

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET



Nada M. Ćujić

**OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE PLODA  
ARONIJE, *Aronia melanocarpa* (Michx.)  
Elliott, MIKROINKAPSULACIJA  
EKSTRAKTA METODAMA  
ELEKTROSTATIČKE EKSTRUZIJE I  
SUŠENJEM RASPRŠIVANJEM**

**doktorska disertacija**

Beograd, 2017.

---

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY



Nada M. Ćujić

**OPTIMIZATION OF CHOKEBERRY  
EXTRACTION, *Aronia melanocarpa*  
(Michx.) Elliott, EXTRACT  
MICROENCAPSULATION BY  
ELECTROSTATIC EXTRUSION AND  
SPRAY DRYING METHODS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

---

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta, a eksperimentalni deo je urađen u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu, na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, Odsek za tehnologiju hrane i na Institutu za medicinska istraživanja, Grupa za kardiovaskularnu fiziologiju, Univerzitet u Beogradu.

Članovi Komisije za odbranu i ocenu doktorske disertacije:

---

**Dr Svetlana Ibrić**, redovni profesor (mentor),  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

**Dr Katarina Šavikin**, naučni savetnik (komentor)  
Institut za proučavanje lekovitog bilja “Dr Josif Pančić”, Beograd

---

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

---

**Dr Nevena Mihailović-Stanojević**, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja

---

**Dr Gordana Zdunić**, viši naučni saradnik  
Institut za proučavanje lekovitog bilja “Dr Josif Pančić”, Beograd

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

---

*Svom mentoru, redovnom profesoru **dr Svetlani Ibrić**, izražavam veliku zahvalnost na sveobuhvatnom angažovanju i podršci, vrednim savetima i stručnoj pomoći tokom izrade ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem, takođe svom mentoru, naučnom savetniku **dr Katarini Šavikin**, na velikom poverenju i ukazanoj prilici da se uključim u istraživanja koja su deo ove disertacije, prenetim iskustvima, usmeravanju u radu i profesionalnom razvoju, a pre svega nesebičnoj podršci, ljudskosti i prijateljstvu. Bez njenih korisnih sugestija sa jedne strane i potpune slobode u radu sa druge strane, izrada ove doktorske teze ne bi bila moguća.*

*Zahvaljujem se naučnom savetniku **dr Teodori Janković** i višem naučnom saradniku **dr Gordani Zdunić**, na neprocenljivoj pomoći i stalnom usmeravanju u usavršavanju, na svestranoj stručnoj pomoći i korisnim sugestijama.*

*Specijalnu zahvalnost dugujem **dr Dejanu Pljevljakušiću**, naučnom saradniku, koji je bio uključen u statističku obradu svih segmenata ove teze. Zahvaljujem se na njegovoj stručnosti, podršci, izuzetnom strpljenju, savetima, a pre svega prijateljstvu.*

***Prof. dr Branku Bugarskom**, redovnom profesoru, zahvaljujem se na ukazanoj prilici da se uključim u eksperimentalni deo rada njegove istraživačke grupe vezanom za mikroinkapsulaciju elektrostatičkom ekstruzijom, prenetim iskustvima i korisnim savetima.*

*Veliku zahvalnost dugujem **dr Neveni Mihailović-Stanojević**, naučnom savetniku, za pomoć u realizaciji dela eksperimentalnog rada sa životinjama, sugestijama koje su bile od velike pomoći u tumačenju dobijenih rezultata.*

*Zahvaljujem se **prof. dr Viktoru Nedoviću** na omogućavanju izvođenja eksperimentalnog rada dela disertacije koji se odnosi na mikroinkapsulaciju sušenjem raspršivanjem.*

*Posebnu zahvalnost na pomoći u izvođenju eksperimenata dugujem kolegama sa Tehnološko-metalurškog fakulteta, iz grupe kojom rukovodi prof. dr Branko Bugarski, kolegama sa Instituta za medicinska istraživanja, Instituta za genetski inženjering i Poljoprivrednog fakulteta, iz grupe kojom rukovodi prof. dr Viktor Nedović.*

*Svim kolegama iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, koji su mi svako na sebi svojstven način pomogli u izradi ovog rada, dugujem veliku zahvalnost.*

*Svim prijateljima, beskrajno hvala na podršci, a veliku zahvalnost dugujem i prijateljima koje sam stekla radeći eksperimentalni deo doktorata.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, na razumevanju, strpljenju i podršci.*

---



*Ovo istraživanje je realizivano u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, III 46013, pod nazivom „Tradicionalni i novi proizvodi od plodova gajenih i samoniklih vrsta voćaka i vinove loze i nus-produkata u preradi, sa posebnim osvrtom na autohtone sorte: hemijska karakterizacija i biološki profil“ i delom iz projekata III 46010 i OI 175096.*

---

**Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott,  
mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem  
raspršivanjem**

**Rezime**

**Uvod.** Poslednjih godina sve je više aktuelna potreba za primenom i proučavanjem alternativnih prirodnih supstanci, antioksidanasa kojima bi se postiglo ciljano zaštitno dejstvo na organizam. Ispitivanje antioksidanasa, posebno prirodnog porekla danas je u fokusu farmaceutskih istraživanja. Po najvećem antioksidativnom kapacitetu ističe se bobičasto voće tamno plave ili ljubičaste boje, a među njima po najvećoj antioksidativnoj aktivnosti odnosno sadržaju polifenola, izdvajaju se plodovi aronije. Interesovanje za bobičasto voće, a posebno aroniju je sve veće proteklih godina, jer visok unos može imati povoljne efekte na smanjenje rizika od nastanka kardiovaskularnih, malignih i različitih degenerativnih bolesti. Aronija (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) pripada porodici Rosacea i jedan je od najbogatijih izvora polifenolnih jedinjenja, u kojima dominiraju antocijani, proantocijanidini, fenolne kiseline, flavanoli. Na našim prostorima prisutna je više od 50 godina, ali je u široj upotrebi poslednjih nekoliko godina. Aktivni principi aronije predstavljaju jedan od najpotentnijih prirodnih antioksidanasa. Zbog toga su izolacija i identifikacija biološki aktivnih jedinjenja iz ploda aronije, njihova dalja primena u vidu obogaćivanja različitih proizvoda ovim jedinjenjima, primena kao dodatka ishrani, trenutno jedna od najaktuelnijih naučno-istraživačkih tema.

Aronija je na tržištu dostupna u vidu svežih i suvih plodova, soka, džemova, ali je nedovoljno zastupljena u vidu različitih fitopreparata, ekstrakata ili dijetetskih suplemenata, pa je interesovanje za dobijanje ovih preparata, a pre svega ekstrakata sve veće. Međutim, primena ekstrakata bogatih polifenolima ima i niz ograničenja, a pre svega nestabilnost, jer aktivni principi iz ekstrakta su osetljivi na prisustvo kiseonika, svetlosti, vlage i drugih nepovoljnih faktora, a posebno su osetljivi antocijani. Jedna od metoda koja može da se primeni za očuvanje biološki aktivnih jedinjenja iz ekstrakata ploda aronije i smanjenje njihove nestabilnosti je mikroinkapsulacija. Ovom metodom se postiže očuvanje stabilnosti ekstrahovanih aktivnih principa, produženje roka trajanja,

---

zaštita od negativnih uticaja spoljašnje sredine, njihovo kontrolisano oslobađanje, pokrivanje gorkog ukusa polifenola, i sprečavanje negativnog dejstva gastrointestinalnog trakta. Među mnogobrojnim metodama mikroinkapsulacije, elektrostatička ekstruzija i sušenje raspršivanjem su se izdvojile kao jednostavne, precizne i isplative metode za dobijanje mikročestica odgovarajućih organoleptičkih i biofarmaceutskih karakteristika, a koje se kasnije mogu primeniti i u industriji. Pored mnogobrojnih delovanja koja ispoljavaju aktivni principi ploda aronije, pa i sam ekstrakt, ističu se antihipertenzivno, antioksidativno i hipolipemičko delovanje. Budući da je predmet istraživanja veoma aktuelna biljna vrsta, neki od ovih efekata ekstrakta aronije na krvni pritisak su se po prvi put *in vivo* ispitali praćenjem sistemskih i regionalnih hemodinamskih, kao i biohemijskih parametara na modelu esencijalne hipertenzije.

**Cilj istraživanja:** Istraživanja u okviru ove teze bila su usmerena ka tri cilja, optimizaciji ekstrakcije polifenola iz suvog ploda aronije, mikroinkapsulaciji ekstrakta u cilju poboljšanja stabilnosti i bioraspoloživosti, kao i potvrdi delovanja ekstrakta dobijenog optimizacijom ekstrakcije na modelu eksperimentalne hipertenzije kod životinja.

