložene metode ogleda se pre svega u tome što se prilikom formiranja filmova ne koriste organski rastvarači, kao što je etanol, već se filmovi zeina dobijaju iz vodenih sistema.

# 2. TEORIJSKI DEO SA PREGLEDOM LITERATURE

## 2.1. Biopolimeri

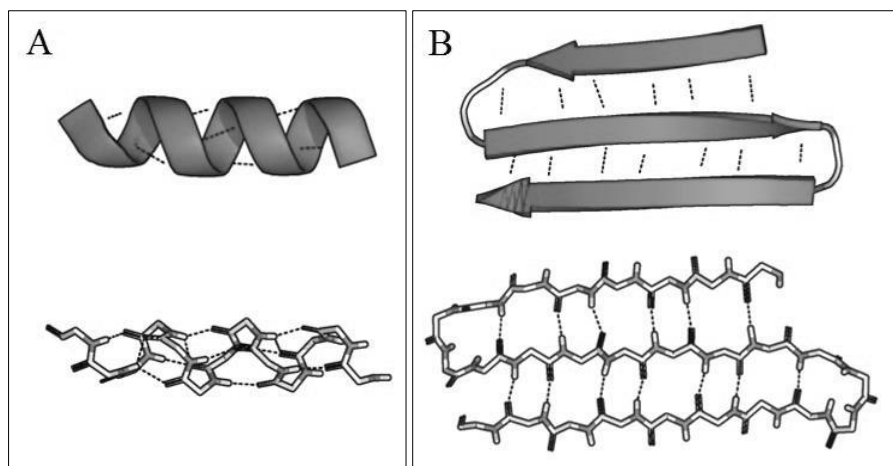
Polimeri predstavljaju jedinjenja sačinjena od velikog broja pojedinačnih gradivnih jedinica – monomera, kovalentno vezanih tako da formiraju velike molekule. Biopolimeri se, dalje, mogu definisati kao polimeri prirodnog porekla, sintetisani od strane biljaka, životinja ili mikroorganizama (Sivakanthan i ostali 2020). Biopolimeri se svakodnevno sreću u različitim oblicima i u njih spadaju polisaharidi, proteini, polifenoli i poliestri. Zahvaljujući svojoj biorazgradivosti, netoksičnosti i biokompatibilnosti, biopolimeri mogu naći široku primenu u medicini, farmakologiji, kozmetici, elektronici, poljoprivredi, za tretmane otpadnih voda, kao ambalažni materijali ili apsorbenti, u proizvodnji tkanina, plastičnih materijala,

biosenzora, itd. Prirodi biorazgradivi polimeri mogu se izolovati iz različitih materijala biljnog i životinjskog porekla, ali iz mikroorganizama poput algi ili iz otpada iz poljoprivredne ili prehrambene industrije. Kukuruz, pirinač, pšenica, krompir, sirak, banana, tapioka, pamuk i ječam neki su od primera poljoprivrdnih kultura koji predstavljaju izvore bogate biopolimerima. Sledeća grupa izvora biopolimera jesu izvori na bazi biomase, gde spadaju otpad iz poljoprivrede, prerade papira i drveta, i drugih grana industrije koje se bave preradom prirodnih sirovina. Takođe i morski organizmi poput riba, rakova, sunđer i korala mogu biti izvori prirodnih polimera. Svakako, najzastupljeniju grupu ipak predstavljaju biopolimeri animalnog porekla, koji se mogu izolovati iz mleka, kostiju, životinjskih sekreta ili čaura i slično. Osim biopolimera izolovanih direktno iz prirodnih materijala postoje i sintetski biopolimeri, koji su sintetisani iz prirodnih komponenti, ali najčešće nisu biorazgradivi. Neki od predstavnika sintetskih biopolimera, koji se mogu razgraditi u prirodi jesu gelan, dekstran i ksantan (Pinto i sar. 2021, Udayakumar i sar. 2021).

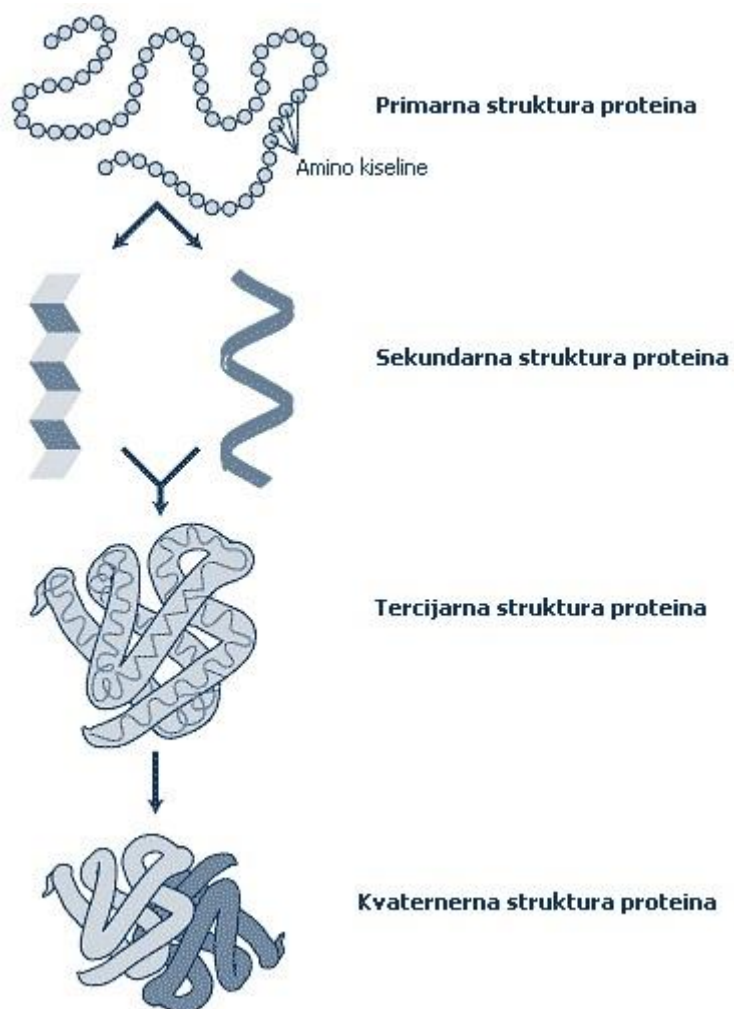
### *2.1.1. Biljni proteini*

#### *2.1.1.1. Struktura i klasifikacija proteina*

Proteini su prirodni makromolekuli, sačinjeni od velikog broja aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. Jedan molekul proteina može sadržati od 100 do 1000 aminokiselinskih ostataka i imati molekulsku masu i preko 100.000 g/mol (Karlson, 1988). U organizmu najčešće imaju gradivnu ili regulatornu ulogu. Prema poreklu proteini se mogu podeliti na biljne (zein, hordein, ureaza i dr.) i životinjske (kolagen, keratin, hemoglobin, aktin, miozin, mioglobin), dok se prema strukturi i hemijskim osobinama dele na fibrilarne – skleroproteine, globularne – sferoproteine i proteide. S obzirom na velik broj aminokiselinskih jedinica koje ih izgrađuju, građa proteina je veoma složena i može se posmatrati u okviru četiri različita nivoa. Osnovnu, odnosno primarnu strukturu predstavlja redosled aminokiselina u polipeptidnom lancu, koji je specifičan za svaku vrstu proteina pojedinačno. Kod fibrilarnih proteina moguće je pronaći pojedine sekvence od 3 – 5 aminokiselina koje se ponavljaju u lancu, dok kod globularnih proteina nema pojave periodičnosti. Sekundarna struktura podrazumeva prostorni položaj samog polipeptidnog lanca, ne obazirući se na položaj i orijentaciju bočnih grupa u lancu. Svaki lanac je naboran na



Slika 1. Sekundarna struktura proteina:  $\alpha$ -heliks (A) i  $\beta$ -ravan (B).



Slika 2. Pregled strukture proteina.



određeni način, što je uslovljeno primarnom strukturom, a postignuto stvaranjem vodoničnih veza između H i O atoma bočnih grupa. U zavisnosti od položaja, razlikujemo dva tipa sekundarne strukture:  $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -ravan (Slika 1).

Tercijarna struktura proteina obuhvata i položaj bočnih grupa aminokiselina, odnosno posmatra prostorni položaj celokupnog polipeptidnog lanca. Na ovom nivou, struktura se formira delovanjem vodoničnih, disulfidnih, jonskih i hidrofobnih veza. Međusobno povezani lanci polipeptida čine kvaternernu strukturu proteina, odnosno formiraju protein (Slika 2). Pojedinačni lanci nazivaju se podjedinice i jedan protein može biti sačinjen od više istih ili više različitih podjedinica (Karlson, 1988).

Biljni proteini su, na osnovu rastvorljivosti i mogućnosti ekstrakcije uz pomoć različitih rastvarača, klasifikovani u četiri osnovne grupe tj. klase: albumine, globuline, prolamine i gluteline. Albumini su rastvorljivi u vodi, ali koagulišu prilikom zagrevanja, dok su globulini nerastvorni u vodi, a rastvorni u slanim rastvorima. Prolamini su nerastvorni u vodi ili rastvorima soli, ali se mogu rastvoriti ili ekstrahovati pomoću koncentrovanih rastvora etanola (> 60% v/v). Glutelini nisu rastvorni u neutralnim vodenim rastvorima, rastvorima soli, niti alkoholu, ali se mogu ekstrahovati pomoću razblaženih kiselina ili baza. Glutelini su uglavnom zastupljeni u zrnima žitarica, kao što su pšenica, pirinač ili kukuruz. Većina biljnih proteina se može svrstati u jednu od ove četiri klase, ali njihov sadržaj i molekulska masa u mnogome zavise od biljne vrste iz koje su izolovani (Tabela 1).

**Albumini** su uglavnom u relativno malom udelu prisutni kao rezervni proteini u zrnu žitarica, a u nešto većem procentu u uljaricama i mahunarkama (Tabela 1), te je tako najveći broj ispitivanja vršen upravo na albuminima iz ovih biljnih vrsta. Albumini su kompaktni globularni proteini, sačinjeni od dva polipeptidna lanca, molekulske mase 4000 g/mol i 9000 g/mol, međusobno povezanih disulfidnim vezama. Važno je napomenuti da albumini sadrže više od 50% ukupnog sumpora u zrnu mahunarki, iako čine svega 10 – 30% ukupnih proteina zrna.

**Globulini** su najzastupljeniji skladišni proteini u semenu mahunarki, uključujući soju, grašak i lupinu, gde istovremeno čine i većinu ukupnih proteina u zrnu. Sadržaj globulina u navedenim biljnim vrstama može varirati u zavisnosti od sorte, pa tako može obuhvatati 40 do 80% ukupnih proteina soje, 65 do 80% ukupnih proteina graška i oko 75% proteina

lupine. Za razliku od albumina, globulini sadrže relativno nizak nivo aminokiselina koje sadrže sumpor, poput cisteina i metionina.

Tabela 1. Približan sadržaj različitih klasa proteina u različitim biljnim vrstama.

Biljka	Albumini (%)	Globulini (%)	Prolamini (%)	Glutelini (%)
<b>Pšenica</b>	6 – 10	5 – 8	35 – 40	40
<b>Pirinač</b>	2 – 6	12	4	80
<b>Ječam</b>	3 – 5	10 – 20	35 – 45	35 – 45
<b>Kukuruz</b>	4	4	60	26
<b>Šećerna trska</b>	2 – 7	2 – 10	35 – 60	20 – 35
<b>Soja</b>		90		
<b>Grašak</b>	15 – 25	50 – 60		
<b>Leblebija</b>	8 – 12	53 – 60	3 – 7	19 – 25
<b>Lupina</b>	25	75		
<b>Uljna repica</b>	20	60	2 – 5	15 – 20

**Prolamini** su glavni skladišni proteini kod žitarica, gde čine oko 50% ukupnih proteina u zrnu, osim kod pirinča gde čine samo oko 4%. Ime su dobili po tome što poseduju visok sadržaj prolamina i glutamina. Prolamini u žitaricama imaju četiri osnovna predstavnika i to su: gliadin i glutenin iz pšenice, koji čine pšenični gluten, hordein iz ječma i zein iz kukuruza. Molekulska masa prolamina značajno varira kako unutar jedne biljne vrste tako i između različitih biljaka. Iz ove grupe biljnih proteina, najviše je izučavan svakako pšenični gluten, srazmerno rasprostranjenosti i širokoj upotrebi ove žitarice.

Za razliku od drugih žitarica, koje svoje rezerve azota skladište u prolaminima, kod pirinča su osnovni skladišni proteini **glutelini**, koji u zrnu pirinča čine i do 80% ukupnih proteina. Molekulska masa ovih proteina može varirati od 45 – 150 kg/mol. Ispitivanja

glutelina iz pirinča vrlo su ograničena, usled njihove intenzivne agregacije, umrežavanja disulfidnih veza molekula i glikozilacije, što ih čini praktično nerastvornim u bilo kom rastvaraču osim razblaženih baza, istovremeno otežavajući njihovo ekstrahovanje (Day 2013).

#### 2.1.1.2. Izvori biljnih proteina

Veliki broj biljnih vrsta i njihovi različiti delovi predstavljaju odlične polazne resurse za izdvajanje i proizvodnju biljnih proteina. U najvećem broju slučajeva, proteini se nalaze u semenu ili znu biljke, gde predstavljaju glavni izvor proteina. Neke biljke se već dugo primenjuju kao izvori proteina za ljudsku upotrebu, kao što su žitarice i mahunarke, pa čak i pojedine uljarice, dok se druge tek od skoro primenjuju u tu svrhu.

**Leguminoze**, odnosno **mahunarke**, oduvek su smatrane za „meso za siromašne“, međutim, od nedavno su prepoznate kao odlični izvori biljnih proteina. Sadržaj proteina u zrnastim mahunarkama kreće su od 18 do 40 % (Tabela 2). U svom aminokiselinskom sastavu, proteini iz ovih biljaka imaju visok sadržaj lizina, leucina, asparaginske kiseline i arginina, ali veoma nizak sadržaj metionina i cisteina, u čijoj strukturi se nalazi sumpor, kao i triptofana. Većina proteina poreklom iz mahunarki, uključujući i soju, su globularni proteini, dok u sastav proteina graška ulaze i globulini i albumini (Kim i sar. 2020). Soja je najzastupljeniji izvor proteina iz ove grupe biljaka, upravo zbog visokog sadržaja proteina i izbalansiranog aminokiselinskog sastava. Grašak, lupina, leblebija, sočivo, pasulj, kao i druga semena jestivih mahunarki, takođe su važni izvori biljnih proteina. Posle soje, grašak je druga mahunarka koja se intenzivno koristi za komercijalno izolovanje proteina. Zrno graška sadrži visok udeo proteina i ugljenih hidrata, relativno visok udeo nerastvornih vlakana i niske koncentracije masti (Tabela 2). U proseku, sadrži oko 25% proteina, ali sadržaj značajno varira u odnosu na sortu. Proteinske frakcije sastoje se uglavnom od albumina u globulina (Kim i sar. 2020). Leblebije sadrže sličan udeo proteina kao grašak, a pokazano je da proteinski izolat leblebije poseduje dobra emulgujuća svojstva.

**Žitarice i pseudožitarice** sadrže 8 – 15 % proteina. Proteini žitarica bogati su sumpornim aminokiselinama, a imaju mali sadržaj lizina, treonina i triptofana, te su komplementarni sa proteinima leguminoza. Većina proteina iz žitarica slabo su rastvorni u

Tabela 2. Prosečan sadržaj proteina u žitaricama, mahunarkama, uljaricama i povrću, najzastupljenijim izvorima biljnih proteina.

<b>Biljka</b>	<b>Sadržaj proteina (%)</b>	<b>Ostale komponente</b>
<b>Pšenica</b>	8 – 15	~75% skrob, 1 – 2% lipidi, ~5% ostali polisaharidi
<b>Pirinač</b>	7 – 9	90% skrob
<b>Kukuruz</b>	9 – 12	70 – 75% skrob, 3 – 18% ulja
<b>Ječam</b>	8 – 15	60 – 64% skrob, 2 – 3% lipidi, 3 – 10% rastvorljiva dijetetska vlakna, 4 – 6% nrastvorljiva dijetetska vlakna
<b>Šećerna trska</b>	9 – 17	~2% lipidi, 70 – 75% skrob
<b>Soja</b>	35 – 40	~20% ulja, ~30% ostali polisaharidi
<b>Grašak</b>	20 – 30	60 – 65% skrob, ~5% ostali polisaharidi
<b>Leblebija</b>	20 – 25	~60% skrob, ~10% ostali polisaharidi
<b>Lupina</b>	35 – 40	~10% ulja, 35 – 40% ostali polisaharidi
<b>Repica</b>	17 – 26	40% ulja, 12 – 30% ostali polisaharidi

vodi i najčešće se koriste kako bi se hrana u čvrstom stanju obogatila proteinima (Schweiggert-Weisz i sar. 2020). Pšenica sadrži 8 – 15 % proteina u zrnu, u zavisnosti od sorte. Osnovni skladišni protein u pšeničnom zrnu je gluten (Kim i sar. 2020). Ovaj protein poseduje fizičku funkcionalnu karakteristiku, jedinstvenu među biljnim proteinima, a to je da formira kohezivnu viskoelastičnu proteinsku mrežu, što omogućava da se od pšenice proizvode različita testa (Day 2013). Pšenični gluten najduže nalazi svoju primenu u

prehrambenoj industriji, zbog svojih jedinstvenih reoloških osobina, a njegova zastupljenost u proizvodima je konstantna bez obzira na činjenicu da je poznato da izaziva bolest celijakliju (Schweiggert-Weisz i sar. 2020). U poslednjih nekoliko godina pirinač je sve zastupljeniji kao izvor hipoalergijskih proteina. Posle pšenice, pirinač je druga najzastupljenija usevna kultura, pa samim tim predstavlja i značajan izvor biljnih proteina, iako ih sadrži mnogo manje u odnosu na druge žitarice (Tabela 2). Kukuruz je takođe veoma zastupljena prehrambena i industrijska žitarica. Sadrži 9 – 12% proteina. Skrob i ulje su osnovni proizvodi koji se dobijaju preradom kukuruza, dok tzv. kukuruzni gluten (eng. *corn gluten meal*) bogat proteinima zaostaje kao nus-proizvod. Iz kukuruznog glutena industrijski se izdvaja protein zein. Iako je zein jedan od retkih proteina iz žitarica koji se proizvodi industrijski, njegova primena u prehrambenim proizvodima još uvek je dosta ograničena, zbog njegove slabe rastvorljivosti u vodi. Osnovna primena zeina jeste izrada biopolimernih materijala za filmove, premaze i plastiku (Day 2013). Ječam je četvrta najzastupljenija žitarica u svetu, posle pšenice, pirinča i kukuruza. Ječam sadrži 10 – 17% proteina, malo više u odnosu na pšenicu i pirinač (Tabela 2).

Nus-proizvodi prerade **uljarica** (uljna pogača nakon presovanja ili brašno nakon ekstrakcije rastvaračima, iz suncokreta ili repice na primer) sadrže između 45% i 65% proteina, u zavisnosti od sirovine i uslova prerade. Većina proteina iz uljarica sastoji se od rezervnih (skladišnih) proteina zrna, uglavnom globulina i albumina. Proteinski koncentрати i izolati se iz uljarica mogu izdvojiti vodenim frakcionisanjem (Schweiggert-Weisz i sar. 2020). Uljna repica jedna je od najzastupljenijih uljarica na svetu (Fetzer i sar. 2020). Pre izdvajanja ulja sadrži 17 – 26% proteina. Pozitivna svojstva proteina prisutnih u ovoj uljarici, jesu dobre gelirajuće osobine, kao i povoljan aminokiselinski sastav, koji ih čini komplementarnim sa proteinima iz žitarica. Seme suncokreta predstavlja treći najveći izvor jestivog ulja na svetu. Iako lipidi imaju najveći udeo u semenu suncokreta, ono je bogato i proteinima, te tako oljušteno seme sadrži 20 – 40% sirovih proteina. Uz suncokret i repicu, kao dva najzastupljenija izvora proteina, novija istraživanja bave se i manje zastupljenim biljnim kulturama, poput konoplje, tikve, lana, divljeg lana i susama (Schweiggert-Weisz i sar. 2020).

**Košunjavo voće** predstavlja takođe važan izvor biljnih proteina, kao i drugih nutrijenata, poput ulja, vlakana i polifenola. Oni međutim, predstavljaju jedan od najvećih alergena, kada je reč o hrani. Najviše se koriste u direktnoj ljudskoj ishrani, ali se na tržištu

mogu naći i različita biljna mleka, brašno, puter i slični proizvodi od koštunjavog voća (Day 2013).

Prilikom obrade **krtolastog i korenastog povrća**, koji se primarno koristi kao izvor skroba, zaostaju nus–proizvodi bogati proteinima rastvorljivim u vodi i mogu se koristiti za njihovo izolovanje. Svež krompir sadrži svega 1 – 1,5% proteina. Pokazano je da emulgujuća i peneća svojstva ovih proteina mogu da se porede sa svojstvima proteina leguminoza, ali sa daleko većim prinosom prilikom izolovanja. Međutim, krompir sadrži toksične glikoalkaloide gorkog ukusa, koji se mogu naći u proteinskom izolatu u značajnom udelu i koji moraju biti uklonjeni pre upotrebe izolata u proizvodnji hrane. Svakako, interesovanje za izolovanje proteina iz krtolastog i korenastog povrća daleko je manje u poređenju sa mahunarkama i žitaricama najvećim delom zbog srazmerno malog sadržaja proteina u polaznom materijalu, što ekstrakciju čini ekonomski malo isplativom (Day 2013, Schweiggert-Weisz i sar. 2020).

### 2.1.1.3. Funkcionalna svojstva biljnih proteina

Najznačajnija funkcionalna svojstva proteina u hrani obuhvataju rastvorljivost, kapacitet vezivanja vode i masti, geliranje, kao i reološka, emulgujuća i peneća svojstva. Ove osobine su povezane sa načinom na koji proteini interaguju se velikim (ugljeni hidrati, lipidi, proteini) i malim (gasovi, soli, isparljive materije, voda) molekulima, a takođe i sa veličinom molekula, strukturom (primarna aminokiselinska sekvenca, sekundarna i tercijarna konformacija) i raspodelom naelektrisanja u molekulu proteina. Promene u strukturi proteina, koje nastaju kao rezultat izloženosti proteina različitim uslovima u toku procesa obrade hrane ili koje do koji dolazi usled interakcije sa drugim komponentama hrane, takođe utiču na funkcionalne osobine samih proteina. Najbitnija funkcionalna svojstva biljnih proteina, koja su potrebna da bi se njihova upotreba raširila, jesu rastvorljivost, emulgujuće, gelirajuće i peneće svojstvo, kao i pozitivan doprinos osobinama testa.

Rastvorljivost proteina u vodi često je preduslov za druga funkcionalna svojstva, poput emulgujućih i penećih. Uslovi koji utiču na rastvorljivost proteina su pH vrednost, jonska jačina, tip rastvarača i temperatura. Proteini su najslabije rastvorni u izoelektričnoj tački (IET), odnosno na pH na kojoj je broj pozitivno i negativno naelektrisanih grupa u molekulu proteina jednak. Uobičajena metoda za izdvajanje proteina rastvorljivih u vodi (najvećim delom albumina i/ili globulina) je na osnovu njihove IET. Naime, proteini se prvo rastvore

primenom baznog, kiselog ili neutralnog rastvarača (sa ili bez rastvorene soli), na pH različitoj od IET, a zatim se iz rastvora proteini izdvajaju podešavanjem pH na vrednost IET. Proteini koji se izoluju na ovaj način (npr. proteinski izolati soje, graška, lupine i uljne repice) imaju dobru rastvornost na neutralnim pH. Međutim, većina biljnih proteina, pogotovo proteini iz žitarica, koji sadrže veliki udeo prolamina i glutelina, veoma je slabo rastvorna na neutralnim pH vrednostima, usled prisustva malog broja naelektrisanih aminokiselinskih grupa (Day 2013).

Jestivi proteini, pogotovo oni iz mleka i jaja, uobičajeno se koriste za stabilizovanje emulzija i pena. Njihova amfifilna priroda im omogućava da se adsorbuju na granici faza ulje/voda ili vazduh/voda gde formiraju međupovršinski sloj, koji snižava međupovršinski napon i sprečava koalescenciju kapljica ulja ili mehurića gasa, tokom proizvodnje i čuvanja hrane. Sposobnost proteina da funkcioniše kao emulgator u hrani zavisi od njegove strukture i koloidnih osobina na granici faza (Bučko i sar. 2018). Od svih biljnih proteina, najviše su ispitivana emulgujuća svojstva proteina soje. Generalno gledano, na sposobnost biljnih proteina da stabilizuju emulzije u velikoj meri utiču pH i jonska jačina sredine, uslovi predtretmana koje prolaze proteini i termički procesi kojima podlaže namirnica u toku proizvodnje (Bučko i sar. 2015, Bučko i sar. 2016). Slaba međusobna interakcija biljnih proteina kada su već adsorbovani na granici faza i debljina proteinskog filma, bar delom doprinose tome da emulzije stabilizovane nekim biljnim proteinima imaju veću stabilnost u odnosu na one stabilizovane proteinima mleka, u slučaju povišene temperature i/ili prisustva soli. Struktura biljnih proteina i nedostatak strukturnog opružanja molekula nakon adsorpcije na međupovršinu, predstavlja potencijalnu mogućnost ovih proteina da formiraju proteinske čestice na granici faza. Na taj način, obezbedila bi se bolja stabilnost emulzija, slična emulzijama stabilizovanim pomoću nano- i mikročestica (Day 2013).

Sposobnost proteina iz hrane da stabilizuju pene povezana je sa njihovom tendencijom da se adsorbuju na granici faza vazduh/voda. Kada se adsorbuju na granici faza, proteini smanjuju međupovršinski napon i formiraju membranu, tj. postojan međupovršinski sloj, uz pomoć protein–protein interakcija. Biljni proteini u svom izvornom obliku, zbog kompaktne strukture, imaju ograničena peneća svojstva. Ipak, proteinske frakcije biljnih proteina koje su bogate albuminima, pokazuju dobra peneća svojstva ekvivalentna svojstvima proteina belanceta. Međutim, najčešće je neophodna strukturna modifikacija proteina biljnog porekla, bilo da se to postiže podešavanjem pH ili ograničenom enzimskom hidrolizom, kako bi proteini dostigli pun potencijal u svrhu stabilizacije pena (Day 2013).

Biljni proteini, pogotovo globularni, imaju sposobnost formiranja gela, kada su denaturisani zagrevanjem u vodenom rastvoru, pri izbalansiranim interakcijama protein–protein i protein–rastvarač. Molekulska građa proteina, i interakcije protein–protein i protein–rastvarač određuju temperaturu geliranja i rezultujuće osobine gela. Neke od interakcija koje se javljaju prilikom umrežavanja proteina i formiranja gela su vodonična veza, hidrofobne interakcije, disulfidne veze, itd. pH vrednosti i prisustvo soli mogu u velikoj meri uticati na gelirajuća svojstva proteina, time što utiču na neto naelektrisanje i međusobne interakcije molekula proteina, kao i na strukturu samih proteina, stabilnost te strukture i disocijaciju polipeptidnih podjedinica. Pokazano je da u nekim slučajevima povećanje pH vrednosti utiče na povećanje temperature geliranja (Day 2013).

Zahvaljujući svojoj strukturi i funkcionalnim osobinama, biljni proteini mogu formirati različite koloidne strukture, koje nalaze primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, medicini, ali i u proizvodnji ambalažnih materijala.

#### 2.1.1.4. Značaj biljnih proteina

U današnje vreme, svest ljudi o bezbednosti hrane koju konzumiraju, kao i sve veći porast svetske populacije, podstiče istraživanja u oblasti razvoja održive i ekološki prihvatljive visokonutritivne hrane. To uključuje i potragu za alternativnim izvorima proteina. Samim tim, veliki broj istraživanja usmeren je ka zameni tradicionalnih životinjskih proteina alternativnim, kao i ka razvoju različitih tehnika za procenu i povećanje njihove svarljivosti i bioraspoloživosti. Od nedavno, biljni proteini se sve više koriste kao ekonomična i raznovrsna alternativa za životinjske proteine, kako u ljudskoj ishrani, tako i u formulacijama proizvoda kao funkcionalne komponente (Sá i sar. 2020). Biljni proteini su široko rasprostranjeni, izoluju se iz jeftinih izvora, biorazgradivi su, imaju antioksidativna dejstva i ređe izazivaju imuni odgovor organizma u odnosu na životinjske proteine (Popov Pereira da Cunha i sar. 2020). Za sada postoji nekoliko razloga zbog kojih se biljni proteini ne primanjuju u većoj meri, a to je: manja nutritivna vrednost (pojedinačnih izvora) u odnosu na životinjske proteine, problemi da se dostigne maksimalno iskorišćenje njihovih fizičkih funkcionalnosti zbog velike molekulske mase, veličine i slabe rastvorljivosti u vodi, kao i ekonomska neisplativost izdvajanja proteinskih frakcija iz biljaka u odnosu na njihov prinos. Ipak, veliki broj naučnih istraživanja usmeren je ka prevazilaženju ovih prepreka i



poboljšanju nutritivnih i funkcionalnih osobina biljnih proteina. Protein soje jedan je od odličnih primera kako naučna istraživanja mogu uticati na svest potrošača o nutritivnoj vrednosti proteina poreklom iz biljaka i kako potencijalne tehnološke inovacije mogu podstaći upotrebu biljnih proteina u velikom broju prehrambenih proizvoda. Osim proteina soje, koji i dalje dominira kao alternativa životinjskim proteinima, pojavljuje se određeni broj novih proizvoda u kojima se primenjuju proteini iz žitarica, mahunarki i nekih vrsta povrća (Day 2013). Gledano sa aspekta održivosti i bezbednosti hrane postoji velika potreba za povećanjem upotrebe proteina biljnog porekla, kako u direktnoj ishrani tako i u proizvodnji prehrambenih proizvoda za ljudsku upotrebu.

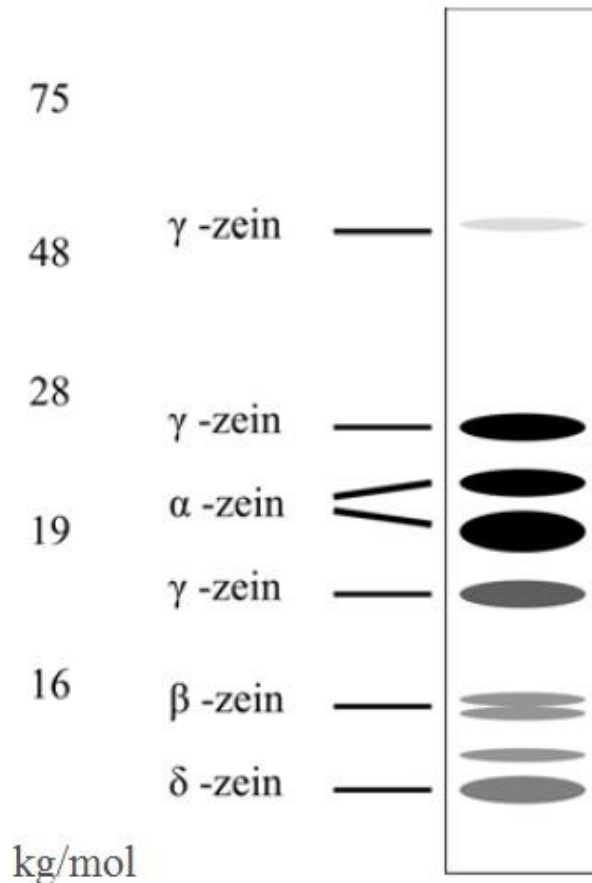
Osim u prehrambenoj industriji, biljni proteini pokazuju veliki potencijal i za primenu u medicinske, biomedicinske i farmaceutske svrhe. Kada je reč o medicini, proteini su poželjniji medijum za izradu različitih nosača, u odnosu na ugljene hidrate i sintetičke polimere, pre svega zbog toga što proteini sačinjavaju najveći deo ljudskog tela, biokompatibilni i citokompatibilni su, a kada su u pitanju veštačka tkiva, funkcije ekstracelularnog matriksa je lakše održati kada su u pitanju proteini, u odnosu na sintetičke polimere. Takođe, nasuprot sintetičkim polimerima, kod kojih se često javlja nedostatak funkcionalnih grupa, prisustvo karboksilnih i amino grupa omogućava proteinima da budu nosioci različitog naelektrisanja, zavisno od pH vrednosti sredine. Upravo zbog toga, proteine je moguće lako prilagoditi da reaguju na različite pH vrednosti u organizmu, što omogućava ciljano dostavljanje različitih farmaceutika. Takođe i razlika u IET kod različitih biljnih proteina omogućava veći izbor odgovarajućih nosača za različite lekove. Upravo zbog ovih prednosti, uveliko se ispituje mogućnost upotrebe proteina poreklom iz biljnog materijala, za razvoj hidrogela, filmova, vlakana, mikro- i nanočestica, za primenu u medicini, pre svega bioinženjereniju i proizvodnju lekova (Reddy i Yang 2011).

#### 2.1.1.5. Zein

Zein je osnovni rezervni protein kukuruza, nalazi se isključivo u endospermu (Anderson i Lamsa 2011) i obuhvata 60% ukupnih proteina u zrnju kukuruza (Day, 2013). Spada u klasu prolamina i javlja se u četiri oblika:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -zein od kojih je  $\alpha$ -zein najzastupljeniji (70–85%) i zajedno sa  $\gamma$ -zeinom (10–20%) čini većinu sadržaja zeina u zrnju. Različiti oblici zeina ustanovljeni su na osnovu razdvajanja pomoću Na-dodecilsulfat-

poliakrilamid gel–elektroforetske tehnike (SDS–PAGE, eng. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Na Slici 3 prikazane su različite frakcije zeina, dobijene ovom metodom, gde se  $\alpha$ –zeini izdvajaju kao molekuli sa molekulskom masom 19.000 g/mol i 22.000 g/mol,  $\beta$ –zeini sa molekulskom masom 16.000 g/mol, 27.000 g/mol i 48.000 g/mol,  $\gamma$ –zeini 14.000 g/mol i  $\delta$ –zeini 10.000 g/mol (Anderson i Lamsa 2011, Nonthanum i sar. 2013).

Svi oblici zeina imaju amfifilni karakter tj. sadrže 2/3 hidrofobnih i 1/3 hidrofilnih delova molekula (Zhang i sar. 2011). Ovo ih čini nerastvornim u vodi, što predstavlja jednu od osnovnih karakteristika zeina, kao i cele klase prolamina. Aminokiselinski sastav zeina prikazan je u Tabeli 3.



Slika 3. Frakcije zeina razdvojene SDS-PAGE metodom (Anderson 2011).

Tabela 3. Najzastupljenije aminokiseline u zeinu (Landry i Guyon 1984).

Aminokiselina	Broj ostataka na 1000 izolovanih ostataka	Aminokiselina	Broj ostataka na 1000 izolovanih ostataka
Asx	49	Val	41
Thr	30	Met	8
Ser	64	Ile	39
Glx	213	Leu	189
Pro	101	Tyr	34
Gly	18	Phe	52
Ala	132	Arg	10
Cys	10	His	9

Treba napomenuti da prolamin zein i komercijalni zein nisu isto. S biološke strane gledano, protein zein predstavlja smešu svih svojih oblika, bez obzira na rastvorljivost i molekulsku masu, dok je komercijalni zein skoro potpuno sačinjen od  $\alpha$ -zeina (Lawton 2002). Osobine komercijalnog zeina date su u Tabeli 4, dok je izgled prikazan na Slici 4.

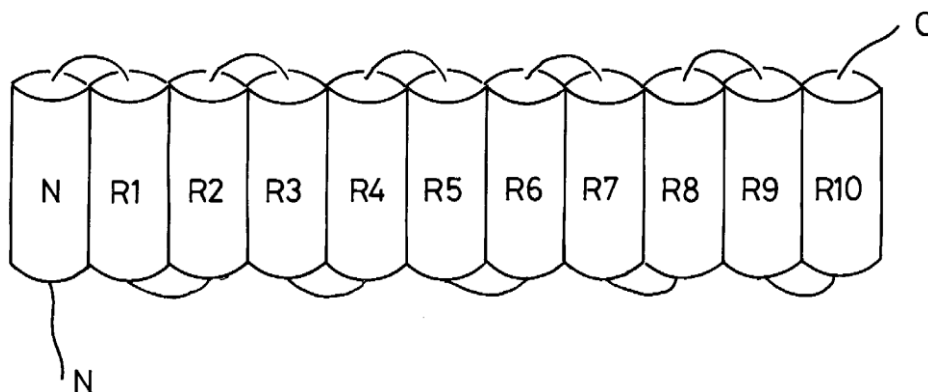
Tabela 4. Osobine komercijalnog zeina (Patel i Velikov 2014).

Osobina	Vrednost/opis
Izgled	Amorfna, svetložuta, praškasta supstanca
Molekulska masa	~35,000 g/mol
Izoelektrična tačka (IET)	6,2
Temperatura degradacije	320°C
Rastvorljivost	Primarni rastvarači (oni koji mogu samostalno da obrazuju rastvore zeina min. 10% m/m) su glikoli, glikol-etri, aminalkoholi, amidi i amini. Sekundarni rastvarači: smeše vode i nižih alifatičnih alkohola ili ketona.



Slika 4. Zein u prahu.

$\alpha$ -zein, kao najzastupljenija frakcija, ima najveći uticaj na osobine proteina. Sačinjena je iz dve grupe, podeljene na osnovu molarne mase, koja iznosi 19.000 g/mol, odnosno 22.000 g/mol. Na osnovu kasnijih ispitivanja sekvenci  $\alpha$ -zeina, pokazano je da se svaka grupa sastoji od po 210–245 aminokiselinskih ostataka, što dovodi do zaključka da je stvarna molarna masa ovih grupa 23–24 kg/mol, odnosno 26–27 kg/mol. Sekvenciona analiza takođe ukazuje na to da se molekul zeina može podeliti u tri domena. N-terminalni domen, koji se sastoji od 36–37 ostataka, zatim niz parova lanaca prosečne dužine oko 20 ostataka i na kraju C-terminalni domen, sačinjen od 10 aminokiselinskih ostataka (Slika 5). Upravo C-terminalni domen uslovljava razliku molarnih masa dve grupe, s obzirom da u okviru grupe sa manjom molarnom masom sadrži jedan ostatak manje, tj 9. Postoji nekoliko različitih modela kojima se objašnjava viša struktura molekula zeina. Među njima je najzastupljeniji onaj po kome sekundarna struktura zeina podrazumeva formiranje  $\alpha$ -heliksa, dok tercijarnu čini niz antiparalelno poređanih zavojnica međusobno povezanih „petljama“ – kraćim lancima, bogatih glutaminom (Matsushima i sar. 1997).



Slika 5. Tercijarna struktura zeina.

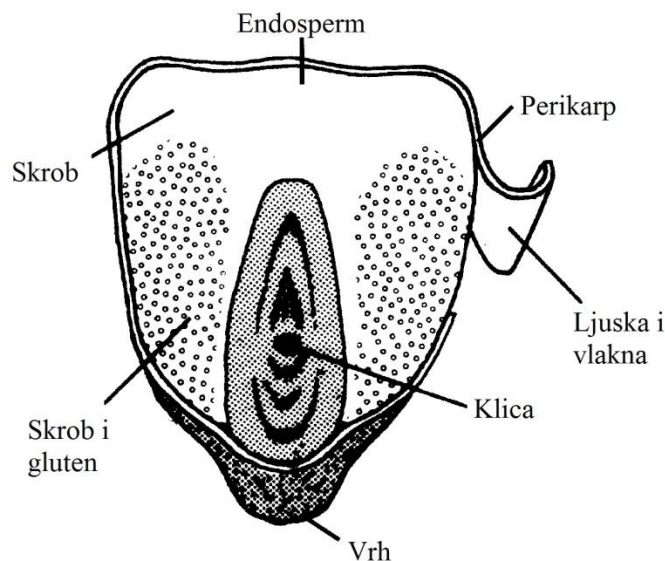
Za rastvaranje zeina najčešće se koriste vodeni rastvori nižih alifatičnih alkohola, kao što su etanol, propanol, izopropanol i drugi, pre svega zbog njihove niske cene i činjenice da se mogu lako regenerisati. Međutim, osim ovih postoji i niz drugih rastvarača i kombinacija rastvarača, koji se mogu upotrebiti za rastvaranje zeina (Lawton 2002). Supstance ili njihove smeše, u kojima je rastvoran zein, mogu se svrstati u primarne, sekundarne ili tercijarne rastvarače.

Tabela 5. Sekundarni rastvarači za zein (Lawton 2002).

Voda u smeši sa nekom od sledećih tečnosti	Niži alifatični alkohol u smeši sa nekom od sledećih tečnosti
Aceton	Acetaldehid
Acetonil-aceton	Aceton
<i>n</i> -Butanol	Benzen
<i>t</i> -Butanol	Butil-laktat
<i>s</i> -Butanol	Hloroform
Dioksalan	Dihlormetan
Dioksan	Dietilen-glikol monoetiletar
Etanol	Etil-laktat
Izobutanol	Etilen-dihlorid
Izopropanol	Etilen-glikol
Metanol	Etilen-glikol monoetil-etar
<i>n</i> -Propanol	Furfural
	Metiletilketon
	Metilen-hlorid
	1,1,2,2-tetrahloretan
	1,2,3-trihloretan
	Toluen
	Propilen-glikol

Primarnim rastvaračima se mogu smatrati oni rastvarači koji mogu da formiraju makar 10% rastvor zeina, bez dodatka drugih supstanci (Lawton 2002, Anderson 2011). Ovu grupu čine najvećim delom glikoli, glikol-etri, aminoalkoholi, amidi i amini. Neki od primarnih rastvarača za zein su: acetamid, sirćetna kiselina, anilin, glicerol i njegovi derivati, mravlja kiselina, mlečna kiselina, propilen-glikol, piridin, metanol, fenol. Primarni rastvarači istovremeno podjednako dobro rastvaraju i polarne i nepolarne aminokiseline, koje se nalaze u sastavu zeina. Sekundarni rastvarači su organske supstance, koje rastvaraju zein ako se nalaze u smeši sa vodom ili nižim alifatičnim alkoholom (Tabela 5). Dodavanjem drugog rastvarača povećava se rastvorljivost zeina, pri čemu se mora voditi računa o odnosu dva rastvarača i temperaturi (Lawton 2002). Kod ove grupe rastvarača, organska komponenta reaguje sa nepolarnim, a voda sa polarnim aminokiselinama zeina (Anderson i Lamsa 2011). Tercijarni rastvarači su slični sekundarnim, s tom razlikom da se, da bi rastvorili zein, moraju istovremeno nalaziti u smeši i sa vodom i sa još jednom organskom komponentom, najčešće nekim alkoholom (Lawton 2002, Anderson 2011).