**Metode:** Eksperimentalni rad sproveden je kroz tri faze: 1) U prvoj fazi izvršila se optimizacija procesa ekstrakcije i dobijanje ekstrakta sa najvećom količinom polifenola. U fazi optimizacije ekstrakcije polifenola, varirani su različiti parametri (5 stepena usitnjenosti droge, 4 različita rastvarača, 3 odnosa droga-rastvarač, 4 vremena ekstrakcije), i ispitivani su kao nezavisne promenljive. Optimalni uslovi su bili određeni na osnovu sadržaja ukupnih fenola i ukupnih antocijana (određenih spektrofotometrijskom metodom), a sva ispitivanja su bila zasnovana na primeni eksperimentalnog dizajna. Kvantitativna analiza individualnih polifenolnih jedinjenja je izvedena korišćenjem HPLC metode (visoko efikasna tečna hromatografija) iz odabranih ekstrakata, sa posebnim osvrtom na pojedinačna polifenolna jedinjenja. Kako bi se utvrdio uticaj ultrazvuka na ekstrakciju polifenolnih jedinjenja i izvršilo poređenje sa klasičnom metodom ekstrakcije, maceracijom, ispitivan je uticaj ultrazvučne ekstrakcije korišćenjem prethodno izabranog optimalnog rastvarača, odnosa droga-rastvarač, stepena usitnjenosti i optimalnog vremena ekstrakcije. Nakon toga, odabran je ekstrakt sa najvećim sadržajem aktivnih principa, koji se dalje koristio u sledećim fazama ispitivanja. 2) Ekstrakt sa najvećom količinom polifenola dobijen optimizacijom ekstrakcije je inkapsuliran u odgovarajuće nosače, dvema metodama mikroinkapsulacije,

---

elektrostatičkom ekstruzijom i sušenjem raspršivanjem. 2a) Tokom mikroinkapsulacije elektrostatičkom ekstruzijom, varirana su 4 faktora koji utiču na inkapsulaciju (4 različita tipa nosača-alginati različitih viskoziteta, nisko i srednjemolekularni, sa ili bez dodatka inulina, kao i 3 različite veličine igala-18, 20, 22). Nakon dobijanja, mikročestice su fizičko-hemijski i biofarmaceutski okarakterisane na: efikasnost inkapsulacije (spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u česticama razorenim u rastvoru natrijum-citrata) kao i *in vitro* procenu efikasnosti ispitivanjem brzine oslobađanja inkapsuliranih polifenola u tačno utvrđenim vremenskim intervalima (spektrofotometrijski), FTIR analizu mikročestica (Furijerova transmisiona infracrvena spektroskopija), analizama na Skenirajućem elektronskom mikroskopu (SEM). Veličina čestica kako u hidrogel tako i u liofilizovanim česticama je određena korišćenjem optičkog mikroskopa. 2b) U okviru ove faze istraživanja, ekstrakt dobijen optimizacijom ekstrakcije je bio inkapsuliran metodom sušenja raspršivanjem sa različitim nosačima (mleko u prahu, maltodekstrin, arapska guma), u cilju upoređivanja ove metode mikroinkapsulacije sa ekstruzionom metodom. Dobijene mikročestice su fizičko-hemijski i biofarmaceutski okarakterisane: *in vitro* oslobađanje ukupnih fenola i antocijana u odgovarajućim medijumima (spektrofotometrijski), FTIR analiza mikročestica (Furijerova transmisiona infracrvena spektroskopija) i određivanje veličine mikročestica na Mastersizer uređaju. 3) U okviru treće faze ispitivanja, ekstrakt sa najvećim sadržajem polifenola koji je dobijen optimizacijom je liofilizovan i koristio se za ispitivanje antihipertenzivnog dejstva na modelu esencijalne hipertenzije kod spontano hipertenzivnih pacova. Za ispitivanje su se koristili mužjaci pacova sa urođenom hipertenzijom, a životinje bile raspoređene u dve eksperimentalne grupe, kontrolnu i tretiranu grupu. Kod eksperimentalnih grupa određivani su sistemski (sistolni, dijastolni i srednji arterijski pritisak, kao i frekvencija rada srca, pulsni pritisak i minutni volumen) i regionalni hemodinamski parametri (protoci i otpori u karotidnoj i renalnoj arteriji i aorti). Od biohemijskih analiza određivani su ukupan holesterol, HDL, LDL i trigliceridi, glukoza, minerali, stepen lipidne peroksidacije metodom TBARS u plazmi i eritrocitima. Određivana je i aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima, superoksid dismutaze, katalaze, glutatjon peroksidaze i glutatjon reduktaze.

**Rezultati:** Ekstrakt sa najvećom količinom aktivnih principa, ukupnih fenola (27.7 mg GAE/g suvog ploda) i antocijana (0.27%), dobijen je maceracijom pomoću 50% etanola

---

kao rastvarača, 1:20 odnosom droga-rastvarač, 0.75 mm stepenom usitnjenosti droge, u trajanju od 60 minuta. HPLC analiza je potvrdila da se pod istim, odabranim ekstrakcionim uslovima postiže najveći prinos polifenolnih jedinjenja. Dominantni antocijani u ekstraktu bili su cijanidin-3-*O*-galaktozid, cijanidin-3-*O*-arabinozid i cijanidin-3-*O*-glukozid, dok su među flavonoidnim jedinjenjima dominantno bili zastupljeni rutin, hiperozid i izokvercetin. Korišćenje ultrazvučne metode za ekstrakciju suvog ploda aronije nije pokazalo veće prinose u vidu ekstrahovanih aktivnih principa. Rezultati su pokazali da je maceracija efektivna i jednostavna metoda za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije. Ekstrakt dobijen optimizacijom ekstrakcije suvog ploda aronije sa najvećim prinosom polifenola se dalje koristio za mikroinkapsulaciju. Čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom, korišćenjem alginata srednje viskoznosti, u koncentraciji 1.5%, uz dodatak inulina kao punioca (5%) i igle srednjeg dijametra (20) su pokazale najbolju efikasnost inkapsulacije i količinu *in vitro* oslobođenih polifenola. Hidrogel čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom su bile pravilnog oblika, u rasponu veličina od 800 do 1340  $\mu\text{m}$ . Nakon liofilizacije veličina čestica je redukovana za 18-24%. Hidrogel čestice su sadržale 0.24 mg GAE/g inkapsuliranih polifenola i sa njima je postignuto produženo oslobađanje od 10 minuta, a liofilizovane čestice 3.57 mg GAE/g polifenola sa kojima je oslobađanje produženo na čak 40 minuta. SEM mikrografije su potvrdile da su čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom ujednačenih oblika, bez vidljivih oštećenja, ali i da je dodatak inulina kao punioca doprineo boljim karakteristikama čestica. FTIR analiza je pokazala nekoliko karakterističnih pikova u spektrima sistema u koje je inkapsuliran ekstrakt, bez vidljivih inkompatibilnosti i interakcija između nosača i ekstrakta. Zbog produženog vremena oslobađanja polifenola, čestice izrađene elektrostatičkom ekstruzijom su se pokazale kao efikasni sistemi za isporuku i očuvanje stabilnosti polifenolnih jedinjenja. Iz mikročestica dobijenih drugom metodom mikroinkapsulacije, sušenjem raspršivanjem, aktivni principi su se oslobodili trenutno. Najveća količina aktivnih principa, ukupnih fenola (2.168 mg GAE/g) i ukupnih antocijana (0.04%) oslobodila se iz arapske gume kao nosača. Veličina dobijenih mikročestica bila je u u rasponu od 8.5 do 15.87  $\mu\text{m}$ , čime je potvrđeno da je ova tehnika pogodna za proizvodnju malih i uniformih čestica, koje se mogu koristiti za oralnu primenu. FTIR analiza je potvrdila da se ekstrakt može uspešno inkorporirati u mikročestice metodom sušenja raspršivanjem. Dobijeni rezultati su pokazali

---

da je inkapsulacija u spiralnom vazdušnom mlaznom mlinu takođe pogodna tehnika za proizvodnju mikročestica za oralnu primenu.

Četvoronedeljnom hroničnom primenom liofilizovanog ekstrakta kod spontano hipertenzivnih pacova, značajno je redukovan sistolni pritisak (SHR-K:  $205.1 \pm 20.5$  mm Hg za kontrolnu grupu, u poređenju sa SHR-A:  $184.5 \pm 10.09$  mm Hg za tretiranu grupu), kao i pulsni pritisak ( $p < 0.05$ ). Značajna redukcija sistolnog krvnog pritiska je povezana sa povećanom diurezom. Primena ekstrakta aronije dovela je do značajnog smanjenja TBARS i u plazmi i u eritrocitima ( $p < 0.001$ ), smanjene lipidne peroksidacije što je posledica smanjenog oksidativnog stresa kod životinja koje su primale ekstrakt. Takođe, primena ekstrakta je dovela i do povećanja gvožđa u plazmi, što je značajno povećalo FRAP aktivnost u plazmi ( $p < 0.01$ ). Ekstrakt aronije je značajno smanjio SOD aktivnost u tretiranoj grupi životinja u poređenju sa kontrolnom ( $p < 0.01$ ), bez promena u GP<sub>x</sub> i GR aktivnostima, dok je CAT aktivnost bila povećana za 33.27%.

**Zaključak:** Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije pokazali su da je odabrani ekstrakt aronije, izrađen maceracijom kao ekstrakcionom tehnikom pogodan za izradu biljnog proizvoda, sa maksimalnom količinom aktivnih principa, a koji se može koristiti kao blag antihipertenziv u početnim fazama bolesti ili kao dopuna konvencionalnoj antihipertenzivnoj terapiji. Mikroinkapsulacione metode su se pokazale kao efikasne u očuvanju stabilnosti ekstrahovanih jedinjenja. Obe ispitivane tehnike mikroinkapsulacije pokazale su niz prednosti. Ispitivanjem bioloških efekata ekstrakta aronije pokazano je da njegova hronična upotreba može pozitivno uticati na sistolni krvni pritisak i oksidativni status. Sve ovo upućuje na potencijalnu primenu aronije i njenih proizvoda kod blažih oblika hipertenzije, metaboličkog sindroma ali i u prevenciji.

**Ključne reči:** aronija, polifenoli, antocijani, optimizacija, ekstrakcija, mikroinkapsulacija, ekstruzija, sušenje raspršivanjem, hipertenzija, oksidativni stres.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska tehnologija

**UDK:** 616.12.331.1:582.711.71:[577.344:546.21(043.3)]

---

## **Optimization of chokeberry extraction, *Aronia melanocarpa* (michx.) Elliott, extract microencapsulation by electrostatic extrusion and spray drying methods**

### **Summary**

**Introduction.** In recent years, there is a growing interest for application and investigation of alternative natural substances, antioxidants which could achieve protective effects on human health. Examination of antioxidants, especially of natural origin nowadays represents the main focus in pharmaceutical research. Among many plants, berry fruits and especially dark blue or purple ones have the most antioxidant capacity, which include the highest antioxidant activity and polyphenol content, especially in the case of chokeberry. Growing interest in berries, peculiar in chokeberry is increasing in the recent past years because their high intake may have beneficial effects on reducing the cardiovascular risks, cancer and various degenerative diseases. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) belongs to the Rosacea family, and it is one of the richest sources of polyphenol compounds, particular in anthocyanins, proanthocyanidins, phenolic acids, flavanols. In our country chokeberry exists more than 50 years, but is widely used in recent past. The active principles of chokeberry represent one of the most potent natural antioxidants. Therefore, the isolation and identification of chokeberry biologically active compounds, their further application in terms of enrichment the different products with these compounds, the possibility for their use as a dietary supplements are currently one of the most scientific and research topics. Chokeberry is available on the market in the form of fresh and dry fruits, juice, jams, but it is not enough represent in the form of various herbal remedies, extracts or dietary supplements, and there is growing interest in obtaining an extract rich in their active principles. However, the use of extracts rich in polyphenols has a number of limitation, extract instability due to the effects of oxygen, light, moisture and other adverse factors. Anthocyanins are especially sensitive among all polyphenols. One of the methods that can be applied for the preservation of biologically active compounds of chokeberry extract and which can reduce their instability is microencapsulation technology. This method could preserve the stability of the active principles, their shelf life extension, protection from the negative impact of the external environment, controlled release, covering the polyphenols bitter taste and preventing the negative effects of the gastrointestinal tract. Among many

---

microencapsulation methods, electrostatic extrusion and spray drying are pointed out as a simple, precise and cost-effective methods for microparticles obtaining, with suitable organoleptic and biopharmaceutical characteristics, which can later be applied in the industry.

Among many actions which chokeberry active principles are demonstrating, antihypertensive, antioxidative and hypolipemic are dominant. Since the main subject of this examination is current plant species, some of these chokeberry extract effects on blood pressure lowering were examined for the first time through *in vivo* monitoring of systemic and regional hemodynamics and biochemical parameters in the model of essential hypertension.

**Aim.** Research as the part of this thesis were directed to three target points, the optimization of the polyphenols extraction from chokeberry dried fruit, microencapsulation of extract in order to improve the stability and bioavailability, biological activity confirmation of the extract in the model of experimental hypertension.

**Methods.** Experimental work was carried out through three phases: 1) The first phase, optimization of the extraction process was conducted and extract with the highest amount of polyphenols was obtained. Various parameters were varied (5 particle sizes of dried chokeberry fruit, 4 different solvents, 3 solid-solvent ratios, 4 extraction times) and examined as independent variables. Optimal conditions were determined and based on the content of total phenols and total anthocyanins (by spectrophotometric method) and all of the results were based on experimental design. Quantitative analysis of individual polyphenolic compounds was performed using HPLC methods (high performance liquid chromatography) from selected extracts, with special emphasis on the individual polyphenol compounds. In order to determine the effect of ultrasound on the extraction of polyphenolic compounds and comparison with classical maceration method, it was examined the influence of ultrasonic extraction using the previously selected optimum solvent, solid-solvent ratio, particle size and extraction time. After that, the selected extract with the highest content of active principles was used in the following stages of the examination. 2) The extract with the highest content of polyphenols obtained by optimizing the extraction process was encapsulated in suitable carriers with the two microencapsulation methods, the

---



electrostatic extrusion and spray drying. 2a) During the microencapsulation by electrostatic extrusion were varied 4 factors which could affect on the encapsulation process (4 different types of carriers-low and medium viscosity alginates, with or without addition of inulin, as well as 3 different sizes of the needle-18, 20, 22). Obtained microparticles were physicochemical and biopharmaceutical characterized on encapsulation efficiency (spectrophotometric determination of total phenols in the particles desintegrated in sodium citrate) and *in vitro* assessment of efficiency by testing the release rate of encapsulated polyphenols in precisely defined time intervals (spectrophotometry), FTIR analysis of microparticles (Fourier transmission infrared spectroscopy) and Scanning electron microscope analysis (SEM). The particle sizes of the hydrogel and lyophilized particles, both forms were determined using an optical microscope. 2b) In this phase of research, extract obtained by optimizing the extraction process was encapsulated by spray drying method with different carriers (milk powder, maltodextrin, gum arabic) in order to compare this microencapsulation technique with the previously mentioned electrostatic extrusion method. Obtained microbeads were physicochemical and biopharmaceutical characterized: *in vitro* dissolution of total phenolics and anthocyanins in appropriate media (spectrophotometry), FTIR analysis of microparticles (Fourier transmission infrared spectroscopy) and determining the microbeads size by Mastersizer. 3) In the third phase of the study, the extract with the highest content of polyphenols obtained by optimizing the extraction process was lyophilized and used to test the antihypertensive effect on a model of essential hypertension in the spontaneously hypertensive rat (SHR). For the purpose of *in vivo* study male rats with congenital hypertension were used, the animals were distributed in two experimental groups, control and treatment. In experimental groups were determined the systemic (systolic, diastolic, mean arterial pressure, heart rate, pulse pressure and cardiac output) and regional hemodynamic parameters (flow rates and resistances in the carotid and renal arteries and aorta). Biochemical parameters were also determined on the total cholesterol, HDL, LDL and triglycerides, glucose level, minerals, lipid peroxidation by TBARS method in plasma and erythrocytes. Activities of antioxidative enzymes in erythrocytes were also determined, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase.

---

**Results.** Extract with the greatest amount of active principles, total phenols (27.7 mg GAE/g dry weight) and anthocyanins (0.27%), was obtained by maceration method using 50% ethanol as a solvent, 1:20 solid-solvent ratio, 0.75 mm particle size, during 60 minutes. HPLC analysis confirmed that with the same, selected extraction conditions was achieved the highest yield of polyphenol compounds. Dominant anthocyanins in the extract were cyanidin-3-*O*-galactoside, cyanidin-3-*O*-arabinoside and cyanidin-3-*O*-glucoside, while among flavonoids predominantly were presented rutin, hyperoside and isoquercetin. The use of ultrasound extraction method for the dried chokeberry fruit extraction did not show higher yields of extracted active principles. The results showed that maceration was effective and simple method for polyphenolics extraction from dried chokeberry. The extract obtained by extraction optimization with the highest yield of polyphenols was used for both microencapsulation process. Microparticles obtained with electrostatic extrusion, using a medium viscosity alginate (1.5%), with the addition of inulin as filler (5%) and the using medium needle diameter (20) indicated the best encapsulation efficiency and amount of *in vitro* released polyphenols. Hydrogel particles obtained by electrostatic extrusion had regular shape, size ranged between 800 to 1340  $\mu\text{m}$ . After lyophilization the particle size was reduced by 18-24%. The hydrogel particles contained 0.24 mg GAE/g of the encapsulated polyphenols and achieved sustained release of 10 min, while freeze dried particles contained 3.57 mg GAE/g of the encapsulated polyphenols with prolonged release of 40 min. SEM micrographs confirmed that the particles obtained by electrostatic extrusion had uniform shape, without destructions, while the addition of inulin as filler contributed to the better performances of microbeads. FTIR analysis showed a number of relevant peaks in the spectra of the systems which were encapsulated with extract, without visible incompatibility and matrix vs. extract interactions. Due to the extended release of polyphenols, microbeads obtained by electrostatic extrusion method have been demonstrated as efficient systems for the prolonged polyphenols delivery and maintenance their stability. From microparticles obtained by another microencapsulation method, spray drying, the active principles released immediately. The greatest amount of active principles, total phenols (2.168 mg GAE/g) and total anthocyanins (0.04%) released from the gum arabic as a carrier. Sizes of the obtained microparticles were in range between 8.5 to 15.87  $\mu\text{m}$  which confirmed that spray drying is suitable technique for small and uniform particles

---

production, which can be used for oral administration. FTIR analysis confirmed that the extract could be successfully incorporate into the microbeads by spray drying method. The obtained results showed that the encapsulation in a spiral jet air mill was also suitable technique for the production of microparticles.

A four week term usage of the lyophilized extract in spontaneously hypertensive rats significantly reduced the systolic blood pressure (SHR-K:  $205.1 \pm 20.5$  mm Hg for the control group, compared with the treated one, SHR-A:  $184.5 \pm 10.9$  mm Hg) and pulse pressure ( $p < 0.05$ ). A significant reduction of systolic blood pressure was associated with increased diuresis. Chokeberry extract administration significantly decreased plasma and erythrocytes TBARS ( $p < 0.001$ ), increased lipid peroxidation which is consequence of increased oxidative stress. Plasma iron level was increased, which significantly increased the activity of plasma FRAP activity ( $p < 0.01$ ). Chokeberry extract significantly decreased SOD activity in the treated group compared to control one ( $p < 0.01$ ), with no changes in GPx and GR activities, while the CAT activity was increased for 33.27%.

**Conclusion.** The research results of this doctoral thesis demonstrated that the optimized chokeberry extract obtained by maceration as extraction technique is suitable for plant products production, with a maximum amount of active ingredients, which can be used as a mild antihypertensive agent in the early stages of disease or as a supplement to conventional antihypertensive therapy. Microencapsulation methods have been proven to be effective in preserving the stability of the extracted compounds. Both microencapsulation techniques have a number of advantages. The biological effects examination of chokeberry extract showed that its chronic use could have a positive impact on systolic blood pressure and oxidative status. All this results pointed to the potential application of chokeberry extract and its products in mild stage of hypertension, metabolic syndrome but also in prevention in healthy subjects.