Kukuruzno brašno ili griz (eng. *dry-milled corn – DMC*), kukuruzni gluten (eng. *corn gluten meal – CGM*) i suva džibra sa rastvorenim materijama (eng. *distillers' dried grains with solubles – DDGS*) se najčešće koriste kao polazne sirovine za izolovanje zeina. Kukuruzno brašno (griz) se dobija kao proizvod mlevenja zrna kukuruza, pri čemu se odstranjuju perikarp i klica (Slika 6). Predstavlja dobru sirovinu za izolovanje zeina, s obzirom da nije podvrgavano visokoj temperaturi ili agresivnim hemijskim tretmanima, koji mogu oštetiti strukturu proteina. Negativan aspekt jeste veoma nizak sadržaj proteina u brašnu, koji iznosi 6-8% u odnosu na ukupnu masu samlevene sirovine, što čini da proces izolovanja zeina iz ove sirovine bude veoma slabo isplativ. Kao sirovina za komercijalno izolovanje zeina najčešće se koristi kukuruzni gluten, upravo zbog veoma visokog sadržaja proteina, 61,5–74%, od čega 60–71% čini zein, a 36–47%  $\alpha$ -zein. Suva džibra sa rastvorenim materijama se dobija kao sporedni proizvod industrije bioetnola i industrija alkoholnih pića i predstavlja noviju sirovinu za izolovanje zeina (Anderson 2011, Semenčenko i sar. 2013). Džibra sadrži 28–30% proteina. Većina metoda za izolovanje zeina iz mlevenog endosperma kukuruza, zasniva se na korišćenju vodenog rastvora etnola, kao sredstva za ekstrakciju, i povišene temperature. Prilikom ekstrakcije mogu se dodati različita pomoćna sredstva (natrijum-hidroksid, sumpor-dioksid, mlečna kiselina, natrijum-bisulfit, natrijum-sulfit), u svrhu povećanja prinosa ili čistoće zeina. Veoma je bitno ukloniti ulje iz sirovine, pre ili u toku ekstrakcije, da ne bi došlo do njegovog izdvajanja zajedno sa



Slika 6. Delovi zrna kukuruza (Shukla i Cheryan 2001).

zeinom. Pokazano je da veće koncentracije etanola uspešno izoluju ulje, bez izolovanja zeina. Iz ekstrakta, zein je izdvajan isparavanjem rastvarača ili smanjenjem rastvorljivosti dodatkom vode ili hlađenjem. Najviše upotrebljavana komercijalna metoda za izolovanje zeina iz kukuruznog glutena, obuhvata ekstrakciju zeina pomoću 88% m/m vodenog rastvora 2-propanola, na povišenoj temperaturi, uz dodatak NaOH.

Zahvaljujući svojim osobinama zein ima sposobnost da obrazuje različite koloidne strukture – mikrovlakna, nanočestice, filmove, hidrokele (Patel i Velikov 2014).

Veliki broj radova izučava mogućnosti pripreme i karakterizacije nanočestica zeina (Zhong i Jin 2009, Li i sar. 2013, Chen i Zhong 2014, Baars i sar. 2015). Zein može, postupkom precipitacije u nerastvaraču (vodi), spontano da formira nanočestice, bez dodatka drugih jedinjenja (Zhong i Jin 2009, Gomez-Estaca i sar. 2012, Podaralla i Perumal 2012). Ipak zbog velike osetljivosti nanočestica na pH vrednosti u blizini IET, često se koriste različiti surfaktanti ili makromolekuli za povećanje njihove stabilnosti (Patel i sar. 2010, Hu i McClements 2014, Chen i Zhong 2015, Davidov-Pardo i sar. 2015). Takođe, zbog male rastvorljivosti nanočestica zeina na neutralnim pH vrednostima (pH = 5 – 8), zein se može kombinovati sa drugim polimerima, pri čemu nastaju kompozitne nanočestice (J. Chen i sar. 2014, Chen i Zhong 2015, Hu i McClements 2015).

Filmovi zeina takođe se intenzivno proučavaju u mnogim radovima. Najčešće se pripremaju iz etanolnog rastvora zeina, otparavanjem etanola nakon nanošenja rastvora u kalup ili direktno na supstrat (Guo i Shi 2009, Y. Chen i sar. 2014, Gaona-Sánchez i sar. 2015, Zhang i sar. 2015, Kashiri i sar. 2016). Zeinski filmovi pripremani bez dodatka plastifikatora ili drugih makromolekula veoma su kruti i neelastični, tako da se u formulacije za pripremu filmova gotovo uvek dodaju jedinjenja koja doprinose poboljšanju njihovih fizičkih i mehaničkih osobina (Lawton 2004, Ghanbarzadeh i sar. 2007, Naushad Emmambux i Stading 2007, Arcan i Yemenicioğlu 2013, Escamilla-García i sar. 2013, Liang i sar. 2015). Prilikom sušenja filmova, dolazi do konformacionih promena sekundarne strukture zeina. Usled dovođenja toplote, molekuli teže obrazovanju uređenije strukture, te dolazi do smanjenja udela  $\alpha$ -zavojnica, a povećanja udela  $\beta$ -ravni u sekundarnoj strukturi zeina (Forato i sar. 2003, Turasan i Kokini 2017).

### 2.1.2. Hidrokoloidi

Polisaharidi su biopolimeri sačinjeni od monosaharidnih jedinica međusobno povezanih O-glikozidnim vezama. Sastav monosaharida u sastavu polisaharida, tip veze i molekulska masa određuju fizičke osobine polisaharida.



Slika 7. Podela izvora hidrokoloida, sa primerima.



Hidrokoloidi predstavljaju posebnu grupu polisaharida, koji su veoma dobro rastvorni u vodi, pri čemu obrazuju viskozne rastvore. Sačinjeni su od uronskih kiselina koje sadrže polisaharide i, ponekad, proteine. Pored rastvorljivosti u vodi, odlikuje ih i biorazgradivost i biokompatibilnost, zbog čega predstavljaju veoma poželjne komponente u razvoju prehrambenih i farmaceutskih proizvoda. Najčešće su produkti različitih biljaka, ali mogu biti poreklom i iz mikroorganizama ili morskih organizama (Slika 7).

#### 2.1.2.1. Guma arabika

Guma arabika (GA) je hidrokoloid, izolovan iz grana i stabljika drvenastih biljaka iz porodice *Acacia*. Spada u kisele polisaharide i sastoji se od D–galaktoze, D–glukuronske kiseline, L–ramnoze i L–arabinoze. Osnovni lanac gume arabike sačinjen je od 1→3 vezanih D–galaktopiranozilnih jedinica, sa 1,6 vezanim galaktopiranznim bočnim lancima, dok se na krajevima pojedinih lanaca nalaze ramnoza ili glukuronska kiselina. U ukupnom sastavu molekula GA postoji i mala količina azotnih jedinjenja, koja nije moguće ukloniti prečišćavanjem. Ova azotna jedinjenja povezana su sa frakcijom visoke molekulske mase, koja čini 10 – 30% molekula GA i predstavlja proteinsku frakciju u sastavu GA. Arabinogalaktan predstavlja glavni konstituent gume arabike i ima diskastu strukturnu organizaciju. Zajedno sa proteinskom frakcijom molekula GA, arabinogalaktan formira kompleks u kome su ugljenohidratni blokovi vezani za polipeptidne lance preko serina i hidrosiprolina. Osim arabinogalaktan–protein kompleksa, u sastavu guma arabike postoji i glikoproteinska komponenta, koja sadrži 20 – 50% proteina u svom sastavu, i razlikuje se od arabinogalaktan–protein kompleksa po tome što se ne razlaže pod dejstvom proteolitičkih enzima. U više navrata dokazano je da su upravo proteinske frakcije u sastavu GA zaslužne za njene funkcionalne osobine, pre svega osobina na granici faza. Pri ispoljavanju funkcionalnih osobina važan je sadržaj proteinskih frakcija, njihov položaj u molekulu i dostupnost za interakcije sa drugim jedinjenjima. Osim proteinskih frakcija, za funkcionalne osobine GA u velikoj meri zaslužna je i veoma razgranata struktura molekula GA, koja omogućava sternu stabilizaciju prilikom adsorbovanja na granici faza. Pored toga, GA je i polielektrolit, što znači da i elektrostatičke sile imaju ulogu u stabilizaciji molekula, ali i sistema u koji je dodata GA. Prah gume arabike lako se rastvara u vodi, pri čemu nastaju

rastvori niskog viskoziteta i pH vrednosti oko 4,5. Pojedini rezultati reoloških merenja pokazuju da u rastvorima GA dolazi do spontanog asociiranja molekula GA. Ipak, rastvori GA pokazuju njutnovski karakter do koncentracije 25 – 30 % m/m, pre svega zbog veoma kompaktnog rasporeda konstituenata unutar makromolekula, što uslovljava veoma mali hidrodinamički prečnik makromolekula. GA je biopolimer koji se često primenjuje za stabilizaciju suspenzija i emulzija u topikalnim i oralnim formulacijama. Ona poseduje različita svojstva poput antibakterijskih, nutritivnih, hipoglikemijskih, imunosupresivnih i slično. U farmaceutskoj industriji, GA se primenjuje kao zgušnjivač, emulgator, vezivno sredstvo u tabletama, za stabilizaciju suspenzija, kao i za smirivanje upalnih procesa i zarastanje rana na koži (Dickinson 2018, Koyyada i Orsu 2021). Guma arabika ispoljava svoja funkcionalna svojstva u širokom opsegu pH vrednosti, temperature i jonske jačine sredine u kojoj se nalazi. Veoma je zasupljena kao emulgator u osvežavajućim bezalkoholnim pićima (OBP), zbog svoje sposobnosti da stabilizuje aromatična ulja bilo da se radi o koncentratima ili o veoma razblaženim sistemima (Dickinson 2018).

Guma arabika se takođe može koristiti i u kompleksima sa drugim jedinjenjima o čemu postoji veliki broj istraživanja. Tako, na primer, Sharkawy i sar. (2019) govore o mogućnosti primene kompozitnih nanočestica hitozan/guma arabika za stabilizaciju Pickering emulzija. Pri tome se dobijaju koloidno stabilne emulzije, bez upotrebe sintetičkih surfaktanata. Takođe, GA se može koristiti i u kombinaciji za  $\beta$ -laktoglobulinom za dobijanje kompozitnih nanočestica, za inkapsulaciju epigalokatehin-galata (EGCG). Autori navode da se ovakvom inkapsulacijom povećava stabilnost EGCG i omogućava njegovo kontrolisano otpuštanje (Gao i sar. 2021). Dalje, GA se može koristiti i za dobijanje kompozitnih nanovlakana zajedno sa želatinom, uz korišćenje genipina kao umreživača. Na ovaj način mogu se dobiti vlaknaste strukture kontrolisanih mehaničkih osobina i hidrofobnosti površine, za primenu u prehrambenoj tehnologiji (Zhang i sar. 2021). Još jedan od primera jesu i nanočestice zein/GA čija su priprema i primena opisane od strane Gali i sar. (2021). Autori navode da metodom precipitacije u nerastvaraču i stabilizacijom pomoću GA mogu da se dobiju nanočestice pogodne za inkapsulaciju rutina, u vodi nerastvornog flavonola .

### 2.1.3. Prirodne smole

Prirodne smole predstavljaju viskozne tečnosti, koje, u specijalizovanim ćelijama, proizvode određene vrste biljaka i životinja. Iz biljaka se dobijaju iz grana, kore, cveta ili izdanaka, dok je kod životinja obično reč o sakupljanju ekskreta prilikom prirodnog izlučivanja. Smole se uglavnom sastoje od terpena – jedinjenja snažnog, prijatnog mirisa, sačinjenih od izoprenskih podjedinica i smolastih kiselina.

#### 2.1.3.1. Šelak

Šelak predstavlja prečišćeni proizvod poreklom od prirodne smole lak (Slika 8), koju proizvodi mali, parazitski insekt *Kerria Lacca*. Jedina je poznata smola životinjskog porekla, koja se komercijalno proizvodi i upotrebljava. U pogledu hemijske strukture, šelak predstavlja kompleksnu smešu estara i poliestara polihidroksilnih kiselina. Osnovni konstituenti šelaka jesu aleuritinska i šelainska kiselina, koje imaju i do 70% udela u hemijskom sastavu šelaka, u zavisnosti od geografskog porekla. Pored ovih kiselina, u sastav šelaka ulaze i butolinska i druge seskviterpenske kiseline, kao i njihovi estri. Šelak je čvrsta, lomljiva, smolasta materija, čiji miris potiče od aleuritinske kiseline. Boja zavisi od porekla i načina prečišćavanja, te može varirati od svetlo žute do jarko crvene. Filmovi šelaka imaju visok sjaj, slabu propustljivost za vodenu paru i druge gasove i dobre dielektrične osobine. Ova smola nerastvorna je u vodi, osim pri jako baznim uslovima, ali je rastvorna u etanolu, metanolu i delimično rastvorna u etru, etil-acetatu i hloroformu. Smatra se neškodljivom i netoksičnom materijom. Nasuprot jedinjenjima sa uređenom kristalnom strukturom, amorfne supstance poput šelaka nemaju oštru tačku topljenja, pa tako temperatura staklišta kod šelaka može da varira između 30°C – 50°C. Takođe, ova smola podleže starenju. S obzirom da mnoge kiseline u njenom sastavu imaju više od jedne hidroksilne grupe, a neke i više od jedne karboksilne grupe, pretpostavlja se da je proces starenja posledica samoesterifikacije šelaka. Kao posledica starenja javlja se smanjenje rastvorljivosti i povećanje temperature staklišta (Farag 2010).

S obzirom da je prepoznat kao bezbedan za ljudsku upotrebu (eng. *GRAS*) šelak se može primeniti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Jedna od najčešćih primena šelaka u prehrambenoj industriji jeste za premazivanje poslastičarskih proizvoda i nekih vrsta voća,



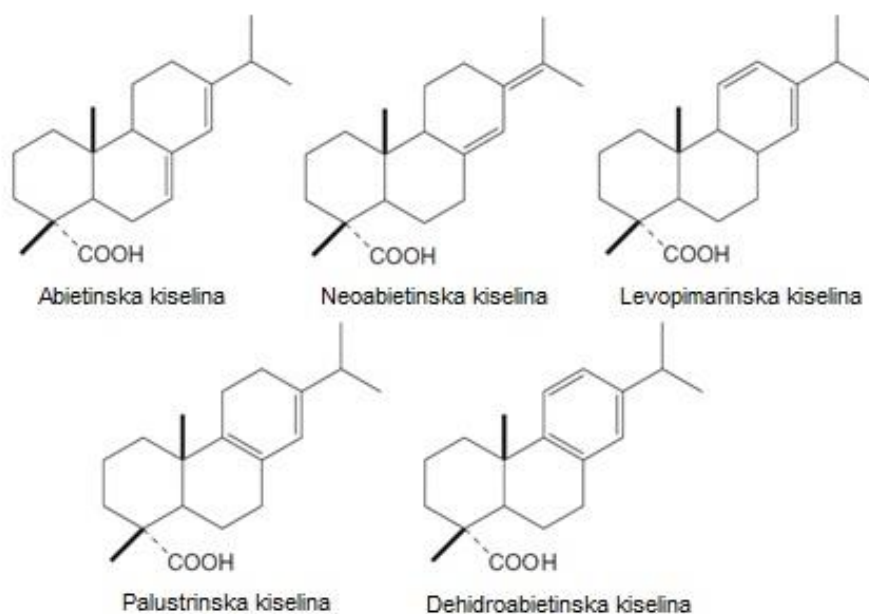
Slika 8. Šelak.

kako bi im se povećao sjaj. Takođe, primenjuju se i kao premaz za citrusne, jer sprečava isparavanje vode i isparljivih aroma iz ploda, a takođe obezbeđuje i mikrobiološku zaštitu. Osim toga, šelak se može primeniti i u razvoju prirodne, biorazgradive ambalaže. Šelak se najčešće primenjuje u obliku etanolnog rastvora. Međutim, u ovom obliku nije pogodan za upotrebu u farmaceutskoj industriji, iako pokazuje odlične enteričke osobine. Stoga je za potrebe farmaceutske industrije razvijen rastvor šelaka u razblaženom amonijaku, gde se šelak nalazi u obliku amonijačne soli. Na ovaj način, šelak se može naneti na čvrste forme lekova, na čijoj površini formira zaštitni film, koji omogućava ciljano dostavljanje aktivnih materija leka, najčešće do debelog creva, pri čemu film ostaje nerastvoran u uslovima pH vrednosti unutar želuca i creva. Takođe, zbog male propustljivosti za vodenu paru, filmovi i premazi šelaka nalaze primenu u formulacijama lekova osetljivih na visoke vrednosti aktivnosti vode ( $a_w$ ). Osim kao zaštitni premaz ili film, šelak se može koristiti i za mikrokapsulaciju hidrofobnih aktivnih materija, zasebno ili u kombinaciji sa drugim jedinjenjima poput želatina. Mikrokapsulacija se može postići precipitacijom šelaka, čime se dobijaju mikrosfere nerastvorne u vodi (Farang 2010, Stummer i sar. 2010, Farang i Leopold 2011, Oehme i sar. 2011).

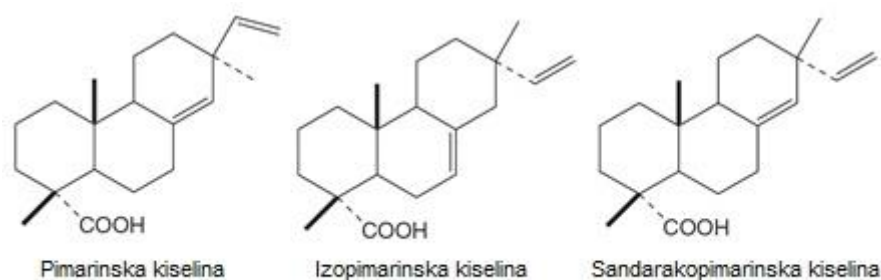
#### 2.1.3.2. Kalafonijum

Kalafonijum je prirodni biorazgradivi oligomer, sa niskom molekulskom masom (oko 400 g/mol), koji se dobija kao čvrsta smolasta materija izolovanjem iz oleorezina. Oleorezin predstavlja smolu koju izlučuju različite vrste iz porodice borova, *Pinus sp.* Glavni izvori oleorezina iz ove porodice su *Pinus roxburghii*, *Pinus longifolium* i *Pinus toeda*. S obzirom na veliku rasprostranjenost borova u svetu, kalafonijum je široko rasprostranjen, lako dostupan i jeftin. Biorazgradiv je i biokompatibilan. Sirov, neprečišćen kalafonijum je krta,

delimično transparentna masa, sjajne površine, čija boja se kreće od bledo žute do svetlo braon ili čilibarne boje. Veoma je zapaljiv i prilikom sagorevanja stvara velike količine dima. Nerastvoran je u vodi, a rastvoran u etanolu, etru, hloroformu, nekim uljima i glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Tačka topljenja kalafonijuma nalazi se u rasponu od 100 – 120°C. 90 – 95% udela u hemijskom sastavu kalafonijuma imaju kiseline, pre svega abietinskog i pimarinskog tipa, dok ostatak čine druge materije. Kiseline u sastavu kalafonijuma su po strukturi triciklične diterpenske monokarboksilne kiseline sa molekulskom formulom  $C_{20}H_{30}O_2$ . Molekuli ovih kiselina poseduju dve vrste hemijski aktivnih centara: dvostruke veze i karboksilne grupe, pa su tako kod kiselina abietinskog tipa dvostruke veze konjugovane (Slika 9), a kod kiselina pimarinskog tipa nekonjugovane (Slika 10). Najzastupljenije kiseline u sastavu kalafonijuma su abietinska, neoabietinska, palustrička, levopimarinska, pimarinska, izopimarinska i sandarakopimarinska (Rao i sar. 2013, McKeon i sar. 2014, Azemard i sar. 2016, Stanzione i La Scala 2016, Yadav i sar. 2016, Narayanan i sar. 2017).



Slika 9. Hemijske strukture kiselina abietinskog tipa (Silvestre i Gandini 2008).



Slika 10. Hemijske strukture kiselina pimarinskog tipa (Silvestre i Gandini 2008).

Kalafonijum predstavlja bezbednu i biokompatibilnu supstancu, odobrenu za primenu i prehrambenim i farmaceutskim proizvodima, klasifikovanu brojem E915 (sredstva za glaziranje i zaslađivači) od strane Evropske agencija za bezbednost hrane (EFSA). U prehrambenoj industriji koristi se za glaziranje žvakaćih guma i sličnih proizvoda. Takođe, može se primetiti i kao estar glicerola (E445 – zgušnjivači, stabilizatori i emulgatori), kao emulgator u OBP. Kada je reč o farmakološkom delovanju, kiseline abietinskog tipa u sastavu kalafonijuma poseduju antiinflamatorno dejstvo, služe kao inhibitori lipoksigenaza i mogućnost vezivanja za membranski fosfolipidni dvosloj. Većina istraživanja primene kalafonijuma u farmaceutskoj industriji baziraju se na njegovoj sposobnosti formiranja dobrih barijernih filmova, bilo da se primenjuje kao esterifikovan ili neesterifikovan. Prema tome, glavni potencijal kalafonijuma jeste upotreba u vidu premaza za farmaceutske proizvode. Pokazuje odgovarajuće osobine za postizanje odloženog, kao i kontrolisanog oslobađanja aktivne materije. Za ciljanu dostavu se često kombinuje sa polisaharidima, zbog njihove degradabilnosti. Ipak, filmovi kalafonijuma su veoma kruti, te se najčešće moraju modifikovati ili kombinovati se drugim komponentama. Takođe, pojedina ispitivanja pokazala su mogućnost primene filmova kalafonijuma za transdermalnu dostavu lekova. Kalafonijum pokazuje i potencijal za pripremu formulacija za implante, za koje ne bi bilo neophodno uklanjanje operativnim putem. Osim filmova, kalafonijum ima i sposobnost formiranja mikro- i nanočestica, koje se takođe mogu primeniti kao svojevrsni nosači aktivnih materija, pre svega onih nerastvornih u vodi. Takođe, čestice kalafonijuma mogu služiti i inkapsulaciju aktivnih materija neprijatnog ukusa i samim tim za njegovo maskiranje (Yadav i sar. 2016, Narayanan i sar. 2017).

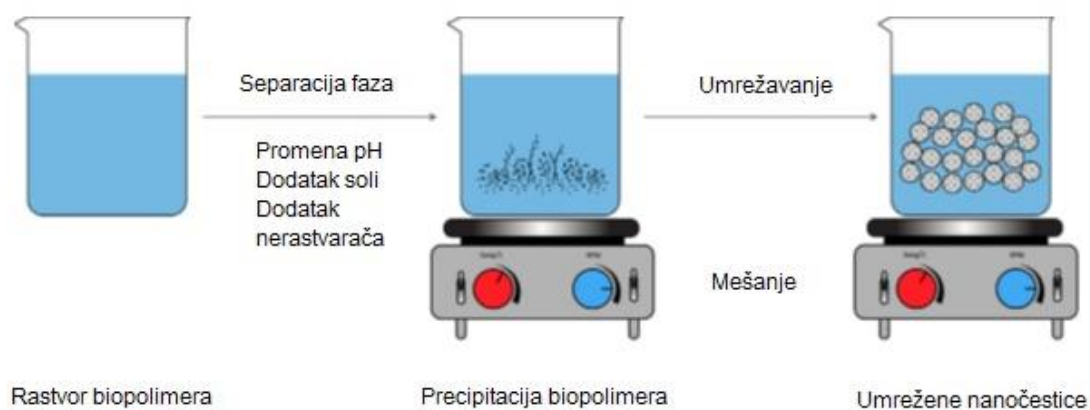
## 2.2. Biopolimerne nanočestice

Razvoj nanočestica specifičnih svojstava podstaknut je njihovom primenom u nanotehnologiji, prehrambenim i poljoprivrednim sistemima, pogotovo razvojem bioaktivnih komponenata funkcionalne hrane, sa poboljšanom rastvorljivošću, fizičko-hemijskom stabilnošću, oralnom bioraspoloživošću i senzornim karakteristikama. U poređenju sa svim drugim prirodnim i sintetskim partikularnim sistemima, nanočestice na bazi biljnih proteina imaju značajnu prednost zbog svoje biorazgradivosti, porekla iz široko dostupnih obnovljivih sirovina, *in vivo* bezbednosti i velikog broja funkcionalnih osobina. Uz to, čestice pripremljene od biljnih proteina imaju veliki kapacitet inkapsulacije za različite aktivne komponente, usled amfifilne strukture, velikog broja aktivnih grupa i različitih mehanizama vezivanja, koje uključuju elektrostatičko vezivanje, hidrofobne interakcije, vodonične i kovalentne veze (Mohammadian i sar. 2020, Tomadoni i sar. 2020).

### 2.2.1. Priprema biopolimernih nanočestica

Postoji više metoda za pripremu biopolimernih nanočestica. Izbor metode zavisi od različitih faktora, ali prvenstveno od fizičko-hemijskih osobina biopolimera. Uprkos međusobnim razlikama, većina metoda za pripremu biopolimernih nanočestica se zasnivaju na precipitaciji makromolekula. Do precipitacije dolazi kada se smanji rastvorljivost makromolekula u datom rastvaraču, što se može postići dodatkom nerastvarača ili promenom fizičko-hemijskih parametara, kao što su pH, salinitet ili temperatura rastvora proteina.

**Koacervacija** (eng. *coacervation*) predstavlja separaciju rastvora makromolekula na dve tečne faze: koacervat i ravnotežni rastvor – supernatant. Uzroci separacije faza mogu biti različiti. Ukoliko do separacije faza dolazi usled promene rastvorljivosti makromolekula u pitanju je prosta koacervacija. Ukoliko je separacija faza u rastvoru nekog makromolekula izazvana dodatkom drugog makromolekula, reč je o kompleksnoj koacervaciji ili o termodinamičkoj nekompatibilnosti. Proces proste koacervacije zasniva na različitoj rastvorljivosti proteina u rastvaračima, zavisno od polarnosti rastvarača, pH, jonske jačine i prisustva elektrolita. U toku procesa koacervacije dolazi do smanjenja rastvorljivosti proteina, što dovodi do separacije faza. U toku koacervacije iz rastvora proteina se izdvajaju dve tečne

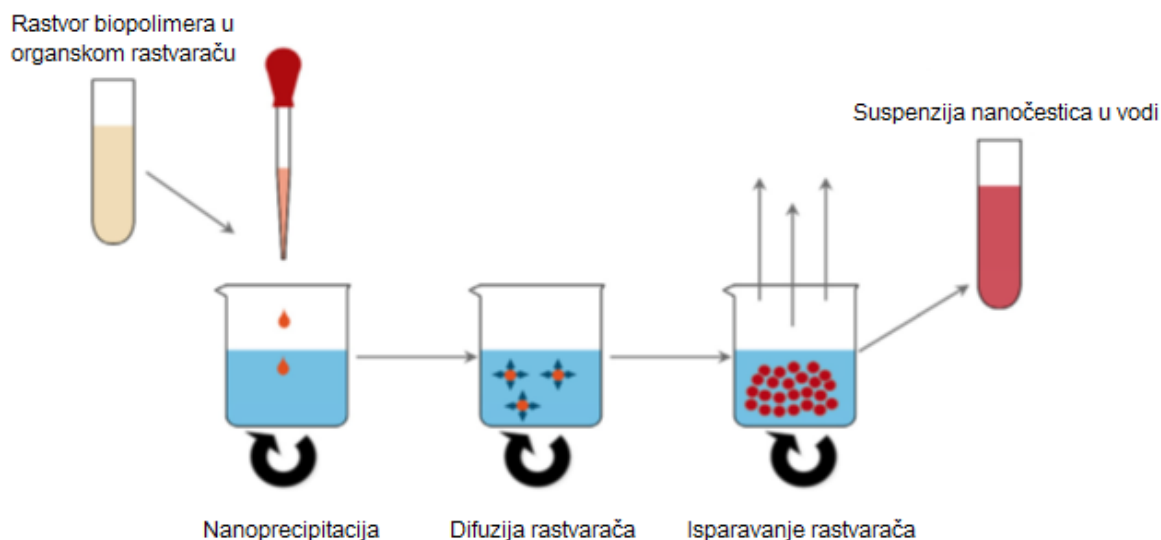


Slika 11. Priprema nanočestica prostom koacervacijom (Mohammadian i sar. 2020).

faze, koacervatna bogata proteinom koja se izdvaja na dnu, a na vrhu supernatant koji ne sadrži proteine. Prilikom kompleksne koacervacije dolazi do stvaranja kompleksa između dva makromolekula, pri čemu izdvojeni koacervat sadrži oba makromolekula dok je supernatant praktično čist rastvarač. Kod termodinamičke nekompatibilnosti dolazi do formiranja koacervata, kada dva prisutna makromolekula nemaju težnju ka asociiranju, već jedan makromolekul teži da istisne drugi iz rastvora. U tom slučaju, svaka od dve nastale faze bogata je samo jednim makromolekulom. Na neki od ova tri načina u koacervatnoj fazi, sa ili bez umreživača, dolazi do formiranja nanočestica (Slika 11). Na veličinu čestica dobijenih tehnikom koacervacije utiču koncentracija biopolimera, njegova molekulaska masa, kao i viskozitet rastvarača (Verma i sar. 2020). Ova metoda se može primeniti za dobijanje nanočestica zeina ili proteina iz mahunarki (Tarhini i sar. 2017). Umrežavanje se može koristiti kao pomoćna tehnika kod pripreme nanočestica tehnikom koacervacije, kako bi se povećala stabilnost biopolimernih čestica. U ove svrhe se mogu koristiti različiti umreživači: hemijski, jonski, termalni i enzimski. Umreživači obično imaju zadovoljavajuću efikasnost i uticaj na stabilnost čestica, ali se u nekim slučajevima teško uklanjaju i mogu biti toksični. Ponekad je potrebno upotrebiti i proces dijalize za njihovo uklanjanje, što može poskupeti proces pripreme nanočestica (Tarhini i sar. 2017).

**Precipitacija u nerastvaraču** (eng. *antisolvent precipitation*) zahteva upotrebu dva međusobno mešljiva rastvarača, pri čemu je nužno da je biopolimer rastvoran u jednom, a nerastvoran u drugom rastvaraču. U toku procesa precipitacije dolazi do nagle desolvacije biopolimera kada se rastvor biopolimera doda u nerastvarač. Tako na primer, 70 – 80% etanolni rastvor proteina može, uz mešanje, biti dodat u vodu koja predstavlja nerastvarač i





Slika 12. Priprema nanočestica precipitacijom.

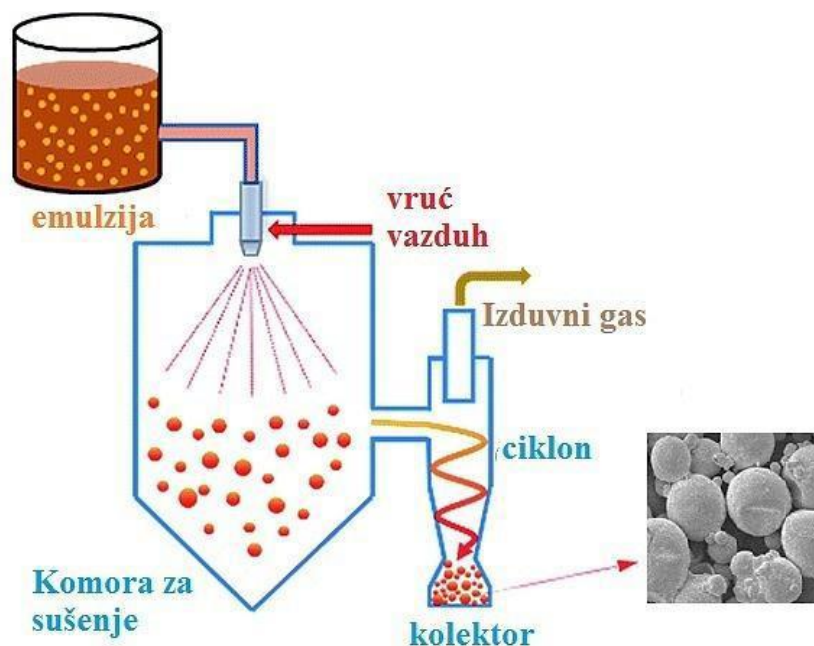
eventualno sadrži rastvorene površinski aktivne materije. Kada koncentracija alkohola opadne ispod kritične tačke rastvorljivosti proteina, proteini postaju nerastvorni i precipituju formirajući nanočestice (Slika 12). Na ovaj način mogu se formirati nanočestice hidrofobnih proteina kao što su zein, gliadin iz glutena i sl. (Wouters i Delcour 2019). Tehnikom precipitacije u nerastvaraču mogu se formirati i nanočestice albumina iz goveđeg i humanog seruma, kao i želatina, tako što se njihovi vodeni rastvori dodaju u etanol kao nerastvarač (Verma i sar. 2020). Ova tehnika je brza i jednostavna, omogućava pripremu čestica veoma malih dimenzija sa monomodalnom raspodelom veličina i iziskuje mali utrošak energije. Kod precipitacije, fizičko–hemijske osobine nanočestica najvećim delom zavise od uslova pod kojim se rastvor biopolimera dodaje u vodenu fazu, a tu spadaju brzina i način dodavanja, brzina mešanja u toku postupka, kao i odnos rastvarač/nerastvarač. Takođe, na karakteristike nanočestica utiču i osobine i koncentracija komponenata od kojih su sačinjene. Iako upotreba surfaktanata nije neophodna u okviru ove metode, ukoliko su prisutni, njihov uticaj na karakteristike nanočestica se ne može zanemariti (Tarhini i sar. 2017).

Tehnika **električnog raspršivanja** (eng. *electrospraying*) naziva se još i elektrodinamičko raspršivanje ili elektrohidrodinamička atomizacija. Predstavlja tehniku za pripremu nanočestica zasnovanu na delovanju električnog polja, uz pomoć koga se formiraju veoma sitne kapi rastvora biopolimera od kojih nastaju nanočestice. Raspršene kapljice dalje

se prikupljaju u kolektoru, koji sadrži vodu ili drugi nerastvarač, gde se ponovo po principu precipitacije u nerastvaraču formiraju nanočestice (Faridi Esfanjani i Jafari 2016, Kurakula i Raghavendra Naveen 2021). Istraživanja su pokazala da se tehnikom električnog raspršivanja mogu dobiti nanočestice gliadina i albumina iz goveđeg seruma (Samrot i sar. 2020).

Kada je reč o **emulgovanju** kao tehnici za pripremu biopolimernih nanočestica, u literaturi postoje dve osnovne strategije. Prva se zasniva na formiranju jednostrukih emulzija, a druga na formiranju duplih emulzija. Obe metode podrazumevaju upotrebu intenzivne homogenizacije ili ultrasonifikacije, nakon koje sledi otparavanje rastvarača uz konstantno mešanje, na sobnoj temperaturi ili pod vakuumom. Po završetku uklanjanja rastvarača, čvrste nanočestice se izdvajaju pomoću ultracentrifuge (Sağlam i sar. 2014, Tarhini i sar. 2017). Kada se primenjuje za dobijanje nanočestica hidrofилnog biopolimera, vodenu fazu emulzije čini vodeni rastvor biopolimera, dok uljanu tj. nepolarnu fazu predstavlja nepolarnu rastvarač u kome je rastvoren surfaktant (Asgari i sar. 2019). Neki od primera biopolimera od kojih se na ovaj način mogu formirati nanočestice jeste albumin iz goveđeg seruma (Samrot i sar. 2020) i hitozan (Shoueir i sar. 2021).

**Raspršivanje u struji vrelog vazduha** (eng. *(nano)spray-drying*) je tehnika koja se koristi za kontinualno dobijanje čvrstih čestica iz rastvora ili suspenzije, uklanjanjem tečne faze pod dejstvom povišene temperature, odnosno sušenjem. Veoma je pogodna za tretiranje molekula osetljivih na visoke temperature, poput proteina, sprečavajući njihovu degradaciju. U okviru ove tehnike, jednostavnim podešavanjem uslova sušenja, mogu se kontrolisati osobine čestica, odnosno njihova veličina, rastresitost i sipkost. Uobičajeno je da se formulacija za pripremu nanočestica sastoji iz vodene suspenzije ili rastvora biopolimera, koja može sadržati i neki od punilaca koji potpomažu sušenje. Proces samog sušenja sastoji se iz četiri koraka (Slika 13): 1) atomizacija suspenzije polimera; 2) mešanje atomizovane suspenzije sa vrelim vazduhom; 3) sušenje i 4) odvajanje suvih nanočestica i vlažnog vazduha (Tarhini i sar. 2017). Ova tehnika se odavno koristi za komercijalno dobijanje različitih čestica mikronskih veličina. Međutim, novija istraživanja pokazala su da je moguće dobiti i čestice submikronskih veličina, koristeći specijalno opremljene uređaje za sušenje raspršivanjem u struji vrelog vazduha. Ovi uređaju poseduju specijalno namenjen atomizer sa vibrirajućom mrežicom, uz pomoć kojeg se mogu formirati veoma sitne kapljice, čijim sušenjem se dobijaju nanočestice sa vrlo uskom raspodelom veličina. Pokazano je da se primenom ovakvog vida sušenja mogu dobiti nanočestice hitozana sa prečnikom oko 300 nm (Faridi Esfanjani i Jafari 2016, Shoueir i sar. 2021).



Slika 13. Priprema mikrokapula raspršivanjem u struji vrelog vazduha.

### 2.2.2. Primena biopolimernih čestica

Najčešća primena biopolimernih čestica jeste neki vid inkapsulacije (Joye i McClements 2014). Pri tome, same nanočestice mogu služiti kao nosači inkapsulirane materije ili pak služiti kao stabilizatori, umesto emulgatora, za emulzije koje sadrže aktivne materije (Pikering emulzije). Za primenu u inkapsulaciji, mogu se koristiti polisaharidne, lipidne ili proteinske nanočestice. Gao i sar. (2021) navode mogućnost pripreme kompozitnih nanočestica  $\beta$ -laktoglobulin/guma arabika za inkapsulaciju i kontrolisano otpuštanje antioksidanta EGCG. Nanočestice su pripremane postupkom koacervacije, a potom sušene liofilizacijom. Pokazano je da inkapsulirani EGCG ima povećanu antioksidativnu aktivnost u odnosu na slobodni, te da je sastav nanočestica pogodan za inkapsulaciju i kontrolisano otpuštanje. Autori takođe navode da su glavni mehanizmi interakcije između antioksidanta i nosača uspostavljeni na osnovu elektrostatičkih, vodoničnih i hidrofobnih veza. Polisaharidi hitozan i Na-alginat mogu se koristiti za pripremu biokompatibilnih nanočestica koje imaju mogućnost prodiranja u mukozno tkivo, sa ciljem ciljanog dostavljanja antibiotika (Gómez-Guillén i Montero 2021, Kimna i sar. 2021). Takođe, Na-alginat korišćen je i u kombinaciji sa zeinom, za inkapsulaciju kurkumina, pri čemu su nanočestice pripremane tehnikom precipitacije u nerastvaraču (Li i sar. 2021). Zein je primenjivan i za inkapsulaciju rutina

(Gali i sar. 2021). Autori istraživanja navode da su nanočestice zeina pripremane tehnikom precipitacije u nerastvaraču i stabilizovane pomoću guma arabike, koja je doprinela stabilnosti zeinskih nanočestica na  $\text{pH} = 2 - 8$ , pri različitim jonskim jačinama i na temperaturi do  $100^{\circ}\text{C}$ . Osim toga, guma arabika doprinela je efikasnosti inkapsulacije i kontrolisanom otpuštanju rutina iz nanočestica. Protein iz leguminoza, konkanavalin A takođe ima sposobnost formiranja nanočestica. On je, zajedno sa amilopektinom, korišćen za pripremu kompozitnih nanočestica osetljivih na glukozu. Ove nanočestice ispitivane su u svrhu kontrolisane dostave insulina (Chang i sar. 2018). Primena različitih biopolimernih nanočestica za formiranje Pickering emulzija i formiranja kapsula tipa rezervoara fokus je sve većeg broja novijih istraživanja (Zhang i sar. 2021). Kompozitne nanočestice hitozan/guma arabika primenjivane su za stabilizovanje U/V emulzija, pri čemu se dobijaju veoma stabilne emulzije sa visokim sadržajem ulja (60 – 70%) (Sharkawy i sar. 2019).

Druga, nešto manje zastupljena, primena biopolimernih nanočestica jeste modifikovanje fizičko–hemijskih i senzornih osobina hrane. Pri tome, nanočestice se najčešće upotrebljavaju za regulisanje izgleda, ukusa, teksture ili stabilnosti različitih prehrambenih proizvoda sa smanjenim sadržajem masti. Naime, kapljice masti u prehrambenim proizvodima doprinose njihovom izgledu, ukusu i teksturi, te uklanjanje jednog dela masti iz nekog proizvoda za posledicu ima pogoršanje senzornih osobina. Osim toga, nanočestice mogu služiti i za inkapsulaciju soli i njeno odloženo oslobađanje, čime se omogućava razvoj prehrambenih proizvoda sa smanjenim sadržajem soli (Joye i McClements 2014).

### 2.2.3. Koloidne osobine biopolimernih nanočestica

#### 2.2.3.1. Električne osobine i stabilnost čestica

Jedna od osnovnih osobina nanočestica jeste njihovo naelektrisanje. Ono utiče, pre svega, na stabilnost čestica, ali i na mogućnost interakcije sa drugim česticama ili molekulima prisutnim u njihovoj blizini.

Naelektrisanje nanočestica najčešće se kvantifikuje preko veličine koju nazivamo elektrokinetički ili zeta potencijal. Naime, kada se naelektrisana čestica nađe u tečnom medijumu oko nje se formira električni dvojni sloj, koji se sastoji od adsorpcionog i

difuzionog sloja, između kojih postoji određena razlika potencijala, koja predstavlja zeta potencijal. Adsorpcioni sloj čine joni, suprotnog naelektrisanja u odnosu na česticu, koji bivaju privučeni od strane elektrostatičkog polja čestice. Sa povećanjem rastojanja, elektrostatičko polje čestice slabi, i najčešće doseže tek nekoliko nanometara od površine čestice. Usled elektrostatičkog privlačenja od strane čestice i adsorpcionog sloja, koje deluje istovremeno, oko adsorpcionog sloja formira se difuzioni sloj, sačinjen od jona i istog i suprotnog naelektrisanja u odnosu na česticu. Sastav difuzionog sloja nije konstantan, već varira u zavisnosti od različitih faktora, kao što su pH, jonska jačina, koncentracija čestica, itd. Kada se na disperziju naelektrisanih čestica primeni električno polje, doći će do kretanja čestica ka suprotno naelektrisanjoj elektrodi, odnosno do elektroforeze. Unutar difuzionog sloja nalazi se hipotetička ravan, koja se ponaša kao granica između čestice koja se kreće i sloja disperznog sredstva oko nje. Ova ravan naziva se smicajna ravan i smatra se da se na njoj javlja zeta potencijal. Potencijal same površine čestice naziva se Nernstov potencijal ( $\Psi_0$ ) i ne može biti direktno izmeren. Kako se potencijal elektrostatičkog polja smanjuje sa povećanjem rastojanja od čestice, tako se prema Debajevom zakonu (eng. *Debye*) Nernstov potencijal menja prema jednačini:

$$\psi = \psi_d * e^{-\kappa x} \quad (1)$$

gde  $\Psi$  predstavlja potencijal površine na udaljenosti  $x$  od adsorpcionog sloja,  $\Psi_d$  potencijal površine adsorpcionog sloja,  $\kappa$  Debaj–Hikelovu konstantu (eng. *Debye–Hückel*), a  $x$  udaljenost.

Ako se pretpostavi da se hipotetička smicajna ravan nalazi na samoj površini adsorpcionog sloja, onda je  $\Psi_d \approx \zeta$ , te se jednačina (1) može modifikovati da glasi:

$$\psi = \zeta * e^{-\kappa x} \quad (2)$$

Debaj–Hikelova konstanta zavisi od jonske jačine, pa se tako sa povećanjem jonske jačine, odnosno dodatkom elektrolita, sabija električni dvojni sloj oko čestice, a vrednost zeta potencijala opada (Bhattacharjee 2016a).

Zeta potencijal, takođe, ne može biti izmeren direktno, već se određuje na osnovu elektroforetske pokretljivosti naelektrisane čestice u električnom polju. Elektroforetska pokretljivost ( $\mu_e$ ) se može odrediti preko jednačine (3):

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad (3)$$

gde je  $V$  brzina kretanja čestice u električnom polju ( $\mu\text{m/s}$ ), a  $E$  jačina električnog polja ( $\text{V/cm}$ ). Dalje sledi da se zeta potencijal može izračunati iz Henrijeve jednačine (4):

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad (4)$$

gde je  $\varepsilon_r$  dielektrična konstanta sredine,  $\varepsilon_0$  dielektrična konstanta vakuuma,  $\zeta$  zeta potencijal,  $f(Ka)$  Henrijeva funkcija, a  $\eta$  viskozitet sredine na datoj temperaturi.