**Keywords:** chokeberry, polyphenols, anthocyanins, optimization, extraction, microencapsulation, extrusion, spray drying, hypertension, oxidative stress.

**Scientific field:** Pharmacy

**Narrow scientific field:** Pharmaceutical technology

**UDC:** 616.12.331.1:582.711.71:[577.344:546.21(043.3)]

---

## LISTA SLIKA

<b>Slika 1.</b> <i>Aronia melanocarpa</i> .....	3
<b>Slika 2.</b> Osnovne klase polifenolnih jedinjenja .....	5
<b>Slika 3.</b> Opšta formula antocijana .....	10
<b>Slika 4.</b> Najčešći antocijani izolovani iz aronije .....	11
<b>Slika 5.</b> Različite forme antocijana u zavisnosti od pH vrednosti, (A) hemijske strukture (B) šematski prikaz .....	12
<b>Slika 6.</b> Hemijska struktura proantocijanidina .....	16
<b>Slika 7.</b> Smeđe alge .....	29
<b>Slika 8.</b> Struktura natrijum alginata .....	30
<b>Slika 9.</b> <i>Egg-box</i> model .....	31
<b>Slika 10.</b> Strukturna formula inulina .....	33
<b>Slika 11.</b> Aparatura za izvođenje metode elektrostatičke ekstruzije .....	36
<b>Slika 12.</b> Šema dobijanja mikročestica jonskim geliranjem metodom elektrostatičke ekstruzije .....	36
<b>Slika 13.</b> Priprema mikročestica korišćenjem metode sušenja raspršivanjem (A) konvencionalna metoda; (B) metoda sa sniženom temperaturom .....	38
<b>Slika 14.</b> Šematski prikaz dobijanja mikročestica metodom sušenjem raspršivanjem .....	38
<b>Slika 15.</b> Osušen plod aronije korišćen u eksperimentima .....	44
<b>Slika 16.</b> Šejker za izvođenje maceracije .....	49
<b>Slika 17.</b> Vakum uparivač .....	53
<b>Slika 18.</b> Uređaj za elektrostatičku ekstruziju .....	55
<b>Slika 19.</b> Liofilizator .....	56
<b>Slika 20.</b> Uređaj za sušenje raspršivanjem .....	60
<b>Slika 21.</b> Primenjivanje gavaže kod spontano hipertenzivnih pacova .....	64
<b>Slika 22.</b> Preliminarana ispitivanja uticaja pojedinačnih faktora na sadržaj ukupnih fenola (TP) i ukupnih antocijana (TA) tokom ekstrakcije suvog ploda aronije .....	75

---

<b>Slika 23.</b> Pareto dijagram ispitivanja uticaja faktora na prinos ekstrahovanih ukupnih fenola-TP (A) i ukupnih antocijana-TA (B). Faktori: 1-odnos droga-rastvarač, 2-tip rastvarača, 3-stepen usitnjenosti, 4-vreme ekstrakcije .....	80
<b>Slika 24.</b> Identifikacija pojedinačnih antocijana (A) i flavonoida (B) u ekstraktu ploda aronije (50% etanol, 1:20 odnos droga-rastvarač, 0.75 mm stepen usitnjenosti) HPLC-DAD metodom (A) (1) Cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid (2) Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid (3) Cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid, (B) (1) Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid (rutin) (2) Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid (hiperozid) (3) Kvercetrin-3- <i>O</i> -glukozid (izokvercetin) .....	87
<b>Slika 25.</b> Poređenje maceracije i ultrazvučne ekstrakcije na prinos ukupnih fenola (TP)-A i B, ukupnih antocijana (TA)-C i D, kao i poređenje uticaja dužine ultrazvučne ekstrakcije (A i C) .....	88
<b>Slika 26.</b> Mikrografija hidrogel mikročestica (igla 20, F2 formulacija) sa inkapsuliranim ekstraktom, optički mikroskop, 2.5 x 10 (500 μm barovi) .....	91
<b>Slika 27.</b> Mikrografije inkapsuliranih hidrogel F2 čestica (u medijumu) dobijenih iglama 18, 20, 22, uvećanje 2.5 x 10 (bar 500μm) .....	94
<b>Slika 28.</b> Mikrografije inkapsuliranih hidrogel F4 čestica (u medijumu) dobijenih iglama 18, 20, 22, uvećanje 2.5 x 10 (bar 500μm) .....	95
<b>Slika 29.</b> Mikrografije inkapsuliranih hidrogel F2 čestica (bez medijuma) dobijenih iglom 20, uvećanja 2.5 x 10, 5 x 10, respektivno (bar 500μm) .....	95
<b>Slika 30.</b> Bar-plotovi na kojima je prikazana efikasnost inkapsulacije polifenola (TP <sub>e</sub> ) u F1-F4 hidrogel čestice .....	98
<b>Slika 31.</b> Step en inkapsulacije polifenola aronije u hidrogel i liofilizovane F2 i F4 čestice (sve čestice su dobijene iglom 20) .....	101
<b>Slika 32.</b> Kinetika oslobađanja inkapsuliranih polifenola (TP) iz svih tipova mikročestica (F1-F4) i svi testiranih veličina igala (18, 20, 22) prikazana kao srednje vrednosti .....	104
<b>Slika 33.</b> Ispitivanje uticaja tipova nosača i veličine igala na oslobađanje polifenola iz mikročestica (bar plot) .....	106
<b>Slika 34.</b> Model površine odgovora-RSM uticaja varirajućih faktora na A) stepen inkapsuliranja polifenola B) oslobađanje polifenola iz hidrogel čestica .....	107
<b>Slika 35.</b> Kinetika oslobađanja polifenola aronije iz hidrogel i liofilizovanih mikročestica u A) vodi B) u zakišeljnom medijumu .....	108

---

<b>Slika 36.</b> FTIR spektri (a) liofilizovanog ekstrakta (b) praznih F2 čestica (c) prazne F4 čestice (d) F2 čestice inkapsulirane ekstraktom (e) F4 čestice inkapsulirane ekstraktom..	112
<b>Slika 37.</b> SEM mikrografije (A) kontrolne F2 mikročestice, 200 x (B) kontrolne F2, 4990 x (C) F2 inkapsulirane ekstraktom, 119 x (D) F2 inkapsulirane ekstraktom, 10.000 x (E) kontrolne F4, 119 x (F) kontrolne F4, 20.000 x (G) kontrolne F4, 121 x (H) F4 inkapsulirane ekstraktom, 10.000 x (I) F4 inkapsulirane ekstraktom, 119 x (J) F4 inkapsulirane ekstraktom, 10.000 x, gde su F2 čestice dobijene od alginata srednje viskoznosti, a F4 od alginata srednje viskoznosti uz dodatak inulina .....	116
<b>Slika 38.</b> Prazne F2 čestice (alginat srednje viskoznosti), različitih uvećanja, 1 x i 6 x ....	119
<b>Slika 39.</b> Prazne F4 čestice (alginat srednje viskoznosti uz dodatak inulina), različitih uvećanja, 6 x i 13 x .....	119
<b>Slika 40.</b> F2 (alginat srednje viskoznosti) čestice inkapsulirane ekstraktom aronije, različitih uvećanja, 1x, 6x, 1x, 6x, 6x, 3x, posmatrane s leva na desno .....	120
<b>Slika 41.</b> F4 (alginat srednje viskoznosti uz dodatak inulina) čestice inkapsulirane ekstraktom aronije, različitih uvećanja, 1x, 6x, 6x, 13x, 6x, 1x, posmatrane s leva na desno .....	121
<b>Slika 42.</b> Izgled mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem u koje je inkapsuliran ekstrakt aronije u nosače maltodekstrin, arapska guma, mleko u prahu, respektivno .....	123
<b>Slika 43.</b> Količina oslobođenih polifenola iz mikročestica u koje je inkapsuliran ekstrakt aronije u tri različita nosača metodom sušenja raspršivanjem .....	124
<b>Slika 44.</b> Količina otpuštenih antocijana iz mikročestica u koje je inkapsuliran ekstrakt aronije, u tri različita nosača metodom sušenjem raspršivanjem .....	125
<b>Slika 45.</b> Veličine mikročestica dobijenih metodom sušenja raspršivanjem .....	126
<b>Slika 46.</b> FTIR spektri (a) maltodekstrina (b) arapske gume (c) mleka u prahu, u koje je inkapsuliran ekstrakt aronije .....	128
<b>Slika 47.</b> HPLC-DAD hromatogrami antocijana (A) i fenolnih kiselina i flavonoida (B) u etanolnom ekstraktu dobijenom iz suvog ploda. (A) (1) Cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid (2) Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid (3) Cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid, (B) (1) Hlorogena kiselina (1a) Derivat hlorogene kiseline (2) Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid (rutin) (3) Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid (hiperozid) (4) Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid (izokvercetin) .....	131