Jedan od načina za merenje elektroforetske pokretljivosti čestica jeste uz pomoć elektroforetskog rasipanja svetla, pri čemu čestice u toku svog kretanja rasipaju svetlost usmerenog laserskog zraka. S obzirom na to da se čestice kreću, frekvencija rasutih zraka se razlikuje od frekvencije upadnog laserskog zraka, a taj pomeraj frekvencije je proporcionalan brzini kretanja čestica (Doplerov pomeraj). Prilikom emitovanja, laserski zrak se razdvaja na dva dela, pri čemu je jedan usmeren ka uzorku (disperziji), a drugi služi kao referentni. Svetlost rasuta od strane uzorka se kombinuje, odnosno „optički meša“ sa referentnim zrakom, kako bi se odredio Doplerov pomeraj, uz pomoć koga se može odrediti vrednost brzine kretanja čestica ( $V$ ), a potom i vrednost zeta potencijala čestica u datim uslovima.

Na vrednost zeta potencijala utiču različiti faktori, kao što su pH vrednost, jonska jačina i koncentracija čestica u disperziji. pH vrednost najčešće ima najznačajniji uticaj na zeta potencijal, u odnosu na ostale faktore. Ovo je posebno izraženo ako je reč o vodenim disperzijama čestica. U zavisnosti od pH, zeta potencijal može varirati ka pozitivnim ili ka negativnim vrednostima, pa tako zavisnost zeta potencijala od pH vrednosti često služi za određivanje izoelektrične tačke (IET), u kojoj je zeta potencijal jednak nuli. Kada je reč o vodenim disperzijama – gde su  $\text{H}^+$  i  $\text{OH}^-$  predominantne jonske grupe – izoelektrična tačka se može izjednačiti sa nulom naelektrisanja. Koloidne čestice gube stabilnost i koagulišu na pH

vrednostima bliskim IET. Jonska jačina takođe značajno utiče na zeta potencijal. Sa povećanjem jonske jačine sredine dolazi do sabijanja električnog dvojnog sloja čestica u disperziji i opadanja vrednosti zeta potencijala, i obrnuto. Valentnost jona isto tako utiče na zeta potencijal, te što je veća valentnost jona dolazi do intenzivnijeg smanjenja zeta potencijala. Uticaj koncentracije na zeta potencijal nešto je kompleksniji i obično je uslovljen i površinskom adsorpcijom i uticajem električnog dvojnog sloja. Zbog kompleksnosti, teško je ustanoviti opšte pravilo kada je reč o uticaju koncentracije na zeta potencijal. Ipak, postoje određene pravilnosti u zavisnosti od koncentracije. Kada je reč o razblaženim disperzijama, površinska adsorpcija je dominantna pojava, te se zeta potencijal povećava se povećanjem koncentracije. S druge strane, kada se radi o koncentrovanijim disperzijama, dominantan je uticaj koncentracije na debljinu električnog dvojnog sloja, te sa povećanjem koncentracije opada zeta potencijal, ali i stabilnost čestica.

Zeta potencijal pre svega pruža informaciju o koloidnoj stabilnosti nanočestica. Generalno gledano, disperzije sa zeta potencijalom  $\pm 0 - 10$  mV smatraju se veoma nestabilnim, one sa  $\pm 10 - 20$  mV relativno stabilnim, sa  $\pm 20 - 30$  mV umereno stabilnim i one sa  $\geq \pm 30$  mV veoma stabilnim. Međutim, sama koloidna stabilnost čestica je mnogo kompleksnija i nije uslovljena samo vrednošću zeta potencijala. U skladu sa široko prihvaćenom DLVO (eng. *Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek*) teorijom, koloidna stabilnost čestica zavisi od sume Van der Valsovih privlačnih i elektrostatičkih odbojnih sila električnog dvojnog sloja između čestica. S tim u vezi, zeta potencijal pruža informacije o odbojnim silama, ali ne i o Van der Valsovim privlačnim silama, te je moguće da i disperzije sa malim vrednostima zeta potencijala budu stabilne, kao i obrnuto. Osim toga, i sterne interakcije imaju uticaj na stabilnost čestica (Bhattacharjee 2016b).

Drugi način da se definiše naelektrisanje čestica jeste određivanjem površinske gustine naelektrisanja. Površinska gustina naelektrisanja predstavlja količinu naelektrisanja po jedinici površine čestice i može se izraziti preko jednačine (5):

$$\sigma = \frac{q}{A} \quad (5)$$

pri čemu je  $q$  količina naelektrisanja, a  $A$  specifična površina čestice.

Jedna od tehnika za određivanje površinske gustine naelektrisanja nanočestica jeste merenje strujnog potencijala (eng. *streaming potential*), u toku titracije disperzije nanočestica polielektrolitima. Strujni potencijal se meri pomoću uređaja koji se naziva detektor naelektrisanja čestica (eng. *Particle Charge Detector – PCD*). Strujni potencijal nastaje kada se, pod pritiskom, uspostavi protok disperznog sredstva u blizini čestica, usled čega dolazi do kretanja protiv-jona iz difuzionog sloja čestica i stvaranja električnog polja. Rezultujuća električna struja se detektuje uz pomoć dve elektrode na uređaju i konvertuje u vrednost strujnog potencijala. Znak očitanoog strujnog potencijala ukazuje na to da li je čestica naelektrisana pozitivno ili negativno. Vrednost strujnog potencijala je relativna vrednost i na nju utiču različiti faktori, kao što su: dimenzije merne ćelije, čistoća ćelije, provodljivost, hemijske osobine uzorka, molekulska masa, veličina čestica, pH vrednost, viskozitet uzorka i temperatura pri kojoj se merenje izvodi. Kako bi se kvantifikovalo naelektrisanje čestica, nakon određivanja znaka naelektrisanja, disperziju nanočestica je potrebno titrisati standardnim vodenim rastvorom suprotno naelektrisanog polielektrolita, sa poznatom količinom naelektrisanja. Usled jakog međusobnog elektrostatičkog privlačenja, molekuli polielektrolita vezuju se na površinu čestica. Titracija se izvodi sve do postizanja nultog strujnog potencijala, koji ukazuje na to da je ukupno naelektrisanje prisutnih čestica kompenzovano dodatom količinom polielektrolita. Iz utroška rastvora polielektrolita može se izračunati količina naelektrisanja svih čestica u uzorku, a zatim se može odrediti površinska gustina naelektrisanja, preko jednačine (6):

$$\sigma_{tot} = \frac{F * c(PE) * V(PE)}{m(N\check{C})} \quad (6)$$

gde F predstavlja Faradejevu konstantu (C/mol), c(PE) koncentraciju titranta (mol/L), V(PE) zapreminu titranta potrebnu da se neutrališe ukupno naelektrisanje čestica disperzije, a m(NČ) masu nanočestica u korišćenoj disperziji (Špadina i sar. 2018).

Ukoliko se titracija izvodi u zavisnosti od pH vrednosti, takođe je i ovom tehnikom moguće odrediti izoelektričnu tačku nanočestica.



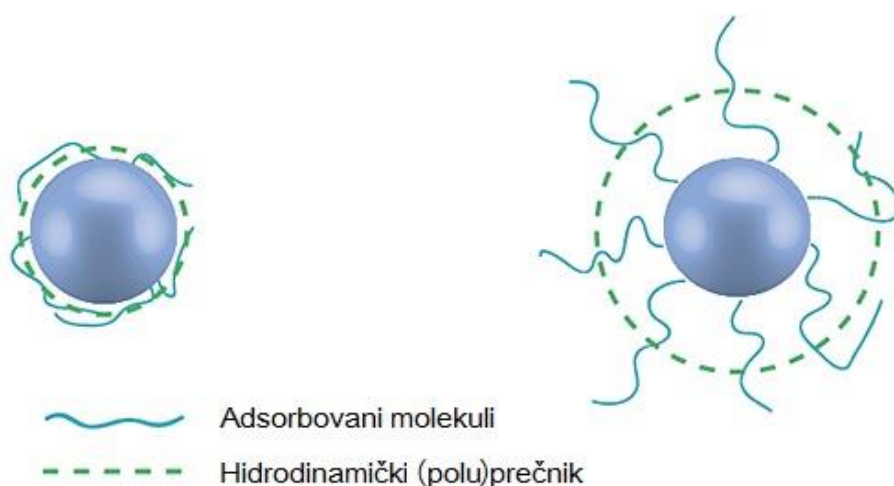
### 2.2.3.2. Veličina nanočestica

Veličina i raspodela veličina nanočestica takođe je jedna od važnih njihovih osobina. Određivanje ovih parametara naziva se disperziona analiza i ima za cilj da se veličina i raspodela veličina izraze sa što manjim brojem realnih parametara. Najjednostavniji slučaj je kada su sistemi mono disperzni tj. kada su čestice sfernog oblika i međusobno jednake te se njihova veličina izražava samo preko vrednosti (polu)prečnika. Ipak, većina realnih sistema je polidisperzna, a često sadrže i čestice nepravilnog oblika, te se ne mogu opisati samo jednom vrednošću. Za definisanje veličine čestica nepravilnog oblika koristi se ekvivalentni prečnik. U tom slučaju veličina čestice se definiše preko prečnika sfere koja je po određenoj dimenziji ekvivalentna datoj čestici, te tako postoji zapreminski, površinski, Stoksov (sedimentacioni), prečnik prosejavanja, maseni ekvivalentni prečnik i dr. Kod polidisperznih sistema, prosečni prečnik čestica se takođe može izraziti na više načina, kao intenzitetni (aritmetički), zapreminski, površinski, zapreminsko–površinski ili maseni. Raspodela veličina čestica se prikazuje grafički, gde se na x–osu nanosi interval prečnika, a na y–osu učestanost, odnosno udeo čestica datog prečnika u ukupnom broju (zapremini) svih čestica. Takođe, raspodela može biti brojčana, zapreminska ili izražena preko intenziteta.

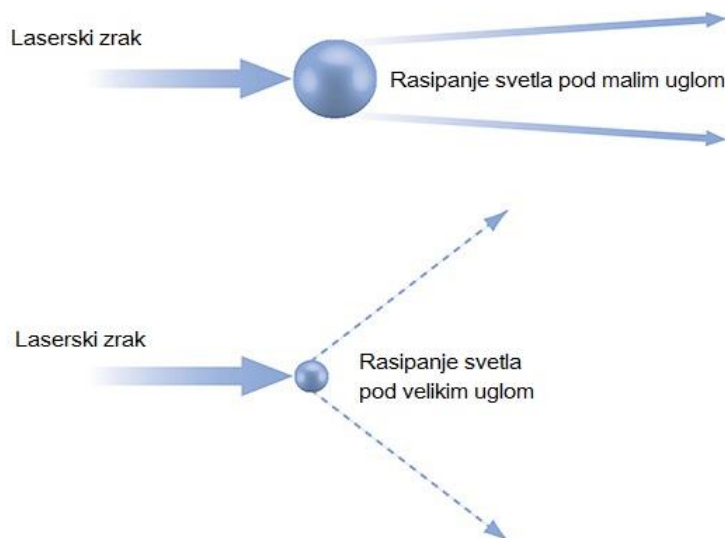
S obzirom na male dimenzije nanočestica, njihovu veličinu nije moguće okarakterisati pomoću klasičnih tehnika, kao što je svetlosna mikroskopija, već su za to potrebne nešto kompleksnije tehnike. U današnje vreme se za karakterizaciju nanočestica najčešće koriste tehnike zasnovane na rasipanju svetla od strane čestica, kao i elektronska mikroskopija.

Jedna od njih je i tehnika merenja prečnika čestica na osnovu dinamičkog rasipanja svetla (eng. *dynamic light scattering* – *DLS*). Naime, dispergovane nanočestice rasipaju usmereni zrak svetlosti, pri čemu je intenzitet rasute svetlosti proporcionalan šestom stepenu njihovog poluprečnika ( $r^6$ ). Kada su nanočestice manje od desetog dela talasne dužine upadnog zraka ( $\lambda/10$ ), rasuto svetlo nosi istu količinu energije kao upadni zrak (elastično rasipanje) i ne zavisi od ugla pod kojim se rasipa, odnosno rasipanje je jednako u svim pravcima (Rejlijevo rasipanje). U toku merenja veličine, nanočestice u disperziji rasipaju svetlost upadnog laserskog zraka, a veličina čestica je proporcionalna intenzitetu rasutog svetla. DLS tehnika se primenjuje za merenje veličine čestica kod kojih se očekuje da je prečnik nanometarskih veličina ( $\sim 10 - 1000$  nm). Dispergovane nanočestice se neprekidno nasumično kreću unutar disperznog sredstva, a to kretanje se naziva Braunovo kretanje i obuhvata translatorno kretanje, ali i konstantno i veoma brzo rotiranje čestica. Takođe, veoma

su značajne i interakcije između čestica, s obzirom da se sa povećanjem koncentracije povećava i broj sudara između čestica, a prosečni pređeni put čestice između dva uspešna sudara smanjuje. Osim toga, adsorpcijski sloj utiče na površinu dispergovanih čestica, pa je tako površina čestice hidrirana i prekrivena molekulima koji se zapravo ne nalaze u sastavu same čestice, ali oko nje formiraju tzv. koronu. Korona se najčešće sastoji od „čvrstih“ i „mekih“ komponenti. Čvrsta korona se odnosi na stabilan sloj molekula čvrsto vezanih za površinu čestice, dok meka korona predstavlja slabije vezani sloj na površini čvrste korone i sastoji se od molekula različitog naelektrisanja i veličine. U koloidnim sistemima, zapravo, čestice zajedno sa solvatnim slojem – koronom reflektuje saopštenu svetlost. Upravo zbog toga, poluprečnik čestica se može definisati na dva različita načina, kao hidrodinamički poluprečnik i kao poluprečnik rotacije. Hidrodinamički poluprečnik predstavlja poluprečnik hipotetičke čvrste sfere, koja se kreće istom brzinom kao čestice u ispitivanom sistemu. Iz tog razloga i hidrodinamički prečnik predstavlja hipotetičku vrednost (Slika 14). U realnim sistemima čestice su okružene solvatnim slojem i koronom, čiji sastav nije konstantan, već varira u zavisnosti od jonske jačine, vrste prisutnih molekula i prirode disperznog sredstva. Stoga, rezultati DLS merenja prikazuju samo indikativnu veličinu nanočestica. S druge strane, poluprečnik rotacije predstavlja prosečnu udaljenost između centra mase čestice i svakog atoma koji pripada čestici. Za njegovo određivanje potrebne su još osetljivije tehnike kao što je tehnika rasipanja X-zraka pod malim uglom (eng. *small angle X-ray scattering* – SAXS) ili statičko rasipanje svetla (eng. *static light scattering* – SLS) (Bhattacharjee 2016b).



Slika 14. Šematski prikaz hidrodinamičkog poluprečnika.



Slika 15. Šematski prikaz ugla rasipanja svetla kod velikih i malih čestica.

Druga tehnika za merenje veličine čestica zasnovana na rasipanju svetla jeste tehnika merenja prečnika čestica na osnovu difrakcije laserskog zraka (eng. *laser diffraction*). Ova tehnika se koristi za merenje veličina čestica kod čvrstih i tečnih uzoraka, kod kojih se očekuje da je prečnik čestica mikrometarskih veličina ( $\sim 0,1 - 1000 \mu\text{m}$ ). Kod merenja veličine na osnovu difrakcije laserskog zraka veličina čestica proporcionalna je uglu pod kojim rasuto svetlo pada na detektor, pa tako veće čestice rasipaju svetlost pod manjim uglom u odnosu na pravac upadnog zraka, dok za male čestice važi suprotno (Slika 15) (Levoguer 2013, Pan i sar. 2017).

Različiti faktori mogu uticati na merenje veličine čestica tehnikama zasnovanim na rasipanju svetla. Jedan od najvažnijih faktora je priprema uzorka. Kod većine merenja potrebno je razblažiti uzorak u odgovarajućem rastvaraču, ali vodeći računa o tome da pojedini rastvarači i sami mogu rasipati svetlost (npr. toluen). Uzorci bi trebali da budu homogeni i bez zamućenja ili precipitovanih čestica. Filtriranje uzoraka može biti pogodno u nekim slučajevima, radi uklanjanja agregata, ali takođe može da dovede do prividno sužene raspodele veličina čestica, te se i o tome mora voditi računa. Potrebno je takođe da uzorci kod kojih se meri veličina i raspodela veličina čestica, tehnikom dinamičkog rasipanja svetla, budu odgovarajuće koncentracije. Kod uzoraka sa velikim koncentracijama čestica može doći do višestrukog rasipanja svetla, pri čemu se zrak rasut od strane jedne čestice sudara sa drugim česticama, pre kontakta sa detektorom, čime slabi njegov intenzitet. Na ovaj način, dobijaju se rezultati koji prividno pokazuju manju veličinu čestica u odnosu na njihovu

stvarnu veličinu. S druge strane, ako su uzorci previše razblaženi može doći do toga da se ne generiše dovoljno rasute svetlosti koja bi se mogla detektovati. Upravo zbog navedenih razloga potrebno je pronaći idealnu koncentraciju za data merenja, koja će zavisiti od osobina čestica, ali i od karakteristika samog uređaja za merenje. Prilikom merenja važno je obratiti pažnju i na pojavu aglomeracije, koja takođe može dovesti do greške merenja, kao i obojene ili fluorescentne čestice (Bhattacharjee 2016b).

Elektronska mikroskopija je takođe veoma zastupljena tehnika uz pomoć koje je moguće analizirati veličinu, ali i morfologiju nanočestica. Postoje dve bazične tehnike elektronske mikroskopije: skenirajuća elektronska mikroskopija – SEM (eng. *scanning electron microscopy*) i transmisiona elektronska mikroskopija – TEM (eng. *transmission electron microscopy*).

SEM je tehnika koja za dobijanje uvećane slike različitih uzoraka koristi snop elektrona umesto svetlosnih zraka. Ima mogućnost uvećavanja i preko 400.000 puta. Svaki SEM mikroskop se sastoji od izvora elektrona, komore u kojoj dolazi do interakcije elektrona sa uzorkom, detektora i sistema koji rezultujući signal pretvara u sliku. Izvor elektrona emituje elektronski snop, koji se uz pomoć magnetnih sočiva usmerava ka uzorku. Kada snop elektrona dođe u dodir sa uzorkom dolazi do ekscitacije atoma u uzorku, što izaziva emitovanje elektrona različitih energija, te na taj način nastaje signal koji se registruje na detektoru i pruža informacije o morfologiji, sastavu, kristalografskoj strukturi ili drugim karakteristikama uzorka. Na ovaj način, SEM tehnikom se skenira površina uzorka, rezultujući signal se pojačava i kompjuterski konvertuje u sliku (mikrofotografiju), koja se dalje može vizuelno ili softverski analizirati. Pored velikih prednosti koje pokazuje u poređenju sa svetlosnom mikroskopijom, ova tehnika ipak ima određena ograničenja, koja uglavnom potiču od toga što se komora sa uzorkom mora održavati pod konstantnim vakuumom u toku rada. Iz tog razloga, svi uzorci koji se analiziraju SEM tehnikom moraju biti otporni na uslove visokog vakuuma. Osim toga, uzorci moraju imati sposobnost električne provodljivosti (Kwiecińska i sar. 2019).

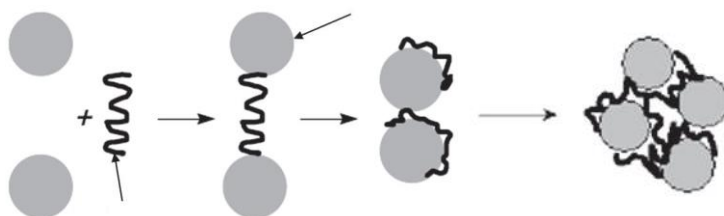
Transmisiona elektronska mikroskopija se zasniva na istom principu kao i svetlosna transmisiona mikroskopija, ali se umesto svetlosnog zraka ka uzorku usmerava paralelni snop elektrona. Najnoviji TEM mikroskopi imaju rezoluciju ispod 0,2 nm i mogućnost posmatranja uzoraka do 500 nm debljine. Kao i SEM mikroskop, sastoji se od izvora elektrona, sistema sočiva, detektora i konvertora signala. Izvor elektrona emituje elektronski snop koji se uz pomoć sočiva fokusira na uzorak u vidu malog, tankog paralelnog snopa.

Kada tako usmeren snop elektrona dođe u kontakt sa uzorkom deo elektrona se prenosi kroz uzorak do detektora i na osnovu njega se formira slika (mikrofotografija) uzorka. TEM predstavlja veoma moćan alat za kvalitativnu i kvantitativnu analizu različitih mikrometarskih i nanometarskih struktura (Kwiecińska i sar. 2019).

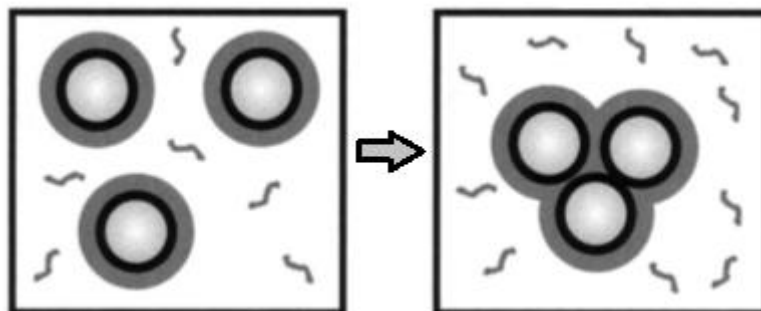
#### 2.2.4. Interakcije nanočestica i polimera

Prilikom dodatka rastvora polimera u disperziju nanočestica dolazi do interakcije molekula polimera i nanočestica. U zavisnosti od prirode polimera i nanočestica, polimer može da se adsorbuje ili da se ne adsorbuje na površinu nanočestica. Do adsorpcije može doći usled elektrostatičkih interakcija ili hidrofobnih interakcija, pri čemu se oko čestice stvara liofilni omotač, koji povećava njenu stabilnost putem sterne stabilizacije.

S druge strane dodatak polimera u disperziju nanočestica može dovesti do koloidne nestabilnosti disperzije. Flokulacija je jedan od mehanizama koji može dovesti do smanjene stabilnosti nanočestica. Ona predstavlja fizičko–hemijski proces, koji se odvija između dispergovanih čestica i flokulanata, odnosno polimernih jedinjenja dodatih u disperziju. Bridžing flokulacija (eng. *bridging flocculation*) je najčešći vid flokulacije. Do nje dolazi kada su u disperziji prisutni molekuli polimera sa dugim lancima, koji se mogu istovremeno adsorbovati na površinu više čestica, povezujući ih formiranjem „mostova“ (eng. *bridge – most*). Daljim vezivanjem molekula polimera na nastale strukture i privlačenjem novih čestica iz disperzije nastaju agregati – flokule (Slika 16). Međusobne interakcije između ovih komponenata dovode do stvaranja veza koje izazivaju aglomeraciju čestica i njihovo taloženje. (Czemierska i Jarosz-wilkolazka 2016).



Slika 16. Bridžing flokulacija.



Slika 17. Depleciona flokulacija (Hibberd i sar. 1999).

Drugi vid flokulacije, koji se može javiti prilikom dodatka polimera u disperziju nanočestica, jeste depleciona flokulacija (eng. *depletion flocculation*), do koje dolazi kada se polimer ne adsorbuje na površinu čestice. U ovom slučaju, oko čestice se formira sloj disperznog sredstva u kome nisu prisutni molekuli polimera, koji se naziva deplecioni omotač. Van ovog omotača, čestice su okružene molekulima polimera. Usled razlike u koncentraciji polimera, na česticu deluju osmotske sile koje su izotropne – iste u svim pravcima, te se međusobno poništavaju. Kada se susedne čestice približe na razdaljinu manju od efektivnog prečnika molekula polimera, dolazi do istiskivanja molekula polimera iz prostora između čestica i preklapanja deplecionih omotača čestica. Preklapanjem deplecionih omotača dve čestice se privlače usled anizotropnog karaktera nastalih osmotskih sila i dolazi do flokulacije (Slika 17) (Dickinson 1989).

#### 2.2.4.1. Izotermalna titraciona kalorimetrija

Izotermalna titraciona (mikro)kalorimetrija (eng. *isothermal titration calorimetry – ITC*) je biofizička tehnika koja služi za određivanje termodinamičkih parametara neke reakcije u tečnoj sredini. Najčešće se koristi za proučavanje reakcija vezivanja malih molekula za makromolekule ili molekula za nanočestice. ITC predstavlja kvantitativnu tehniku, uz pomoć koje se može odrediti afinitet vezivanja ( $K_a$ ), promena entalpije ( $\Delta H$ ) ili stahiometrija vezivanja ( $n$ ) u interakciji dva ili više molekula u tečnoj sredini. Uz diferencijalnu skenirajuću kalorimetriju (eng. *differential scanning calorimetry – DSC*) predstavlja jedinu tehniku pomoću koje je moguće direktno meriti promenu entalpije reakcije (Wang i sar. 2012, Huang i Lau 2016). Osnovni delovi uređaja za mikrokolorimetrijska

merenja jesu dve identične ćelije smeštene unutar adijabatske obloge. U jednoj od ćelija se nalazi ispitivani sistem i u njoj se odvija reakcija, dok druga služi kao referentna i u njoj se nalazi samo rastvarač, odnosno disperzna faza ispitivanog sistema. Kao što i sam naziv govori, titracija, odnosno reakcija se odvija pri konstantnoj temperaturi. Rastvor jednog reaktanta predstavlja titraciono sredstvo (titrant) koji se dodaje u reakcionu ćeliju u kojoj se nalazi rastvor ili suspenzija drugog reaktanta (titrand). Nakon dodatka svakog alikvota titranta, mala količina toplote, koja se oslobađa ili apsorbuje unutar reakcione ćelije, meri se u odnosu na referentnu ćeliju. Ova promena toplote izražava se kao električna snaga potrebna da bi se održala konstanta mala razlika u temperaturi između reakcione i referentne ćelije. Titrant se dodaje automatski, pomoću preciznog šprica, koji kontroliše sam uređaj – kalorimetar. Sadržaj reakcione ćelije se neprekidno intenzivno meša, kako bi se obezbedila praktično momentalna interakcija titranta i titranda, nakon svakog dodatog alikvota. Uobičajena zapremina reakcione ćelije je 0,2 – 1,4 ml, dok zapremina titranta koja se dodaje zavisi od količine oslobođene toplote u toku reakcije. Ukoliko je afinitet vezivanja reaktanata ( $K_a$ ) velik, na početku reakcije pri malom molarnom odnosu titrant/titrant, može se pretpostaviti da su se svi molekuli dodatog titranda vezali za aktivna mesta molekula/čestica titranda. U nastavku titracije, kako raste zasićenost površine titranda nakon svakog dodatog alikvota, toplota reakcije opada. Nakon potpunog zasićenja površine titranda, oslobođena ili apsorbovana toplota postaje približno nula. Ipak, i nakon zasićenja može se izmeriti mala promena toplote reakcije, koja potiče od razblaženja titranta prilikom dodatka u reakcionu ćeliju. Ovaj najjednostavniji model interakcije važi samo u slučaju kada se dodati molekuli vezuju za  $n$  identičnih i nezavisnih aktivnih mesta na receptoru. Ukoliko to nije slučaj, već postoje aktivna mesta sa različitim afinitetom vezivanja, zasićenje aktivnih mesta receptora zavisiće upravo od afiniteta vezivanja. Promena entalpije izmerena uz pomoć ITC tehnike karakteristična je za celokupan ispitivani sistem. Predstavlja ukupnu oslobođenu ili apsorbovanu toplotu, pri svakom dodatku titranta. Osim toplote same reakcije, na promenu entalpije sistema mogu uticati i drugi nespecifični procesi do kojih dolazi u toku titracije. Ti procesi obuhvataju toplotu razblaženja titranta, toplotu koja nastaje usled razlike u temperaturi sadržaja reakcione ćelije i vrha injektorskog šprica ili toplote usled mešanja rastvarača sa veoma malom razlikom u sastavu. Zbog svega navedenog, izmerena promena entalpije može se smatrati prividnom (relativnom) promenom entalpije ispitivanog sistema (Jelesarov i Bosshard 1999, Doyle 1997).

### 2.2.5. Nanokapsulacija

Kapacitet inkapsulacije u nanočesticama, ali i drugim nosačima, se generalno definiše kao udeo aktivne materije koja može da se veže na određenu masu nosača. Najčešće se izražava u mol/mg nosača ili mg/mg nosača, a može se predstaviti i procentualno. Veliki kapacitet inkapsulacije jedan je od kriterijuma koji karakteriše koliko je neki sistem pogodan za inkapsulaciju. Prednost takvog sistema je što omogućava smanjenu količinu nosača potrebnu za dostavljanje aktivne materije. Vezivanje aktivne materije na nosač može da se postigne na dva različita načina: u toku precipitacije, odnosno pripreme nanočestica ili nakon pripreme, kada se pripremljene nanočestice uranjaju u koncentrovan rastvor aktivne materije, pri čemu dolazi do adsorpcije/apsorpcije aktivne materije na nosač. Glavni faktori koji utiču na kapacitet i efikasnost inkapsulacije su hemijski sastav polimernog nosača, molekulaska masa, interakcije u sistemu polimer–aktivna materija i prisustvo funkcionalnih grupa. Kako bi se kvantifikovala količina aktivne materije koja se vezuje za nosač, potrebno je znati tačnu količinu aktivne materije koja je upotrebljena za inkapsuliranje ( $W$ ), dok se količina slobodne aktivne materije (neinkapsulirane) određuje u supernatantu nakon ispiranja i centrifugiranja nanokapsula ( $w$ ). Količina aktivne materije u supernatantu može se odrediti pomoću UV spektrofotometrije, fluorescentne spektrofotometrije ili pomoću tečne hromatografije visokih performansi (eng. *high performance liquid chromatography* – HPLC), uz prethodno kalibrisanje standardnim rastvorima aktivne materije (Tarhini i sar. 2017). Količina inkapsulirane aktivne materije računa se kao razlika ukupne i slobodne, te se efikasnost inkapsulacije određuje prema jednačini (7):

$$EE (\%) = (W-w)*100/W \quad (7)$$

Otpuštanje aktivne materije iz nanočestica takođe je veoma bitna osobina za primenu svih sistema za inkapsulaciju. Na njega utiču rastvorljivost aktivne materije, difuzija kroz matriks nosača, kao i razgradnja nosača, odnosno samih nanočestica. U slučaju nanočestica, aktivna materija je ravnomerno raspoređena u polimernom matriksu, te otpuštanje prvenstveno zavisi od difuzije i razgradnje nanočestica, odnosno od onog procesa koji se od ta dva brže odvija. Dinamika otpuštanja može biti ispitana *in vitro* uz pomoć različitih metoda: uz pomoć veštačkih membrana, kesica za dijalizu, centrifugiranjem ili



ultrafiltracijom. Metoda koja se najviše primenjuje za razdvajanje nanočestica od prihvatnog medijuma za određenu aktivnu materiju jeste centrifugiranje, s obzirom na jednostavnost i malu cenu postupka, ali u pogledu efikasnosti dijaliza ima veliku prednost (Tarhini i sar. 2017).

Zein je jedan od biljnih proteina koji, usled amfifilne strukture, može spontano da obrazuje nanočestice. U poređenju sa drugim biljnim proteinima, zeinske čestice su najviše istraživane zbog potencijala za inkapsulaciju hidrofobnih aktivnih materija. Do sada, mikro i nanočestice zeina su korišćene za inkapsulaciju, stabilizaciju i kontrolisano otpuštanje različitih aktivnih supstanci, kao što su polifenoli, esencijalna ulja, jestivi antibiotici, bioaktivni lipidi, funkcionalni mikronutrijenti i neke prehrambene boje. Pokazano je i da je moguće pripremiti šuplje zeinske nanočestice za inkapsulaciju metformina, koje su pokazale veći kapacitet inkapsulacije, manje dimenzije i bolju kontrolu otpuštanja, u odnosu na nanočestice tipa matriks (Reddy i Yang 2011, Wan i sar. 2015, Mohammadian i sar. 2020). Proteini soje takođe mogu formirati čestice, mikrometarskih veličina. Ove čestice se mogu dobiti tehnikom raspršivanja u struji vrelog vazduha, koacervacijom ili hladnim geliranjem, a mogu se primeniti za inkapsulaciju i hidrofilnih i hidrofobnih aktivnih supstanci, poput: riboflavina, vitamina B, polifenola iz brusnice, kurkumina, rezervatrola (Wan i sar. 2015). Takođe, gliadin iz pšeničnog glutena ima sposobnost formiranja nanočestica, te inkapsulacije različitih jedinjenja poput karbazola i amoksicilina, ali i drugih hidrofobnih ili amfifilnih jedinjenja. Nanočestice mogu biti pripremljene i od proteina mahunarki, postupkom koacervacije, i ječmenih proteina, umrežavanjem (Reddy i Yang 2011, Wan i sar. 2015, Tarhini i sar. 2017).

### **2.3. Biopolimerni filmovi**

Biopolimerni filmovi se mogu koristiti za inkapsulaciju aktivnih materija, ipak daleko se više ispituje njihova primena kao alternativnih ambalažnih materijala, nasuprot sintetskih polimera. Neke od glavnih prednosti filmova na bazi biljnih biopolimera, u odnosu na filmove od sintetskih polimera, je to što su jestivi, biorazgradivi i ekološki isplativi. Mogu se koristiti ili kao premazi, pri čemu se nanose na različite namirnice ili kao sama ambalaža, gde služe kao kese ili folije za pakovanje namirnica. Jestivi premazi služe da proizvod zaštite od mikrobioloških kontaminanata, produže rok trajanja, uspore kvarenje, minimalizuju lipidnu

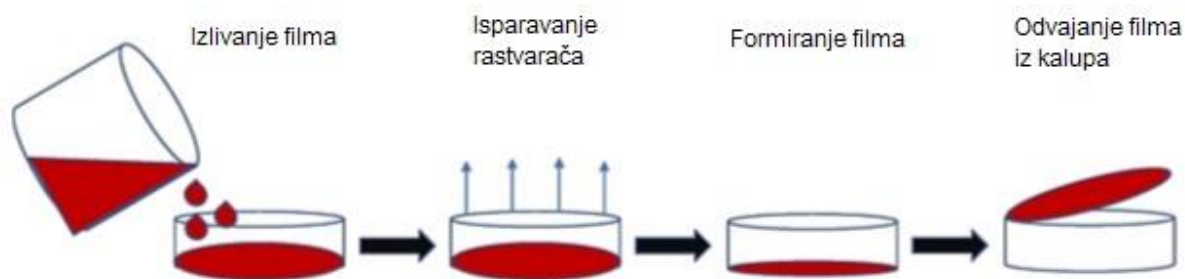
oksidaciju i gubitak vlage usled stajanja. Takodje, jestivi premazi se mogu nanositi na lekove u formi tableta, kako bi se zaštitili od negativnog uticaja spoljašnjih uslova ili kako bi se obezbedilo odloženo oslobađanje aktivne materije leka. Najbitnije osobine jestivih filmova i premaza jesu njihova mehanička i barijerna svojstva, koja pre svega zavise od prirode biopolimera, njihove koncentracije, vremena sušenja, viskoziteta, itd. Najčešće je potrebno dodati i plastifikatore u formulaciju jestivog premaza ili filma. Tako su, na primer, proteinski filmovi bez plastifikatora uglavnom kruti i neelastični, zbog jakih interakcija između polimernih lanaca proteina. Većina plastifikatora je izuzetno higroskopna, pa se dodaje do 30% na masu suve materije. Najčešće se kao plastifikatori koriste: glicerol, propilen-glikol, sorbitol, saharoza, polietilen-glikol i kukuruzni sirup (Suhag i sar. 2020). Kako se jestivi filmovi primenjuju za direktno pakovanje ili oblaganje hrane i lekova veoma je važno da budu bez ukusa, mirisa i boje, kao i da ne interferiraju sa senzornim osobinama određenog prehrambenog proizvoda. Filmovi se mogu koristiti i kao ambalaža za tečne ili praškaste proizvode, te da se prilikom dodatka u topla ili hladna pića istope i oslobode sadržaj, čime bi se smanjila upotreba jednokratne ambalaže.

Jestivi filmovi mogu se formirati izlivanjem ili ekstruzijom, dok se premazi mogu naneti uranjanjem proizvoda, raspršivanjem, metodom uz pomoć fluidizacije ili rotirajućeg bubnja.

### 2.3.1. Metode pripreme biopolimernih filmova

Kod izlivanja filmova presudna je rastvorljivost biopolimera i aditiva, dok je kod procesa ekstruzije bitno poznavati termoplastične osobine polimera, kao i temperature faznog prelaza, staklastog prelaza i gelirajuće osobine.

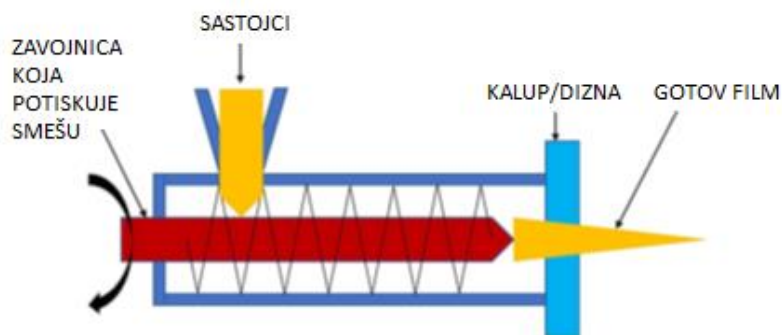
**Metoda izlivanja** (eng. *casting*) je najzastupljenija metoda pripreme filmova u laboratorijskim i pilot uslovima. Sastoji se iz tri koraka: 1) rastvaranje proteina (polimera) u odgovarajućem rastvaraču; 2) izlivanje rastvora u kalup i 3) sušenje rastvora u kalupu (Slika 18). U toku sušenja dolazi do isparavanja rastvarača i adhezije filma za dno kalupa. Sušenje se može odvijati u klasičnoj, mikrotalasnoj ili vakuum sušnici. Postepeno sušenje veoma je bitno zbog jačanja intramolekulskih veza između polimernih lanaca, čime se postiže optimalna mikrostruktura proteinskih filmova. Metode koje koriste brzo sušenje pokazale su negativan uticaj na fizičke osobine i strukturu filmova. Potrebno je da pripremljeni filmovi



Slika 18. Priprema filmova metodom izlivanja.

budu konzistentni i bez nedostataka, u smislu neujednačenosti, nečistoća i mehaničkih oštećenja. Debljina filma, transparentnost, zamućenost, stepen bubrenja, termička stabilnost, mehanička otpornost, propustljivost kiseonika i vodene pare, kao i biološke karakteristike, najvažniji su parametri za karakterizaciju dobijenih filmova. Takođe je veoma bitno da se filmovi lako odvajaju od kalupa u kojem su pripremani. U rastvore proteina pre izlivanja dodaju se plastifikatori, u cilju poboljšanja barijernih, mehaničkih i termičkih osobina filma. Glavna prednost metode izlivanja jeste niska cena i mogućnost pripreme filmova bez dodatne specijalizovane opreme. Osim toga, ovom metodom dobijaju se homogeniji i transparentniji filmovi, u odnosu na one dobijene metodom ekstruzije. S druge strane, nedostaci ove metode su to što se mogu formirati filmovi isključivo jednostavnih oblika, moguće zaostajanje toksičnih rastvarača nakon sušenja, denaturacija proteina u toku sušenja, ograničena količina filmova koji se mogu pripremiti, to što osobine filma zavise od primenjene temperature i dugotrajnost procesa sušenja (Suhag i sar. 2020).

**Metoda ekstruzije** je druga opcija za pripremu polimernih filmova i metoda koja je najzastupljenija u komercijalnoj proizvodnji. Može se primeniti za pripremu filmova od termoplastičnih biopolimera, kao što su različiti skrobovi ili proteini. Ceo proces se može podeliti u tri zone: 1) zona punjenja; 2) zona sabijanja (gnječenja) i 3) zona zagrevanja (Slika 19). Prvo je potrebno pomešati sve sastojke za pripremu filma i uneti ih u zonu punjenja. Ovaj proces zahteva minimalne količine vode ili drugih rastvarača, te se zbog toga naziva suvi proces. Ipak, i u ovoj metodi je potrebno dodati plastifikatore, radi poboljšanja fleksibilnosti dobijenih filmova. U zoni sabijanja, povećava se istežanje, temperatura i gustina smeše sastojaka. Potom, u zoni zagrevanja dolazi do topljenja svih sastojaka smeše, pri čemu se dobija homogena viskozna masa. Film se formira pod dejstvom mehaničke i toplotne energije, istiskivanjem kroz diznu ekstrudera. Pokazano je da brzina rotiranja valjaka za ekstrudiranje utiče na osobine dobijenih filmova, kao i sadržaj vlage u početnoj smeši,



Slika 19. Priprema filмова metodom ekstruzije.

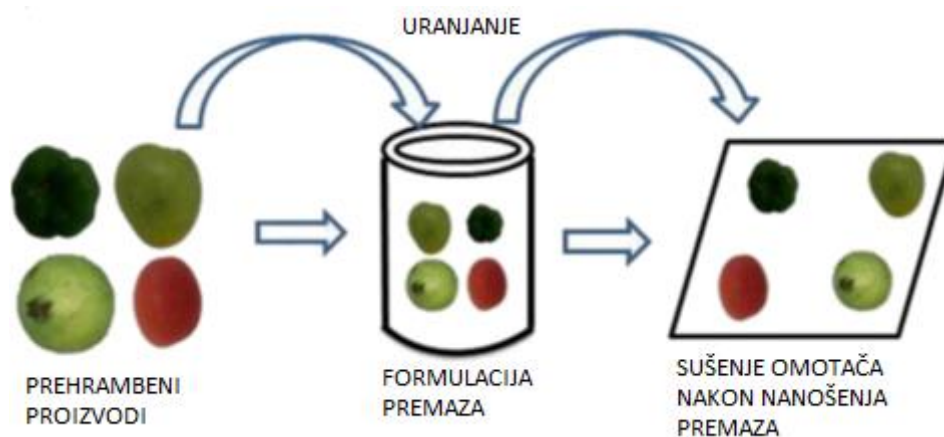
temperatura ekstrudiranja, veličina valjaka, pritisak, kao i vrsta i sadržaj plastifikatora. Tehnikom koekstruzije moguće je proizvesti i višeslojne filmove, pri čemu svaki od slojeva doprinosi nekoj od osobina gotovog filma. Osnovne prednosti metode ekstruzije, u odnosu na metodu izlivanja, jesu manja potrošnja energije i kraće vreme trajanja procesa, kao i bolja mehanička i optička svojstva dobijenih filмова. Takođe, u ovom procesu se ne koriste štetni rastvarači, a može se primeniti širok opseg procesnih parametara, temperature i pritiska, što omogućava bolju kontrolu mehaničkih osobina dobijenog filma, koja nije moguća kod metode izlivanja. Nedostatak metode ekstruzije je to što se mogu koristiti samo polimeri otporni na povišene temperature i mešavine sa niskim sadržajem vlage. Visoka cena opreme i njenog održavanja čini ovu metodu ekonomski neisplativom za male količine filмова (Suhag i sar. 2020).

### 2.3.2. Metode nanošenja biopolimernih premaza

Efikasnost premaza nanosenih na prehrambene proizvode kao što su voće, povrće, meso i drugo, može zavistiti od primenjene tehnike nanošenja. S druge strane, izbor tehnike zavisti pre svega od prirode proizvoda, osobina njegove površine i osnovne svrhe za koji je namenjen premaz, a takođe se moraju uzeti u obzir i osobine premaza, kao što su površinski napon, gustina i viskozitet. Nanošenje premaza na proizvod zasniva se na procesu adhezije, koji uključuje difuziju između rastvora premaza i površine proizvoda. Za efikasnu adheziju veoma je bitan postupak kvašenja proizvoda, čime se značajno smanjuje vreme potrebno da se premaz adsorbuje na njegovu površinu. Izbor proteina koji će biti upotrebljen za

formulaciju premaza zavisi od veličine i oblika proizvoda i željene debljine premaza. Premazi se mogu, različitim tehnikama, nanositi u obliku tečnog rastvora, suspenzije, emulzije ili praha. Postojan sloj premaza na prehrambenim proizvodima postiže se zagrevanjem, sušenjem, hladjenjem i koagulacijom. Pokazano je da je veoma teško naneti premaze na već isečene namirnice, jer se najčešće hidrofobni premaz veoma teško zadržava na hidrofilnoj površini isečenog dela.

**Metoda uranjanja** (eng. *dip coating*) proizvoda u formulaciju premaza u tečnom stanju najzastupljenija je metoda za nanošenje premaza na neki proizvod. Ova metoda nanošenja jestivog premaza na prehrambene proizvode sastoji se iz tri koraka: 1) potapanje i natapanje; 2) depozicija i 3) isparavanje tečne kontinualne faze (rastvarača). U prvom koraku, supstrat (proizvod) se uranja u rastvor/suspenziju/emulziju proteina, konstantnom brzinom, pri čemu se omogućava da se na površini supstrata zadrži dovoljna količina premaza i potpuna interakcija supstrata i premaza. U toku procesa nanošenja, obrazuje se tanak sloj premaza na površini proizvoda i uklanja višak tečnosti. Zagrevanjem i sušenjem se, u toku faze isparavanja, uklanja višak rastvarača, odnosno tečne faze (Slika 20). Sušenje se može odvijati na sobnoj ili na povišenoj temperaturi. Ova metoda se često koristi za nanošenje premaza na sveže namirnice, tako što se sveže voće ili povrće uroni na 5 – 30 s u formulaciju jestivog premaza. Zbog jednostavnosti i niske cene ova metoda je najzastupljenija u laboratorijskim uslovima. Uranjanje obezbeđuje dobru pokrivenost površine proizvoda, kao i ujednačenost nastalog filma na hrapavim površinama i kompleksnim oblicima proizvoda. Negativne strane ove metode jesu moguće poteškoće pri rastvaranju proteina u formulaciji, kao i moguće nagmilavanje nečistoća ili viška premaza na površini proizvoda. Takođe, može

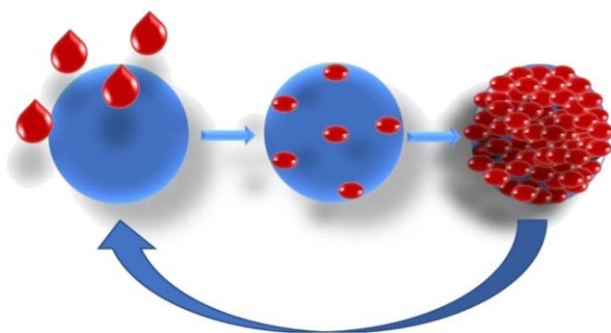


Slika 20. Nanošenje premaza metodom uranjanja.

doći do rastvaranja i degradacije spoljašnjeg sloja površina supstrata, što posledično pokazuje negativan uticaj na rok trajanja proizvoda.

**Metoda nanošenja premaza raspršivanjem** (eng. *spray coating*) veoma je zastupljena metoda za nanošenje premaza na različite proizvode. Raspršivanje povećava slobodnu površinu tečnosti formirajući kapljice koje se na površinu proizvoda nanose uz pomoće dizni (Slika 21). U ovoj metodi, osnovni procesni parametar je pritisak prilikom atomizacije, a faktori koji takođe utiču su viskozitet i površinski napon formulacije premaza, temperatura površine proizvoda, kao i oblik i dizajn dizne. Metoda raspršivanja se može koristiti za nanošenje premaza na različiti proizvode, kao što su meso i voće. Uz pomoće ove metode moguće je lako kontrolisati debljinu sloja, kontrolišući brzinu raspršivanja, a nakon sušenja dobijaju se uniformni slojevi. Osim toga, moguće je uspostaviti kontrolu temperature formulacije premaza i kontinualnu proizvodnju, sa smanjenim rizikom od kontaminacije. Ipak, nije moguće raspršivanje veoma viskoznih formulacija (Suhag i sar. 2020).

Nanošenje premaza metodom uz pomoć **fluidizacije** (eng. *fluidbed coating*) veoma se često primenjuje u proizvodnji i istraživanjima. Služi za nanošenje tankih slojeva premaza na čvrste čestice koje imaju veoma malu specifičnu masu i/ili dimenzije. U ovoj metodi formulacija se raspršuje preko fluidizovanog praha čestica. Za ovaj proces potrebno je da čestice ne budu manje od 100  $\mu\text{m}$ , kako bi se sprečilo stvaranje agregata. Može se izvoditi šaržno ili kontinualno. Negativne karakteristike ove metode su veoma visoka cena, potreba za većom količinom formulacije premaza zbog velikih gubitaka i često prisustvo nehomogenosti u nanesenom sloju (Suhag i sar. 2020).



Slika 21. Nanošenje premaza metodom raspršivanja.

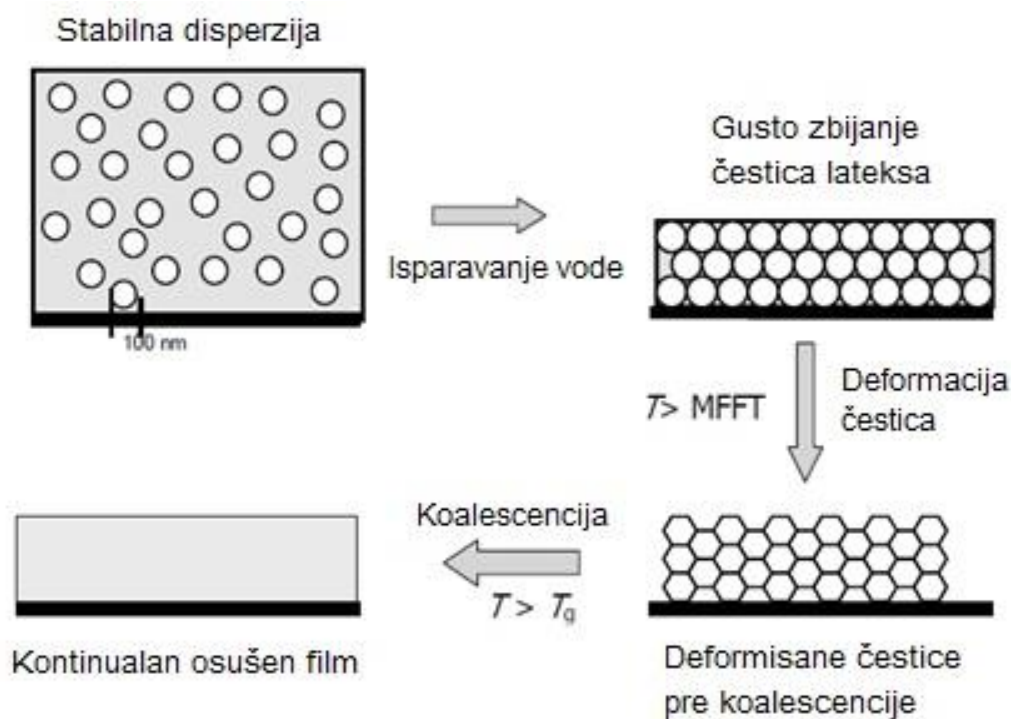
Metoda nanošenja premaza **uz pomoć rotirajućeg bubnja** (eng. *pan coating*) je najstarija od svih metoda. Podrazumeva unošenje proizvoda na koje se nanosi premaz u veliku posudu – bubanj, koji može da se rotira. Formulacija premaza se zatim posipa preko proizvoda, uz rotiranje bubnja i dolazi do uniformnog raspoređivanja premaza preko proizvoda. Naneseni sloj(evi) suše se na vazduhu, na sobnoj ili povišenoj temperaturi. Novija varijanta ove metode, elektrostatičko suvo premazivanje prahom (eng. *dry coating*), koristi se u farmaceutskoj industriji za oblaganje kapsula i tableta. Izvodi se diskontinualno i koristi za nanošenje debljih ili tanjih slojeva premaza uglavnom na sferne čestice, u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, na proizvode poput tableta ili koštunjavog voća. Uz pomoć ove metode, na supstratima se formiraju veoma transparentni filmovi, odlične fleksibilnosti i sjaja. Takođe, ovom metodom moguće je naneti premaze i na supstrate nepravilnog oblika, a u okviru jedne šarže moguće je naneti premaz na veliki broj komada proizvoda istovremeno. Nedostatak ove metode je što potrebno periodično sušenje, što proces čini dugotrajnim (Suhag i ostali 2020).

### 2.3.3. Formiranje biopolimernih filmova iz lateksa

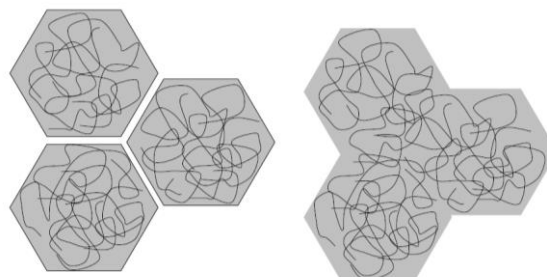
Lateksi predstavljaju podvrstu koloidnih disperzija. To su sistemi koji se sastoje od polimernih koloidnih čestica dispergovanih u vodi, pri čemu je uobičajeno da su čestice prečnika nekoliko stotina nanometara. Lateksi najčešće sadrže oko 50% čvrste faze, a sistem je koloidno stabilan duži vremenski period (nekoliko godina). Pod lateksima se najčešće podrazumevaju disperzije nanočestica sintetičkog porekla, koji se koriste kao boje ili premazi, pri čemu se nanočestice formiraju postupkom polimerizacije. S druge strane, različiti biopolimeri mogu formirati pseudolatekse, odnosno vodene suspenzije analogne lateksima. Literaturni podaci navode da se pseudolateksi od lateksa razlikuju jedino po načinu pripreme, dok su njihove karakteristike iste (McGinity i Felton 2008).

Bilo da se radi o lateksima ili pseudolateksima, njihova primena zasniva se na njihovoj sposobnosti formiranja filmova. Proces transformacije stabilne disperzije koloidnih polimernih čestica u kontinualan film obuhvata nekoliko koraka, koji obuhvataju promene od razblažene disperzije, preko koncentrovane disperzije, do sloja gusto zbijenih čestica i, konačno, formiranja kontinualnog polimernog filma (Slika 22). Prvi korak jeste deponovanje stabilne disperzije na površinu na kojoj će se formirati film. Zatim sledi otparavanje vode iz

disperzije, koje se može izvoditi na sobnoj ili na povišenoj temperaturi, i u toku koga dolazi do koncentrovanja disperzije i međusobnog zbijanja nanočestica. U najvećem broju slučajeva, sušenje lateksa nije ravnomerno, te se filmovi u nekim delovima suše brže, a u nekim sporije. Najčešće se ivice suše brže od ostatka filma, što je moguće utvrditi i vizuelno, s obzirom da zbog dispergovanih čestica u vodi, vlažni delovi više rasipaju svetlost, te su mutniji od suvih. Daljim isparavanjem vode, sve veće zbijanje čestica dovodi do njihovog deformisanja i popunjavanja prostora između njih. U ovoj fazi, iako deformisane, čestice su i dalje u vidu pojedinačnih struktura. Nakon popunjavanja prostora između čestica, film



Slika 22. Proces formiranja filma iz lateksa.



Slika 23. Koalescencija čestica lateksa.



postaje optički transparentan, s obzirom da više ne dolazi do rasipanja svjetla uslovljenog različitim indeksima prelamanja čestica i vode. Pojava transparentije filmova se u nekim slučajevima može primeniti za određivanje uslova formiranja filma. Naime, ukoliko su čestice previše tvrde, neće doći do njihovog deformisanja, te će nastali film biti zamućen i ispucao, veoma krt i zrnaste strukture. Međutim, na temperaturama višim od njihove temperature staklišta, polimeri omekšavaju, što omogućava nesmetanu deformaciju čestica i dovodi do formiranja transparentnih i manje krutih filmova. Najniža temperatura, pri kojoj se od čestica nekog polimera dobija optički transparentan film, naziva se minimalna temperatura formiranja filma (eng. *minimal film forming temperature – MFFT*). U slučajevima kada se (pseudo)lateks sastoji od čestica različitih polimera, pa samim tim i različite mekoće, i dalje je moguće formiranje kontinualnog filma. Pri tome, film će biti formiran od mekših čestica, dok će tvrde čestice biti raspoređene u njemu. Nakon deformisanja, daljim zagrevanjem dolazi do difuzije polimera između pojedinačnih čestica, koalescencije čestica (Slika 23) i formiranja kontinualnog, homogenog filma. Proces difuzije neophodan je kako bi se postigle odgovarajuće mehaničke osobine filma (Winnik 1997, Steward i sar. 2000, Jensen i Morgan 1991, Van Tent i Te Nijenhuis 2000, Carter i sar. 2014, Keddie i Routh 2010).

Veoma skroman broj istraživanja bavi se ispitivanjem mogućnosti pripreme i osobina filmova formiranih iz disperzija zeinskih čestica. O'Donnell i sar. (1997) navode metodu za nanošenje zeinskog pseudolateksa na tablete koje kao aktivnu supstancu sadrže acetaminofen. Kao rezultat navode smanjeno se prodiranje vlage do aktivne materije. S druge strane, Guo i sar. (2008) pokazali su da je moguće formirati kontinualne filmove zeina, uz upotrebu glicerola i polietilen-glikola kao plastifikatora. Pokazano je da se sušenjem disperzije nanočestica zeina na 60°C dobijaju glatki kontinualni filmovi, pogodni za upotrebu u svrhu zaštitnih premaza za različite farmaceutske forme. Slične rezultate prikazuju i drugi autori (Li i ostali 2010), pri čemu je navedeno da filmovi sa polietilen-glikolom kao plastifikatorom pokazuju bolje barijerne osobine od onih sa glicerolom. Sva navedena istraživanja bave se primenom disperzija nanočestica zeina u farmaceutskoj industriji, dok se u dostupnoj literaturi ne spominju istraživanja usmerena ka primeni zeinskih filmova iz lateksa u prehrambenoj industriji.

#### 2.3.4. Osobine biopolimernih filmova

Najvažnije osobine biopolimernih filmova, jesu njihova mehanička, barijerna i mikrostrukturna svojstva.

Mehanička svojstva biopolimernih filmova – uključujući debljinu, zateznu jačinu, izduženje pri kidanju, fleksibilnost, Jangov modul elastičnosti, stabilnost na temperaturne promene i otpornost na fizički stres izazvan faktorima sredine – veoma su bitna, s obzirom na to da je bitno da film zadrži svoj integritet i zaštiti proizvod. Mehanička svojstva zavise od sastava filma, načina pripreme i uslova sredine u kojoj se film nalazi. Ponašanje pri naprezanju ili deformaciji u velikoj meri zavisi od temperature i relativne vlažnosti. Sa porastom temperature, Jangov modul elastičnosti, prirast zatezne jačine i maksimalna zatezna jačina uglavnom opadaju. Nasuprot tome, pri istim uslovima, izduženje pri maksimalnoj zateznoj jačini ima trend porasta. U Tabeli 6 dat je pregled mehaničkih osobina nekih biopolimernih filmova u poređenju sa sintetičkim. Često dodatak plastifikatora povoljno utiče na elastična svojstva filmova, dok drugi aditivi i umreživači mogu poboljšati čvrstoću i mogućnost istezanja. Vlažnost vazduha sredine može uticati na mehanička svojstva biopolimernih filmova. Na primer, hidrofilni filmovi upijaju više vlage u uslovima visoke vlažnosti vazduha, tako pospešujuće dejstvo vode kao plastifikatora, pri čemu opada zatezna čvrstoća, a raste rastegljivost filmova. Dodatno, interakcija upakovanog proizvoda i filma takođe utiče na osobine i performanse filma (Wihodo i Moraru 2013, Lazić i Popović 2015).

Barijerna svojstva biopolimernih filmova takođe su veoma bitna za njihovu primenu i podrazumevaju propustljivost različitih gasova i vodene pare, ali i mogućnost upijanja vode i vodene pare. Na barijerna svojstva filmova utiču različiti faktori, kao što su priroda i sastav filma i uslovi sredine, sa obe strane filma. Na primer, filmovi pripremljeni od polarnih jedinjenja obično pokazuju visoku propustljivost za vodenu paru, a malu za gasove, dok je kod filmova od nepolarnih jedinjenja obrnuto. Takođe, propustljivost gasova proporcionalna je zapreminskom udelu amorfne faze u strukturi filma. Vlažnost i temperatura sredine takođe utiču na barijerna svojstva biopolimernih filmova, pa je tako na primer propustljivost za gasove i vodenu paru veća ukoliko je vlažnost vazduha veća. Dodatak plastifikatora, pored

Tabela 6. Mehaničke osobine različitih polimernih filmova (Lazić i Popović 2015).

<b>Vrsta polimera</b>	<b>Zatezna jačina (MPa)</b>	<b>Izduženje pri kidanju (%)</b>
<b>Kolagen</b>	1 – 70	10 – 70
<b>Zein</b>	3 – 4	50 – 120
<b>Želatin</b>	4 – 6	101 – 184
<b>Hitozan</b>	36	18
	Acetat	44 – 64
<b>Celuloza</b>	Hidroksipropil	14 – 15
	Metil	55 – 60
<b>Skrob</b>	4 – 6,5	80 – 120
<b>Polietilen</b>	Niske gustine	9 – 20
	Visoke gustine	10 – 60

toga što utiče na mehanička, utiče i na barijerna svojstva biopolimernih filmova. S obzirom da plastifikatori povećavaju, razređuju i omekšavaju strukturu polimera, povećava se i njihova pokretljivost, pa samim tim i koeficijent difuzije gasova i vode. Drugim rečima, plastifikatori često mogu da pogoršaju barijerna svojstva filma. Zbog toga je filmove koji se koriste kao ambalažni materijali bitno prilagoditi određenom proizvodu i uslovima skladištenja (Wihodo i Moraru 2013, Lazić i Popović 2015). Proteinski filmovi uglavnom pokazuju bolja barijerna svojstva u odnosu na lipide i polisaharide (Assad i sar. 2020). U Tabeli 7 dat je pregled propustljivosti gasova za pojedine polimerne filmove.

I barijerna i mehanička svojstva filmova povezana su sa njihovim mikrostrukturnim karakteristikama, koje zavise od formulacije i načina pripreme filma. Pokazano je da su hrapaviji filmovi obično rastegljiviji, dok glatki filmovi imaju veći sjaj, ali su lomljiviji. Takođe, uklanjanje vazduha iz formulacija za pripremu filmova utiče na smanjenje poroznosti filmova (Wihodo i Moraru 2013). Takođe, biopolimerni filmovi su osetljivi na promenu relativne vlažnosti. Pri niskoj vrednosti relativne vlažnosti filmovi postaju krtiji i gube svoja mehanička svojstva, dok pri visokoj vrednosti dolazi do bubrenja biopolimera, što utiče na gubitak barijernih svojstava filma. Ovi nedostaci se mogu preduprediti pripremom

višeslojnih filmova različitog sastava ili kombinovanjem polarnih i nepolarnih polimera prilikom pripreme filma (Lazić i Popović 2015).

Tabela 7. Propustljivost gasova različitih polimernih filmova.

Polimer od koga je izgrađen film	Propustljivost gasova (ml/m <sup>2</sup> /24h 1 bar)			
	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	Vazduh
<b>Protein tikve golice</b>	20,88	15,85	0	3,32
<b>Polietilen (PE)</b>	7350,40	2431,20	573,00	949,40
<b>Biaksijalno orijentisani polipropilen (BOPP)</b>	2997,90	1130,80	257,5	442,80
<b>Višeslojni film od sintetskih polimera</b>	87,00	25,30	11,70	14,06

Pojedine fizičke osobine takođe utiču na svojstva i integritet pripremljenog filma. Tako je ukupna rastvorljivost važna karakteristika biopolimernih filmova. Osim toga što povoljno utiče na njihovu biorazgradivost, isto tako utiče i na mogućnost njihove primene. Hidrofobni, visokomolekularni i umreženi polimeri su nerastvorni ili neznatno rastvorni u vodi, pa se od njih mogu pripremati vodootporni biorazgradivi filmovi. Pored rastvorljivosti, i bubrenje filmova je veoma značajna karakteristika. U kontaktu sa kompatibilnim rastvaračem filmovi bubre. Kada filmovi u inicijalnom stanju dođu u kontakt sa molekulima rastvarača, molekuli rastvarača bivaju privučeni površinom filma, a zatim prodiru u sam matriks filma, vezujući se za odgovarajuće grupe unutar njega. Bez obzira što na ovaj način film ne biva potpuno rastvoren, njegov integritet se može značajno narušiti, a time i njegova zaštitna uloga (Lazić i Popović 2015).

Strukturne karakteristike biopolimernih filmova, koje definišu ostala svojstva su: odnos kristalne i amorfne zone, pokretljivost polimernih lanaca, specifične interakcije funkcionalnih grupa polimernih lanaca i permeabilnost amorfne zone. Najčešće primenjivane tehnike za proučavanje strukture biopolimernih filmova uključuju: Furije transformišuću infracrvenu

spektroskopiju (eng. *Fourier transform infrared spectroscopy* – FTIR), skenirajuću elektronsku mikroskopiju (SEM), diferencijalnu skenirajuću kalorimetriju (DSC), termo–mehaničku analizu (TMA) i dinamičko–mehaničku analizu (DMA) (Lazić i Popović 2015).

### 2.3.5. Biopolimeri za pripremu filmova

Proteini soje pokazuju odličan potencijal za formiranje ambalažnih filmova. Priprema filmova proteina soje uglavnom zavisi od koncentracije proteina i pH vrednosti rastvora iz kojih se filmovi pripremaju. Kada se radi o pripremi metodom izlivanja filmova, koncentracija proteina je obično oko 4 – 5%, a kada se koristi metoda ekstruzije koncentracija je mnogostruko veća, oko 80%. Mehaničke osobina filmova proteina soje mogu se modifikovati dodavanjem glicerola kao plastifikatora ili kalcijumovih soli kao umreživača. Filmovi pripremljeni od proteina soje pokazuju dobra barijerna svojstva za kiseonik i ulja u uslovima niske vlažnosti.

Pšenični gluten takođe može formirati filmove, koji pokazuju dobra mehanička i barijerna svojstva prema kiseoniku, ali loša prema vodenoj pari. Mogu se pripremiti izlivanjem iz rastvora proteina u razblaženom alkoholu ili pomoću termičkog presovanja tankog sloja proteina. Glutenski filmovi pripremljeni metodom izlivanja u kalupe pokazuju bolja svojstva istezanja, dok su filmovi pripremljeni presovanjem otporniji na kidanje i druga oštećenja. Natrijum–sulfit i kalcijum–hlorid pospešuju mehaničke osobine glutenskih filmova, pre svega zateznu čvrstoću. Visok sadržaj glutamina u glutenu utiče na smanjenje fleksibilnosti glutenskih filmova bez dodatka plastifikatora. Jedinjenja poput hlorofila i polipirola povećavaju antioksidativna svojstva glutenskih filmova, a smanjuju njihovu rastvorljivost.

Zein može samostalno da formira koherentne filmove i oni se najčešće formiraju izlivanjem etanolnog rastvora zeina u nelepljive kalupe i sušenjem. Mogu se pripremiti i ekstruzijom, na sobnoj temperaturi, ali koja takođe podrazumeva precipitaciju proteina u hladnoj vodi. Način pripreme filmova zeina u mnogome utiče na njihove osobine. Filmovi pripremani izlivanjem iz rastvora pokazali su se kao veoma kruti, neistegljivi i lomljivi, dok se mnogo elastičniji i fleksibilniji filmovi dobijaju ekstruzijom zeina. Prilikom pripreme

filmova na bazi zeina mogu se koristiti plastifikatori, drugi polimeri ili se formiraju višeslojni filmovi.

Jedan od primera potencijalne upotrebe filmova zeina jeste za formiranje aktivnog ambalažnog materijala, koji sadrži esencijalno ulje kao antimikrobnu komponentu (Kashiri i sar. 2017). Autori navode da su filmovi sa inkapsuliranim esencijalnim uljem *Zataria multiflora* Boiss., formirani u obliku vrećica, uspešno sprečili rast bakterija u mleku inokulisanom sa bakterijama *L. monocytogenes* i *E. coli*, koje se nalazilo unutar vrećica. S druge strane, aktivna materija iz filmova nije imala uticaj na gasnu atmosferu iznad tečnog medijuma. Kashiri i sar. (2017) takođe navode da je moguće naneti zeinski omotač na unutrašnju stranu vrećica od polipropilena, koje bi služile za produženje roka trajanja kravljeg mleka. Tihminlioglu i sar. (2010) su takođe pokazali da nanošenje zeinskog premaza na polipropilenske filmove može poboljšati njihove barijerne karakteristike prema vodenoj pari i kiseoniku. Pri tome, propustljivost kiseonika smanjena je za skoro tri reda veličine. Pokazano je da barijerne osobine tako dobijenog višeslojnog ambalažnog materijala najviše zavise od koncentracije zeina, koncentracije plastifikatora i vrste plastifikatora. Zeinski filmovi ispitivani su i za inkapsulaciju lauroil arginata, kao antimikrobnog agensa (Kashiri i sar. 2016). Pokazano je da inkapsulirani lauroil arginat ne utiče na osobine filma. S druge strane, filmovi su pokazali veoma dobro antimikrobno dejstvo prema bakterijama *L. monocytogenes* i *E. Coli*. U formulacije za pripremu filmova zeina mogu se dodati i različiti polifenoli i flavonoidi, koji utiču na povećanje fleksibilnosti filmova, ali i doprinose njihovom antimikrobnom dejstvu (Arcan i Yemenicioğlu 2011). Pokazano je da zeinski filmovi koji sadrže galnu kiselinu imaju antimikrobno dejstvo prema *L. monocytogenes* i *C. jejuni*. Kompozitni filmovi na bazi zeina testirani su i kao ambalaža za čuvanje sira, naneseni u vidu premaza (Pena-Serna i sar. 2016). Formulacija premaza sadržala je zein, glicerol i oleinsku kiselinu, sa i bez ksantana. Formulacija je na komade sira nanošena premazivanjem uz pomoć četke. U radu je pokazano da se fizičko-hemijske osobine sira zaštićenog omotačem na bazi zeina nisu bitno razlikovale od osobina neupakovanog sira i sira pakovanog u plastični omotač. U poređenju sa neupakovanim sirom, omotač na bazi zeina sprečio je mikrobiološku kontaminaciju i smanjio gubitak vlage. Ipak, tekstura, boja i stepen proteolize bili su lošiji u odnosu na tradicionalno pakovane komade sira. Omotači od zeina, sa dodatkom propilen-glikola, nanošeni su na jabuke u vidu premaza. Autori navode da je formulacija sa 10% zeina i 10% propilen-glikola rastvorenih u etanolu, na jabukama formirala omotač sa odgovarajućim sjajem i propustljivošću za gasove, koji čuva svežinu

jabuka jednako ili bolje u odnosu na komercijalne premaze (Bai i sar. 2003). Jestivi zeinski filmovi sa odgovarajućim mehaničkim i antimikrobnim karakteristikama mogu se dobiti i kombinovanjem zeina sa voskovima ili masnim kiselinama (Arcan i Yemenicioğlu 2013). Uz dodatak katehina kao plastifikatora i antimikrobnog agensa, filmovi zeina sa voskom ili oleinskom kiselinom pokazali su antimikrobnu aktivnost prema *L. innocua*. Ovako formulisani filmovi testirani su za pakovanje svežeg sira, pri čemu su pokazali slabu antimikrobnu aktivnost u samom siru, ali dobru zaštitu od oksidativnih promena (Ünalán i sar. 2013). Antimikrobna svojstva zeinskih ambalažnih materijala mogu se pospešiti i dodavanjem kristala ZnO (Cao i sar. 2017). Zeinski filmovi i premazi mogu naći primenu i u farmaceutskoj industriji, pre svega za formiranje omotača oko različitih lekova u formi tableta, čime se između ostalog može postići i kontrolisano otpuštanje aktivne materije leka (Guo i Shi 2009).

Proteini semena suncokreta zaostaju nakon ekstrakcije ulja i mogu se upotrebiti za pripremu barijernih filmova, metodom izlivanja u alkalnim uslovima uz dodatak plastifikatora (Assad i sar. 2020).

# 3. MATERIJAL I METODE

## 3.1. Materijal

U toku eksperimentalnog rada, korišćene su sledeće hemikalije:

- Zein, protein kukuruza, Sigma Aldrich (SAD)
- Šelak, prirodna smola izolovana iz ekskreta vrste insekta *Kerria lacca*, Sigma Aldrich (SAD)
- Kalafonijum, prirodna biljna smola izolovana iz četinarskih vrsta *Pinus sp.*, Fluka Chemie AG (Švajcarska)
- Guma arabika, polisaharid iz drveta akacije (*Acaciae*) Sigma Aldrich (SAD)
- Karvakrol (5-isopropyl-2-methylphenol), 99%, Sigma Aldrich (SAD)
- poli(natrijum-4-stiren-sulfonate), NaPSS, Sigma Aldrich (SAD)
- poli(dialildimetilamonijum-chloride), PDADMAC, Sigma Aldrich (SAD)



- Tween 20 (polyoxyethylenesorbitan-monolaureate), SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
- Tween 80 (polyoxyethylenesorbitan-monooleate), SERVA Electrophoresis GmbH (Nemačka)
- Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), 96%, Reahem (Srbija)
- Propilen–glikol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>), p.a., Centrohém (Srbija)
- Natrijum–hidroksid (NaOH), p.a., Centrohém (Srbija)
- Hlorovodonična kiselina (HCl), 36%, ZorkaPharm (Srbija)
- Natrijum–bromid (NaBr), p.a., Centrohém (Srbija)
- Demineralizovana voda

### 3.2. Priprema rastvora

0,5%, 2%, 5% i 10% m/m osnovni rastvori zeina pripremani su rastvaranjem praha zeina u smeši etanola i vode, sa udelom etanola 70–90% v/v. Osnovni rastvori pripremani su u erlenmajerima od 100 ml, sa šlifovanim zatvaračem, kako bi se sprečilo isparavanje etanola. Odmeravana je odgovarajuća masa praha zeina, potrebna za pripremu 25 g osnovnog rastvora, koja je potom postepeno dodavana u prethodno odmereni razblaženi etanol u erlenmajeru, uz mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon dodavanja celokupne količine odmerenog praha mešanje je nastavljeno u toku 1 h, a potom su rastvori ostavljeni preko noći, kako bi se postiglo potpuno rastvaranje proteinskih makromolekula. Narednog dana, rastvori su filtrirani kroz kvantitativnu filter hartiju, u cilju uklanjanja nerastvornih čestica i nečistoća, pre dalje upotrebe. Na isti način pripremani su 2% m/m osnovni rastvori šelaka i kalafonijuma u 90% v/v etanolu.

2% i 10% rastvori smeša zeina i šelaka (Z/Š) i zeina i kalafonijuma (Z/K), u masenim odnosima Z/Š 0,8/0,2, i 0,5/0,5 i Z/K 0,8/0,2 i 0,4/0,6, pripremani su tako što su prvo pomešani prah zeina i odgovarajuće smole, a potom rastvoreni u 90% v/v etanolu. Dalji postupak pripreme rastvora bio je isti kao za pripremu rastvora zeina bez smole.

### 3.3. Priprema nanočestica

Nanočestice zeina (Z), šelaka (Š) i kalafonijuma (K), kao i kompozitne nanočestice zein/šelak (Z/Š) i zein/kalafonijum (Z/K) pripremane su postupkom precipitacije, odnosno koprecipitacije biopolimera, u prisustvu nerastvarača. Naime, precipitacija biopolimera indukovana je postepenim dodavanjem 20 g osnovnog rastvora biopolimera u 80 g demineralizovane vode, u odnosu osnovni rastvor/voda = 1/4, uz blago mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon dodatka potrebne zapremine osnovnog rastvora, mešanje je nastavljeno još 30 min, u cilju potpune precipitacije biopolimera. Ovako pripremljene disperzije čuvane su na temperaturi 4 – 8°C pre daljeg korišćenja, ne duže od 7 dana.

U cilju pripreme uzoraka za ispitivanje interakcija nanočestica sa gumom arabikom, 2% Z i 0,8/0,2 Z/K disperzije dijalizirane su u toku 48 h, kako bi se uklonio etanol i nečistoće poput zaostalih jona poreklom iz praha biopolimera. Tok dijalize praćen je merenjem provodljivosti suspenzije i dijaliza je smatrana završenom kada je vrednost provodljivosti bila  $\leq 20 \mu\text{S}$ . Konačna koncentracija nanočestica u dijaliziranim disperzijama bila je 1,5 – 1,7 % m/m. Dijalizirane disperzije čuvane su na temperaturi 4 – 8°C pre daljeg korišćenja, ne duže od mesec dana.

Nanočestice korišćene za formiranje filmova, pripremane su od 2% m/m i 10% m/m osnovnih rastvora zeina, tako da se dobiju 0,5% i 2% m/m disperzije nanočestica zeina, respektivno. Tako dobijene disperzije, naknadno su uparavane do koncentracije 4% m/m uz pomoć rotacionog vakuum uparivača (Devarot, Elektromedicina, Slovenia), na 50°C i pritisku 0,1 bar. Na taj način, pripremljene su disperzije nanočestica zeina ( $Z_d$ ), sa različitom veličinom čestica, NČ90 (iz 2% m/m rastvora) i NČ180 (iz 10% m/m rastvora). Takođe, pripremljene su i disperzije sa propilen–glikolom, dodavanjem 30 % propilen–glikola na masu zeina, u 4%-tnu disperziju nanočestica zeina. Sve pripremljene disperzije kondicionirane su 24 h na 4°C pre izlivanja filmova, u cilju degaziranja.

### 3.4. Priprema nanokapsula

5 % m/m karvakrola, računato na masu biopolimera, dodato je u 2 % m/m rastvore smeša zeina i kalafonijuma, u masenim odnosima ZK/ 1/0, 0,8/0,2 i 0,6/0,4. Tako pripremljen rastvor, ukapavan je u destilovanu vodu, te su Z i Z/K nanokapsule formirane metodom

smanjenja rastvorljivosti, analogno postupku dobijanja Z i Z/K nanočestica. Na ovaj način, pripremljene su 0,4% m/m disperzije nanokapsula.

### 3.5. Priprema zeinskih filmova

Zeinski filmovi pripremani su izlivanjem 2,5 ml 4% m/m disperzije nanočestica zeina u vodi ili 4% m/m rastvora zeina u 90% etanolu u kružne silikonske kalupe, prečnika 3,5 cm, i sušenjem u sušnici 3 – 8 h, na 50°C. Na taj način dobijeni su filmovi koji sadrže 0,1 g zeina. Za pripremu filmova korišćene su disperzije ( $Z_d$  filmovi) sa česticama različite veličine (NČ90 i NČ180), uz dodatak 30% propilen–glikola, računato na masu zeina, kao plastifikatora (ZDPGNČ90 i ZDPGNČ180 filmovi) i bez plastifikatora (ZDNČ90 i ZDNČ180 filmovi). Takođe, pripremani su filmovi iz etanolnog rastvora zeina ( $Z_r$  filmovi), bez plastifikatora (ZR filmovi) i sa 30% propilen–glikola, računato na masu zeina (ZRPG filmovi). Nakon sušenja, filmovi su ostavljeni da stoje u kalupima na sobnoj temperaturi preko noći, kako bi se olakšalo odvajanje od silikonskog kalupa, a potom vađeni iz kalupa i čuvani na 4°C, pre dalje karakterizacije. Sadržaj vlage u filmovima kondicioniranim 24h u eksikatoru, u uslovima relativne vlažnosti vazduha 0%, iznosila je  $6,86 \pm 2,01$  %, dok je sadržaj pepela u jednako tretiranim filmovima, određen u skladu sa standardnom AOAC metodom, bio  $0,99 \pm 0,20$  %.

### 3.6. Određivanje veličine i raspodele veličina nanočestica

Srednji intezitetni prečnik i raspodela veličina nanočestica zeina, šelaka, kalafonijuma, kao i kompozitnih nanočestica zein/smola, određivani su metodom dinamičkog rasipanja svetla (eng. *DLS*), uz pomoć ZetaSizer–a Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija), na 25°C. Za određivanje veličine nanočestica korišćene su jednokratne polistirenske kivete. Srednji intezitetni prečnik i raspodela veličina nanočestica određivani su u disperzijama nanočestica razblaženim demineralizovanom vodom do 0,1% m/m, na pH vrednostima 3–12. pH suspenzija podešavana je pomoću 0,1 mol/L HCl ili 0,1 mol/L NaOH, 24 h pre početka merenja. Za svaki uzorak suspenzija nanočestica, srednji intezitetni prečnik izmeren je minimalno tri puta, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja.

Promena srednjeg intenzitetnog prečnika Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica usled dodatka GA, praćena je u toku titracije 0,1% m/m suspenzija Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica 1% rastvorom GA, na pH vrednostima 3–5,5. Promena prečnika merena je pomoću ZetaPlus Zeta Potential analizatora (BIC, SAD). U kivetu sa 2 ml suspenzije dodavani su alikvoti od 15  $\mu$ l rastvora GA, sve do postizanja odnosa NČ:GA=1:2. Nakon dodatka svakog alikvota, suspenzija je intenzivno mešana na magnetnoj mešalici, a zatim je određivan srednji intenzitetni prečnik čestica. Na svakoj pH titracija obe suspenzije rastvorom GA ponovljena je tri puta, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri merenja.

### 3.7. Električne osobine nanočestica

#### 3.7.1. Određivanje zeta potencijala

Zeta potencijal nanočestica zeina, šelaka, kalafonijuma, kao i kompozitnih nanočestica zein/smola, određivan merenjem elektroforetke pokretljivosti, uz pomoć ZetaSizer–a Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija), na 25°C. Za određivanje zeta potencijala korišćena je protočna kiveta. Zeta potencijal nanočestica određivan je u disperzijama nanočestica razblaženim demineralizovanom vodom do 0,1% m/m, na pH vrednostima 3–12. pH suspenzija podešavana je pomoću 0,1 mol/L HCl ili 0,1 mol/L NaOH, 24 h pre početka merenja. Za svaki uzorak suspenzija nanočestica, zeta potencijal je izmeren minimalno tri puta, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja.

U cilju ispitivanja uticaja GA na naelektrisanje nanočestica, zeta potencijal Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica, pre i posle dodatka GA, određen je na pH vrednostima 3–5,5, pomoću ZetaPlus Zeta Potential analizatora (BIC, SAD). pH vrednost podešena je koristeći 0,1 mol/L HCl, a odnos NČ:GA bio je 1:1. Na svakoj pH, zeta potencijal nanočestca sa i bez GA izmeren je po tri puta, na sobnoj temperaturi, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja.

#### 3.7.2. Određivanje površinske gustine naelektrisanja nanočestica

Površinska gustina naelektrisanja Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica, određena je pomoću detektora naelektrisanja čestica Mütek–PCD05 (BTG Instruments, Švajcarska). 0,4% m/m

suspenzije nanočestica razblažene su demineralizovanom vodom do koncentracije 0,1% m/m. Polielektroliti, NaPSS i PDADMAC, rastvoreni su u demineralizovanoj vodi, tako da koncentracija u rastvoru, računata na osnovu molarne mase gradivnih jedinica polimera, iznosi  $10^{-5}$  mol/L. Površinska gustina naelektrisanja nanočestica određivana je na pH vrednostima u rasponu 3–9. pH vrednost disperzija podešavana je neposredno pre početka merenja, uz pomoć 0,1 mol/L NaOH i 0,1 mol/L HCl. Nakon podešavanja pH vrednosti, u mernu ćeliju detektora odmereno je 10 ml suspenzije, te titrisano rastvorom odgovarajućeg polielektrolita (PDADMAC pri pH = 7 – 9 ili NaPSS at pH = 3 – 5). Tok titracije praćen je merenjem vrednosti električnog potencijala, a titracija je završena u trenutku kada električni potencijal promeni znak. Površinska gustina naelektrisanja računata je na osnovu zapremine rastvora elektrolita utrošene u toku titracije, koristeći formulu (8):

$$\sigma_{tot} = \frac{F * c(PE) * V(PE)}{m(N\check{C})} \quad (8)$$

gde F predstavlja Faradejevu konstantu (C/mol), c(PE) koncentraciju titranta (mol/L), V(PE) zapreminu titranta potrebnu da se neutrališe ukupno naelektrisanje čestica u 10 mL suspenzije (L), a m(NČ) masu nanpčestica u 10 mL suspenzije.

Na svakoj od navedenih pH vrednosti merenja su ponovljena po tri puta za svaku suspenziju, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri merenja.

### 3.8. Izotermalna titraciona kalorimetrija

Izotermalni mikrokolorimetar (model CSC 4200, Calorimetry Science Corp., SAD) primenjen je za merenje promena entalpije u toku titracije Z i Z/K 0,8/0,2 suspenzija nanočestica rastvorom GA. U skladu sa metodom koju su predložili Baier i sar. (2011), 1,3 ml 0,5% suspenzije nanočestica, titrisano je 5% rastvorom GA, dodavanjem 16 uzastopnih alikvota od po 15  $\mu$ l, sa međusobnim razmakom od 6 min, sve do dostizanja ukupne zapremine od 240  $\mu$ l rastvora GA. Mikrokolorimetrijska merenja su rađena na tri različite pH vrednosti, 3, 4 i 5,5, sve tri ispod izoelektrične tačke zeina ( $IET_z = 6,2$ ) (Patel i sar. 2010). Navedene pH vrednosti izabrane su zato što je zein pozitivno naelektrisan na  $pH \leq 6,2$ , te dolazi u interakciju sa negativno naelektrisanom GA, koje je stabilna na  $pH \geq 3$ . pH suspenzija podešavana je pomoću 0,1 mol/L HCl ( $pH = 3$  i  $pH = 4$ ), dok je  $pH = 5,5$ , pH

vrednost suspenzije bez dodavanja HCl. Tokom svih merenja, temperatura je održavana na 25°C. Takođe, u toku svih merenja, referentna kalorimetrijska ćelija bila je ispunjena sa 1,3 ml destilovane vode. Za vreme merenja, suspenzija je intenzivno mešana uz pomoć propelerske mešalice integrisane u mikrokolorimetru. Kako bi se odredila toplota razblaženja rastvora GA, merna kalorimetrijska ćelija napunjena je destilovanom vodom, te je izveden postupak titracije na isti način kao i pri titraciji suspenzije, pri čemu su korišćene iste koncentracije rastvora GA i pH vrednosti titranda. Takođe, sprovedena su dodatna merenja promene entalpije na pH = 4, uz korišćenje duplo koncentrovanije suspenzije i rastvora GA, kako bi se promene entalpije intenzivirale. U ovom slučaju, rastvor GA dodavan je u mernu ćeliju u alikvotima od po 10 µl, te je dodato 24 alikvota kako bi se postigla ukupna zapremina rastvora GA od 240 µl. Na svakoj pH vrednosti titracije su ponovljene po tri puta, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti merenja.

### 3.9. Skenirajuća elektronska mikroskopija i mikroskopija atomskih sila

Za uporednu morfološku analizu Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica, sa i bez GA, pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije, korišćen je Helios NanoLab™ 650 (FEI, SAD). Za pripremu uzoraka nanočestica sa GA, suspenzije nanočestica koncentracije 0,1 % m/m pomešane su sa 5 % m/m rastvorom GA, tako da maseni odnos nanočestica i GA bude 1. Po jedna kap suspenzija Z i Z/K 0,8/0,2 NČ sa GA nanosena je staklenu mikroskopsku predmetnicu. Takođe, po jedna kap suspenzija Z i Z/K 0,8/0,2 NČ bez GA nanosena je na staklenu predmetnicu. Uzorci na predmetnicama osušeni su preko noći, na sobnoj temperaturi.

Mikrofotografije zeinskih filmova snimljene su pomoću elektronskog mikroskopa JSM-6460 LV (JEOL, Japan).