---

<b>Slika 48.</b> FRAP i ABTS liofilizovanog ekstrakta koji se koristio u <i>in vivo</i> studiji kod SHR .....	134
<b>Slika 49.</b> Uticaj primene ekstrakta suvog ploda aronije na telesnu masu kod SHR, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt .....	135
<b>Slika 50.</b> Efekat konzumacije liofilizovanog ekstrakta suvog ploda aronije na dnevni unos vode (A) i diurezu (B) kod spontano hipertenzivnih pacova, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt .....	137
<b>Slika 51.</b> Uticaj ekstrakta aronije na sistemske hemodinamske parametre (A) sistolni arterijski pritisak, (B) dijastolni arterijski pritisak, (C) srednji arterijski pritisak, (D) pulsni pritisak u eksperimentalnim grupama, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt .....	138
<b>Slika 52.</b> FRAP i ABTS aktivnosti u plazmi, nakon primene liofilizovanog ekstrakta aronije .....	147
<b>Slika 53.</b> Efekti četvoronedeljnog tretmana liofilizovanim ekstraktom aronije na TBARS u (A) plazmi, (B) eritrocitima kod SHR, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt .....	148
<b>Slika 54.</b> Uticaj hronične konzumacije ekstrakta aronije na aktivnost enzima antioksidativne zaštite (A) superoksid dismutaze-SOD, (B) katalaze-CAT, (C) glutation peroksidaze-GPx, (D) glutation reduktaze-GR u eksperimentalnim grupama, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt .....	150
<b>Slika 55.</b> Hromatogrami ekstrakta (50% etanol, 1:30 odnos droga-rastvarač, 1 mm veličina čestica) .....	188
<b>Slika 56.</b> Hromatogrami ekstrakta (50% etanol, 1:20 odnos droga-rastvarač, 1 mm veličina čestica) .....	189
<b>Slika 57.</b> Hromatogrami ekstrakta (70% etanol, 1:30 odnos droga-rastvarač, 1 mm veličina čestica) .....	190
<b>Slika 58.</b> Hromatogrami ekstrakta (70% etanol, 1:20 odnos droga-rastvarač, 1 mm veličina čestica) .....	191
<b>Slika 59.</b> Hromatogrami ekstrakta (70% etanol, 1:20 odnos droga-rastvarač, 0.75 mm veličina čestica) .....	192

---

<b>Slika 60.</b> Hromatogrami ekstrakta (50% etanol, 1:30 odnos droga-rastvarač, 0.75 mm veličina čestica) .....	193
<b>Slika 61.</b> Hromatogrami ekstrakta (70% etanol, 1:30 odnos droga-rastvarač, 0.75 mm veličina čestica) .....	194
<b>Slika 62.</b> Veličina i distribucija čestica dobijenih inkapsulacijom ekstrakta aronije u maltodekstrin .....	195
<b>Slika 63.</b> Veličina i distribucija čestica dobijenih inkapsulacijom ekstrakta aronije u mleko u prahu .....	196
<b>Slika 64.</b> Veličina i distribucija čestica dobijenih inkapsulacijom ekstrakta aronije u arapsku gumu .....	197

## **LISTA ŠEMA**

<b>Šema 1.</b> Prikaz eksperimenata po svim fazama tokom optimizacije ekstrakcije .....	52
<b>Šema 2.</b> Faze eksperimentalnog rada tokom mikroinkapsulacije metodom elektrostatičke ekstruzije .....	59
<b>Šema 3.</b> Faze eksperimentalnog rada tokom mikroinkapsulacije metodom sušenja raspršivanjem .....	62
<b>Šema 4.</b> Prikaz <i>in vivo</i> eksperimenata na modelu eksperimentalne hipertenzije.....	72

---



## **LISTA TABELA**

<b>Tabela 1.</b> Prikaz faktora i nivoa korišćenjem $2^4$ faktorijalnog dizajna .....	51
<b>Tabela 2.</b> Formulacije pripremljenih čestica .....	55
<b>Tabela 3.</b> Eksperimentalni dizajn $2^3$ za ispitivanje faktora koji utiču na ekstrakciju ukupnih fenola (TP) i ukupnih antocijana (TA), sa eksperimentalno dobijenim i predviđenim vrednostima .....	81
<b>Tabela 4.</b> Statistička analiza optimizacije ekstrakcije upotrebom $2^3$ faktorijalnog dizajna..	85
<b>Tabela 5.</b> Identifikacija i sadržaj pojedinačnih antocijana i flavonoida (mg/g droge) u ekstraktima aronije određenih HPLC analizom .....	85
<b>Table 6.</b> Veličina hidrogel čestica izrađenih različitim veličinama igala i alginatima različitih viskozитета, sa ili bez dodatka inulina (4 x 3) eksperimentalni dizajn .....	92
<b>Tabela 7.</b> Uticaj sušenja na veličinu čestica .....	93
<b>Tabela 8.</b> Sadržaj ukupnih fenola, antocijana, proantocijanidina u liofilizovanom ekstraktu aronije i sadržaj pojedinačnih antocijana, flavonoida i fenolne kiseline u etanolnom ekstraktu suvog ploda aronije određenih HPLC metodom .....	132
<b>Tabela 9.</b> Efekat četvoronedeljnog konzumiranja liofilizovanog ekstrakta aronije na sistemske i regionalne hemodinamske parametre kod spontano hipertenzivnih pacova (SHR), gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt .....	140
<b>Tabela 10.</b> Efekat ekstrakta aronije na biohemijske parameter kod spontano hipertenzivnih pacova (SHR) .....	144

---

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1. Značaj bobičastog voća</b> .....	1
<b>2. Aronija</b> .....	2
<b>2.1. Botaničke karakteristike</b> .....	2
<b>2.2. Hemijski sastav ploda aronije</b> .....	3
Polifenoli .....	4
Flavonoidi .....	7
Antocijani .....	8
Proantocijanidini .....	15
<b>2.3. Biološke aktivnosti aronije</b> .....	17
<b>2.4. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije</b> .....	20
2.4.1. Primena eksperimentalnog dizajna u optimizaciji ekstrakcije .....	22
2.4.2. Stabilnost polifenolnih jedinjenja iz ekstrakata .....	23
<b>3. Inkapsulacija polifenolnih jedinjenja iz ekstrakata</b> .....	24
<b>3.1. Mikročestice</b> .....	27
<b>3.2. Materijali koji se koriste za izradu mikročestica</b> .....	29
Alginat .....	29
Inulin .....	33
<b>3.3. Izrada mikročestica</b> .....	34
3.3.1. Elektrostatička ekstruzija .....	34
3.3.2. Mikroinkapsulacija metodom sušenjem raspršivanjem .....	37
<b>3.4. Kriterijumi za izbor metode inkapsulacije</b> .....	39
<b>3.5. Karakterizacija mikročestica</b> .....	40
<b>3.6. Mikroinkapsulacija polifenola iz ploda aronije</b> .....	41
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	42
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	43
<b>3.1. Biljni materijal</b> .....	43
<b>3.2. Hemikalije i reagensi</b> .....	44

---

<b>3.3. Hemijske analize ukupnih aktivnih principa</b> .....	45
3.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola .....	45
3.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana .....	46
3.3.3. Određivanje ukupnih proantocijanidina .....	46
3.3.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta aronije (FRAP i ABTS metoda)....	47
<b>3.4. Hemijska analiza pojedinačnih jedinjenja-HPLC metoda</b> .....	47
3.4.1. Kvantitativna analiza antocijana .....	47
3.4.2. Kvantitativna analiza flavonoida .....	48
<b>3.5. Optimizacija ekstrakcije</b> .....	48
3.5.1. Ispitivanje optimalnih uslova ekstrakcije .....	49
3.5.2. Dizajn eksperimenta .....	50
3.5.2.1. Definisane (izbor) nivoa nezavisno promenljivih koje će biti korišćene eksperimentalnom dizajnu .....	50
3.5.2.2. Faktorijalni dizajn .....	50
<b>3.6. Poređenje metoda ekstrakcije-maceracija i ultrazvučna metoda</b> .....	51
<b>3.7. Mikroinkapsulacija ekstrakta</b> .....	53
3.7.1. Priprema ekstrakta za mikroinkapsulaciju .....	53
<b>3.8. Inkapsulacija polifenola aronije u alginat i alginat/inulin sisteme metodom elektrostatičke ekstruzije</b> .....	54
3.8.1. Sušenje čestica metodom sušenja zamrzavanjem (liofilizacijom) .....	55
3.8.2. Karakterizacija čestica .....	56
3.8.2.1. Određivanje veličine čestica .....	56
3.8.2.2. Određivanje efikasnosti inkapsulacije polifenola .....	56
3.8.2.3. Oslobođanje polifenola u <i>in vitro</i> uslovima .....	57
Preliminarna ispitivanja oslobađanja polifenola .....	57
Ispitivanje uticaja sušenja i različitih pH vrednosti medijuma na oslobađanje polifenola iz hidrogel i liofilizovanih čestica .....	57
3.8.2.4. FTIR analiza .....	58
3.8.2.5. SEM analiza čestica .....	58
<b>3.9. Inkapsulacija polifenola aronije metodom sušenja raspršivanjem</b> .....	60

---

3.9.1. Karakterizacija mikročestica .....	61
3.9.1.1. Oslobođanje polifenola i antocijana iz mikročestica u <i>in vitro</i> uslovima .....	61
3.9.1.2. FTIR analiza .....	61
3.9.1.3. Određivanje veličine čestica.....	61
<b>3.10. Potvrda delovanja ekstrakta dobijenog optimizacijom ekstrakcije na modelu eksperimentalne hipertenzije .....</b>	<b>63</b>
3.10.1. Životinje .....	63
3.10.2. Merenje sistemskih hemodinamskih parametara .....	64
3.10.3. Merenje regionalnih hemodinamskih parametara .....	65
3.10.4. Određivanje biohemijskih parametara .....	65
3.10.5. Određivanje stepena lipidne peroksidacije metodom TBARS u plazmi i eritrocitima .....	66
3.10.6. Određivanje antioksidativnog kapaciteta plazme pomoću FRAP i ABTS metode ...	67
3.10.7. Određivanje enzima antioksidativne zaštite .....	67
3.10.7.1. Određivanje hemoglobina metodom Drabkina i Austina .....	68
3.10.7.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) .....	68
3.10.7.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) .....	69
3.10.7.4. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) .....	70
3.10.7.5. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR) .....	71
<b>4. STATISTIČKA ANALIZA .....</b>	<b>73</b>
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>74</b>
<b>5.1. Optimizacija ekstrakcije ploda aronije .....</b>	<b>74</b>
5.1.1. Optimalni uslovi ekstrakcije (preliminarna ispitivanja) .....	74
5.1.1.1. Uticaj vremena ekstrakcije .....	76
5.1.1.2. Uticaj odnosa droga-rastvarač .....	76
5.1.1.3. Uticaj različitih rastvarača na ekstrakciju .....	77
5.1.1.4. Uticaj stepena usitnjenosti .....	78
5.1.2. Pun faktorijalni dizajn u optimizaciji ekstrakcije .....	79