Reljefne i morfološke osobine zeinskih filmova analizirane su pomoću mikroskopa atomskih sila NT-MDT Ntegra SPM (Spectrum Instruments, Irska), u polukontaktom režimu greške (eng. *Semi-contact Error Mode*). Kod svakog filma snimljena je površina od 100 µm<sup>2</sup>, pri čemu je primenjena frekvencija skeniranja od 1 Hz, sa pomerajem 39,0 nm i amplitudom oscilovanja nosača 10,0 V. Na osnovu dobijenih podataka određen je morfološki profil i prosečna hrapavost površine zeinskih filmova.

### 3.10. Debljina filmova

Debljina filmova izmerena je pomoću digitalnog mikrometra (Mitutoyo, Nemačka) i izražena kao srednja vrednost debljine 10 filmova, gde je kod svakog filma debljina merena u najmanje 5 tačaka.

### 3.11. FTIR spektroskopija

FTIR spektri  $Z_r$ , kao i  $Z_d$  filmova sa i bez propilen–glikola snimljeni su pomoću IRAffinity-1S FTIR spektrofotometra (Shimadzu, Japan). Spektri su snimani u oblasti od  $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $700\text{ cm}^{-1}$ , u režimu merenja transmisije IR zraka.

### 3.12. Otpuštanje karvakrola iz nanokapsula

Maksimalna koncentracija aditiva (MKA) karvakrola u 1% m/v rastvoru *Tween*–a 20 i 1% m/v rastvoru *Tween*–a 80 određena je spektrofotometrijski (HALO DB-20S UV–Vis spektrofotometra Dynamica, Switzerland). 100 ml rastvora *Tween*–a odmereno je u levak za ekstrakciju sa šlifovanim zatvaračem, a zatim titrisano dodavanjem alikvota od po 15  $\mu\text{l}$  99%-tnog karvakrola. Na taj način, pripremane su smeše karvakrola i rastvora *Tween*–a, sa različitim koncentracijama karvakrola (od 0,015% do 0,18% v/v). Nakon dodatka svakog alikvota, smeše su intenzivno mućkane, a potom im je izmerena apsorbanca na 275 nm.

0,4% disperzije Z i Z/K nanokapsula filtrirane su kroz ultrafiltrar (L/S Economy Drive, Masterflex, SAD, peristaltička pumpa; Vivaflow 200 filtraciona ćelija sa 10000 HY membranom, Sartorius, Nemačka; uz primenu transmembranskog pritiska od 3 bar), u cilju uklanjanja etanola i neinkapsuliranog karvakrola. 100 ml svake disperzije nanokapsula je filtrirano i sakupljano 60 ml permeata, a potom je tako koncentrovana disperzija ponovo razblaživana demineralizovanom vodom do 100 ml. Ciklus ultrafiltracije ponavljan je tri puta za svaku disperziju.

3 ml profiltrirane disperzije razblaživano je sa 3 ml 2% rastvora *Tween*–a 20 i mešano na magnetnoj mešalici u toku 24 h, kako bi se postiglo otpuštanje karvakrola iz nanokapsula.

Nanokapsule su zatim precipitovane dodavanjem 0,01 mol/L HCl ili 0,01 mol/L NaOH. Precipitat je od supernatanta odvajanjem filtracijom kroz filter sa veličinom pora 0,45 μm (celuloza–nitrati membranski filter, Sartorius, Nemačka) i spektrofotometrijski je određivan sadržaj karvakrola u supernatantu, merenjem apsorbanca na 275 nm, uz pomoć HALO DB-20S UV–Vis spektrofotometra (Dynamica, Switzerland).

### 3.13. Barijerna svojstva zeinskih filmova

#### 3.13.1. Apsorpcija vlage

Apsorpcija vlage zeinskih filmova pri relativnoj vlažnosti vazduha 65 % i temperaturi 20±2°C, određivana je gravimetrijski. Prethodno, filmovi su kondicionirani 24h u eksikatoru u uslovima 0 % vlažnosti vazduha. Nakon kondicioniranja, filmovi su držani 72h u eksikatoru pri vlažnosti vazduha od 65 %, koja je postignuta pomoću zasićenog rastvora NaBr. Masa svakog filma izmerena je pre stavljanja u eksikator sa vlažnim vazduhom ( $m_0$ ), a zatim ponovo merena na svakih 24h ( $m_v$ ). Apsorbovana vlaga izračunata je prema jednačini (9):

$$\text{Apsorbovana vlaga (\%)} = \frac{m_v - m_0}{m_0} \times 100 \quad (9)$$

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri merenja.

#### 3.13.2. Rastvorljivost u vodi

Rastvorljivost zeinskih filmova u vodi određivana je gravimetrijski. Filmovi su kondicionirani 24h u eksikatoru u uslovima 0 % vlažnosti vazduha, a potom je izmerena masa filmova i korigovana za prosečnu vrednost zaostale vlage ( $m_f$ ). Svaki film je zatim potopljen u čašu sa 50 ml demineralizovane vode i ostavljen da stoji u vodi 24h, na sobnoj temperaturi, bez mešanja. Masa suvog ostatka nakon 24 h određena je nakon sušenja filmova na 105°C, do konstantne mase ( $m_n$ ). Rastvorljivost filmova (R) računata je prema formuli (10):



$$R(\%) = \frac{m_f - m_n}{m_f} \times 100 \quad (10)$$

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri istovetna merenja.

### 3.13.3. Propustljivost vodene pare

Propustljivost vodene pare (PVP) filmova takođe je određivana gravimetrijski, u skladu sa metodom opisanom kod (Cao i sar. 2017). Filmovi su, prethodno, kondicionirani u eksikatoru pri vlažnosti vazduha od 65 %, u toku 24h. U plastične bočice sa navojnim zatvaračem odmereno je približno 9 g demineralizovane vode, a zatim su kondicionirani filmovi isečeni na krugove prečnika otvora bočice, te stavljeni na otvor svake bočice. Na bočice su potom zavrnuti zatvarači, na kojima je prethodno napravljen kružni otvor prečnika  $d = 1,78$  mm. Između filma i zatvarača postavljeni su silikonski prstenovi sa otvorom istog prečnika kao na zatvaraču, kako bi se sprečilo pucanje filmova prilikom zavrtnja zatvarača i obezbedilo da vodena para iz bočice izlazi jedino kroz film. Tako zatvorene bočice smeštene su u eksikator sa relativnom vlažnošću vazduha 0%. Isparavanje vode kroz film praćeno je merenjem mase zatvorenih bočica na svakih sat vremena u toku prvih 8 sati, a potom na svakih 24 h u naredna tri dana. Na osnovu podataka dobijenih merenjem mase bočica, ustanovljena je linearna zavisnost mase propuštene vodene pare od vremena, te je grafički određen nagib ( $k$ ) za svaku bočicu, odnosno za svaki testiran film. Na osnovu nagiba, izračunata je brzina propuštanja vodene pare (BPVP) prema jednačini (11):

$$BPVP \left( \frac{g}{m^2h} \right) = k \times P_F \quad (11)$$

gde  $P_F$  predstavlja površinu filma kroz koju prolazi vodena para. PVP je zatim računata prema jednačini (12):

$$PVP \left( \frac{g \text{ mm}}{m^2 h \text{ kPa}} \right) = BPVP \times \frac{l}{\Delta P} \quad (12)$$

gde je  $l$  debljina filma, a  $\Delta P = 3,17$  kPa razlika napona pare unutar bočice ( $RV = 100$  %) i unutar eksikatora ( $RV = 0$  %).

Rezultati određivanja propustljivosti vodene pare su prikazani kao srednja vrednost tri merenja.

### 3.14. Optička svojstva zeinskih filomva

#### 3.14.1. Zamućenost

Merenje zamućenosti zeinskih filomva izvedeno je i skladu sa metodom opisanom kod Rodsamran i Sothornvit (2017). Zeinski filmovi isečeni su na trake, čija površina odgovara uzdužnom poprečnom preseku kivete UV–VIS spektrofotometra HALO DB-20S (Dynamica, Austrija). Spektrofotometrijski je merena apsorbanca svake trake na talasnoj dužini od 600 nm, dok je zamućenost (O) računata prema jednačini (13):

$$O(\%) = \frac{A}{l} \times 100 \quad (13)$$

gde je A apsorbanca filma na talasnoj dužini od 600 nm, a l debljina filma.

#### 3.14.2. Boja

Boja filmova određivana je pomoću MINOLTA Chroma Meter CR 400 digitalnog kolorimetra, sa osmomilimetarskim otvorom blende (Konica Minolta Inc., Osaka, Japan). U svim merenjima korišćen je D65 izvor svetlosti i standardni ugao detektora od 2°. Boja filmova izražavana je pomoću CIE L\*a\*b\* sistema. Parametar L\* odgovara svetlini filma, dok parametri a\* i b\* definišu preovlađujuće boje u uzorku. Pozitivne vrednosti parametra a\* ukazuju na to da u uzorku preovlađuje crvena boja, a negativne da preovlađuje zelena boja. Kod parametra b\*, pozitivne vrednosti ukazuju da žuta boja preovlađuje nad plavom, a negativne da plava preovlađuje nad žutom. Parametri su mereni na najmanje 10 filmova, poslaganih jedan preko drugog, da bi se izbegla greška usled transparentnosti filmova. Na osnovu izmerenih parametara, računata je ukupna razlika boje ( $\Delta E^*$ ), prema jednačini (14):

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (14)$$

gde su  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  i  $\Delta b^*$  računati u odnosu na apsolutno transparentan film ( $L^*=0$ ,  $a^*=0$ ,  $b^*=0$ ). Takođe, računat je indeks žute boje (YI) zeinskih filmova, prema jednačini (15):

$$YI = \frac{100 \times (C_x \times X - C_z \times Z)}{Y} \quad (15)$$

gde su X, Y i Z koeficijenti izmereni pomoću kolorimetra, a  $C_x$  i  $C_z$  konstante karakteristične za primenjeni izvor svetlosti i detektor.

### 3.14.3. Mehanička svojstva

Mehanička svojstva filmova ispitivana su pomoću Tensile Tester EZ-LX uređaja za ispitivanje mehaničkih osobina materijala (Shimadzu, Japan). Filmovi su kondicionirani 24h na vlažnosti vazduha 65%, te isečeni na trake širine 10 mm. Trake su pojedinačno pričvršćivane u stege mernog dela uređaja, postavljene jedna iznad druge na početnom rastojanju 23 mm. U toku merenja, rastojanje između stega povećavano je za 1 mm/min sve do momenta pucanja filma. Na osnovu rezultata dobijenih u toku merenja, određena je zatezna čvrstoća, izduženje pri kidanju, kao i Jangov modul elastičnosti zeinskih filmova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri istovetna merenja.

### 3.15. Statistička analiza

Za statističku analizu korišćeni su ANOVA i *Tukey* test. Eksperimentalni podaci analizirani su uz pomoć jednofaktorske analize varijanse (ANOVA), sa intervalom poverenja 95%. Srednje vrednosti merenja su potom poređene pomoću *Tukey* testa, *post hoc* testa za višestruko poređenje.

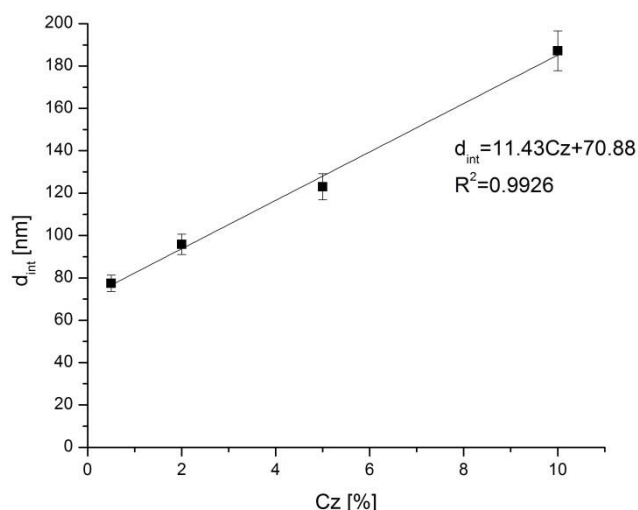
# 4. REZULTATI I DISKUSIJA

## 4.1. Koloidne osobine nanočestica

### 4.1.1. Nanočestice zeina

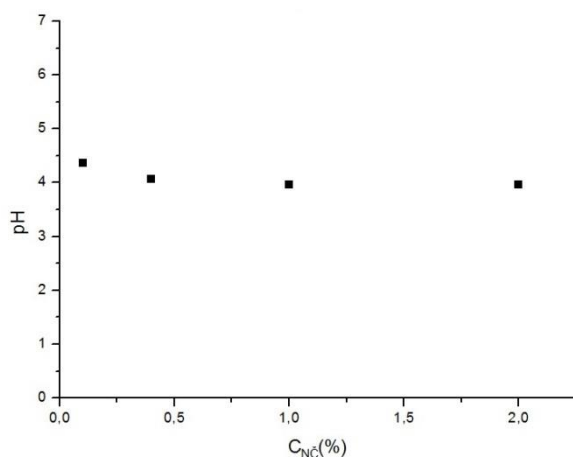
Disperzije nanočestica zeina pripremane su dodavanjem osnovnih rastvora zeina, različitih koncentracija, u vodu, pri čemu molekuli zeina koji su bili rastvoreni u etanolu precipituju i obrazuju nanočestice. Zavisnost prosečnog prečnika formiranih nanočestica zeina,  $d_{int}$ , od koncentracije zeinskih etanolnih rastvora (Cz), prikazana je na Slici 24. Kao što se može videti sa Slike 24, koncentracija zeina u osnovnom rastvoru utiče na prečnik nanočestica u nastaloj disperziji. Povećanje Cz od 0,5 % do 10 % zeina u 90% etanolu, na sobnoj temperaturi, dovodi do linearnog povećanja prečnika nanočestica od 80 nm do 180 nm. U datim uslovima zavisnost prečnika nanočestica od Cz definisana je funkcijom  $d=11,43 \cdot Cz+70,88$ . Povećanje prečnika nanočestica je posledica povećanja viskoziteta

rastvora, sa povećanjem koncentracije zeina. Veći viskozitet rastvora doprinosi formiranju većih čestica tokom precipitacije u nerastvaraču (Zhong i Jin 2009). Generalno gledano, tokom precipitacije biopolimera u nerastvaraču, javljaju se tri kompetitivna mehanizma, od kojih zavisi veličina nastalih čestica (Zhong i Jin 2009). To su: 1) razrušavanje kapi etanolnog rastvora usled smicajnih sila u dodiru sa većom količinom vode; 2) koalescencija kapi analogno emulzijama i 3) očvršćavanje rastvorenih materija usled razređivanja rastvarača nerastvaračem. Dinamika navedena tri procesa u mnogome zavisi od različitih faktora, poput koncentracije etanola u etanolnim rastvorima, intenziteta primenjenog mešanja, itd. Linearno povećanje prečnika nanočestica sa povećanjem koncentracije omogućava pripremu disperzija nanočestica unapred određene veličine.



Slika 24. Zavisnost veličine zeinskih nanočestica od koncentracije osnovnog rastvora zeina.

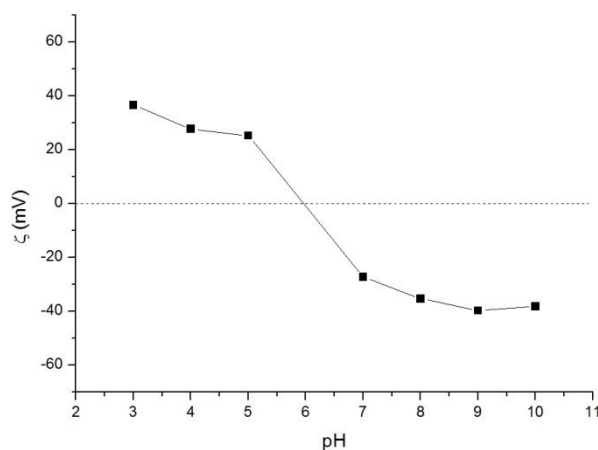
Na Slici 25 prikazana je zavisnost pH vrednosti disperzije nanočestica zeina od koncentracije nanočestica u disperziji. Može se primetiti da pH vrednost sveže pripremljenih disperzija nanočestica zeina ne zavisi od koncentracije zeina, u opsegu koncentracije 1 – 2 % zeina u disperziji, gde je vrednost pH  $\approx$  4, dok je nešto veća pri koncentraciji zeina < 1 % (Slika 25). Prilikom čuvanja uzoraka tokom dužeg vremena dolazilo je do sedimentacije nanočestica i obrazovanja taloga, a nastali talog se mogao lako redispergovati blagim mešanjem. Stabilnost samih disperzija može se posmatrati sa stanovišta gravitacione stabilnosti i koloidne stabilnosti. Kod pripremljenih disperzija, gravitaciona nestabilnost nastupala je tek posle nekoliko dana, što je posledica je male veličine zeinskih nanočestica, kod kojih Braunovo kretanje nadvladava gravitacione sile. S druge strane, koloidna stabilnost



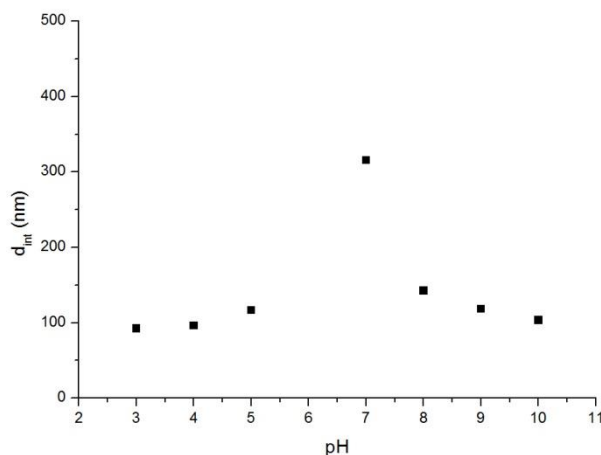
Slika 25. Zavisnost pH vrednosti disperzije nanočestica zeina od koncentracije nanočestica u disperziji.

disperzija zeinskih nanočestica posledica je istoimenog naelektrisanja nanočestica, koje dovodi do međusobnog elektrostatičkog odbijanja čestica i time ih stabilizuje.

Zavisnost zeta potencijala nanočestica zeina od pH vrednosti disperzije prikazana je na Slici 26. Na slici 26 se može videti da su na  $\text{pH} = 3 - 5$  nanočestice pozitivno naelektrisane, pri čemu je na  $\text{pH} = 4$ , koliko iznosi pH vrednost sveže pripremljenih suspenzija, zeta potencijal 25 mV. Sa povećanjem pH vrednosti zeta potencijal opada do dostizanja izoelektrične tačke (IET), koja je na  $\text{pH} = 6,2$ , što odgovara literaturnim podacima (Patel i ostali 2010). Daljim povećanjem pH vrednosti disperzije, čestice postaju negativno naelektrisane, te je najveća negativna vrednost zeta potencijala od -40 mV dostignuta pri  $\text{pH} = 9$ .



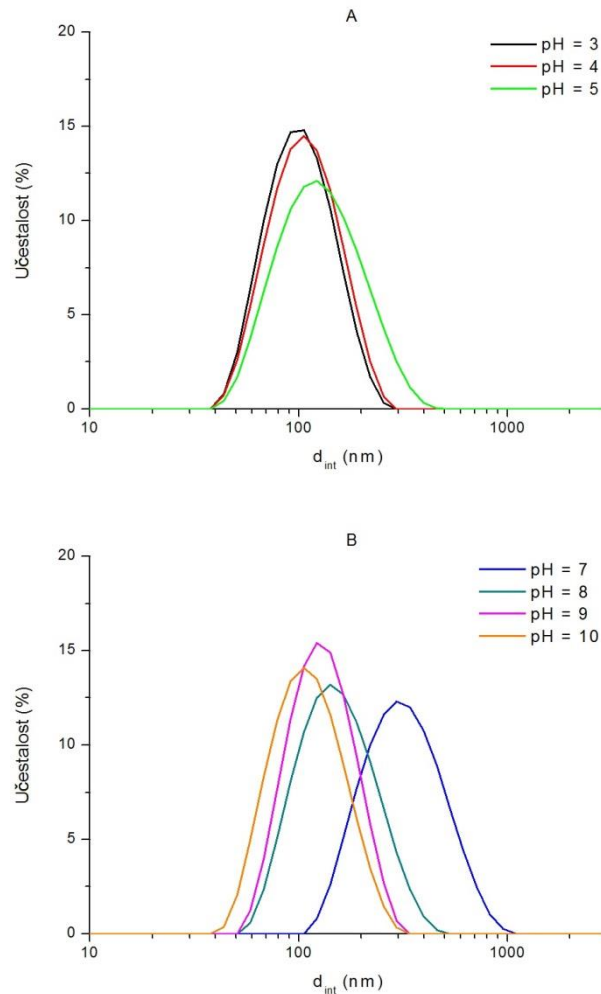
Slika 26. Zavisnost zeta potencijala nanočestica zeina od pH vrednosti disperzije.



Slika 27. Zavisnost srednjeg intenzitetnog prečnika nanočestica zeina od pH vrednosti disperzije.

Slika 27 prikazuje zavisnost srednjeg intenzitetnog prečnika zeinskih nanočestica od pH vrednosti disperzije. Sa Slike 27, može se videti da pH vrednost disperzije utiče na veličinu nanočestica zeina, te da su se najmanje zeinske čestice,  $d \approx 100$  nm, obrazovale pri najnižim i najvišim ispitivanim pH vrednostima, pH = 3, pH = 4, pH = 9 i pH = 10. Srednji prečnik nanočestica je utoliko veći, što je pH vrednost bliža vrednosti IET ( $pI = 6,2$ ), jer usled smanjenja naelektrisanja nanočestica dolazi do njihove aglomeracije. U skladu s tim, najveći srednji prečnik imaju nanočestice na pH = 7, gde je  $d > 300$  nm, dok je na pH = 6 došlo do potpune precipitacije nanočestica.

Raspodela veličina zeinskih nanočestica u disperzijama različitih pH vrednosti prikazana je na Slici 28. Sa Slike 28 može se videti da je raspodela veličina nanočestica zeina monomodalna i simetrična na svim pH vrednostima. Na Slici 25A se može primetiti da se na pH = 3 – 5 sa porastom pH povećava vrednost najverovatnijeg prečnika. Na pH = 5 može se videti nešto šira raspodela, u odnosu na pH = 3 i pH = 4, što je i očekivano na pH bliskim IET zeina ( $pI = 6,2$ ). S druge strane, sa Slike 25B se može videti da vrednost najverovatnijeg prečnika opada sa povećanjem pH vrednosti od 7 do 10. Na pH = 7, šira raspodela i veća vrednost najverovatnijeg prečnika uslovljena je prisustvom krupnijih čestica, koje su nastale usled precipitacije na pH bliskoj IET. Posmatrajući raspodele na pH = 7 – 10, može se videti da je najuža raspodela na pH = 9.



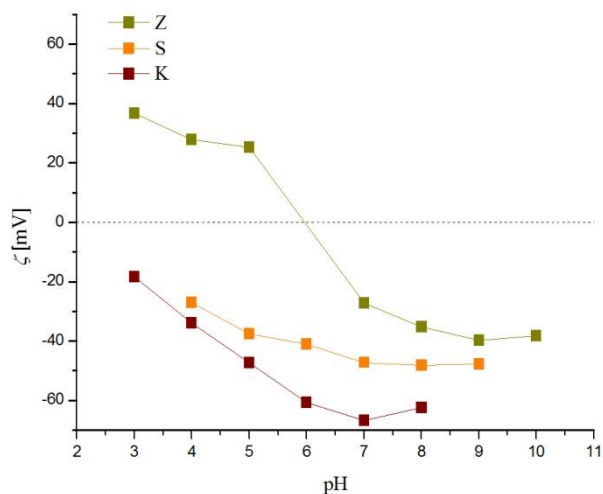
Slika 28. Raspedela veličina zeinskih nanočestica na različitim pH vrednostima.

#### 4.1.2. Nanočestice šelaka i kalafonijuma

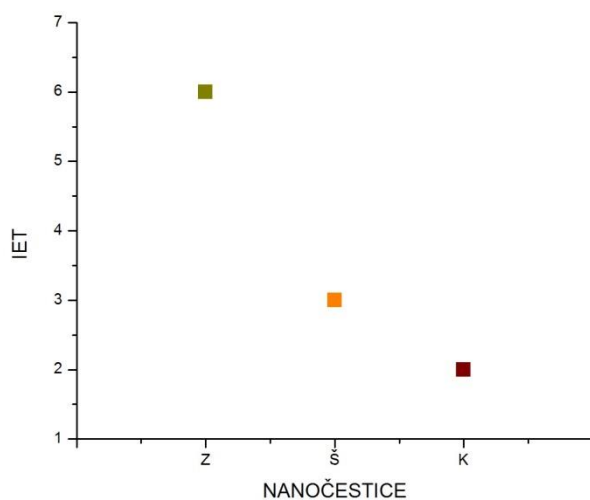
Disperzije nanočestica šelaka i kalafonijuma pripremane su metodom precipitovanja u nerastvaraču, na isti način kao i zeinske nanočestice. Zavisnost zeta potencijala nanočestica zeina, šelaka i kalafonijuma od pH vrednosti disperzije prikazana je na Slici 29. Sa grafika na Slici 29 može se videti da su, za razliku od nanočestica zeina, nanočestice šelaka i kalafonijuma negativno naelektrisane u celom opsegu ispitivanih pH vrednosti. Naelektrisanje nanočestica šelaka kreće se u rasponu od -27 mV do -48 mV, a nanočestica kalafonijuma od -18 mV do -62 mV. Negativno naelektrisanje potiče od jonizovanih karboksilnih grupa estara i poliestara polikarboksilnih kiselina, pretežno aleurinske, butolinske, šelainske i jalarinske kod šelaka, i smolastih kiselina, uglavnom izomera abietinske kiseline kod kalafonijuma (Wang i ostali 1999, McKeon i ostali 2014). Stabilne



disperzije nanočestica šelaka obrazovane su na  $\text{pH} = 4 - 9$ , dok su disperzije nanočestica kalafonijuma bile stabilne na  $\text{pH} = 3 - 8$ . Nanočestice kalafonijuma precipituju na  $\text{pH} = 2$ , a nanočestice šelaka na  $\text{pH} = 3$ , gde njihov zeta potencijal teži nuli. Precipitacija je posledica smanjenja nelektrisanja nanočestica i ukazuje na to da navedene vrednosti  $\text{pH}$  odgovaraju izoelektričnim tačkama polimera. Izoelektrične tačke zeina, šelaka i kalafonijuma ustanovljene na osnovu rezultata merenja zeta potencijala prikazane su na Slici 30. Šelak i kalafonijum se rastvaraju na višim  $\text{pH}$  vrednostima, tačnije na  $\text{pH} > 9$  za šelak i  $\text{pH} > 8$  za kalafonijum.



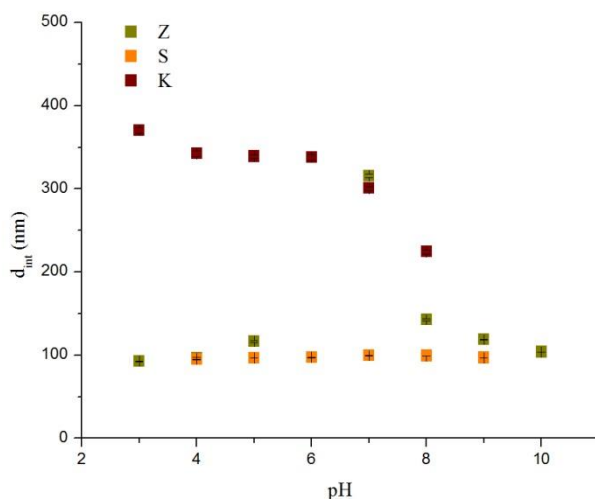
Slika 29. Zavisnost zeta potencijala nanočestica zeina (Z), šelaka (Š) i kalafonijuma (K), od  $\text{pH}$  vrednosti disperzije.



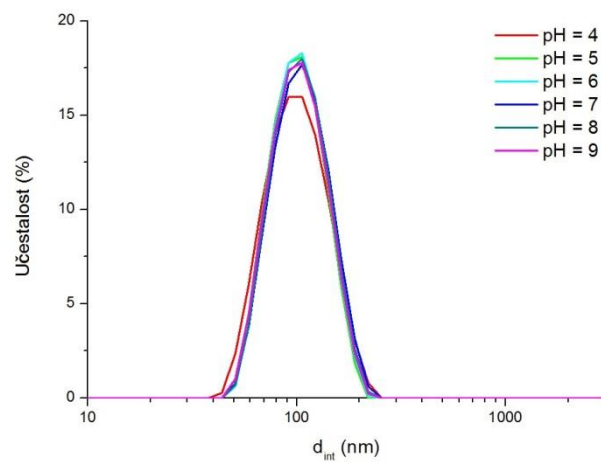
Slika 30. Izoelektrične tačke zeina (Z), šelaka (Š) i kalafonijuma (K).

Zavisnost srednjeg intenzitetnog prečnika nanočestica zeina, šelaka i kalafonijuma od pH vrednosti disperzije, prikazana je na Slici 31. Sa slike se može videti da pH vrednost disperzije ne utiče na veličinu nanočestica šelaka, čiji je srednji prečnik iznosio približno 100 nm, na svim ispitivanim pH vrednostima. S druge strane, pH vrednost ima veliki uticaj na veličinu nanočestica kalafonijuma. Kao i kod zeinskih nanočestica, nanočestice kalafonijuma su najkrupnije kad je pH vrednost bliska vrednosti IET kalafonijuma, te je tako na pH = 3 srednji intenzitetni prečnik čestica bio  $d = 370$  nm. Na pH = 4, pH = 5 i pH = 6, srednji prečnik nastalih nanočestica je bio konstantan i iznosio je  $d = 330$  nm. Daljim povećanjem pH vrednosti, veličina čestica opada na  $d = 300$  nm pri pH = 7, odnosno  $d = 220$  nm pri pH = 8. Smanjenje veličine nanočestica najverovatnije je prouzrokovano povećanom rastvorljivošću kalafonijuma na višim pH vrednostima (Pathak i Dorle 1987).

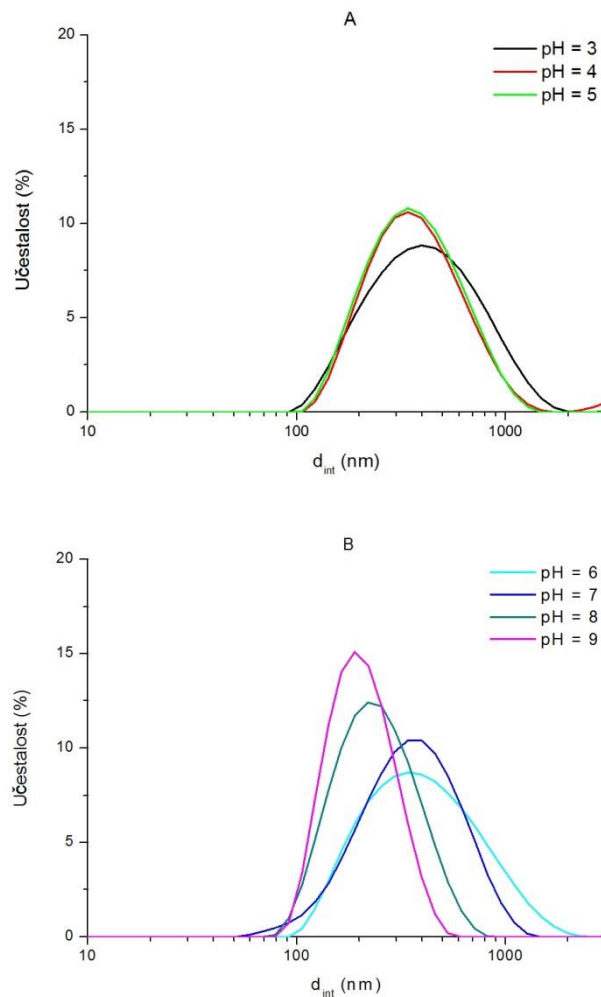
Raspodela veličina nanočestica šelaka i kalafonijuma, pri različitim pH vrednostima, prikazana je na Slici 32 i Slici 33, respektivno. Sa Slike 32 se može uočiti da se kod nanočestica šelaka, raspodela veličina čestica poklapa za skoro sve ispitivane pH vrednosti, što je i očekivano, s obzirom da je pokazano da pH vrednost disperzija ne utiče na veličinu nanočestica šelaka (Slika 31). Raspodela veličina nanočestica šelaka simetrična je i monomodalna na svim ispitivanim pH vrednostima.



Slika 31. Zavisnost srednje intenzitetnog prečnika nanočestica zeina (Z), šelaka (Š) i kalafonijuma (K), od pH vrednosti disperzije.



Slika 32. Raspodela veličina nanočestica šelaka na različitim pH vrednostima.



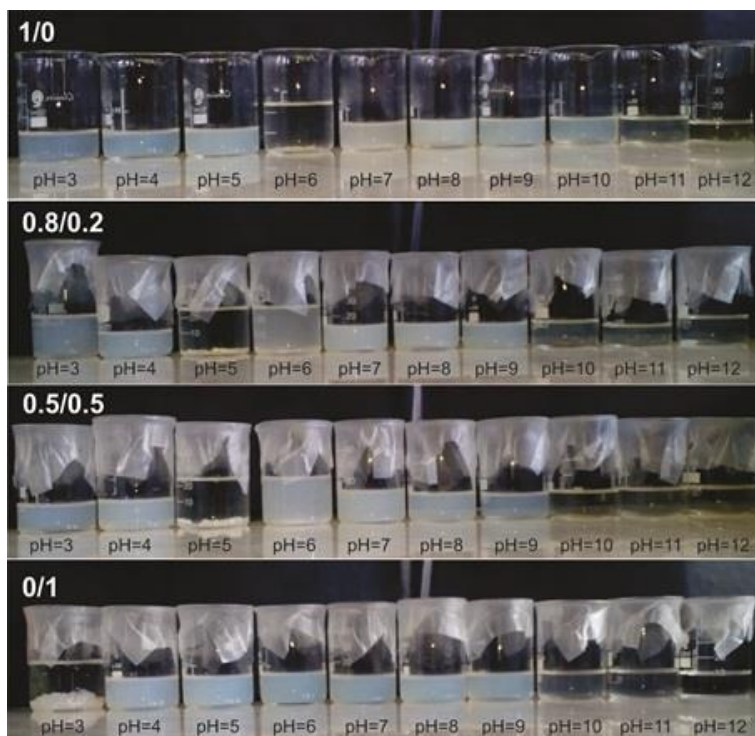
Slika 33. Raspodela veličina nanočestica kalafonijuma na različitim pH vrednostima.

S druge strane, na Slici 33, koja prikazuje raspodelu veličina nanočestica kalafonijuma, može se videti da se širina raspodele i najverovatniji prečnik nanočestica razlikuju kod različitih disperzija, u zavisnosti od pH. Raspodela veličina nanočestica kalafonijuma najuža je na pH = 9, a najšira na pH = 3. Najverovatniji prečnik čestica je približno isti na pH = 3 – 6, a potom opada sa povećanjem pH od 6 do 9, zbog delimičnog rastvaranja nanočestica u blago baznim uslovima. Raspodela veličina čestica kalafonijuma je monomodalna na svim ispitivanim pH vrednostima.

#### 4.1.3. Kompozitne nanočestice zein/šelak i zein/kalafonijum

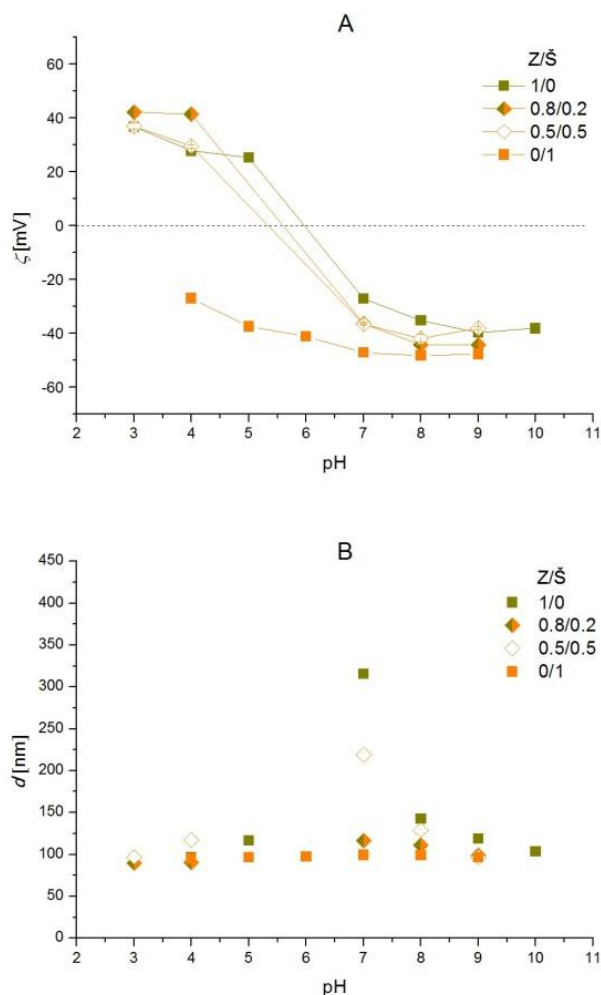
Disperzije kompozitnih nanočestica zein/smola, pripremljene precipitacijom rastvorenih smeša biopolimera, u vodi, rablaživane su nakon pripreme, te su ispitivane koloidne osobine nastalih nanočestica, na različitim pH vrednostima.

Fotografije disperzija kompozitnih nanočestica zein/šelak (Z/Š) na različitim pH (3 – 11) i sa različitim masenim odnosima Z/Š (1/0; 0,8/0,2; 0,5/0,5 i 0/1) prikazane su na Slici 34. Dispergovane čestice rasipaju svetlost, te izazivaju zamućenost disperzija, koja istovre–



Slika 34. Fotografije disperzija nanočestica zein/šelak (Z/Š) na različitim pH (3 – 11) i sa različitim masenim odnosima Z/Š (1/0; 0,8/0,2; 0,5/0,5 i 0/1).

meno zavisi od veličine prisutnih čestica. Disperzija Z/Š 1/0, na pH = 11, i sve druge Z/Š disperzije, na pH = 10 i pH = 11, su transparentne, što ukazuje na rastvaranje nanočestica na tim pH vrednostima. Ova pojava odgovara podacima iz literature, koji govore da su oba biopolimera, zein i šelak, rastvorljivi u baznim vodenim sredinama (Shukla i Cheryan 2001, Farag i Leopold 2011). Precipitacija Z/Š nanočestica primećena je na pH = 6 kod Z/Š 1/0, na pH = 5 i pH = 6 kod Z/Š 0,8/0,2, na pH = 5 kod Z/Š 0,5/0,5 i na pH = 3 kod Z/Š 0/1. Do precipitacije dolazi usled smanjenog naelektrisanja čestica na pH vrednostima bliskim IET, zbog čega je smanjen i intenzitet elektrostatičkog odbijanja među česticama, što ih čini koloidno nestabilnim.

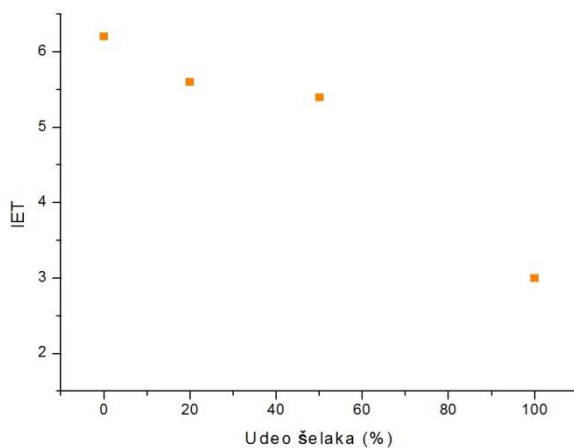


Slika 35. Zavisnost zeta potencijala (A) i srednjeg intenzitetnog prečnika (B) nanočestica zein/šelak (Z/Š) na različitim pH (3 – 10) i sa različitim masenim odnosima Z/Š (1/0; 0,8/0,2; 0,5/0,5 i 0/1).

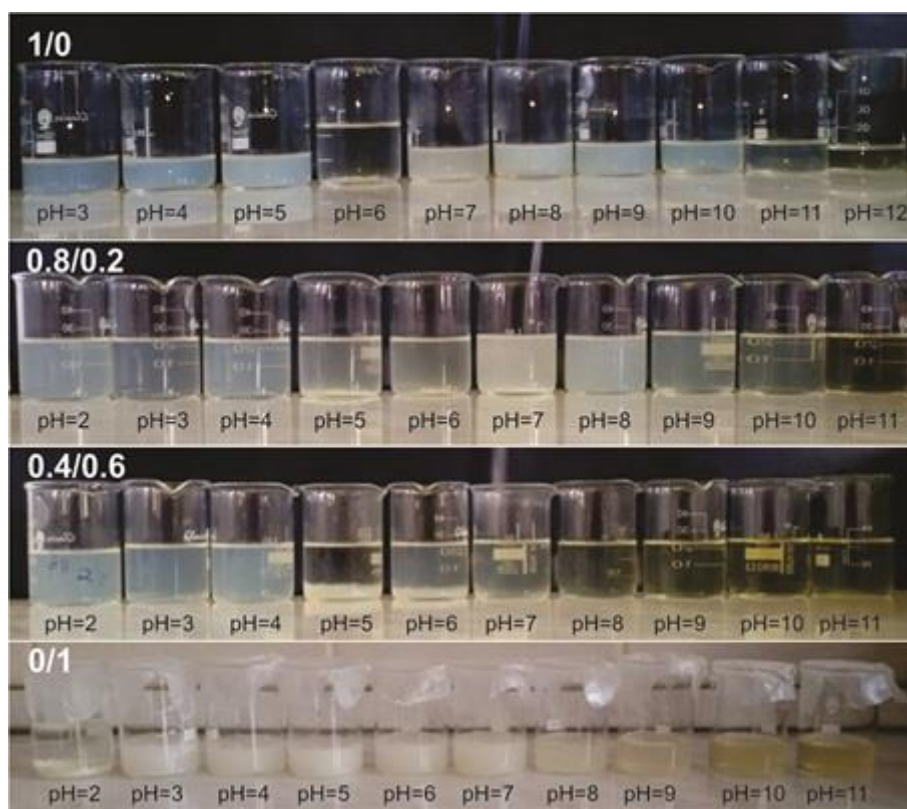
Zavisnost zeta potencijala Z/Š nanočestica, sa različitim Z/Š masenim odnosom, od pH vrednosti, prikazan je na Slici 35A. Sa slike se može videti da su Z/Š 1/0, Z/Š 0,8/0,2 i Z/Š 0,5/0,5 nanočestice pozitivno naelektrisane pri kiselim pH vrednostima, a negativno pri neutralnim i baznim uslovima. Nanočestice Z/Š 0/1 negativno su naelektrisane na svim ispitivanim pH vrednostima. Usled intenzivne koagulacije tokom precipitacije u nerastvaraču, nije bilo moguće pripremiti Z/Š nanočestice kod kojih bi šelak bio u višku, odnosno Z/Š nanočestice sa Z/Š masenim odnosom većim od 0,5/0,5. Zavisnost srednjeg intenzitetnog prečnika Z/Š nanočestica, sa različitim Z/Š masenim odnosom, od pH vrednosti, prikazan je na Slici 35B. Na slici se može videti da su sve pripremljene Z/Š čestice bile nanometarskih veličina, čiji prečnik raste kako se vrednost pH približava vrednosti IET odgovarajućih nanočestica. Uticaj pH vrednosti na veličinu čestica postaje izraženiji sa povećanjem udela zeina u sastavu Z/Š čestica.

Slika 36 prikazuje zavisnost izoelektrične tačke nanočestica zein/šelak od udela šelaka, ustanovljene na osnovu rezultata merenja zeta potencijala. Sa slike se može videti da vrednost IET opada se povećanjem udela šelaka u sastavu Z/Š nanočestica, što odgovara rezultatima vizuelnih opažanja (Slika 34), a posledica je negativnog neelektrisanja molekula šelaka.

Fotografije disperzija nanočestica zein/kalafonijum (Z/K) na različitim pH (2 – 11) i sa različitim masenim odnosima Z/K (1/0; 0,8/0,2; 0,4/0,6 i 0/1) prikazane su na Slici 37. Slično kao kod Z/Š disperzija, Z/K disperzije su zamućene, osim u slučaju ako su čestice precipitovane ili rastvorene. Takođe, sa Slike 37, može se videti da se, sa povećanjem udela kalafonijuma u sastavu čestica, snižava pH vrednost na kojoj počinje rastvaranje Z/K čestica. Tako se, na osnovu vizuelnih zapažanja, može primetiti da se Z/K 1/0 nanočestice rastvaraju na pH = 11, Z/K 0,8/0,2 na pH = 10, a Z/K 0,4/0,6 na pH = 8.

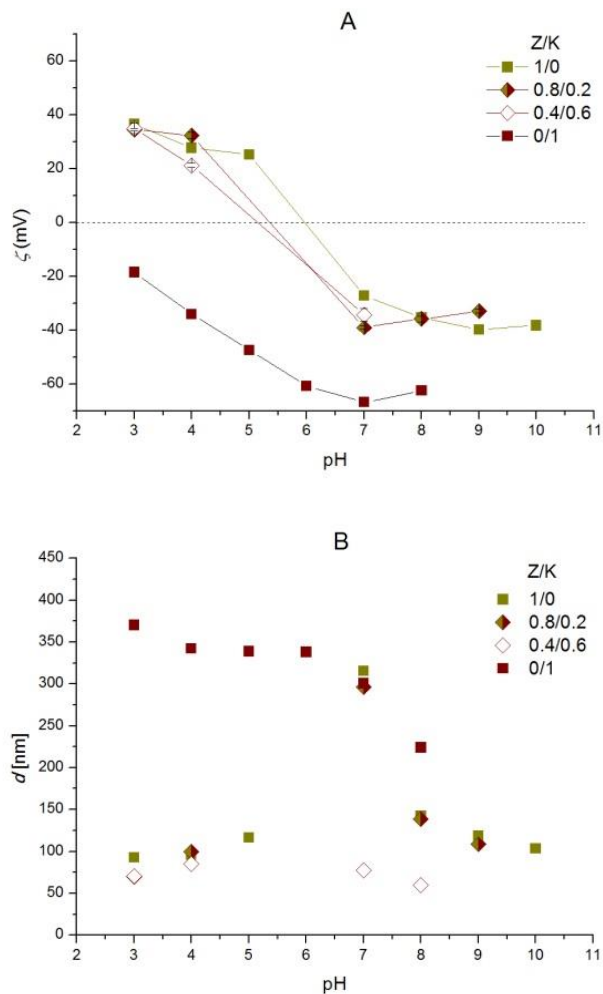


Slika 36. Zavisnost izoelektrične tačke nanočestica zein/šelak od udela šelaka.



Slika 37. Fotografije disperzija nanočestica zein/kalafonijum (Z/K) na različitim pH (2 – 11) i sa različitim masenim odnosima Z/K (1/0; 0,8/0,2; 0,4/0,6 i 0/1).

Slika 38A prikazuje zavisnost zeta potencijala Z/K nanočestica, sa različitim Z/K masenim odnosom, od pH vrednosti disperzije. Sa Slike 38A se može videti da su Z/K 1/0, 0,8/0,2 i 0,4/0,6 nanočestice pozitivno naelektrisane na pH = 3 – 5, a negativno na pH  $\geq$  7. Z/K 0/1 nanočestice su negativno naelektrisane na svim ispitivanim pH vrednostima. Na Slici 38B prikazana je zavisnost srednjeg intenzitetnog prečnika Z/K nanočestica, sa različitim Z/K masenim odnosom, od pH vrednosti disperzije. Sa slike 38B se može zapaziti da su sve pripremljene Z/K nanočestice bile nanometarskih veličina, pri čemu je pokazano da su kompozitne nanočestice (Z/K 0,8/0,2 i Z/K 0,4/0,6) značajno sitnije od nanočestica pripremljenih samo od kalafonijuma, Z/K 0/1 (Slika 31B).

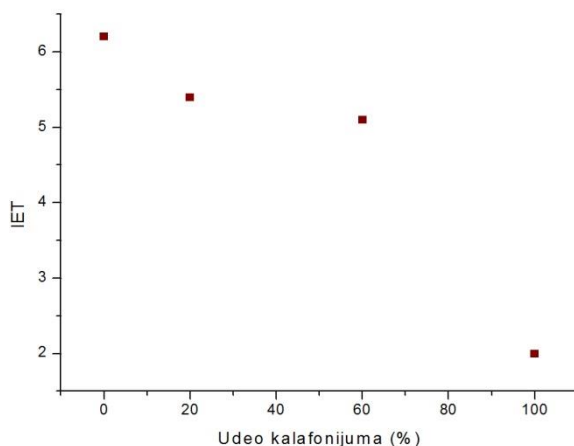


Slika 38. Zavisnost zeta potencijala (A) i srednjeg intenzitetnog prečnika (B) nanočestica zein/kalafonijum (Z/K) na različitim pH (2 – 10) i sa različitim masenim odnosima Z/K (1/0; 0,8/0,2; 0,4/0,6 i 0/1).

Na Slici 39 prikazana je zavisnost izoelektrične tačke nanočestica zein/kalafonijum od udela kalafonijuma. Izoelektrične tačke kompozitnih Z/K nanočestica utvrđene su na osnovu rezultata merenja zeta potencijala (Slika 38A). Sa Slike 39 može se videti da vrednost IET kompozitnih Z/K nanočestica teži sve nižim pH vrednostima, što je veći udeo kalafonijuma u sastavu čestica. Ovaj efekat posledica je negativnog neelektrisanja molekula kalafonijuma.

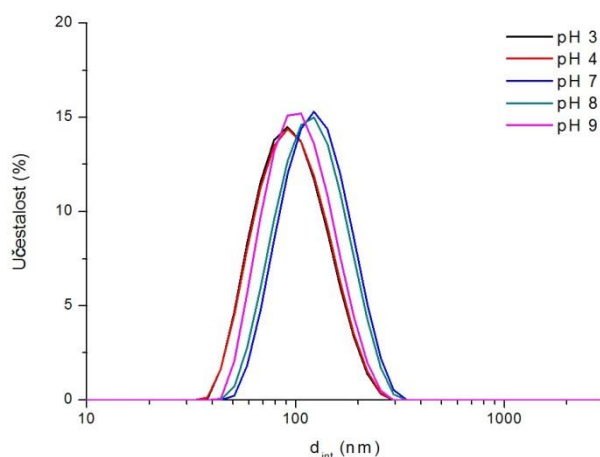
Upoređivanjem rezultata sa Slika 34, 35B, 37 i 38B, može se zaključiti da rastvaranje Z/K nanočestica započinje na nižim pH vrednostima u odnosu na Z/Š nanočestice, odnosno na vrednostima bližim neutralnoj pH. Ovo je poželjno s tačke gledišta oslobađanja aktivnih materija iz nanočestica u neutralnim sredinama.



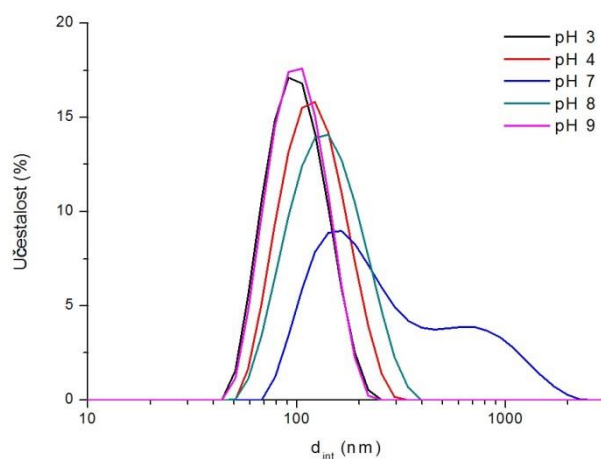


Slika 39. Zavisnost izoelektrične tačke nanočestica zein/kalafonijum od udela kalafonijuma.

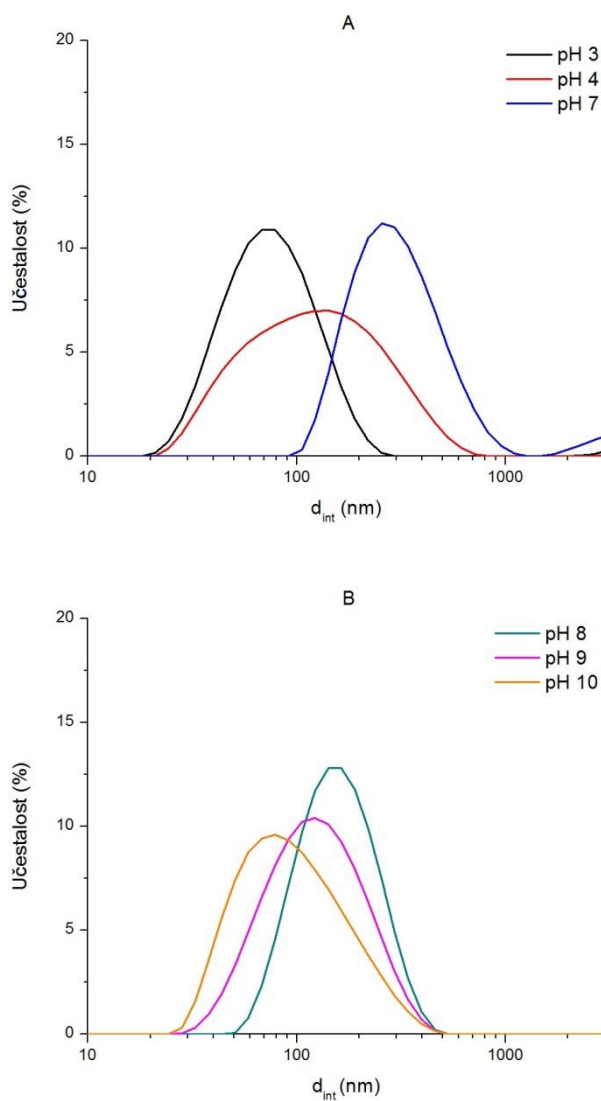
Slike 40 i 41 prikazuju raspodelu veličina kompozitnih Z/Š nanočestica, na različitim pH vrednostima. Sa Slike 40, može se videti da Z/Š 0,8/0,2 nanočestice imaju monomodalnu raspodelu na svim ispitivanim pH vrednostima. Takođe i najverovatniji prečnici imaju veoma slične vrednosti na svim pH. Kod raspodela veličina Z/Š 0,5/0,5 nanočestica, prikazanih na Slici 41, može se primetiti da je raspodela na pH = 7 bimodalna, dok je na ostalim ispitivanim pH monomodalna. Najverovatniji prečnik prvo raste sa povećanjem pH od 3 do 4, usled približavanja pH vrednosti IET, a potom opada od pH 7 do 9.



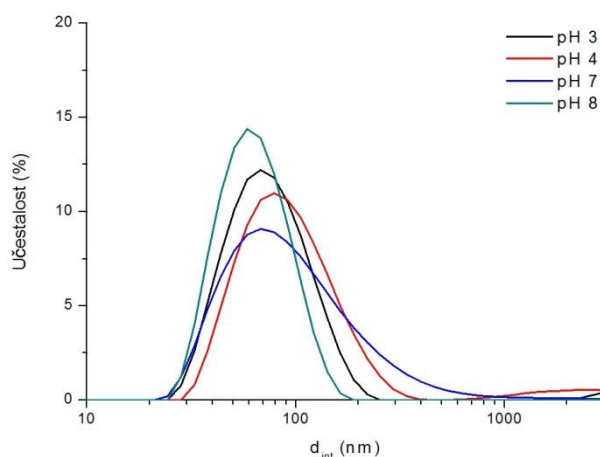
Slika 40. Raspodela veličina nanočestica Z/Š 0,8/0,2 na različitim pH vrednostima.



Slika 41. Raspodela veličina nanočestica Z/Š 0,5/0,5 na različitim pH vrednostima.



Slika 42. Raspodela veličina nanočestica Z/K 0,8/0,2 na različitim pH vrednostima.



Slika 43. Raspedela veličina nanočestica Z/K 0,4/0,6 na različitim pH vrednostima.

Slike 42 i 43 prikazuju raspodelu veličina Z/K kompozitnih nanočestica, na različitim pH vrednostima. Sa Slike 42A se može videti da je raspodela Z/K 0,8/0,2 nanočestica monomodalna pri pH = 3, pH = 4 i pH = 7, ali nešto šira, pogotovo na pH = 4, što je najverovatnije posledica pH vrednosti bliskih prvo IET kalafonijuma, a potom IET zeina. S druge strane, na većim pH vrednostima, pH = 8 – 10 raspodela veličina Z/K 0,8/0,2 čestica je monomodalna (Slika 42B). Sa povećanjem pH od 8 do 10 vrednost najverovatnijeg prečnika čestica opada za oko 25 nm. Na pH = 10, Z/K 0,8/0,2 nanočestice imaju asimetričnu raspodelu. Konačno, raspodela veličina Z/K 0,4/0,6 nanočestica, prikazana je na Slici 43, i monodalna je na svim ispitivanim pH vrednostima. Na pH = 7, raspodela Z/K 0,4/0,6 nanočestica je najšira u odnosu na ostale pH vrednosti i asimetrična.

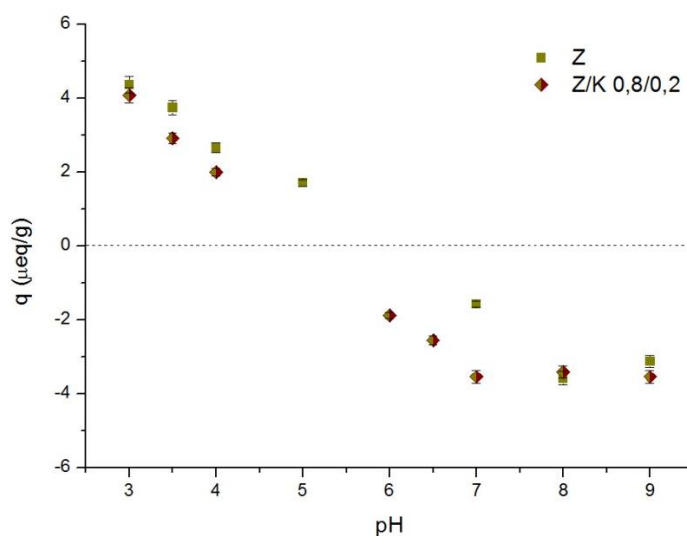
Na pH vrednostima na kojima nastaju stabilne disperzije, pH = 3 – 4 i pH = 8 – 9, i Z/Š i Z/K nanočestice su sličnih veličina ili sitnije u poređenju sa drugim nanočesticama na bazi zeina, čiji su rezultati ispitivanja objavljeni u dostupnoj literaturi (Zou i sar. 2012, Chen i Zhong 2015, Dong i sar. 2016). Wu i sar. (2012) navode da je na pH = 10 takođe došlo do smanjenja prosečnog prečnika čestica na bazi zeina.

#### 4.1.4. Površinska gustina naelektrisanja Z i Z/K nanočestica

Određivana je površinska gustina naelektrisanja zeinskih (Z) i kompozitnih nanočestica zein/kalafonijum (Z/K), sa Z/K masenim odnosom 0,8/0,2, na pH vrednostima pH = 3 – 9. Zavisnost površinske gustine naelektrisanja Z i Z/K nanočestica od pH vrednosti (3 – 9)

prikazana je na Slici 44. Na  $\text{pH} = 3 - 5$  zeinske nanočestice su pozitivno naelektrisane, pri čemu površinska gustina naelektrisanja opada sa porastom  $\text{pH}$ . Do opadanja dolazi usled povećanja broja negativno naelektrisanih deprotonovanih karboksilnih grupa, kako se  $\text{pH}$  približava vrednosti IET ( $\text{IET} = 6,2$ ). Zeinske čestice postaju negativno naelektrisane na  $\text{pH} > 6,2$ , usled deprotonovanja amino grupa u proteinu, a vrednost površinske gustine dalje opada sa povećanjem  $\text{pH}$  vrednosti. Konačno, površinska gustina naelektrisanja postaje konstantna na  $\text{pH} = 8$ . Sličan trend može se primetiti kod kompozitnih Z/K nanočestica, čija površinska gustina naelektrisanja opada sa povećanjem  $\text{pH}$  vrednosti od 3 – 7. Z/K čestice su pozitivno naelektrisane u rasponu  $\text{pH} = 3 - 4,5$ , a negativno pri  $\text{pH} > 5,5$ . Z/K nanočestice su precipitovale na  $\text{pH} \approx 5$ , ukazujući na oblast  $\text{pH}$  blisku njihovoj IET. Površinska gustina naelektrisanja Z/K čestica ima konstantne vrednosti pri  $\text{pH} = 7 - 9$ . Pokazano je da, u rasponu  $\text{pH}$  od 3 do 7, površinska gustina naelektrisanja Z/K nanočestica ima niže vrednosti u odnosu na Z nanočestice, što je posledica prisustva negativno naelektrisanih karboksilnih grupa kalafonijuma. Naime, kao što je ranije pokazano (Slika 38A), nanočestice kalafonijuma negativno su naelektrisane na  $\text{pH}$  vrednostima u rasponu od 3 do 12. Ovo je rezultat prisustva abietinske i pimarinske kiseline u strukturi kalafonijuma, koje sadrže karboksilne grupe koje se lako deprotonuju (Yadav i ostali 2016).

Iz rezultata navedenih u ovom poglavlju može se videti da je metodom precipitacije u nerastvaraču moguće pripremiti nanočestice zeina, kalafonijuma i šelaka, kao i kompozitne



Slika 44. Zavisnost površinske gustine naelektrisanja zeinskih (Z) i kompozitnih (Z/K 0,8/0,2) nanočestica od  $\text{pH}$  vrednosti.

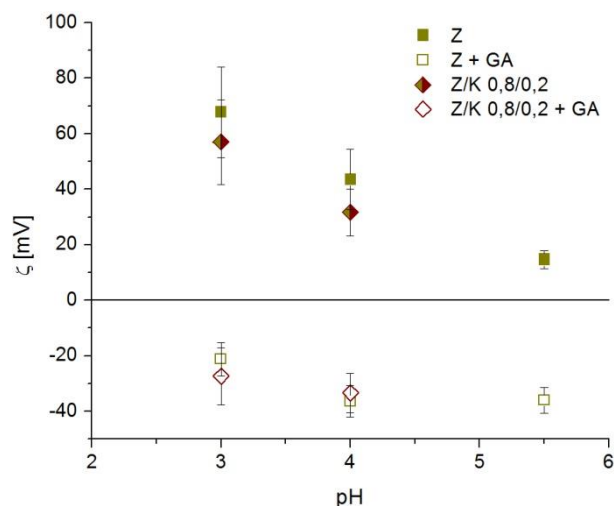
nanočestice zein/smola. Pokazano je da se koncentracijom osnovnog rastvora zeina može uticati na veličinu nastalih zeinskih nanočestica, kao i da se podešavanjem može uticati na zeta potencijal i veličinu svih pripremanih nanočestica. Rezultati su takođe pokazali udeo smole u sastavu nanočestica utiče na vrednost IET nanočestica, kao i na njihovu rastvorljivost pri baznim pH.

## 4.2. Interakcije zeinskih i kompozitnih čestica zein/kalafonijum sa gumom arabikom

Zeinske nanočestice i kompozitne nanočestice na bazi zeina mogu se primeniti za formiranje različitih koloidnih sistema kao što su nano- i mikrokapsule, Pickering emulzije, koacervati i drugi. Pri tome, važno je raspoznati moguće mehanizme interakcije nanočestica sa drugim jedinjenjima, poput lipida i polisaharida. Interakcije zeinskih i kompozitnih čestica zein/kalafonijum sa gumom arabikom ispitivane u svrhu razvoja novog rešenja za stabilizaciju Pickering emulzija, na bazi prirodnih komponenti.

### 4.2.1. Uticaj GA na zeta potencijal Z i Z/K nanočestica

Zeta potencijal Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica (NČ) meren je pre i nakon dodatka rastvora GA u suspenziju nanočestica, na tri različite pH vrednosti (3, 4 i 5,5), pri masenom odnosu NČ:GA 1:1. Zavisnost zeta potencijala Z i Z/K nanočestica od pH vrednosti, pre i nakon dodatka GA, prikazan je na Slici 45. Sa slike se može videti da su i Z i Z/K nanočestice, bez GA, bile pozitivno naelektrisane, na svim ispitivanim pH vrednostima. Zeta potencijal Z i Z/K nanočestica opada sa povećanjem pH od 3 do 5, pri čemu Z/K NČ imaju nešto manje naelektrisanje u odnosu na Z NČ, na svakoj od pH vrednosti. Dodatak rastvora GA u suspenzije NČ dovodi do promene znaka zeta potencijala čestica, te i Z i Z/K NČ postaju negativno naelektrisane, što ukazuje na adsorpciju molekula GA na površinu nanočestica. Zeta potencijal nanočestica nakon dodatka GA kreće se u opsegu od -20 mV do -35 mV i ne zavisi od pH vrednosti. Rezultati merenja ukazuju na to da kalafonijum, bez obzira na njegovo negativno naelektrisanje, ne sprečava vezivanje molekula GA za nanočestice. Autori (Dai i ostali 2018) u svom radu navode slična zapažanja, međutim, njihovi eksperimenti ne uključuju kompozitne nanočestice.

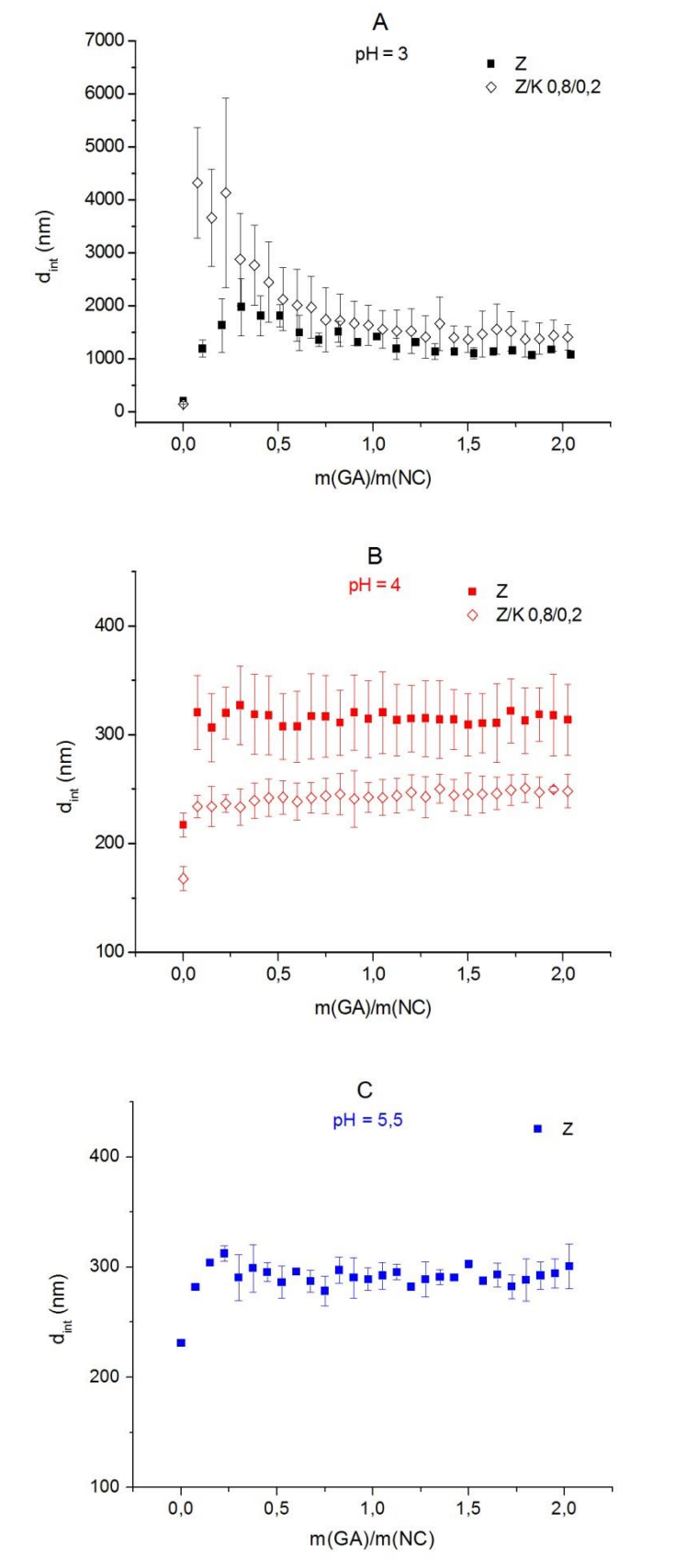


Slika 45. Zeta potencijal Z i Z/K nanočestica (NČ), pre i nakon dodatka rastvora GA u suspenziju nanočestica, na tri različite pH vrednosti (3, 4 i 5,5), pri masenom odnosu NČ:GA 1:1.

#### 4.2.2. Uticaj GA na veličinu Z i Z/K nanočestica

DLS tehnika korišćena je za ispitivanje uticaja dodatka GA na veličinu nanočestica, pri različitim pH vrednostima. Zavisnost veličine Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica od masenog odnosa GA/NČ, na različitim pH, prikazana je na Slici 43. Sa slike se može primetiti da maseni odnos GA/NČ utiče na veličinu Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica, na svim ispitivanim pH vrednostima.

Slika 46A prikazuje zavisnost prosečnog prečnika Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica od masenog odnosa GA/NČ, pri pH = 3. Kao što se sa slike može videti, već pri dodatku prvog alikvota rastvora GA i povećanju masenog odnosa GA/NČ sa 0 na 0,3, prečnik nanočestica naglo raste, sa 200 nm na 2000 nm, kod Z nanočestica i sa 150 nm na 4300 nm, kod Z/K nanočestica. Nakon dostizanja masenog odnosa 0,3, veličina i jednih i drugih čestica blago opada, a zatim postaje konstantna za masene odnose veće od 1. Naglo povećanje veličine čestica pri inicijalnom dodatku GA, ukazuje na pojavu bridžing flokulacije jako naelektrisanih čestica, do koje najverovatnije dolazi tako što negativno naelektrisani molekuli GA privlače pozitivno naelektrisane nanočestice i međusobno ih povezuju (Loganathan i Sankaran 2021). Dalje povećanje masenog odnosa GA/NČ dovodi do smanjenja veličine Z i Z/K nanočestica. Naime, pri većim masenim odnosima GA/NČ, prisutan je veći broj molekula GA, koji se adsorbuju na površinu čestica, što povećava njihovo naelektrisanje.



Slika 46. Zavisnost veličine Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica od masenog odnosa GA/NČ pri pH = 3 (A), pH = 4 (B) i pH = 5,5 (C).

Pri tome dolazi do povećanog elektrostatičkog odbijanja istoimeno naelektrisanih čestica, što dovodi do delimične deaglomeracije.

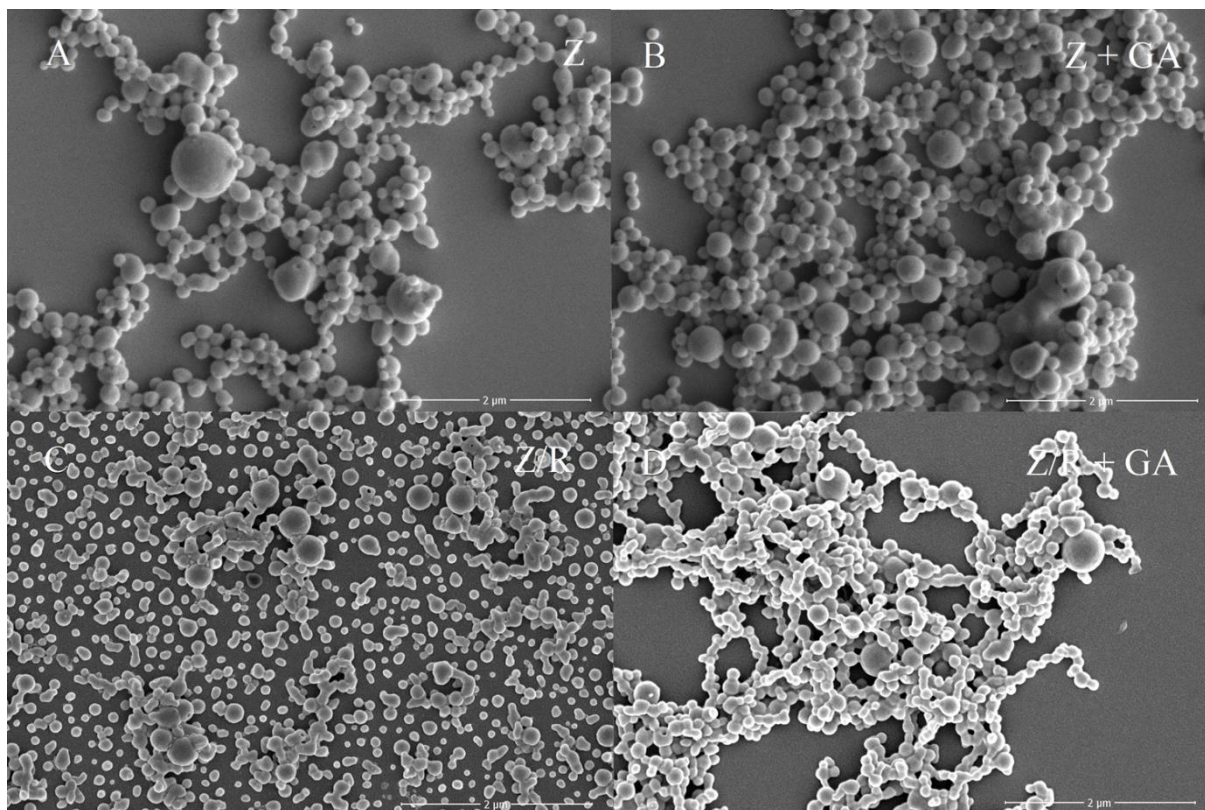
Na Slici 46B prikazana je zavisnost prosečnog prečnika  $Z$  i  $Z/K$  0,8/0,2 nanočestica od masenog odnosa  $GA/NČ$ , pri  $pH = 4$ . Prosečan prečnik  $Z/K$  nanočestica na  $pH = 4$ , pre dodavanja  $GA$  iznosio je približno 170 nm, a nakon dodavanja  $GA$  oko 240 nm (Slika 46B), što ukazuje na to da se molekuli  $GA$  adsorbuju na površinu  $Z/K$  čestica. Navedeni rezultati takođe ukazuju na pojavu bridžing flokulacije, ali u manjoj meri nego na  $pH = 3$ , te se može pretpostaviti da je proces vezivanja molekula  $GA$  na površinu čestica favorizovan, u odnosu na proces agregacije čestica oko molekula  $GA$ .

Zavisnost srednjeg prečnika  $Z$  nanočestica na  $pH = 4$  prikazana je na Slici 46B, a na  $pH = 5,5$ , na Slici 46C. Veličina  $Z$  nanočestica pre dodatka  $GA$  bila je približno 220 nm, kako na  $pH = 4$  (Slika 46B), tako i na  $pH = 5,5$  (Slika 46C). Nakon dodatka  $GA$  veličina  $Z$  čestica na  $pH = 4$  vrednosti bila je oko 320 nm, dok je na  $pH = 5,5$  bila oko 300 nm. Povećanje srednjeg prečnika  $Z$  nanočestica nakon dodatka  $GA$  ukazuje na vezivanje molekula  $GA$  na površinu čestica (Winzen i ostali 2015), ali i pojavu bridžing flokulacije (Loganathan i Sankaran 2021). Može se primetiti da su  $Z$  nanočestice sa  $GA$  na  $pH = 4$  malo veće u odnosu na one pri  $pH = 5,5$ . Navedena razlika se može objasniti time što  $Z$  nanočestice na  $pH = 4$  imaju veće naelektrisanje (Slika 45).

#### 4.2.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Mikrofotografije  $Z$  i  $Z/K$  0,8/0,2 nanočestica, načinjene uz pomoć SEM mikroskopa, prikazane su na Slici 47. Sa Slike 47 se može videti da su zeinske nanočestice (Slika 47A) sfernog oblika i uglavnom uniformne veličine, uz prisustvo nekoliko većih čestica.  $Z$  nanočestice sa dodatkom  $GA$  (Slika 47B) takođe su sfernog oblika i slične veličine kao i  $Z$  nanočestice bez  $GA$ . S druge strane,  $Z/K$  nanočestice (Slika 47C) značajno su sitnije u poređenju sa  $Z$  česticama (Slika 47A) i nepravilnog oblika. Slika 47D prikazuje  $Z/K$  nanočestice sa  $GA$ . Na Slici 47D se može videti da je većina  $Z/K$  čestica nakon dodatka  $GA$  koalescirano, te da formiraju neuređene strukture u vidu lanaca ili nizova.



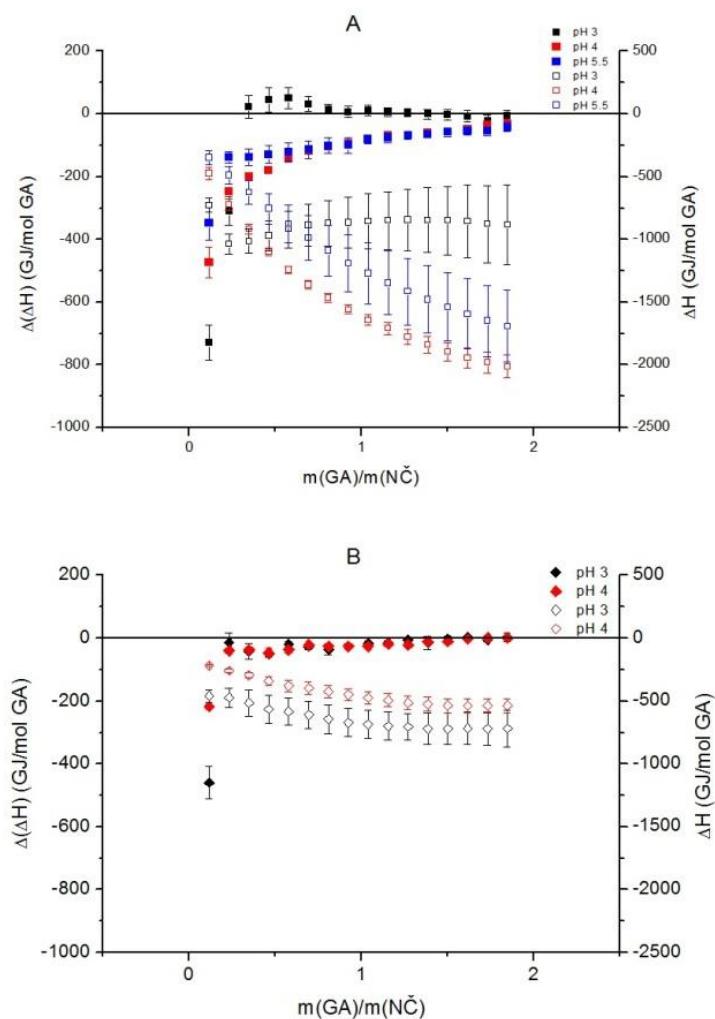


Slika 47. Mikrofotografije Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica, bez (A,C) i sa GA (B,D).

#### 4.2.4. Izotermalna titraciona kalorimetrija

U cilju karakterisanja interakcija zeinskih i kompozitnih nanočestica Z/K 0,8/0,2 sa gumom arabikom, ispitivana je promena entalpije reakcije u toku titracije disperzija nanočestica rastvorom GA. Merenja su rađena na tri različite pH vrednosti (3, 4 i 5,5), na kojima su zeinske nanočestice pozitivno naelektrisane, a GA negativno. Rezultati mikrokolorimetrijskih merenja prikazani su na Slici 48. Na Slici 48A može se videti da, na sve tri pH vrednosti, promena entalpije na početku ima negativan predznak. Najveća promena entalpije uočava se nakon prvog dodatka, a zatim se postepeno smanjuje sa svakim narednim alikvotom rastvora GA. Pri pH = 3, nakon trećeg alikvota entalpija reakcije menja predznak, odnosno ima vrednosti malo veće od 0, nakon čega se ponovo smanjuje težeći nuli. Sa Slike 48A se dalje može videti da na pH = 4 i pH = 5,5 promena entalpije ima negativan predznak pri svim ispitivanim GA/NČ masenim odnosima. Prikazane promene entalpije ukazuju na to da je reakcija između Z nanočestica i GA na pH = 4 i pH = 5,5 egzotermna, a na pH = 3 blago endotermna. Endotermna priroda reakcije na pH = 3 može se povezati sa smanjenjem prosežnog prečnika Z nanočestica na ovoj pH (Slika 46A), s obzirom na to da je deagregacija

proces koji troši energiju. S druge strane, egzotermna priroda reakcije na  $\text{pH} = 4$  i  $\text{pH} = 5,5$  ukazuje na elektrostatičko vezivanje negativno naelektrisanih molekula GA za pozitivno naelektrisane zeinske nanočestice (Liu i sar. 2010, Li i sar. 2012, Huang i Lau 2016). Najveća promena entalpije dešava se prilikom dodatka prvih nekoliko alikvota rastvora GA, kada se molekuli GA adsorbuju na potpuno slobodnu površinu Z nanočestica. Dalji dodatak GA praćen je manjim promenama entalpije, ukazujući na ograničenu adsorpciju molekula GA na površinu nanočestica. Pri dovoljno velikom masenom odnosu GA/NČ, promena entalpije je bliska nuli, što znači da više ne dolazi do adsorbovanja molekula GA na površinu Z nanočestica. Vrednost promene entalpije jednaka nuli na  $\text{pH} = 3$  dostignuta je pri masenom odnosu GA/NČ 0,9, što je značajno manje nego na  $\text{pH} = 4$  i  $\text{pH} = 5,5$ , gde nema promene entalpije tek pri masenom odnosu GA/NČ 1,85. Ova pojava prouzrokovana je smanjenim naelektrisanjem molekula GA na najnižoj ispitivanoj pH.



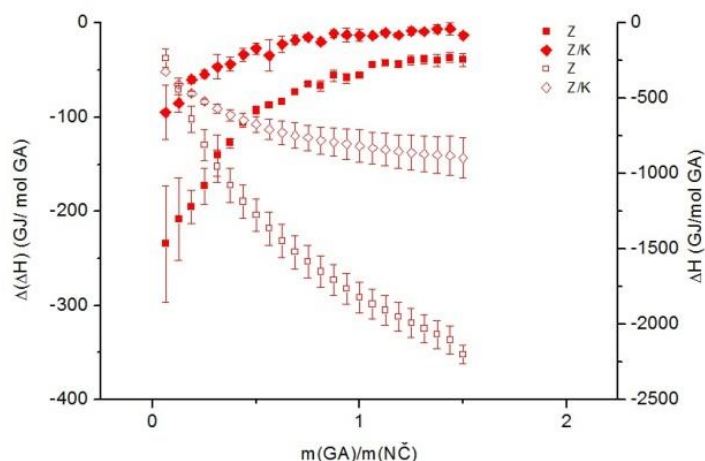
Slika 48. Zavisnost entalpije reakcije Z (A) i Z/K 0,8/0,2 (B) nanočestica sa GA od masenog odnosa GA/NČ, pri različitim pH.

Ukupna promena entalpije (Slika 48A, otvoreni simboli) smanjuje se sa povećanjem masenog odnosa GA/NČ, na sve tri ispitivane pH vrednosti. Do najvećeg opadanja ukupne promene entalpije dolazi na pH = 4, a do najmanjeg na pH = 3, što ukazuje da je interakcija između zeinskih nanočestica i guma arabike najintenzivnija na pH = 4, a najmanje intenzivna na pH = 3.

Slika 48B prikazuje promenu entalpije kao rezultat interakcija između GA molekula i Z/K nanočestica, na pH = 3 i pH = 4. Reakcija je egzotermna na obe ispitivane pH vrednosti, a najveća promena entalpije zabeležena je pri dodatku prvog alikvota rastvora GA u disperziju nanočestica, ukazujući na vezivanje molekula GA na Z/K nanočestice. Dalje dodavanje alikvota rastvora GA ne dovodi do promene entalpije pri dodatku, što ukazuje na zasićenje površine Z/K nanočestica molekulima GA. Ukupna promena entalpije pri dodatku GA u disperziju Z/K nanočestica veća je na pH = 3, nego na pH = 4, što znači da je na pH = 3 adsorbovanje molekula GA na površinu čestica intenzivnije nego na pH = 4.

Poredeći promene entalpije reakcije prikazane na Slici 48A i 48B, može se primetiti da se vrednost promene entalpije reakcije jednaka nuli postiže pri manjem masenom odnosu GA/NČ kod Z/K nanočestica, u odnosu na Z nanočestice. Ova razlika pokazuje da do zasićenja površine Z/K nanočestica dolazi pri manjem masenom odnosu GA/NČ, nego kod Z nanočestica. Do bržeg zasićenja površine Z/K čestica najverovatnije dolazi zbog prisustva negativno naelektrisanih molekula kalafonijuma na površini čestica, koji ometaju vezivanje polianjonskog molekula GA (Baier i ostali 2011).

Početak reakcije, gde su pri manjim masenim odnosima GA/NČ, promene entalpije reakcije najizraženije, detaljnije je ispitivan. Slika 49 prikazuje fine promene entalpije reakcije između Z nanočestica i GA (kvadrati) i Z/K nanočestica i GA (tetraedri) kao funkcije masenog odnosa GA/NČ, na pH = 4. Sa slike se može videti da je promena entalpije po alikvotu, kao i ukupna promena entalpije veća kod Z nanočestica u odnosu na Z/K nanočestice. Ovo je u saglasnosti sa činjenicom da Z nanočestice imaju veću gustinu naelektrisanja (Slika 44) i zeta potencijal (Slika 38A) na ovoj pH, što obezbeđuje veći broj aktivnih mesta za elektrostatičku interakciju između pozitivno naelektrisanih nanočestica i polianjonskog molekula GA. Dodatno, sa Slike 49 se može primetiti da kod Z/K nanočestica, nakon dostizanja vrednosti masenog odnosa GA/NČ od 0,7 nema više promene entalpije reakcije po molu dodate GA, što ukazuje na zasićenje površine nanočestica molekulima GA. U slučaju Z nanočestica, ne dolazi do potpunog zasićenja površine čestica pri ispitivanim masenim odnosima GA/NČ, ali nakon dostizanja masenog odnosa 1, promena entalpije postaje konstantna.



Slika 49. Zavisnost entalpije reakcije Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica sa GA od masenog odnosa GA/NČ, pri pH = 4.

Rezultati ispitivanja interakcija Z i Z/K nanočestica sa gumom arabikom pokazali su da se negativno naelektrisani molekuli GA elektrostatički vezuju za pozitivno naelektrisane nanočestice, pri ispitivanim pH vrednostima. Pri tome dolazi do promene predznaka naelektrisanja nanočestica i do intenzivne bridžing flokulacije, koja je najizraženija pri pH = 3. Reakcija između NČ i GA je egzotermna pri pH = 4 i pH = 5,5, a endotermna pri pH = 3. Od svih ispitivanih pH vrednosti, interakcije između NČ i GA bile su najintenzivnije na pH = 4.

#### 4.3. Nanokapsulacija karvakrola u zeinskim i kompozitnim nanočesticama

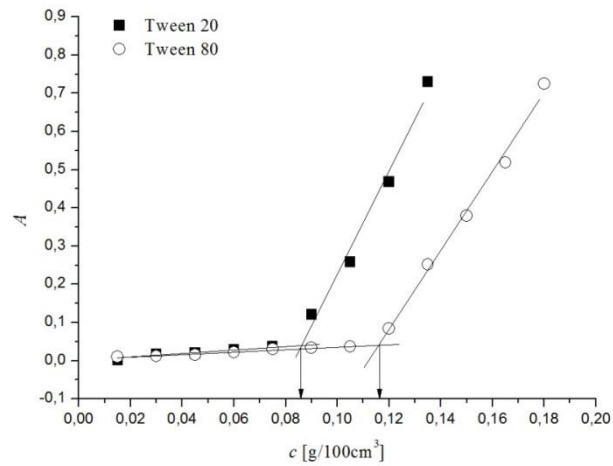
S obzirom na hidrofobnu prirodu zeina, zeinske i kompozitne nanočestice mogu predstavljati veoma pogodan sistem za inkapsulaciju lipofilnih komponenti, kao što su aktivne komponente na bazi ulja, liposolubilni vitamini, hidrofobne farmaceutske komponente i drugo.