---

5.1.3. HPLC karakterizacija odabranih ekstrakta .....	83
5.1.4. Poređenje metoda ekstrakcije-maceracija i ultrazvučna ekstrakcija .....	88
<b>5.2. Mikroinkapsulacija ekstrakta aronije u sisteme alginat i alginat/inulin metodom elektrostatičke ekstruzije .....</b>	<b>89</b>
Optimizacija mikroinkapsulacije .....	90
5.2.1. Uticaj različitih eksperimentalnih faktora na veličinu čestica .....	90
5.2.2. Uticaj sušenja na veličinu čestica .....	96
5.2.3. Efikasnost inkapsulacije polifenola u sisteme alginat i alginat/inulin .....	97
5.2.3.1. Ispitivanje procesnih parametara na efikasnost inkapsulacije .....	97
5.2.3.2. Uticaj sušenja zamrzavanjem (liofilizacije) na količinu inkapsuliranih polifenolnih jedinjenja .....	100
5.2.4. Ispitivanje oslobađanja inkapsuliranih polifenola .....	103
5.2.4.1. Optimizacija eksperimentalnih uslova koji su uticali na oslobađanje polifenola ..	103
5.2.4.2. Uticaj sušenja i različitih pH vrednosti medijuma na oslobađanje iz mikročestica .....	108
5.2.5. Furijerova transmisiona infracrvena spektroskopska analiza mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom .....	112
5.2.6. Morfologija čestica .....	115
5.2.6.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija mikročestica-SEM analiza .....	115
5.2.6.2. Analiza mikročestica pod lupom .....	119
<b>5.3. Mikroinkapsulacija ekstrakta aronije metodom sušenjem raspršivanjem .....</b>	<b>122</b>
Karakterizacija mikročestica .....	123
5.3.1. Ispitivanje oslobađanja ukupnih fenola i ukupnih antocijana iz mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem .....	123
5.3.2. Određivanje veličine čestica .....	126
5.3.3. FTIR analiza mikročestica dobijenih metodom sušenjem raspršivanjem .....	128
<b>6. Ispitivanje bioloških efekata ekstrakta aronije .....</b>	<b>130</b>
6.1. Karakterizacija ekstrakta aronije koji se primenjivao kod eksperimentalnih životinja .....	130

---

6.2. Sadržaj ukupnih fenola, antocijana i proantocijanidina u liofilizovanom ekstraktu aronije .....	133
6.3. FRAP i ABTS aktivnost liofilizovanog ekstrakta .....	134
6.4. Uticaj primene ekstrakta aronije na diurezu, dnevni unos vode i telesnu masu .....	135
6.5. Delovanje ekstrakta aronije na sistemske i regionalne hemodinamske parametre .....	138
6.6. Ispitivanje uticaja ekstrakta aronije na biohemijske parametare .....	143
Uticaj primene ekstrakta na lipidni status .....	145
Uticaj primene ekstrakta aronije na glikemiju .....	145
6.7. Ispitivanje uticaja ekstrakta aronije na antioksidantni kapacitet i redukujući potencijal plazme .....	146
6.8. Uticaj ekstrakta aronije na smanjenje lipidne peroksidacije .....	147
6.6. Ispitivanje uticaja ekstrakta aronije na enzime antioksidativne zaštite .....	149
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>153</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>157</b>
<b>8. PRILOG I</b>	
Količine ukupnih fenola i ukupnih antocijana dobijenih tokom faze optimizacije ekstrakcije primenom 4 x 3 x 4 x 5 eksperimentalnog dizajna .....	180
<b>9. PRILOG II</b>	
Karakterizacija i kvantifikacija pojedinačnih antocijanskih i flavonoidnih jedinjenja urađena HPLC-DAD metodom .....	188
<b>10. PRILOG III</b>	
Veličina i distribucija mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem (Mastersizer 2000) .....	195
<b>11. PRILOG IV</b>	
Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije .....	198
<b>12. BIOGRAFIJA AUTORA</b> .....	<b>201</b>

---

## **Lista skraćenica**

BHT - butilhidroksi toluen

ABTS- 2,2-azobis (3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat)

ANOVA- analiza varijanse (eng. *analysis of variance*)

CAT- katalaza

GAE- ekvivalenti galne kiseline (eng. *gallic acid equivalents*)

GSH- glutation

GSSG- glutation-disulfid

GPx-glutation-peroksidaza

GR-glutation-reduktaza

HDL- lipoprotein velike gustine (eng. *high density lipoprotein*)

LDL- lipoprotein male gustine (eng. *low density lipoprotein*)

NADPH- nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

NO- azot-monoksid

RNS- reaktivne vrste azota (eng. *reactive nitrogen species*)

ROS- reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*)

SD- standardna devijacija

SOD- superoksid-dismutaza

TBARS- tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance (eng. *thiobarbituric acid reacting substances*)

SP-sistolni pritisak

DP-dijastolni pritisak

SAP-srednji arterijski pritisak

PP-pulsni pritisak

TE-Trolox ekvivalent

SHR-spontano hipertenzivni pacovi (engl. *spontaneously hypertensive rats*)

HPLC-visoko efikasna tečna hromatografija

FTIR-Furijerova transmisiona infracrvena spektroskopija

SEM-Skenirajuća elektronska mikroskopija

---

# 1. UVOD

## 1. Značaj bobičastog voća

Budući da se savremeni način života povezuje sa neadekvatnom ishranom i sve učestalijom pojavom različitih hroničnih oboljenja, poslednjih godina sve je više aktuelna potreba za primenom i proučavanjem alternativnih prirodnih supstanci, antioksidanasa kojima bi se postiglo ciljano zaštitno dejstvo na organizam. Od momenta, kada su istraživači pre 20-30 godina otkrili da slobodni radikali koji nastaju u ljudskom organizmu mogu da oštete ćelije i mogu biti uzročnici mnogobrojnih bolesti, ispitivanja antioksidanasa, posebno prirodnog porekla su u fokusu farmaceutskih istraživanja (Stojanović i sar. 2012; Shahidi i sar. 2015). Shodno tome, izveštaji o preporuci za potrošnju prirodnih antioksidanasa u ljudskoj ishrani, ali i prevenciji i terapiji su veoma česti. Svrha pravilne ishrane danas je da obezbedi odgovarajući unos energetske i gradivne materije, a da se postigne i održi optimalna telesna težina i spreči nastanak hroničnih oboljenja. Od funkcionalne hrane se očekuje da, pored hranljive vrednosti, ima i fiziološku funkciju koja je posledica prisustva bioaktivnih jedinjenja.

Voće i povrće su veoma važni izvori hranljivih materija u balansiranoj ishrani, a među mnogobrojnim biljnim vrstama koje se preporučuju u različitim epidemiološkim studijama, izdvaja se bobičasto voće. Interesovanje za bobičasto voće je sve veće proteklih godina, jer visok unos može imati povoljne efekte na smanjenje rizika od nastanka kardiovaskularnih, malignih i različitih degenerativnih bolesti. Bobičasto voće se danas sve češće naziva i funkcionalnom hranom, jer ima važnu ulogu u promociji zdravlja i smanjenju rizika od nastanka bolesti (Szajdek i Borowska, 2008). Bioaktivne komponente iz bobičastog voća poseduju snažno protektivno dejstvo zahvaljujući njihovom antioksidativnom potencijalu. Pokazano je da ukupni antioksidativni potencijal pojedinačnog bobičastog voća zavisi od strukture prisutnih fenolnih jedinjenja, kao i od njihovog ukupnog sadržaja. Ispitivanje koje je obuhvatilo 92 različita biljna ekstrakta, dobijena od različitih biljnih vrsta, pokazalo je da bobičasto voće poseduje najveći antioksidativni kapacitet (Kahkonen i sar. 1999). Ovo se



pripisuje visokom sadržaju različitih aktivnih principa, a posebno polifenolnih jedinjenja (Seeram i sar. 2008). Po najvećem antioksidativnom kapacitetu ističe se bobičasto voće tamno plave ili ljubičaste boje, a među njima po najvećoj antioksidativnoj aktivnosti odnosno sadržaju polifenola, izdvajaju se plodovi aronije (Gil i sar. 2000; Kokotkiewicz, Jaremicz i Luczkiewicz, 2010; Bräunlich i sar. 2013; Denev i sar. 2010; Kulling i sar. 2008). Pokazano je da plod aronije ispoljava čak i do 4 puta veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostalo polifenolima bogato bobičasto voće, kao što su plod borovnice i ribizle (Gil i sar. 2000). Ispitivanje hemijskog sastava i bioloških efekata aronije, danas je u žiži naučnih istraživanja.

## 2. Aronija

### 2.1. Botaničke karakteristike

Aronija (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, engl. *wild gooseberry* ili divlji ogrozd) pripada porodici Rosaceae, a podporodici Maloideae i jedan je od najbogatijih izvora polifenolnih jedinjenja među biljkama, u kojima dominiraju antocijani, proantocijanidini, fenolne kiseline, flavanoli (Rugina i sar. 2012; Sueiro i sar. 2006; Bräunlich i sar. 2013; Kulling i Rawel, 2008).