Ispitivana je inkapsulacija karvakrola u Z i Z/K nanočesticama, pripremanih sa različitim masenim odnosima zeina i kalafonijuma (1/0; 0,8/0,2; 0,6/0,4 i 0/1). Karvakrol je hidrofobna aktivna materija, nerastvorna u vodi, ali rastvorna u etanolu, što omogućava njegovu inkapsulaciju u nanočesticama na bazi zeina. Međutim, bilo je potrebno ispitati oslobađanje karvakrola iz nanokapsula, ali da pri tom ne dođe do rastvaranja samih kapsula.

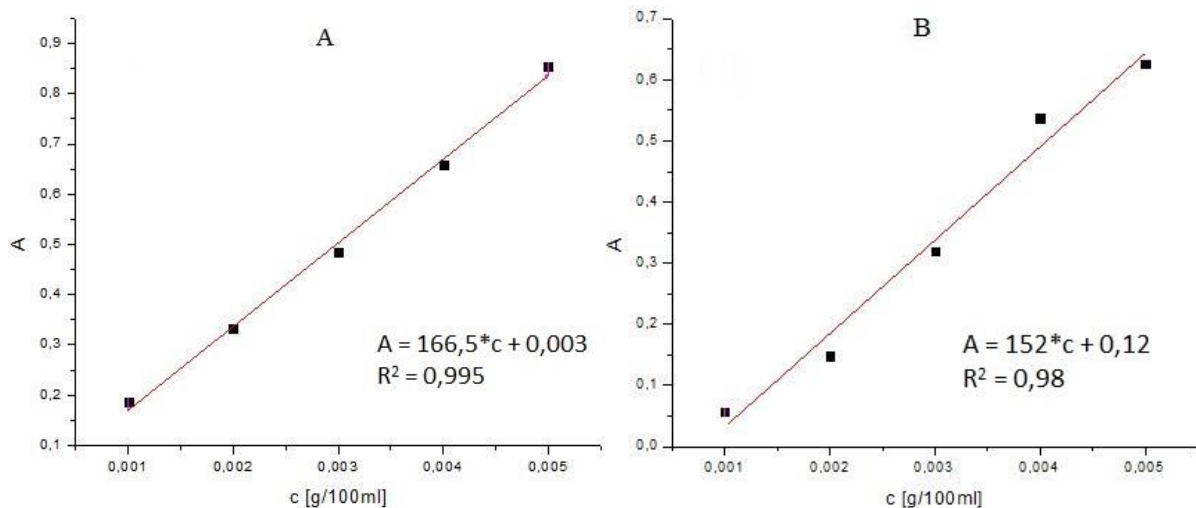
Takođe, većina fizioloških tečnosti predstavljaju vodene sredine, te je ispitivanje otpuštanja karvakrola u vodene medijume jedan od važnih preduslova za njihovu dalju primenu.

U cilju ispitivanja otpuštanja inkapsuliranog karvakrola u vodi, bilo je potrebno identifikovati odgovarajuću metodu. Poznato je da je moguće pospešiti rastvaranje hidrofobnih jedinjenja u vodi uz prisustvo površinski aktivnih materija (PAM) u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije (KMK) (Deng i sar. 2016). Stoga, spektrofotometrijski je ispitivana mogućnost soljubilizacije karvakrola u 1 % vodenim rastvorima *Tween*-a 20 i *Tween*-a 80, kako bi se utvrdila mogućnost primene rastvora *Tween*-a kao prihvatnog medijuma prilikom ispitivanja otpuštanja karvakrola iz Z i Z/R nanočestica.

Zavisnost apsorbance micelarnih rastvora 1 % *Tween*-a 20 i *Tween*-a 80 od koncentracije karvakrola prikazana je na Slici 50. Sa slike se može videti da, pri niskim koncentracijama karvakrola, rastvori ostaju optički transparentni, pri čemu su vrednosti apsorbance za oba rastvora bliske nuli, što ukazuje da je sav prisutan karvakrol soljubilizovan u micelama *Tween*-a. Nakon dostizanja maksimalne koncentracije aditiva (MKA), apsorbance rastvora *Tween*-a naglo raste, sa daljim povećanjem koncentracije karvakrola. Ustanovljeno je da MKA 1 % rastvora *Tween*-a 20 iznosi 0,86 g/l, dok je za *Tween* 80 nešto veća i iznosi 1,16 g/l. Do naglog povećanja apsorbance dolazi usled emulgovanja nesoljubilizovanog karvakrola. Naime, kada je koncentracija karvakrola veća od vrednosti MKA, sve micide *Tween*-a su soljubilizovane i sav naknadno dodat karvakrol biva emulgovan, čime nastaju kapljice. Emulgovane kapljice karvakrola u vodi rasipaju svetlost i smeša postaje zamućena, što posledično dovodi do povećanja apsorbance (Deng i ostali 2016). Dobijene vrednosti MKA pokazale su da 1 % rastvori oba PAM-a mogu da se primene kao prihvatni medijumi za ispitivanje otpuštanja inkapsuliranog karvakrola. Slika 51 prikazuje kalibracione krive za karvakrol u 1% rastvoru *Tween*-a 20 (51A) i 1% rastvoru *Tween*-a 80 (51B). S obzirom na bolji koeficijent korelacije ( $R^2$ ) između vrednosti apsorbance i koncentracije soljubilizovanog karvakrola, u odnosu na koeficijent korelacije u slučaju 1 % rastvora *Tween*-a 80 (Slika 48), 1 % rastvor *Tween*-a 20 je odabran za nastavak eksperimenata.

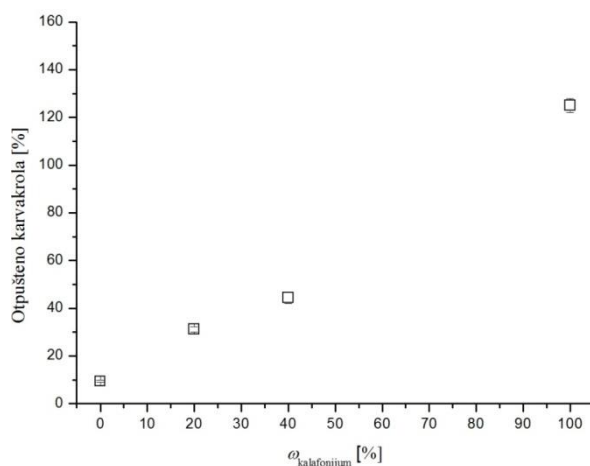


Slika 50. Zavisnost apsorbance micelarnih rastvora 1 % *Tween*-a 20 i *Tween*-a 80 od koncentracije karvakrola.



Slika 51. Kalibraciona kriva za karvakrol u 1% rastvoru *Tween*-a 20 (A) i *Tween*-a 80 (B).

Karvakrol je inkapsuliran u zeinskim i kompozitnim nanočesticama sa različitim Z/K odnosom (0,8/0,2; 0,6/0,4 i 0/1). Slika 52 prikazuje uticaj udela smole u sastavu nanočestica na udeo otpuštenog karvakrola u 1 % rastvoru *Tween*-a 20, nakon 24 h. Sa slike se može videti da sastav nanočestica utiče na udeo otpuštenog karvakrola, te se sa povećanjem udela kalafonijuma otpušta više karvakrola.



Slika 52. Zavisnost udela otpuštenog karvakrola iz nanočestica od udela kalafonijuma u sastavu nanočestica.

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da su zeinske i kompozitne nanočestice zein/kalafonijum pogodne za inkapsulaciju lipofilnih komponenti, kao što je karvakrol. Literaturni podaci navode da je ispitivana inkapsulacija karvakrola u zeinskim nanočesticama, prečnika  $d \approx 300$  nm na  $\text{pH} = 4$  (Lawton 2002), što je dvostruko veće u odnosu na veličinu nanočestica pripremanih u okviru ove disertacije, iz čega sledi da se metodom koprecipitacije, korišćenom u ovoj disertaciji, može unaprediti postupak inkapsulacije aktivnih materija u nanočesticama na bazi zeina.

#### 4.4. Dobijanje i karakterizacija zeinskih filmova

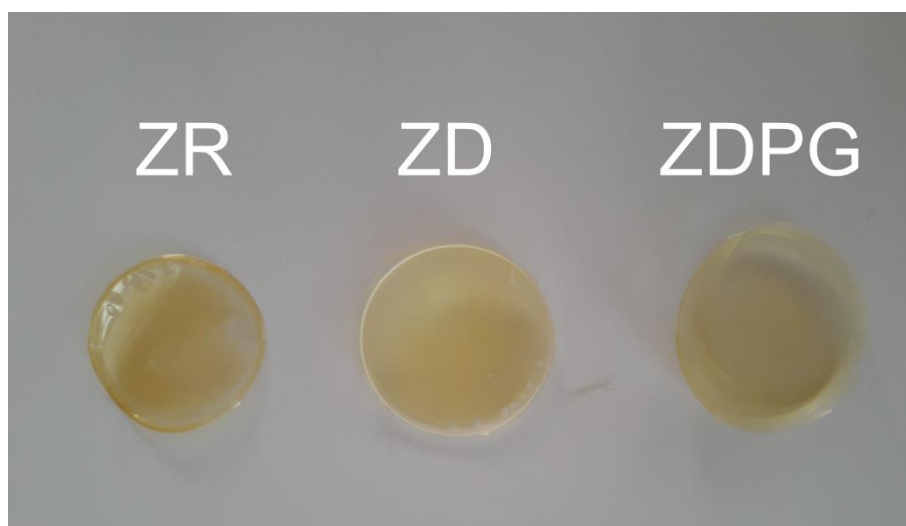
Jestivi barijerni filmovi i premazi, kao alternativa tradicionalnoj ambalaži, sve su prisutniji u prehrambenoj i agroindustriji. Mogu se naći kod pekarskih proizvoda, smrznutih mesnih prerađevina, svežeg voća, kao jestiva ambalaža za konditorske proizvode i slično. Barijerni filmovi i premazi imaju ulogu u sprečavanju apsorpcije ili gubitka vlage iz proizvoda, sprečavanju difuzije gasova poput  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  i etilena, kao i u sprečavanju mikrobiološkog kvarenja proizvoda. Na ovaj način produžava se rok trajanja proizvoda i postiže dugotrajno očuvanje njegove teksture.

Ispitivana je mogućnost pripreme jestivih barijernih filmova iz disperzija nanočestica zeina ( $Z_d$ ), sa dve različite veličine čestica, 90 nm i 180 nm, sa i bez dodatka

propilen–glikola, kao plastifikatora. Takođe, kao referentni, pripremani su filmovi iz rastvora zeina ( $Z_r$ ), sa i bez propilen–glikola. Fotografija dobijenih filmova prikazana je na Slici 53. Na slici se može videti da su i iz rastvora (ZR) i iz disperzija (ZD i ZDPG) dobijeni kontinualni, homogeni filmovi.

$Z_d$  filmovi, pripremani iz 4% m/m suspenzije nanočestica zeina, sušeni su u silikonskim kalupima na 50°C, do potpunog isparavanja vode. Kako voda u toku sušenja postepeno isparava, dolazi do koncentrovanja suspenzije, usled čega čestice unutar suspenzije postaju zbijenije i raspoređene na sve manjem prostoru. Kada sadržaj vode postane dovoljno mali, čestice se deformišu usled zbijenosti, a zatim koalesciraju formirajući film (Winnik 1997, Steward i ostali 2000b). Ovaj efekat potvrđuju i mikrofotografije nanočestica (Slika 47), gde se vidi da je došlo do delimične koalescencije zeinskih čestica, prilikom pripreme uzoraka za SEM analizu, odnosno u toku sušenja disperzija nanočestica na staklenim mikroskopskim predmetnicama.

Prosečna debljina zeinskih filmova dobijenih iz disperzije, ZDNČ180, ZDPGNČ180, ZDNČ90 i ZDPGNČ90, bila je  $72,6 \pm 29,28 \mu\text{m}$ ,  $68,6 \pm 18,23 \mu\text{m}$ ,  $75,6 \pm 24,39 \mu\text{m}$ , and  $59,9 \pm 17,14 \mu\text{m}$ , respektivno, dok je debljina filmova dobijenih iz rastvora, ZR i ZRPG, bila  $84,6 \pm 14,07 \mu\text{m}$  and  $84,9 \pm 11,93 \mu\text{m}$ , respektivno.

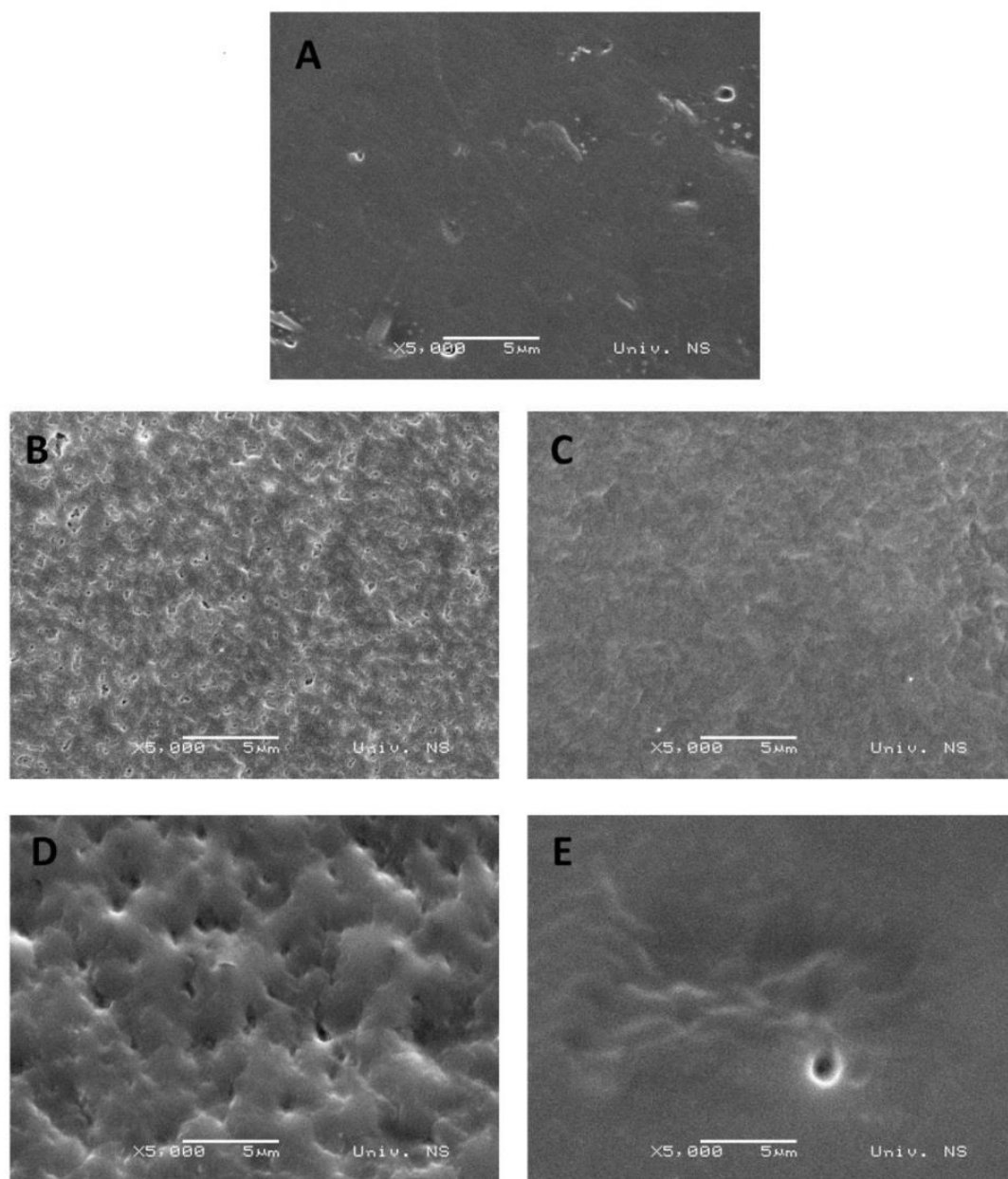


Slika 53. Fotografija zeinskih filmova pripremljenih iz rastvora zeina i disperzija nanočestica zeina.



#### 4.4.1. Morfološke osobine

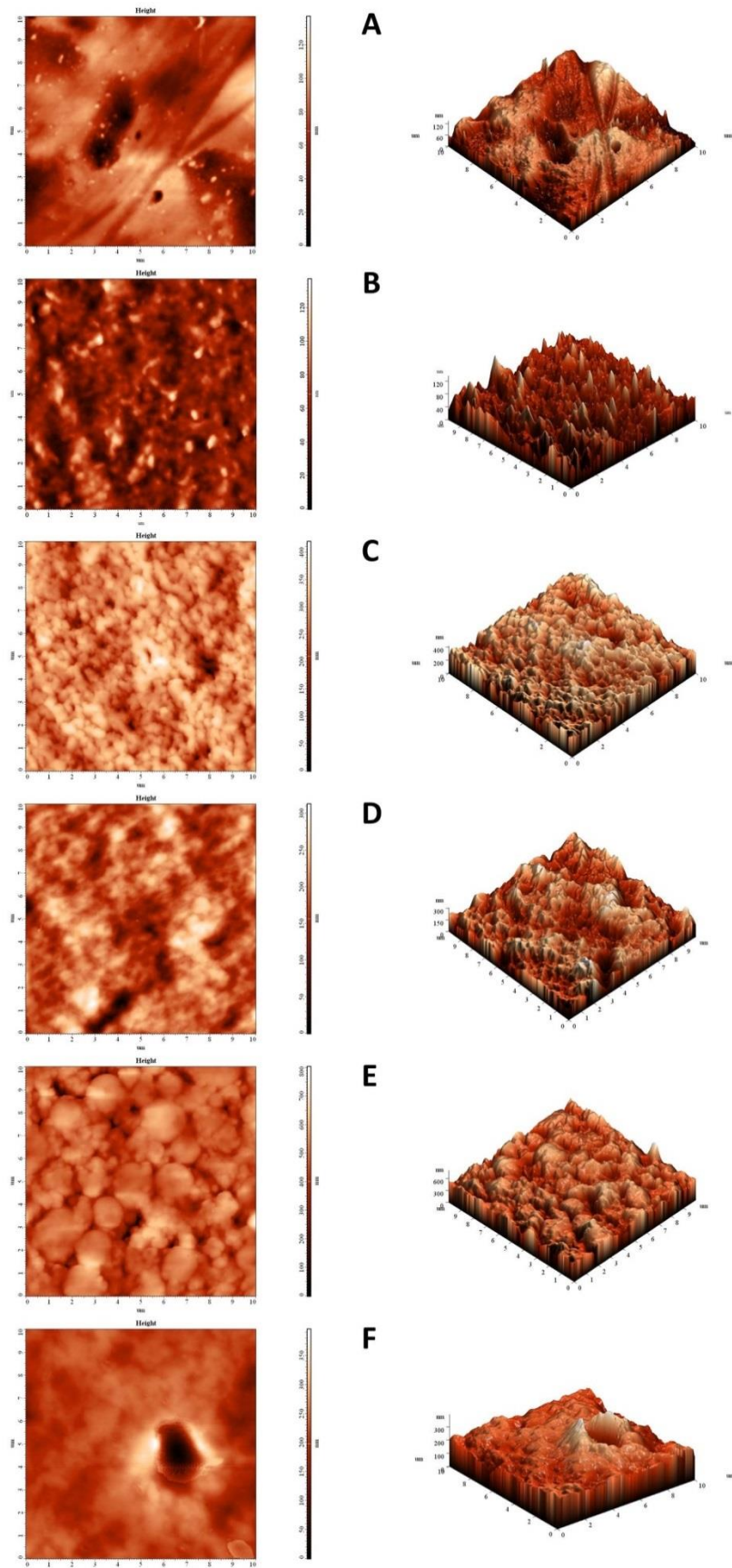
Na Slici 54 prikazane su mikrofotografije osušenih  $Z_d$  i  $Z_r$  filmova snimljene pomoću elektronskog mikroskopa.



Slika 54. SEM mikrofotografije ZR (A), ZDNČ90 (B), ZDPGNČ90 (C), ZDNČ180 (D) i ZDPGNČ180 (E) filmova.

Sa Slike 54 se može jasno videti da se morfologija ZDNČ90 i ZDNČ180 (slika 54B i 54D) veoma razlikuje u odnosu na morfologiju ZR filмова (Slika 54A). Površina  $Z_r$  filma je skoro potpuno glatka, dok navedeni  $Z_d$  filmovi imaju jasno izraženu zrnastu strukturu površine, koja je izraženija što su čestice krupnije. Takođe,  $Z_d$  filmovi su bili znatno krtiji u poređenju sa filmovima dobijenim iz zeinskog rastvora. Krtost  $Z_d$  filмова značajno je smanjena dodatkom propilen–glikola u suspenzije, pre sušenja. Osim na krtost, propilen–glikol ima veliki uticaj i na morfologiju zeinskih filмова. Izraženost zrnaste strukture  $Z_d$  značajno opada sa dodatkom propilen–glikola, nezavisno od veličine čestica, što se može zaključiti iz poređenja slike 54B i 54C i slike 54D i 54E. Ovaj efekat je najizraženiji kod filмова dobijenih od nanočestica sa prečnikom 180 nm (slika 54E), gde se zrnasta struktura skoro potpuno izgubila, u odnosu na film bez propilen–glikola (slika 54D).

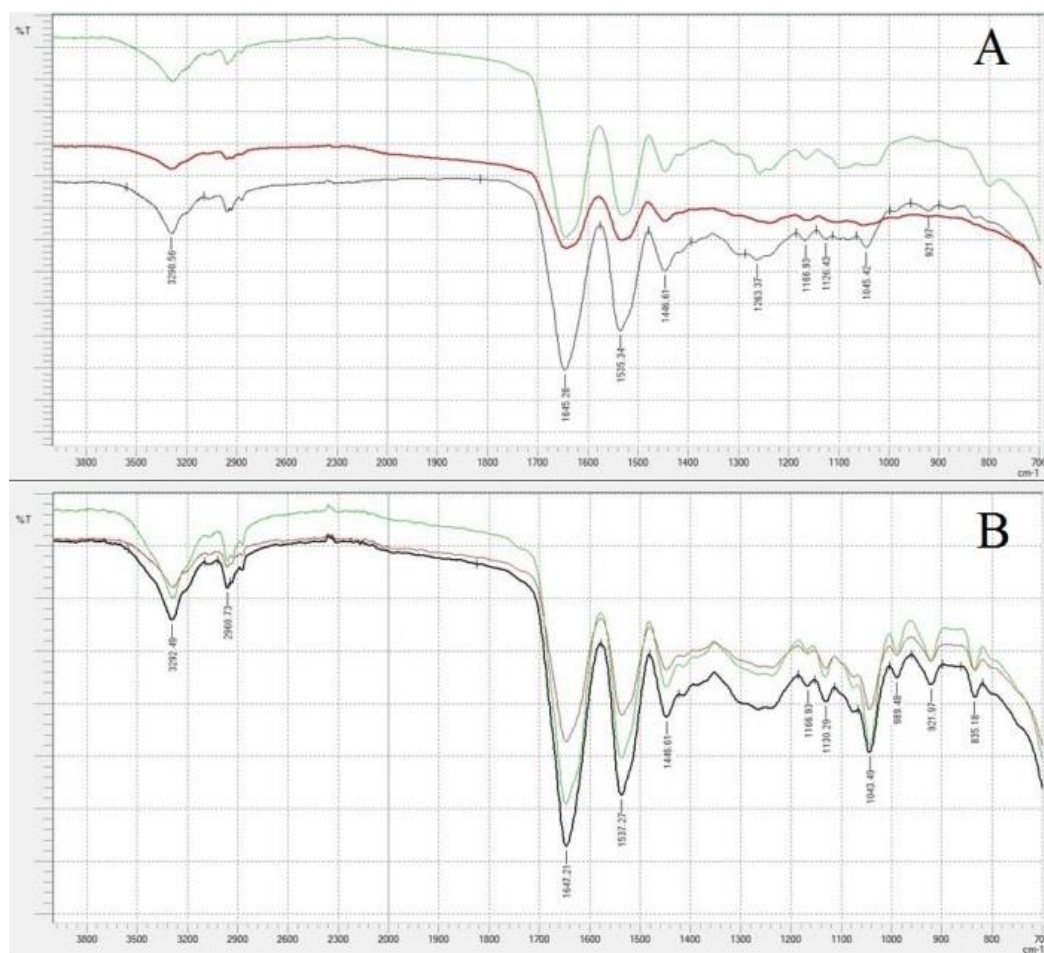
Topologija i hrapavost površine zeinskih filмова ispitivana je pomoću mikroskopije atomskih sila (eng. *atomic force microscopy* – AFM). Izgled i topografski profili površine ZR, ZRPG, ZDNČ90, ZDPGNČ90, ZDNČ180 i ZDPGNČ180 filмова prikazani su na Slici 55. Izmerena prosečna hrapavost,  $S_a$ , ZR, ZRPG, ZDNČ90, ZDPGNČ90, ZDNČ180 i ZDPGNČ180 filмова iznosila je 15,2 nm, 19,7 nm, 36,4 nm, 32,2 nm, 57,1 nm i 27,5 nm, respektivno. AFM analiza  $Z_r$  i  $Z_d$  filмова pokazala je da je površina  $Z_d$  filмова hrapavija od površine  $Z_r$  filмова, nezavisno od prisustva propilen–glikola. Takođe, kod  $Z_d$  filмова u koje nije dodavan PG, površina je hrapavija što su čestice krupnije. Razlog tome je što smanjenje veličine čestica dovodi do povećanja Laplasovog pritiska, kao i do povećanja površinske energije, što pospešuje koalescenciju i formiranje glatkih filмова (Keddie i Routh, 2010). AFM analizom utvrđeno je takođe da dodatak PG utiče na smanjenje hrapavosti  $Z_d$  filмова, što ukazuje na poboljšanje procesa koalescencije nanočestica zeina tokom formiranja filma. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima koje su objavili Keddie i Routh (2010), gde je pokazano da dodatak plastifikatora u polimerni lateks utiče na smanjenje visine pikova na topografskom profilu filмова. Uticaj PG na hrapavost površine filмова izraženiji je kod filмова pripremljenih iz suspenzija sa krupnijim nanočesticama, odnosno u većoj meri je smanjena hrapavost NČ180 filмова u odnosu na NČ90 filmove, što se može videti sa Slike 55 i iz rezultata merenja prosečne hrapavosti,  $S_a$ . S druge strane, nakon dodatka PG primećeno je blago povećanje hrapavosti površine  $Z_s$  filмова, sa 15,2 nm koliko je hrapavost ZS filma, na 19,7 nm za ZSPG film. Isti efekat prikazan je i od strane Gezer i sar. (2015) na primeru oleinske kiseline kao plastifikatora za zeinske filmove dobijene iz rastvora zeina.



Slika 55. AFM fotografije ZR (A), ZRPG (B), ZDNČ90 (C), ZDPGNČ90 (D), ZDNČ180 (E) i ZDPGNČ180 (F) filmova.

#### 4.4.2. FTIR spektroskopija

FTIR spektri zeinskih filmova, dobijenih iz rastvora i iz disperzije nanočestica prikazani su na Slici 56. Na slici se može videti da spektri i  $Z_r$  i  $Z_d$  filmova imaju karakteristične pikove na  $3390\text{ cm}^{-1}$ ,  $2960\text{ cm}^{-1}$ ,  $1643\text{ cm}^{-1}$  i  $1533\text{ cm}^{-1}$ , koji redom ukazuju na prisustvo hidroksilne, amidne A0, amidne I i amidne II funkcionalne grupe (Slika 56A). Navedeni pikovi su karakteristični za spektre proteina (Müller i sar. 2011, Corradini i sar. 2014, Cao i sar. 2017). Isti pikovi prisutni su i na spektrima zeinskih filmova sa PG (Slika 56B), zajedno sa pikom na  $1040\text{ cm}^{-1}$ , koji je karakterističan za  $-\text{C}-\text{OH}$  funkcionalnu grupu propilen-glikola (Suganthi i sar. 2013). Sa Slike 56, može se primetiti da su pikovi oko  $1640\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$  na spektrima ZR i ZRPG simetrični. Ovi pikovi ukazuju na prisustvo nasumičnih zavojnica u sekundarnoj strukturi molekula zeina (Turasan i Kokini 2017).



Slika 56. FTIR spektri zeinskih filmova bez PG (A) i sa PG (B); ZR – crno, ZDNČ90 – zeleno i ZDNČ180 – crveno.

Na spektrima  $Z_d$  filmova, sa i bez PG, ovi pikovi su asimetrični, odnosno imaju proširenje u vidu „ramena“ na  $1620\text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje na prisustvo  $\beta$ -ravni u sekundarnoj strukturi zeina, čiji pikovi se uobičajeno javljaju na  $1610\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$  (Forato i ostali 2003, Turasan i Kokini 2017). Na osnovu rezultata dobijenih FTIR analizom može se pretpostaviti da je kod  $Z_d$  filmova veće prisustvo  $\beta$ -ravni povećano u odnosu na  $Z_r$  filmove, što ukazuje na uređeniju sekundarnu strukturu.

#### 4.4.3. Barijerna svojstva

Sposobnosti apsorpcije vlage, rastvorljivosti u vodi i propustljivosti vodene pare za filmove izlivenne iz disperzija sa različitom veličinom čestica, sa i bez propilen-glikola, određene su i upoređene sa osobinama zeinskih filmova pripremljenih izlivanjem iz rastvora zeina, Slika 57.

Svi ispitivani filmovi su, u ispitivanim uslovima, apsorbovali manje od 8% vlage (Slika 57A). Sa slike se može videti da nije bilo statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u udelu apsorbovane vlage između  $Z_d$  i  $Z_r$  filmova, bez plastifikatora. Takođe, udeo apsorbovane vlage kod  $Z_d$  filmova se ne menja značajno sa dodatkom plastifikatora. Međutim, ipak se može primetiti blago povećanje udela apsorbovane vlage kod  $Z_d$  filmova pripremljenih iz suspenzije sa plastifikatorom, koji se može pripisati higroskopnim osobinama propilen-glikola. Veličina čestica nije uticala na apsorpciju vlage  $Z_d$  filmova. Značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u udelu apsorbovane vlage primećena je jedino između ZR i ZRPG filmova, koje je posledica higroskopnih karakteristika propilen-glikola.

Rastvorljivost i  $Z_r$  i  $Z_d$  filmova u vodi bila je ispod 5% (Slika 57B) što je u saglasnosti sa literaturnim podacima i potiče pre svega od prisustva polarnih grupa u molekulima zeina (Zhang i sar. 2011). Na Slici 57B se može videti da ne postoji značajna razlika u rastvorljivosti  $Z_r$  i  $Z_d$  filmova, nezavisno od veličine nanočestica zeina. Rastvorljivost ZRPG i ZDPG filmova u vodi bila je veća u odnosu na rastvorljivost ZR i ZD filmova, zbog prisustva PG, koji se veoma dobro rastvara u vodi. U ispitivanim uslovima nije došlo do raspadanja nijednog od testiranih filmova.

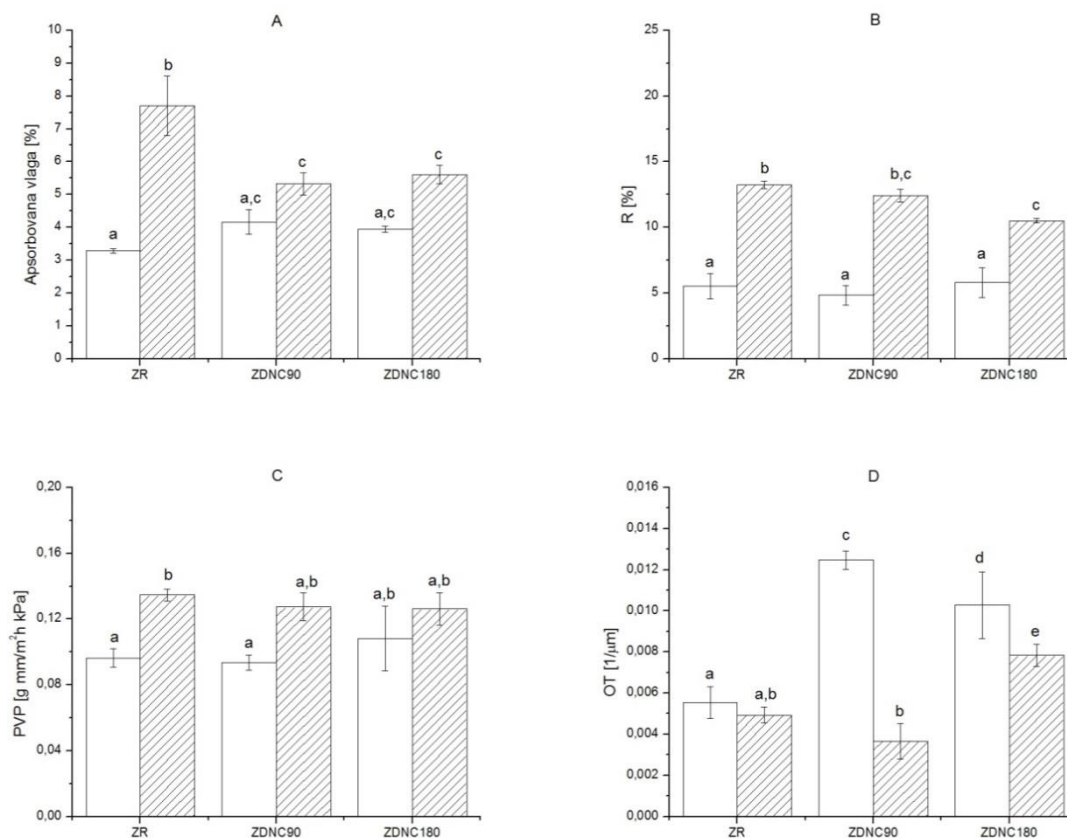
Propustljivost vodene pare (PVP) se nije značajno razlikovala ( $p < 0,05$ ) za ZR, ZD i ZDPG filmove, nezavisno od veličine čestica (Slika 57C). Ipak, blago povećanje PVP nakon dodatka PG se može primetiti i kod  $Z_r$  i kod  $Z_d$  filmova. Povećanje PVP najverovatnije je posledica higroskopnih osobina PG, koje uslovljavaju veću apsorpciju vlage i bubrenje

filmova, pa samim tim i povećanje PVP. Literaturni podaci pokazuju sličan efekat i prilikom korišćenja glicerola kao plastifikatora za filmove zeina (Ghanbarzadeh i Oromiehi 2008, Tihminlioglu i ostali 2010).

U poređenju sa drugim filmovima na bazi zeina, filmovi pripremani u okviru ove disertacije imaju slična ili bolja barijerna svojstva. Tako Ghanbarzadeh i sar. (2007) navode da zeinski filmovi sa i bez dodatka šećera kao plastifikatora imaju PVP 1,5 – 2,5 gmm/kPa  $\text{hm}^2$ , što je za red veličina veće od PVP nego kod filmova pripremanih iz disperzije nanočestica zeina. PVP zeinskih filmova pripremanih iz disperzije nanočestica zeina takođe je manja od PVP hitozanskih filmova (Escamilla-García i sar. 2013), filmova na bazi skroba (Schmidt i sar. 2013) i filmova na bazi proteina surutke (Ghanbarzadeh i Oromiehi 2008). Filmovi pripremani sa PG imali su približno istu rastvorljivost i PVP, kao zeinski filmovi sa dodatkom oleinske kiseline i tretirani galnom kiselinom (Masamba i sar. 2016).

#### 4.4.4. Optičke osobine

Optička zamućenost i boja ZR, ZRPG, ZD i ZDPG filmova sa različitom veličinom čestica prikazani su na Slici 57D i Tabeli 8. Sa Slike 57D može se videti da postoji značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u zamućenosti između svih ispitivanih filmova. Optička zamućenost filmova izlivenih iz disperzija polimernih nanočestica primarno zavisi od hrapavosti površine filma i broja vazdušnih mehurova, nastalih u toku sušenja. Pri tome, vazdušni mehurovi odgovarajuće veličine rasipaju svetlosne zrake vidljivog dela spektra, te zbog toga filmovi dobijeni sušenjem disperzija imaju zamućen izgled (Van Tent i Te Nijenhuis 2000). Mikroskopska SEM i AFM analiza, Slike 54 i 55, jasno pokazuju da je površina  $Z_d$  filmova znatno hrapavija od površine  $Z_r$  filmova, što utiče i na to da  $Z_d$  filmovi budu optički manje transparentni od  $Z_r$  filmova. Osim toga, na Slici 57D, može se videti i da dodatak plastifikatora utiče na povećanje transparentnosti filmova, što takođe odgovara rezultatima SEM i AFM analize, gde se može videti da ZDPG filmovi imaju manje hrapavu površinu u odnosu na ZD filmove. Rezultati su pokazali da je uticaj plastifikatora na povećanje transparentnosti veći, kada su čestice sitnije, pa tako nema značajne razlike u optičkoj zamućenosti ZRPG i ZDPGNČ90 filmova. Takođe, nema statistički značajne razlike u zamućenosti kod ZR i ZRPG filmova.



Slika 57. Apsorbovana vlaga (A), rastvorljivost (B), PVP (C) i zamućenost (D) zeinskih filmova izlivenih iz etanolnog rastvora zeina (ZR) i vodenih disperzija zeina (ZD), bez PG (beli stubići) i sa PG (šrafirani stubići).

Vrednosti CIE koordinata ( $L^*$ ;  $a^*$ ;  $b^*$ ), ukupne razlike boje ( $\Delta E^*$ ) i indeksa žute (YI) za zeinske filmove izlivenne iz etanolnog rastvora i iz disperzija nanočestica sa različitom veličinom čestica (NČ180 i NČ90), sa i bez propilen–glikola, ZR, ZD, ZRPG i ZDPG, respektivno, prikazani su u Tabeli 8. Iz tabele se može videti da postoji značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u vrednostima parametra  $L^*$  između ZR, ZRPG, ZD i ZDPG filmova, te da udeo bele u boji filmova raste po redosledu  $ZR < ZRPG < ZDPG < ZD$ . Udeo bele u boji ZDNC90 filma bio je nešto veći nego kod ZDNC180 filma. Vrednosti parametra  $a^*$  bile su bliske nuli kod svih ispitivanih filmova, što ukazuje na veoma mali udeo crvene, odnosno zelene boje u boji filmova (Tabela 8). Pozitivne vrednosti parametra  $b^*$  kod svih ispitivanih filmova ukazuje na to da u boji filmova preovlađuje žuta, što je i tipično za zeinske filmove. Najmanji udeo žute registrovan je kod ZDPG filmova, nezavisno on veličine čestica. Ukupna razlika boje,  $\Delta E$ , zeinskih filmova računata je u odnosu na idealno transparentan film ( $L^* = 0$ ,  $a^* = 0$ ,  $b^* = 0$ ). U Tabeli 8 se može videti da nema značajne razlike u vrednostima  $\Delta E$  kada su u pitanju ZR,

ZRPG i ZDPG filmovi, dok ZD filmovi imaju veće vrednosti  $\Delta E$  u odnosu na ostale uzorke. Vrednosti indeksa žute, YI, takođe su prikazani u Tabeli 8. Iz tabele se može primetiti da je vrednost YI najveća kod ZR filma, dok između ostalih filmova nema značajne razlike ( $p < 0,05$ ).

Tabela 8. Vrednosti CIE koordinata ( $L^*$ ;  $a^*$ ;  $b^*$ ), ukupne razlike boje ( $\Delta E^*$ ) i indeksa žute (YI) za zeinske filmove izlivenne iz etanolnog rastvora i iz disperzija nanočestica sa različitom veličinom čestica (NČ180 i NČ90), sa i bez propilen–glikola, ZR, ZD, ZRPG i ZDPG, respektivno. Između vrednosti, u okviru jedne kolone, označenih različitim slovima, postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ), ustanovljena analizom varijanse i Tukey testom.

Film	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	YI
ZR	63.05±1.22 <sup>a</sup>	2.44±1.46 <sup>a</sup>	37.38±4.34 <sup>a,b</sup>	73.47±1.70 <sup>a</sup>	80.21±6.67 <sup>a</sup>
ZDNČ90	79.07±2.84 <sup>b</sup>	-0.40±0.99 <sup>b</sup>	40.33±4.15 <sup>a</sup>	88.90±1.30 <sup>b</sup>	70.09±7.39 <sup>b</sup>
ZDNČ180	74.48±4,68 <sup>c</sup>	-0,95±1.29 <sup>b,c</sup>	40.26±4.92 <sup>a</sup>	84.81±4.85 <sup>c</sup>	71.95±7.63 <sup>a,b</sup>
ZRPG	66.90±1.86 <sup>d</sup>	-0.97±0.37 <sup>b,c</sup>	35.73±4.15 <sup>a,b</sup>	75.93±3.03 <sup>a</sup>	70.42±6.08 <sup>b</sup>
ZDPGNČ90	67.62±2.20 <sup>d</sup>	-0.95±0.52 <sup>b,c</sup>	33.91±3.57 <sup>b</sup>	75.72±2.59 <sup>a</sup>	61.05±5.74 <sup>b</sup>
ZDPGNČ180	65.48±1.11 <sup>a,d</sup>	-1.91±0.73 <sup>c</sup>	32.00±2.42 <sup>b</sup>	72.95±1.27 <sup>a</sup>	64.51±4.56 <sup>b</sup>

#### 4.4.5. Mehanička svojstva

Zatezna čvrstoća, elongacija pri kidanju i Jangov modul elastičnosti  $Z_r$  i  $Z_d$  filmova prikazani su u Tabeli 9. Statistička analiza pokazala je da ne postoji značajna razlika u mehaničkim svojstvima između filmova izlivenih iz disperzija nanočestica i filmova izlivenih iz etanolnog rastvora zeina (Tabela 9). Jedino je elongacija pri kidanju ZDPGNČ180 filma bila veća u odnosu na ostale uzorke. Rezultati ispitivanja mehaničkih svojstava zeinskih filmova ukazuju na to da su i  $Z_r$  i  $Z_d$  jednako dobro formirani, te da su njihove mehaničke osobine uporedive se osobinama drugih zeinskih filmova pripremljenih na sličan način (Guo i ostali 2008, Arcan i Yemenicioğlu 2013).



Tabela 9. Mehanička svojstva zeinskih filmova izlivenih iz etanolnog rastvora i iz disperzija nanočestica sa različitim veličinom čestica (NČ180 i NČ90), sa i bez propilen–glikola, ZR, ZD, ZRPG i ZDPG, respektivno. Između vrednosti, u okviru jedne kolone, označenih različitim slovima, postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ), ustanovljena analizom varijanse i *Tukey* testom.