U ishrani se koriste dve vrste, crna i crvena aronija, odnosno *A. melanocarpa* (*Black chokeberry*, *Aronia noir*) i *A. arbutifolia* (*Red chokeberry*, *Aronia rouge*). *A. prunifolia* koja predstavlja treći entitet, je kombinacija prethodne dve vrste i smatra se hibridom. Crna aronija je najbogatija hranljivim sastojcima i biološki aktivnim jedinjenjima, pa je i njena upotreba najveća, i u narodu široko korišćena aronija je upravo ova vrsta. U skladu s tim, ona se najčešće uzgaja zbog ploda koji može da se koristi svež, ali se češće prerađuje i konzumira u vidu soka, džema, vina, sirupa.



Slika 1. *Aronia melanocarpa*

Plod aronije vodi poreklo iz Severne Amerike i Kanade, gde su ga prvi naseljenici ovog kontinenta koristili za lečenje prehlade i podizanje imuniteta. Početkom 20-og veka je počela da se gaji i u Istočnoj Evropi, Skandinaviji i Rusiji, i svim zemljama bivšeg Sovjetskog saveza, a danas se široko gaji i upotrebljava i u Poljskoj (Kokotkiewicz, Jaremicz i Luczkiewicz, 2010). Može se gajiti u blažim klimatskim uslovima, ali zbog otpornosti na hladnoću, može se prilagoditi uslovima koji nisu povoljni za gajenje drugog voća, i temperaturama i do  $-35^{\circ}\text{C}$ .

Na našim prostorima prisutna je više od 50 godina, ali je u široj upotrebi poslednjih nekoliko godina.

Aronija je žbun (gram), visine 0.9-1 m sa tamnom stabljikom oko 6 mm u prečniku, sa objajastim, glatkim listovima, 3-7 cm dugačkim, belim do rozikastim cvetovima koji cvetaju u maju. Plodovi su u slučaju crne aronije, tamno ljubičaste boje, i sazrevaju rano, između jula i septembra (Kokotkiewicz, Jaremicz i Luczkiewicz, 2010).

## 2.2. Hemijski sastav ploda aronije

Aktivni principi iz ploda aronije pokazuju niz pozitivnih delovanja na zdravlje, a koriste se i u profilaksi, ali i terapiji različitih oboljenja kao što su, u prvom redu kardiovaskularne bolesti, dijabetes, kanceri i druga hronična oboljenja (Kokotkiewicz, Jaremicz i Luczkiewicz, 2010; Galvan D'Alessandro i sar. 2012). Plod i sok od aronije dobri su izvori vitamina C, organskih kiselina, karotenoida, tanina, a sadrže i prirodne šećere i pektine,

vitamine B grupe i minerale (kalijum, cink, magnezijum, natrijum, gvožđe) (Kulling i sar. 2008). Ipak dominantno su prisutna polifenolna jedinjenja, a naročito su zastupljeni proantocijanidini, antocijani i fenolne kiseline.

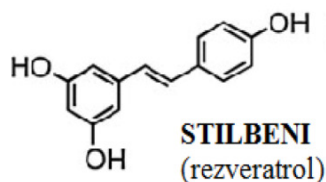
## **Polifenoli**

Po zastupljenosti u ljudskoj ishrani polifenoli su najznačajniji dijetarni antioksidansi i najznačajnija grupa nenutritivnih sastojaka namirnica. Polifenoli čine najbrojniju i najzastupljeniju grupu biološki aktivnih, sekundarnih metabolita biljaka, koji učestvuju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima, deluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, privlače oprašivače i učestvuju u pigmentaciji biljaka. U namirnicama doprinose gorčini, oštrini, boji, ukusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti. Glavni izvori polifenola u ishrani su voće i proizvodi biljnog porekla kao što su voćni sokovi, čajevi, kafa, crveno vino, žitarice, čokolada kao i povrće, a naročito mahunarke. Uprkos njihovoj širokoj zastupljenosti u biljkama, efekti polifenola na zdravlje privukli su veće interesovanje tek tokom poslednjih decenija. Oni su počeli relativno kasno da se izučavaju, a glavni razlog za to je njihova izuzetna raznolikost i kompleksnost strukture, karakteristična po tome što sadrži više od jednog fenolnog jezgra (sa jednom ili više hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu) (Scalbert i sar. 2005).

Do sada je identifikovano više stotina jedinjenja polifenolne strukture prisutnih u namirnicama, a na osnovu hemijske strukture dele se na: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, lignane i tanine (Scalbert i Williamson, 2000; Habauzit i sar. 2014) (Slika 2). Ukupnom dijetarnom unosu polifenola najviše doprinose jedinjenja prve dve grupe, fenolne kiseline i flavonoidi.

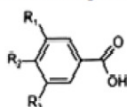
Flavonoidi su podeljeni u više potklasa, a osnovne podgrupe čine flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoli i antocijani (Scalbert i Williamson, 2000). Fenolne kiseline predstavljaju drugu grupu polifenola, koju čine dve potklase jedinjenja, derivati hidroksi benzoeve (vanilinska, galna, elaginska i siringinska) i hidroksi cimetne kiseline (hloragenska kiselina kao najzastupljenija) (Haminiuk i sar. 2012; Manach i sar. 2004; Del Rio i sar. 2013). Tanini predstavljaju grupu polifenola koja određuje senzorne karakteristike svežeg voća i njihovih proizvoda. Oni su odgovorni za kiseo, adstringentni

ukus, kao i promenu boje voća i sokova. U tanine se ubrajaju kondenzovani tanini (proantocijanidini) i estri galne i elaginske kiseline (hidrolizujući tanini) (Bautista-Ortin i sar. 2012; Jimenez-Garcia i sar. 2013). U voću bogatom antocijanima, tanini ih vezuju i formiraju kopolimere, a najveće količina ovakvih tanina je pronađena upravo u aroniji (Hanlin i sar. 2010).



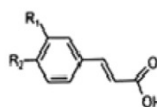
**FENOLNE KISELINE:**

Derivati hidroksi-benzojeve kiseline:



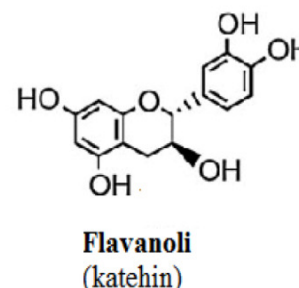
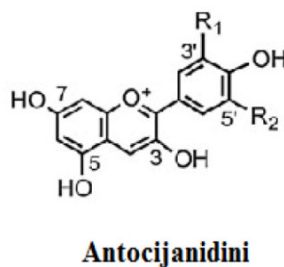
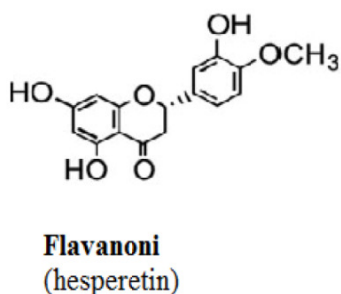
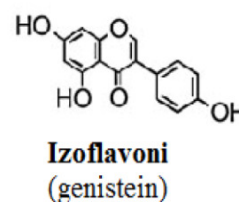
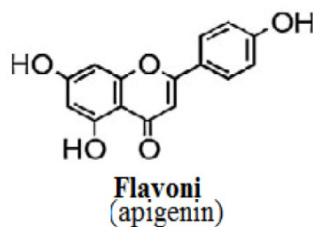
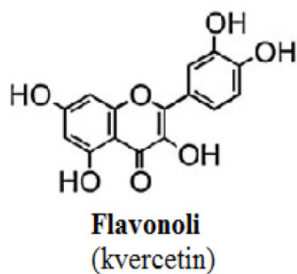
R1=R2=R3=H Protokatehnična kis.  
R1=R2=R3=OH Galna kis.

Derivati cimetne kiseline:



R1=OH Kumarinska kis.  
R1=R2=OH Kafena kis.  
R1=OCH3, R2=OH Ferula kis.

**FLAVONOIDI:**



Slika 2. Osnovne klase polifenolnih jedinjenja (Scalbert i Williamson, 2000)

Antioksidativna aktivnost polifenola zasniva se na njihovoj hemijskoj strukturi i sposobnosti doniranja vodonikovog atoma, odnosno elektrona, sa velikog broja hidroksilnih grupa koje poseduju. Na ovaj način ostvaruje se direktni antioksidativni efekat, uklanjanjem reaktivnih slobodnih radikala. Indirektno antioksidativno delovanje, polifenoli mogu ispoljiti tako što učestvuju u regulaciji aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze) i povoljno deluju na zaštitne mehanizme organizma od oksidativnih oštećenja (Shadidi i sar. 2015; Rice-Evans i sar. 1997; Huang i sar. 2005). Takođe, pojedine klase polifenola mogu da heliraju (vezuju) metalne jone bakra i gvožđa i formiraju metalne komplekse, koji su poznati katalizatori radikalskih reakcija (Hider i sar. 2001).

Polifenoli se odlikuju intenzivnim metabolizmom i malom bioraspoloživošću (Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk, 2011; Belščak-Cvitanović i sar. 2011), te su biološki efekti polifenola najčešće posledica delovanja njihovih metabolita, proizvoda delovanja metaboličkih enzima i mikroflore humanog organizma. Bioraspoloživost polifenola zavisi od klase kojoj određeno polifenolno jedinjenje pripada, ali i od specifične strukture. Danas je identifikovano preko 350 metabolita polifenolnih sastojaka biljaka (Manach i sar. 2005; Denev i sar. 2010). Takođe, polifenoli su veoma osetljivi na toplotu i svetlost, u vodenoj sredini se mogu degradirati ili oksidovati, što može umanjiti njihovu aktivnost, a apsorpcija je otežana, jer su uglavnom velike molekulske mase (Xia i sar. 2010; Čujić i sar. 2016; Stojanović i sar. 2012). Fenolne kiseline, a posebno hlorogena i neohlorogena kiselina su jedna od najzastupljenijih grupa polifenolnih jedinjenja u plodovima aronije. Aronija se među bobičastim voćem smatra najboljim izvorom ovih kiselina sa 96 mg/100 g sveže mase (Mattila i sar. 2006).