<b>Film</b>	<b>Zatezna čvrstoća [MPa]</b>	<b>Elongacija pri kidanju [%]</b>	<b>Jangov modul elastičnosti [MPa]</b>
<b>ZR</b>	16.07±2.31 <sup>a</sup>	1.83±0.02 <sup>a</sup>	876.23±116.89 <sup>a</sup>
<b>ZRPG</b>	11.44±1.15 <sup>a</sup>	2.05±0.10 <sup>a</sup>	465.74±35.02 <sup>a</sup>
<b>ZDNČ90</b>	10.83±0.54 <sup>a</sup>	2.23±0.11 <sup>a</sup>	485.71±24.29 <sup>a</sup>
<b>ZDPGNČ90</b>	12.62±1.85 <sup>a</sup>	6.40±0.65 <sup>a</sup>	215.27±25.94 <sup>a</sup>
<b>ZDNČ180</b>	6.29±2.29 <sup>a</sup>	1.99±1.56 <sup>a</sup>	590.13±348.72 <sup>a</sup>
<b>ZDPGNČ180</b>	12.05±0.42 <sup>a</sup>	13.08±2.03 <sup>b</sup>	189.53±4.21 <sup>a</sup>

## 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove disertacije pripremljene su i okarakterisane nanočestice zeina, kao i kompozitne nanočestice zein/šelak i zein/kalafonijum, dobijene metodom precipitacije u nerastvaraču, uz poseban akcenat na njihove interakcije sa prirodnim polielektrolitima, što ovoj disertaciji daje posebnu vrednost, budući da su ispitivanja interakcija biopolimernih nanočestica sa prirodnim polielektrolitima rađena po prvi put. Takođe, ispitivana je mogućnost inkapsulacije lipofilne aktivne materije u zein i zein/kalafonijum nanočesticama. Osim toga, pripremani su filmovi zeina iz vodenih disperzija nanočestica zeina, sa i bez dodatka plastifikatora, što takođe doprinosi originalnosti ove disertacije, s obzirom da se radi o novoj metodi, kada je reč o prehrambenim sistemima, u kojoj se ne koristi etanol za pripremu zeinskih filmova. Ispitivane su barijerne i mehaničke osobine tako dobijenih filmova i upoređivane sa filmovima dobijenim iz etanolnog rastvora zeina.

Na osnovu rezultata ispitivanja izvedeni su sledeći zaključci:

- 1) Ispitivanjem uticaja koncentracije osnovnog rastvora zeina na veličinu dobijenih nanočestica pokazano je da povećanje  $C_z$  od 0,5 % do 10 % zeina u 90% etanolu, na sobnoj temperaturi, dovodi do linearnog povećanja prečnika nanočestica od 80 nm do 180 nm, koje je definisano funkcijom  $d = 11,43 \cdot C_z + 70,88$ .

- 2) Ispitivanjem zavisnosti pH vrednosti disperzije nanočestica zeina od koncentracije nanočestica u disperziji utvrđeno je da pH vrednost sveže pripremljenih disperzija nanočestica zeina ne zavisi od koncentracije zeina, u opsegu koncentracije 1 – 2 % zeina u disperziji, gde je vrednost  $\text{pH} \approx 4$ , dok pri koncentraciji zeina  $< 1\%$  dolazi do blagog povećanja pH vrednosti.
- 3) Pokazano je da do gravitacione nestabilnosti sveže pripremljenih suspenzija dolazi tek posle nekoliko dana, pri čemu se nastali talog lako redispersuje.
- 4) Utvrđeno je da je izoelektrična tačka nanočestica zeina na  $\text{pH} = 6,2$ , nanočestica šelaka na  $\text{pH} = 3$ , a nanočestica kalafonijuma na  $\text{pH} = 2$ .
- 5) Merenjem srednjeg prečnika nanočestica pokazano je da su se najmanje zeinske čestice,  $d \approx 100$  nm, obrazovale pri najnižim i najvišim ispitivanim pH vrednostima,  $\text{pH} = 3$ ,  $\text{pH} = 4$ ,  $\text{pH} = 9$  i  $\text{pH} = 10$ . Srednji prečnik nanočestica je utoliko veći, što je pH vrednost bliža vrednosti IET ( $\text{pI} = 6,2$ ). U skladu s tim, najveći srednji prečnik imaju nanočestice na  $\text{pH} = 7$ , gde je  $d > 300$  nm, dok je na  $\text{pH} = 6$  došlo do potpune precipitacije nanočestica. Raspodela veličina nanočestica zeina je monomodalna i simetrična na svim pH vrednostima.
- 6) Stabilne disperzije nanočestica šelaka obrazovane su na  $\text{pH} = 4 - 9$ , dok su disperzije nanočestica kalafonijuma bile stabilne na  $\text{pH} = 3 - 8$ , pri čemu su i nanočestice šelaka i nanočestice kalafonijuma negativno naelektrisane na svim ispitivanim pH vrednostima. Šelak i kalafonijum se rastvaraju na višim pH vrednostima, tačnije na  $\text{pH} > 9$  za šelak i  $\text{pH} > 8$  za kalafonijum.
- 7) pH vrednost disperzije ne utiče na veličinu nanočestica šelaka, čiji je srednji prečnik iznosio približno 100 nm, na svim ispitivanim pH vrednostima. S druge strane, pH vrednost ima veliki uticaj na veličinu nanočestica kalafonijuma, čiji je prečnik bio najveći na  $\text{pH} = 3$ , a potom s smanjivao sa povećanjem pH. Raspodela veličina nanočestica šelaka simetrična je i monomodalna na svim ispitivanim pH vrednostima. Raspodela veličina čestica kalafonijuma je monodalna na svim ispitivanim pH vrednostima.
- 8) Kompozitne nanočestice zein/šelak (Z/Š) sa masenim odnosom Z/Š 1/0, Z/Š 0,8/0,2 i Z/Š 0,5/0,5 su pozitivno naelektrisane pri kiselim pH vrednostima, a negativno pri neutralnim i baznim uslovima. IET Z/Š nanočestica opada sa povećanjem udela šelaka.

- 9) Kompozitne nanočestice zein/kalafonijum sa masenim odnosima Z/K 1/0, 0,8/0,2 i 0,4/0,6 su pozitivno naelektrisane na  $\text{pH} = 3 - 5$ , a negativno na  $\text{pH} \geq 7$ . IET Z/K nanočestica opada sa povećanjem udela kalafonijuma. Sve pripremljene Z/K nanočestice su nanometarskih veličina, pri čemu je pokazano da su kompozitne nanočestice (Z/K 0,8/0,2 i Z/K 0,4/0,6) značajno sitnije od nanočestica pripremljenih samo od kalafonijuma, Z/K 0/1.
- 10) Merenjem površinske gustine naelektrisanja pokazano je da su Z nanočestice pozitivno naelektrisane na  $\text{pH} = 3 - 5$ , a negativno na  $\text{pH} = 7 - 9$ . Z/K 0,8/0,2 nanočestice su pozitivno naelektrisanje na  $\text{pH} = 3 - 4$ , a negativno na  $\text{pH} > 5$ . Rezultati merenja površinske gustine naelektrisanja odgovaraju rezultatima merenja zeta potencijala nanočestica.
- 11) Mikrofotografije Z i Z/K 0,8/0,2 nanočestica pokazuju da su zeinske nanočestice sfernog oblika, kao i Z nanočestice sa GA. S druge strane, Z/K nanočestice su nepravilnog oblika. Većina Z/K čestica, nakon dodatka GA, je koalescirano, te formiraju neuređene strukture u vidu lanaca ili nizova.
- 12) Utvrđeno je da je adsorpcija GA na površinu nanočestica egzoterman proces pri  $\text{pH} = 4$  i  $\text{pH} = 5,5$ , a blago endoterman pri  $\text{pH} = 3$ . Najintenzivnije interakcije su pri  $\text{pH} = 4$ . Kod Z/K nanočestica, nakon dostizanja vrednosti masenog odnosa GA/NČ od 0,7 nema više promene entalpije reakcije po molu dodate GA, što ukazuje na zasićenje površine nanočestica molekulima GA. U slučaju Z nanočestica, ne dolazi do potpunog zasićenja površine čestica pri ispitivanim masenim odnosima GA/NČ, ali nakon dostizanja masenog odnosa 1, promena entalpije postaje konstantna.
- 13) Karvakrol je inkapsulran u zeinskim i kompozitnim nanočesticama sa različitim Z/K odnosom (0,8/0,2; 0,6/0,4 i 0/1). Pokazano je da sastav nanočestica utiče na udeo otpuštenog karvarola, te da se sa povećanjem udela kalafonijuma otpušta više karvakrola, u toku 24 h.
- 14) Ispitivana je mogućnost pripreme jestivih barijernih filmova iz disperzija nanočestica zeina ( $Z_d$ ), sa dve različite veličine čestica, 90 nm i 180 nm, sa i bez dodatka propilen–glikola, kao plastifikatora. Prosečna debljina zeinskih filmova dobijenih iz disperzije, ZDNČ180, ZDPGNČ180, ZDNČ90 i ZDPGNČ90, bila je  $72,6 \pm 29,28 \mu\text{m}$ ,  $68,6 \pm 18,23 \mu\text{m}$ ,  $75,6 \pm 24,39 \mu\text{m}$ , and  $59,9 \pm 17,14 \mu\text{m}$ , respektivno,

- dok je debljina filmova dobijenih iz rastvora, ZR i ZRPG, bila  $84,6 \pm 14,07 \mu\text{m}$  and  $84,9 \pm 11,93 \mu\text{m}$ , respektivno.
- 15) Površina  $Z_r$  filma je skoro potpuno glatka, dok  $Z_d$  filmovi imaju jasno izraženu zrnastu strukturu površine, koja je izraženija što su čestice krupnije. Takođe,  $Z_d$  filmovi su bili znatno krtiji u poređenju sa filmovima dobijenim iz zeinskog rastvora. Krtost  $Z_d$  filmova značajno je smanjena dodatkom propilen–glikola u suspenzije. Osim na krtost, propilen–glikol ima veliki uticaj i na morfologiju zeinskih filmova. Izraženost zrnaste strukture  $Z_d$  značajno opada sa dodatkom propilen–glikola, nezavisno od veličine čestica.
  - 16) Izmerena prosečna hrapavost,  $S_a$ , ZR, ZRPG, ZDNČ90, ZDPGNČ90, ZDNČ180 i ZDPGNČ180 filmova iznosila je 15,2 nm, 19,7 nm, 36,4 nm, 32,2 nm, 57,1 nm i 27,5 nm, respektivno. AFM analiza  $Z_r$  i  $Z_d$  filmova pokazala je da je površina  $Z_d$  filmova hrapavija od površine  $Z_r$  filmova, nezavisno od prisustva propilen–glikola. Takođe, kod  $Z_d$  filmova u koje nije dodavan PG, površina je hrapavija što su čestice krupnije. AFM analizom utvrđeno je takođe da dodatak propilen–glikola utiče na smanjenje hrapavosti  $Z_d$  filmova, što ukazuje na poboljšanje procesa koalescencije nanočestica zeina tokom formiranja filma.
  - 17) FTIR spektroskopijom zeinskih filmova, utvrđeno je da spektri i  $Z_r$  i  $Z_d$  filmova imaju karakteristične pikove na  $3390 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2960 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1643 \text{ cm}^{-1}$  i  $1533 \text{ cm}^{-1}$ , koji redom ukazuju na prisustvo hidroksilne, amidne A0, amidne I i amidne II funkcionalne grupe. Pikovi oko  $1640\text{--}1650 \text{ cm}^{-1}$  na spektrima ZR i ZRPG su simetrični. Ovi pikovi ukazuju na prisustvo nasumičnih zavojnica u sekundarnoj strukturi molekula zeina Na spektrima  $Z_d$  filmova, sa i bez PG, ovi pikovi su asimetrični, odnosno imaju proširenje u vidu „ramena“ na  $1620 \text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje na prisustvo  $\beta$ –ravni u sekundarnoj strukturi zeina, čiji pikovi se uobičajeno javljaju na  $1610\text{--}1640 \text{ cm}^{-1}$ . Na osnovu rezultata dobijenih FTIR analizom može se pretpostaviti da je kod  $Z_d$  filmova prisustvo  $\beta$ –ravni povećano u odnosu na  $Z_r$  filmove, što ukazuje na uređeniju sekundarnu strukturu.
  - 18) Svi ispitivani filmovi su, u ispitivanim uslovima, apsorbovali manje od 8% vlage. Rastvorljivost i  $Z_r$  i  $Z_d$  filmova u vodi bila je ispod 5%. Propustljivost vodene pare (PVP) se nije značajno razlikovala ( $p < 0,05$ ) za ZR, ZD i ZDPG filmove,

nezavisno od veličine čestica. Ipak, blago povećanje PVP nakon dodatka PG se može primetiti i kod  $Z_r$  i kod  $Z_d$  filmova.

- 19) Optička zamućenost ZD filmova bila je veća nego kod ZR filmova. Dodatak plastifikatora utiče na smanjenje optičke zamućenosti, te su ZDPG filmovi bili najmanje mutni. Po pitanju boje filmova, pokazano je da udeo bele u boji filmova raste po redosledu  $ZR < ZRPG < ZDPG < ZD$ . Vrednosti parametra  $a^*$  bile su bliske nuli kod svih ispitivanih filmova, što ukazuje na veoma mali udeo crvene, odnosno zelene boje u boji filmova. Pozitivne vrednosti parametra  $b^*$  kod svih ispitivanih filmova ukazuje na to da u boji filmova preovlađuje žuta, što je i tipično za zeinske filmove.
- 20) Statistička analiza pokazala je da ne postoji značajna razlika u mehaničkim svojstvima između filmova izlivenih iz disperzija nanočestica i filmova izlivenih iz etanolnog rastvora zeina.

## 6. LITERATURA

- Anderson, T.J. 2011: Extraction of zein from corn co-products.: MSc Thesis, 1–120.
- Anderson, T.J., Lamsa, B.P. 2011: Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: A review.: *Cereal Chemistry* 88, 159–173.
- Arcan, I., Yemenicioğlu, A. 2013: Development of flexible zein-wax composite and zein-fatty acid blend films for controlled release of lysozyme.: *Food Research International* 51, 208–216.
- Arcan, I., Yemenicioğlu, A. 2011: Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials.: *Food Research International* 44, 550–556.
- Asgari, S., Saberi, A.H., McClements, D.J., Lin, M. 2019: Microemulsions as nanoreactors for synthesis of biopolymer nanoparticles.: *Trends in Food Science and Technology* 86, 118–130.
- Assad, I., Bhat, S.U., Gani, A., Shah, A. 2020: Protein based packaging of plant origin: Fabrication, properties, recent advances and future perspectives.: *International Journal of Biological Macromolecules* 164, 707–716.

- Azemard, C., Menager, M., Vieillescazes, C. 2016: Analysis of diterpenic compounds by GC-MS/MS: contribution to the identification of main conifer resins.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 6599–6612.
- Baars, R.J., van Leeuwen, Y.M., Hendrix, Y., Velikov, K.P., Kegel, W.K., Philipse, A.P. 2015: Morphology-controlled functional colloids by heterocoagulation of zein and nanoparticles.: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 483, 209–215.
- Bai, J., Alleyne, V., Hagenmaier, R.D., Mattheis, J.P., Baldwin, E.A. 2003: Formulation of zein coatings for apples (*Malus domestica* Borkh).: *Postharvest Biology and Technology* 28, 259–268.
- Baier, G., Costa, C., Zeller, A., Baumann, D., Sayer, C., Araujo, P.H.H., Mailänder, V., Musyanovych, A., Landfester, K. 2011: BSA Adsorption on Differently Charged Polystyrene Nanoparticles using Isothermal Titration Calorimetry and the Influence on Cellular Uptake.: *Macromolecular Bioscience* 11, 628–638.
- Bhattacharjee, S. 2016a: Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not?: *Journal of Controlled Release* 235, 337–351.
- Bhattacharjee, S. 2016b: Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not?: *Journal of Controlled Release* 235, 337–351.
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Petrović, L., Milinković, J. 2016: Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate.: *Food Hydrocolloids* 60, 271–278.
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Vaštag, Ž., Petrović, L., Vučinić-Vasić, M. 2015: Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate.: *LWT - Food Science and Technology* 64, 609–615.
- Bučko, S., Katona, J.M., Petrović, L.B., Milinković, J.R., Fraj, J.L., Spasojević, L.M., Miller, R. 2018: An investigation of the influence of pH and ionic strength on the adsorption and interfacial dilatational properties at the oil–water interface of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein hydrolysate.: *Journal of the Serbian Chemical Society* 83, 847–861.
- Cao, Y., Chen, T.-T., Wang, W., Chen, M., Wang, H.-J. 2017: Construction and functional assessment of zein thin film incorporating spindle-like ZnO crystals.: *RSC Advances* 7, 2180–2185.



- Cao, Y., Chen, T.T., Wang, W., Chen, M., Wang, H.J. 2017: Construction and functional assessment of zein thin film incorporating spindle-like ZnO crystals.: *RSC Advances* 7, 2180–2185.
- Carter, F.T., Kowalczyk, R.M., Millichamp, I., Chainey, M., Keddie, J.L. 2014: Correlating particle deformation with water concentration profiles during latex film formation: Reasons that softer latex films take longer to dry.: *Langmuir* 30, 9672–9681.
- Chang, R., Li, M., Ge, S., Yang, J., Sun, Q., Xiong, L. 2018: Glucose-responsive biopolymer nanoparticles prepared by co-assembly of concanavalin A and amylopectin for insulin delivery.: *Industrial Crops and Products* 112, 98–104.
- Chen, H., Zhong, Q. 2015: A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil.: *Food Hydrocolloids* 43, 593e602.
- Chen, H., Zhong, Q. 2014: Processes improving the dispersibility of spray-dried zein nanoparticles using sodium caseinate.: *Food Hydrocolloids* 35, 358–366.
- Chen, J., Zheng, J., McClements, D.J., Xiao, H. 2014: Tangeretin-loaded protein nanoparticles fabricated from zein/lactoglobulin: Preparation, characterization, and functional performance.: *Food Chemistry* 158, 466–472.
- Chen, Y., Ye, R., Liu, J. 2014: Effects of different concentrations of ethanol and isopropanol on physicochemical properties of zein-based films.: *Industrial Crops and Products* 53, 140–147.
- Corradini, E., Curti, P.S., Meniqueti, A.B., Martins, A.F., Rubira, A.F., Muniz, E.C. 2014: Recent advances in food-packing, pharmaceutical and biomedical applications of zein and zein-based materials.: *International Journal of Molecular Sciences* 15, 22438–22470.
- Czemierska, M., Jarosz-wilkolazka, A. 2016: Purification of wastewater by natural flocculants.
- Dai, L., Zhan, X., Wei, Y., Sun, C., Mao, L., McClements, D.J., Gao, Y. 2018: Composite zein - propylene glycol alginate particles prepared using solvent evaporation: Characterization and application as Pickering emulsion stabilizers.: *Food Hydrocolloids* 85, 281–290.
- Davidov-Pardo, G., Joye, I.J., Espinal-Ruiz, M., McClements, D.J. 2015: Effect of Maillard Conjugates on the Physical Stability of Zein Nanoparticles Prepared by Liquid

- Antisolvent Coprecipitation.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 8510–8518.
- Day, L. 2013: Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food security.: *Trends in Food Science and Technology* 32, 25–42.
- Deng, L.L., Taxipalati, M., Que, F., Zhang, H. 2016: Physical characterization and antioxidant activity of thymol solubilized Tween 80 micelles.: *Scientific Reports* 6, 1–8.
- Dickinson, E. 1989: A model of a concentrated dispersion exhibiting bridging flocculation and depletion flocculation.: *Journal of Colloid And Interface Science* 132, 274–278.
- Dickinson, E. 2018: Hydrocolloids acting as emulsifying agents – How do they do it?: *Food Hydrocolloids* 78, 2–14.
- Dong, F., Dong, X., Zhou, L., Xiao, H., Ho, P. 2016: Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Doxorubicin-loaded biodegradable self-assembly zein nanoparticle and its anti-cancer effect : Preparation , in vitro evaluation , and cellular uptake.: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 140, 324–331.
- Doyle, L.: Characterization calorimetry of binding interactions by isothermal titration.
- Escamilla-García, M., Calderón-Domínguez, G., Chanona-Pérez, J.J., Farrera-Rebollo, R.R., Andraca-Adame, J.A., Arzate-Vázquez, I., Mendez-Mendez, J. V., Moreno-Ruiz, L.A. 2013: Physical and structural characterisation of zein and chitosan edible films using nanotechnology tools.: *International Journal of Biological Macromolecules* 61, 196–203.
- Farag, Y. 2010: Characterization of different shellac types and development of shellac coated dosage forms, Dissertation.
- Farag, Y., Leopold, C.S. 2011: Development of shellac-coated sustained release pellet formulations.: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42, 400–405.
- Faridi Esfanjani, A., Jafari, S.M. 2016: Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds.: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 146, 532–543.
- Fetzer, A., Müller, K., Schmid, M., Eisner, P. 2020: Rapeseed proteins for technical applications: Processing, isolation, modification and functional properties – A review.: *Industrial Crops and Products* 158, 112986.
- Forato, L.A., Bicudo, T.D.C., Colnago, L.A. 2003: Conformation of  $\alpha$  Zeins in Solid State by

- Fourier Transform IR.: *Biopolymers - Biospectroscopy Section* 72, 421–426.
- Gali, L., Bedjou, F., Ferrari, G., Donsì, F. 2021: Formulation and Characterization of Zein/Gum Arabic Nanoparticles for the Encapsulation of a Rutin-Rich Extract from *Ruta chalepensis*.: *Food Chemistry*, 129982.
- Gao, J., Mao, Y., Xiang, C., Cao, M., Ren, G., Wang, K., Ma, X., Wu, D., Xie, H. 2021: Preparation of  $\beta$ -lactoglobulin/gum arabic complex nanoparticles for encapsulation and controlled release of EGCG in simulated gastrointestinal digestion model.: *Food Chemistry* 354.
- Gaona-Sánchez, V.A., Calderón-Domínguez, G., Morales-Sánchez, E., Chanona-Pérez, J.J., Velázquez-de la Cruz, G., Méndez-Méndez, J. V., Terrés-Rojas, E., Farrera-Rebollo, R.R. 2015: Preparation and characterisation of zein films obtained by electrospraying.: *Food Hydrocolloids* 49, 1–10.
- Gezer, P.G., Brodsky, S., Hsiao, A., Liu, G.L., Kokini, J.L. 2015: Modification of the hydrophilic/hydrophobic characteristic of zein film surfaces by contact with oxygen plasma treated PDMS and oleic acid content.: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 135, 433–440.
- Ghanbarzadeh, B., Musavi, M., Oromiehie, A.R., Rezayi, K., Razmi Rad, E., Milani, J. 2007: Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films.: *LWT - Food Science and Technology* 40, 1191–1197.
- Ghanbarzadeh, B., Oromiehi, A.R. 2008: Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis.: *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 209–215.
- Gomez-Estaca, J., Balaguer, M.P., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P. 2012: Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin.: *Food Hydrocolloids* 28, 82–91.
- Gómez-Guillén, M.C., Montero, M.P. 2021: Enhancement of oral bioavailability of natural compounds and probiotics by mucoadhesive tailored biopolymer-based nanoparticles: A review.: *Food Hydrocolloids* 118.
- Guo, H.X., Heinämäki, J., Yliruusi, J. 2008: Stable aqueous film coating dispersion of zein.:

- Journal of Colloid and Interface Science 322, 478–484.
- Guo, H.X., Shi, Y.P. 2009: A novel zein-based dry coating tablet design for zero-order release.: International Journal of Pharmaceutics 370, 81–86.
- Hibberd, D.J., Robinson, B.H., Robins, M.M. 1999: Ultrasonic characterisation of colloidal dispersions: Detection of flocculation and adsorbed layers.: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 12, 359–371.
- Hu, K., McClements, D.J. 2015: Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles.: Food Hydrocolloids 44, 101–108.
- Hu, K., McClements, D.J. 2014: Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method.: Food Research International 64, 329–335.
- Huang, R., Lau, B.L.T. 2016: Biomolecule-nanoparticle interactions: Elucidation of the thermodynamics by isothermal titration calorimetry.: Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1860, 945–956.
- Jelesarov, I., Bosshard, H.R. 1999: Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition.: 3–18.
- Jensen, D.P., Morgan, L.W. 1991: Particle size as it relates to the minimum film formation temperature of latices.: Journal of Applied Polymer Science 42, 2845–2849.
- Joye, I.J., McClements, D.J. 2014: Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application.: Current Opinion in Colloid and Interface Science 19, 417–427.
- Karlson, P., 1988: *Biokemija*, Hrvatska: Školska knjiga
- Kashiri, M., Cerisuelo, J.P., Domínguez, I., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R. 2016: Novel antimicrobial zein film for controlled release of lauroyl arginate (LAE):. Food Hydrocolloids 61, 547–554.
- Kashiri, M., Cerisuelo, J.P., Domínguez, I., López-Carballo, G., Muriel-Gallet, V., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. 2017: Zein films and coatings as carriers and release systems of Zataria multiflora Boiss. essential oil for antimicrobial food packaging.: Food Hydrocolloids 70, 260–268.

- Keddie, J. L., i Routh, A. F. (2010). *Fundamentals of latex film formation: processes and properties*. Dordrecht: Springer.
- Kim, W., Wang, Y., Selomulya, C. 2020: Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers.: *Trends in Food Science and Technology* 105, 261–272.
- Kimna, C., Winkeljann, B., Hoffmeister, J., Lieleg, O. 2021: Biopolymer-based nanoparticles with tunable mucoadhesivity efficiently deliver therapeutics across the corneal barrier.: *Materials Science and Engineering C* 121, 111890.
- Koyyada, A., Orsu, P. 2021: Natural gum polysaccharides as efficient tissue engineering and drug delivery biopolymers.: *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 63, 102431.
- Kurakula, M., Raghavendra Naveen, N. 2021: Electrospaying: A facile technology unfolding the chitosan based drug delivery and biomedical applications.: *European Polymer Journal* 147, 110326.
- Kwiecińska, B., Pusz, S., Valentine, B.J. 2019: Application of electron microscopy TEM and SEM for analysis of coals, organic-rich shales and carbonaceous matter.: *International Journal of Coal Geology* 211, 103203.
- Landry, J., Guyon, P. 1984: Zein of maize grain: I - isolation by gel filtration and characterization of monomeric and dimeric species.: *Biochimie* 66, 451–460.
- Lawton, J. 2004: Plastisizers for zein: their effect on tensile properties and water absorption of zein films.: *Cereal Chem.* 81, 1–5.
- Lawton, J.W. 2002: Zein: A history of processing and use.: *Cereal Chemistry* 79, 1–18.
- Lazić, V., Popović, S. 2015: Biopolimerni ambalžni materijali.: Tehnološki fakultet Novi Sad
- Levoguer, C. 2013: Using laser diffraction to measure particle size and distribution.: *Metal Powder Report* 68, 15–18.
- Li, K.K., Yin, S.W., Yin, Y.C., Tang, C.H., Yang, X.Q., Wen, S.H. 2013: Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization.: *Journal of Food Engineering* 119, 343–352.
- Li, X., Chen, M., Yang, W., Zhou, Z., Liu, L., Zhang, Q. 2012: Interaction of bovine serum albumin with self-assembled nanoparticles of 6-O-cholesterol modified chitosan.: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 92, 136–141.

- Li, X.N., Guo, H.X., Heinamaki, J. 2010: Aqueous coating dispersion (pseudolatex) of zein improves formulation of sustained-release tablets containing very water-soluble drug.: *Journal of Colloid and Interface Science* 345, 46–53.
- Li, Z., Lin, Q., McClements, D.J., Fu, Y., Xie, H., Li, T., Chen, G. 2021: Curcumin-loaded core-shell biopolymer nanoparticles produced by the pH-driven method: Physicochemical and release properties.: *Food Chemistry* 355, 129686.
- Liang, J., Xia, Q., Wang, S., Li, J., Huang, Q., Ludescher, R.D. 2015: Influence of glycerol on the molecular mobility, oxygen permeability and microstructure of amorphous zein films.: *Food Hydrocolloids* 44, 94–100.
- Liu, S., Han, Y., Qiao, R., Zeng, J., Jia, Q., Wang, Y., Gao, M. 2010: Investigations on the interactions between plasma proteins and magnetic iron oxide nanoparticles with different surface modifications.: *Journal of Physical Chemistry C* 114, 21270–21276.
- Loganathan, S., Sankaran, S. 2021: Surface chemical and selective flocculation studies on iron oxide and silica suspensions in the presence of xanthan gum.: *Minerals Engineering* 160.
- Masamba, K., Li, Y., Zhong, F. 2016: Effect of homogenization stirring speed on mechanical and water barrier properties of gallic acid treated zein-oleic acid composite films.: *Food Packaging and Shelf Life* 10, 97–105.
- Matsushima, N., Danno, G.-I., Takezawa, H., Izumi, Y. 1997: Three-dimensional structure of maize a-zein proteins studied by small-angle X-ray scattering.: *Biochimica et Biophysica Acta* 1339, 14–22.
- McGinity, J. W., i Felton, L. A. 2008: *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms* (3th ed.). Boca Raton: CRC Press.
- McKeon, L., Regan, F., Burns, B., Leonard, R. 2014: Determination of resin acid composition in rosin samples using cyclodextrin-modified capillary electrophoresis.: *Journal of Separation Science* 37, 2791–2796.
- Mohammadian, M., Waly, M.I., Moghadam, M., Emam-Djomeh, Z., Salami, M., Moosavi-Movahedi, A.A. 2020: Nanostructured food proteins as efficient systems for the encapsulation of bioactive compounds.: *Food Science and Human Wellness* 9, 199–213.
- Müller, V., Piai, J.F., Fajardo, A.R., Fávoro, S.L., Rubira, A.F., Muniz, E.C. 2011:

- Preparation and characterization of zein and zein-chitosan microspheres with great prospective of application in controlled drug release.: *Journal of Nanomaterials* 2011.
- Narayanan, M., Loganathan, S., Valapa, R.B., Thomas, S., Varghese, T.O. 2017: UV protective poly(lactic acid)/rosin films for sustainable packaging.: *International Journal of Biological Macromolecules* 99, 37–45.
- Naushad Emmambux, M., Stading, M. 2007: In situ tensile deformation of zein films with plasticizers and filler materials.: *Food Hydrocolloids* 21, 1245–1255.
- Nonthanum, P., Lee, Y., Padua, G.W. 2013: Effect of pH and ethanol content of solvent on rheology of zein solutions.: *Journal of Cereal Science* 58, 76–81.
- O'Donnell, P.B., Wu, C., Wang, J., Wang, L., Oshlack, B., Chasin, M., Bodmeier, R., McGinity, J.W. 1997: Aqueous pseudolatex of zein for film coating of solid dosage forms.: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43, 83–89.
- Oehme, A., Valotis, A., Krammer, G., Zimmermann, I., Schreier, P. 2011: Preparation and characterization of shellac-coated anthocyanin pectin beads as dietary colonic delivery system.: *Molecular Nutrition and Food Research* 55, 75–85.
- Pan, L., Ge, B., Zhang, F. 2017: Indetermination of particle sizing by laser diffraction in the anomalous size ranges.: *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 199, 20–25.
- Patel, A.R., Bouwens, E.C.M., Velikov, K.P. 2010: Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12497–12503.
- Patel, A.R., Velikov, K.P. 2014: Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures.: *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 19, 450–458.
- Pathak, Y. V., Dorle, A.K. 1987: Study of rosin and rosin derivatives as coating materials for controlled release of drug.: *Journal of Controlled Release* 5, 63–68.
- Pena-Serna, C., Penna, A.L.B., Lopes Filho, J.F. 2016: Zein-based blend coatings: Impact on the quality of a model cheese of short ripening period.: *Journal of Food Engineering* 171, 208–213.
- Pinto, L., Bonifacio, M.A., De Giglio, E., Santovito, E., Cometa, S., Bevilacqua, A., Baruzzi, F. 2021: Biopolymer hybrid materials : Development , characterization , and food packaging applications.: *Food Packaging and Shelf Life* 28, 100676.

- Podaralla, S., Perumal, O. 2012: Influence of Formulation Factors on the Preparation of Zein Nanoparticles.: *AAPS PharmSciTech* 13, 919–927.
- Popov Pereira da Cunha, M.D., Caracciolo, P.C., Abraham, G.A. 2020: Latest advances in electrospun plant-derived protein scaffolds for biomedical applications.: *Current Opinion in Biomedical Engineering*.
- Rao, Z., Dong, K., Yang, X., Lin, J., Cui, X., Zhou, R., Deng, Q. 2013: Natural amber, copal resin and colophony investigated by UV-VIS, infrared and Raman spectrum.: *Science China: Physics, Mechanics and Astronomy* 56, 1598–1602.
- Reddy, N., Yang, Y. 2011: Potential of plant proteins for medical applications.: *Trends in Biotechnology* 29, 490–498.
- Rodsamran, P., Sothornvit, R. 2017: Rice stubble as a new biopolymer source to produce carboxymethyl cellulose-blended films.: *Carbohydrate Polymers* 171, 94–101.
- Sá, A.G.A., Moreno, Y.M.F., Carciofi, B.A.M. 2020: Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet.: *Trends in Food Science and Technology* 97, 170–184.
- Sağlam, D., Venema, P., van der Linden, E., de Vries, R. 2014: Design, properties, and applications of protein micro- and nanoparticles.: *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 19, 428–437.
- Samrot, A. V, Sean, T.C., Kudaiyappan, T., Bisyarah, U., Mirarmandi, A., Faradjeva, E., Abubakar, A., Ali, H.H., Angalene, J.L.A., Suresh Kumar, S. 2020: Production, characterization and application of nanocarriers made of polysaccharides, proteins, biopolyesters and other biopolymers: A review.: *International Journal of Biological Macromolecules* 165, 3088–3105.
- Schmidt, V.C.R., Porto, L.M., Laurindo, J.B., Menegalli, F.C. 2013: Water vapor barrier and mechanical properties of starch films containing stearic acid.: *Industrial Crops and Products* 41, 227–234.
- Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., Bader-Mittermaier, S., Osen, R. 2020: Food proteins from plants and fungi.: *Current Opinion in Food Science* 32, 156–162.
- Semenčenko, V. V., Mojović, L. V., Radosavljević, M.M., Terzić, D.R., Milašinović-Šeremešić, M.S., Janković, M.Z. 2013: Mogućnosti iskorišćenja sporednih proizvoda prerade kukuruznog zrna iz proizvodnje etanola i skroba.: *Hemijska Industrija* 67, 385–



397.

- Sharkawy, A., Barreiro, M.F., Rodrigues, A.E. 2019: Preparation of chitosan/gum Arabic nanoparticles and their use as novel stabilizers in oil/water Pickering emulsions.: *Carbohydrate Polymers* 224, 115190.
- Shoueir, K.R., El-Desouky, N., Rashad, M.M., Ahmed, M.K., Janowska, I., El-Kemary, M. 2021: Chitosan based-nanoparticles and nanocapsules: Overview, physicochemical features, applications of a nanofibrous scaffold, and bioprinting.: *International Journal of Biological Macromolecules* 167, 1176–1197.
- Shukla, R., Cheryan, M. 2001: Zein: The industrial protein from corn.: *Industrial Crops and Products* 13, 171–192.
- Silvestre, A.J.D., Gandini, A. 2008: Rosin: Major sources, properties and applications.: *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 67–88.
- Sivakanthan, S., Rajendran, S., Gamage, A., Madhujith, T., Mani, S. 2020: Antioxidant and antimicrobial applications of biopolymers: A review.: *Food Research International* 136.
- Špadina, M., Gourdin-Bertin, S., Dražić, G., Selmani, A., Dufrêche, J.F., Bohinc, K. 2018: Charge Properties of TiO<sub>2</sub> Nanotubes in NaNO<sub>3</sub> Aqueous Solution.: *ACS Applied Materials and Interfaces* 10, 13130–13142.
- Stanzione, J., La Scala, J. 2016: Sustainable polymers and polymer science: Dedicated to the life and work of Richard P. Wool.: *Journal of Applied Polymer Science* 133.
- Steward, P.A., Hearn, J., Wilkinson, M.C. 2000a: An overview of polymer latex film formation and properties.: 195–267.
- Steward, P.A., Hearn, J., Wilkinson, M.C. 2000b: An overview of polymer latex film formation and properties.: 195–267.
- Stummer, S., Salar-Behzadi, S., Unger, F.M., Oelzant, S., Penning, M., Viernstein, H. 2010: Application of shellac for the development of probiotic formulations.: *Food Research International* 43, 1312–1320.
- Suganthi, K.S., Anusha, N., Rajan, K.S. 2013: Low viscous ZnO-propylene glycol nanofluid: A potential coolant candidate.: *Journal of Nanoparticle Research* 15.
- Suhag, R., Kumar, N., Petkoska, A.T., Upadhyay, A. 2020: Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review.: *Food Research International*

136, 109582.

- Tarhini, M., Greige-gerges, H., Elaissari, A. 2017: Protein-based nanoparticles : From preparation to encapsulation of active molecules.: *International Journal of Pharmaceutics* 522, 172–197.
- Van Tent, A., Te Nijenhuis, K. 2000: The Film Formation of Polymer Particles in Drying Thin Films of Aqueous Acrylic Latices: II. Coalescence, studied with Transmission Spectrophotometry.: *Journal of Colloid and Interface Science* 232, 350–363.
- Tihminlioglu, F., Atik, I.D., Özen, B. 2010: Water vapor and oxygen-barrier performance of corn-zein coated polypropylene films.: *Journal of Food Engineering* 96, 342–347.
- Tomadoni, B., Capello, C., Valencia, G.A., Gutiérrez, T.J. 2020: Self-assembled proteins for food applications: A review.: *Trends in Food Science and Technology* 101, 1–16.
- Turasan, H., Kokini, J.L. 2017: Advances in Understanding the Molecular Structures and Functionalities of Biodegradable Zein-Based Materials Using Spectroscopic Techniques: A Review.: *Biomacromolecules* 18, 331–354.
- Udayakumar, G.P., Muthusamy, S., Selvaganesh, B., Sivarajasekar, N., Rambabu, K., Banat, F., Sivamani, S., Sivakumar, N., Hosseini-Bandegharai, A., Show, P.L. 2021: Biopolymers and composites: Properties, characterization and their applications in food, medical and pharmaceutical industries.: *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, 105322.
- Ünal, I.U., Arcan, I., Korel, F., Yemenicioğlu, A. 2013: Application of active zein-based films with controlled release properties to control *Listeria monocytogenes* growth and lipid oxidation in fresh Kashar cheese.: *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 20, 208–214.
- Verma, M.L., Dhanya, B.S., Sukriti, Rani, V., Thakur, M., Jeslin, J., Kushwaha, R. 2020: Carbohydrate and protein based biopolymeric nanoparticles: Current status and biotechnological applications.: *International Journal of Biological Macromolecules* 154, 390–412.
- Wan, Z.L., Guo, J., Yang, X.Q. 2015: Plant protein-based delivery systems for bioactive ingredients in foods.: *Food and Function* 6, 2876–2889.
- Wang, L., Ishida, Y., Ohtani, H., Tsuge, S., Nakayama, T. 1999: Characterization of natural resin shellac by reactive pyrolysis-gas chromatography in the presence of organic alkali.:

- Analytical Chemistry 71, 1316–1322.
- Wang, X., Matei, E., Gronenborn, A.M., Ramström, O., Yan, M. 2012: Direct measurement of glyconanoparticles and lectin interactions by isothermal titration calorimetry.: Analytical Chemistry 84, 4248–4252.
- Wihodo, M., Moraru, C.I. 2013: Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review.: Journal of Food Engineering 114, 292–302.
- Winnik, M.A. 1997: Latex film formation.: Current Opinion in Colloid & Interface Science 2, 192–199.
- Winzen, S., Schoettler, S., Baier, G., Rosenauer, C., Mailaender, V., Landfester, K., Mohr, K. 2015: Complementary analysis of the hard and soft protein corona: Sample preparation critically effects corona composition.: Nanoscale 7, 2992–3001.
- Wouters, A.G., Delcour, J.A. 2019: Cereal protein-based nanoparticles as agents stabilizing air–water and oil–water interfaces in food systems.: Current Opinion in Food Science 25, 19–27.
- Wu, Y., Luo, Y., Wang, Q. 2012: Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method.: LWT - Food Science and Technology 48, 283–290.
- Yadav, B.K., Gidwani, B., Vyas, A. 2016: Rosin: Recent advances and potential applications in novel drug delivery system.: Journal of Bioactive and Compatible Polymers 31, 111–126.
- Zhang, B., Luo, Y., Wang, Q. 2011: Effect of acid and base treatments on structural, rheological, and antioxidant properties of  $\alpha$ -zein.: Food Chemistry 124, 210–220.
- Zhang, C., Wang, P., Li, J., Zhang, H., Weiss, J. 2021: Characterization of core-shell nanofibers electrospun from bilayer gelatin/gum Arabic O/W emulsions crosslinked by genipin.: Food Hydrocolloids 119, 106854.
- Zhang, T., Xu, J., Chen, J., Wang, Z., Wang, X., Zhong, J. 2021: Protein nanoparticles for Pickering emulsions: A comprehensive review on their shapes, preparation methods, and modification methods.: Trends in Food Science & Technology 113, 26–41.
- Zhang, Y., Cui, L., Che, X., Zhang, H., Shi, N., Li, C., Chen, Y., Kong, W. 2015: Zein-based

films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape.:  
Journal of Controlled Release 206, 203–219.

Zhong, Q., Jin, M. 2009: Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion.: Food  
Hydrocolloids 23, 2380–2387.

Zou, T., Li, Z., Percival, S.S., Bonard, S., Gu, L. 2012: Fabrication, characterization, and  
cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles.: Food  
Hydrocolloids 27, 293–300.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

### План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
Припрема наночестица зеина и њихова примена као функционалних колоида
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
а) Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад б) Универзитет у Загребу, Природословно–математички факултет в) Универзитет у Љубљани, Здравствени факултет
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
<b>1. Опис података</b>
<b>1.1 Врста студије</b> <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> _____ Докторска дисертација _____
<b>1.2 Врсте података</b> <input checked="" type="radio"/> а) квантитативни <input type="radio"/> б) квалитативни
<b>1.3. Начин прикупљања података</b> а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ <input checked="" type="radio"/> д) узорци ткива: навести врсту _____ протеини кукуруза, смоле, полисахариди _____

ђ) снимци, фотографије: навести врсту фотографије узорака током рада, микрофотографије наночестица, микрофотографије површине протеинских филмова

е) текст, навести врсту литература

ж) мапа, навести врсту \_\_\_\_\_

з) остало: описати експериментални резултати

### 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

#### 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека .xlsx

б) SPSS фајл, датотека \_\_\_\_\_

в) PDF фајл, датотека .pdf

г) Текст фајл, датотека .docx

д) JPG фајл, датотека .jpg, .jpeg

е) Остало, датотека \_\_\_\_\_

#### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли 23 (7 типова наночестица, 10 различитих рН вредности и 6 типова протеинских филмова)

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) \_\_\_\_\_

#### 1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је од неколико минута до неколико дана

б) варијабле које се више пута мере односе се на све експерименталне анализе

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као \_\_\_\_\_

Напомене: \_\_\_\_\_

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## 2. Прикупљање података

### 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип анализа колоидних особина протеинских и композитних наночестица, као и анализа морфолошких, баријерних, оптичких и механичких својстава протеинских филмова \_\_\_\_\_

б) корелационо истраживање, навести тип \_\_\_\_\_

ц) анализа текста, навести тип прикупљање литературних података и упоређивање са експерименталним резултатима \_\_\_\_\_

д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### 2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да  Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

---

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је одређивањем поновљивости добијених резултата.

---

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података је извршена упоређивањем са експерименталним резултатима и  
литературним подацима.

### 3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у НаРДУс – Националном репозиторијуму дисертација у Србији и у репозиторијуму Информационог система научне делатности Универзитета у Новом Саду. \_\_\_\_\_ ? \_\_\_\_\_

3.1.2. URL адреса <https://nardus.mpn.gov.rs>, <http://www.uns.ac.rs/index.php/univerzitet/javnost-rada-2/javni-uvид-doktorske>

3.1.3. DOI \_\_\_\_\_

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а)  Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење



---

---

### 3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? \_\_\_\_\_

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

---

---

*Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.*

### 3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? \_\_\_\_\_

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да  Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да  Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да  Не

Образложити

---

---

## 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

#### 4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

---

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- a) Подаци нису у отвореном приступу
  - b) Подаци су анонимизирани
  - ц) Остало, навести шта
- 
- 

### 5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- а) јавно доступни
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

---

---

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

---

---

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

---

## 6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Љиљана Спасојевић, ljiljanas@uns.ac.rs

---

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Љиљана Спасојевић, ljiljanas@uns.ac.rs

---

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Љиљана Спасојевић, ljiljanas@uns.ac.rs

---