Poslednjih godina posebno su atraktivna istraživanja vezana za polifenolna jedinjenja, kojima se pripisuju pozitivni efekti na ljudsko zdravlje zahvaljujući potentnoj biološkoj aktivnosti (Stojanović i sar. 2012; Shahidi i sar. 2015). Studije sa preporukama za konzumiranje polifenola su danas veoma česte (Bräunlich i sar. 2013; Denev i sar. 2010). Pored toga, poseduju i važnu ulogu, sa stanovišta farmaceutske industrije i industrije hrane. Pri dodatku namirnicama ili farmaceutskim preparatima, mogu uticati na usporavanje procesa lipidne peroksidacije, čime povećavaju stabilnost i znatno

produžavaju rok trajanja u primenjenim proizvodima, a mogu i povećati nutritivnu vrednost hranljivih sastojaka. Do nedavno su u širokoj upotrebi bili antioksidansi sintetskog porekla, kao što su butilhidroksianizol (BHA) i butilhidroksitoluen (BHT), međutim njihova upotreba je ograničena zakonskim regulativama zbog sumnje da poseduju, ili mogu biti uzročnici različitih toksičnih i kancerogenih efekata (Shahidi i sar. 2015). Polifenoli su klasa jedinjenja interesantna za primenu u industriji jer se smatraju dobrom alternativom veštačkim antioksidansima, dok su sa medicinskog aspekta interesantni zbog niza dokazanih pozitivnih efekata na zdravlje ljudi. Zbog toga su izolacija i identifikacija ovih biološki aktivnih jedinjenja iz biljaka, njihova dalja primena u smislu obogaćivanja različitih proizvoda, mogućnost primene kao dodatka ishrani, trenutno jedna od najaktuelnijih naučno-istraživačkih tema.

## Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju dobro poznate sekundarne metabolite u biljkama sa značajnim uticajem na ljudsko zdravlje. Flavonoidi su grupa polifenolnih jedinjenja zajedničke hemijske strukture (C6-C3-C6 jedinice) koju čine dva aromatična benzenova prstena povezana sa tri ugljenikova atoma, preko C-3 jedinice, koja su deo heterocikličnog prstena sa kiseonikom (Slika 2) (Scalbert i Williamson, 2000). Na osnovu stepena oksidacije C3 jedinice (centralnog piranovog prstena), mogu biti podeljeni u deset klasa: flavoni, flavanoni, flavonoli, flavanonoli, katehini, antocijani, leukoantocijanidini, halkoni, dihidrohalkoni i auronoli (Scalbert i Williamson, 2000). Flavonoidi danas broje preko 8000 različitih jedinjenja koji ljudi koriste u svakodnevnoj ishrani, a najbolji izvori istih su crveno voće, borovnice, citrusi, jabuke, čokolada, orašasto voće, crni luk, kao i čajevi, pivo i vino (Bigović i sar. 2013). Sintetišu se u listovima, pupoljcima i plodovima biljaka iz šikimske kiseline i imaju brojne uloge u razvoju i reprodukciji biljaka, ali su uključeni i u različite odgovore na stres kod biljaka (Liu i sar. 2013). Na njihovu produkciju utiču faktori životne sredine, kao što su: temperaturni ekstremi, jaka svetlost, UV-B zračenje, niski nivoi ugljen dioksida, dostupnost vode, kao i nedostatak mineralnih materija.

Flavonoidi su poznati po svojoj antioksidativnoj aktivnosti, koja se ogleda u vezivanju slobodnih radikala (reaktivnih oksigen/nitrogen vrsta-ROS/RNS) koji nastaju u ljudskom organizmu pod dejstvom enzima ksantin oksidaze, NADPH oksidaze i lipooksigenaza. ROS/RNS su odgovorne za oksidativni stres, glavni uzrok nastanka kardiovaskularnih bolesti, kao što su ateroskleroza, srčana insuficijencija, arterijska hipertenzija i koronarna srčana bolest (Kardum i sar. 2015).

Istraživanja su pokazala da flavonoidi, pored antioksidativne funkcije, mogu poboljšati funkciju endotela krvnih sudova, inhibirati oksidaciju lipoproteina male gustine, odnosno LDL čestica, smanjiti krvni pritisak i poboljšati stanje dislipidemije (Mulvihill i Huff, 2010). Dokazano je da unos flavonoida u organizam poboljšava arterijsku elastičnost. Kako arterije postaju manje elastične, povećava se pritisak, što na kraju može dovesti do porasta pulsa. Flavonoidi su pokazali mogućnost da snize krvni pritisak kod hipertenzivnih životinja i kao svakodnevni deo ljudske ishrane imaju preventivnu ulogu u mnogim bolestima savremenog doba. Oni su se dokazali i kao dobri vazodilatatori, antiinflamatorni i imunomodulatorni agensi (Gonzalez-Gallego i sar. 2014). Aronija predstavlja značajan izvor flavonoida, a od flavonoidnih jedinjenja najviše su zastupljeni derivati kvercetina (Kokotkiewicz i sar. 2010).

### **Antocijani**

Antocijani su heterozidi antocijanidina i predstavljaju dominantnu grupu polifenola u bobičastom voću, a posebno aroniji. Oni su najvažnija grupa vodeno rastvornih pigmenata, odgovornih za crvenu, ljubičastu i plavu boju mnogih biljaka, povrća, žitarica a posebno jagodastih bobica (Castaneda-Ovando i sar. 2009). Antocijani strukturno pripadaju flavonoidima (Scalbert i Williamson, 2000, Slika 2). Njihovo ime je izvedeno od grčke reči *antho* što znači cvet, i *kyanos* što znači plav. Antocijani se nalaze u sprovodnim snopićima i boja biljnih organa zavisi od pH soka (Kong i sar. 2003). Kod aronije su odgovorni za tamno ljubičastu boju zrelog ploda.

Obuhvataju grupu od preko 500 različitih jedinjenja, u čiji sastav ulazi oko 23 različitih antocijanidina. Do sada je ukupno izolovano 539 antocijana, od kojih je 277 izolovano posle 1992. godine, što ukazuje na to koliko se antocijani intenzivno istražuju. Tokom prethodne decenije, izolovano je 7 novih dezoksiantocijanidina i novi tipovi antocijanidina nazvanih piranoantocijanidini (Beliz i sar. 2004; Timberlake i Bridle, 1997; Kong i sar. 2003; Pascual i Sanchez 2008; Wrolstad 2004; Castaneda-Ovando i sar. 2009).

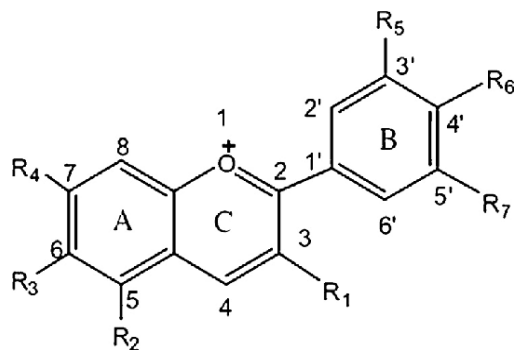
Na njihovu produkciju utiču i različiti faktori životne sredine, kao što su svetlost, temperatura, prisustvo minerala, podneblje i mnogi drugi faktori. Štite biljke od UV zračenja, štetnih mikroorganizama i pomažu u oprašivanju i raznošenju semena privlačenjem insekata (Wrolstad 2004).

Kod biljaka koje se koriste u ishrani, antocijani su rasprostranjeni u 27 familija, 73 roda, i mnoštvu biljnih vrsta (Timberlake i Bridle, 1997). Neke od familija u kojima su zastupljeni antocijani su: Alliaceae, Convolvulaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Labiateae, Liliaceae, Nymphaeaceae, Orchidaceae, Ranunculaceae, Solanaceae, Rosacea, a neke od biljnih vrsta u kojima se sreću, *Vitis vinifera*, *Sambucus nigra*, *Brassica oleracea*, *Hibiscus sabdariffa*, *Citrus sinensis*, *Aronia melanocarapa* i druge (Ćujić i sar. 2013). Aronija se smatra najboljim izvorom antocijana u prirodi, i sadržaj u plodovima ili u sveže iscedenom soku dostiže vrednost od 300-2000 mg/100g.

Već je pomenuto da su antocijani široko rasprostranjeni u prirodi i javljaju se u vidu velikog broja jedinjenja. Glavne razlike između njih su broj hidroksilnih grupa koje sadrže, priroda i broj šećera u njihovoj strukturi, alifatične ili aromatične kiseline vezane za šećer u molekulu, kao i položaj ovih vezivanja (Castaneda-Ovando i sar. 2009; Timberlake i Bridle, 1997).

Antocijani su po hemijskoj strukturi glikozilirani, polihidroksi ili polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilijuma ili flavijum katjona i sadrže dva benzoil prstena (A i B) razdvojena heterocikličnim prstenom C. Strukturne varijacije antocijana se javljaju usled različitog broja hidroksi grupa i njihovog stepena metilovanja, prirode i broja šećera povezanih za fenolni (aglikonski deo) molekula, kao i položaja tih supstituenata, i prirode i broja alifatičnih i aromatičnih kiselina vezanih za šećer (Castaneda-Ovando i sar. 2009, Slika 3).





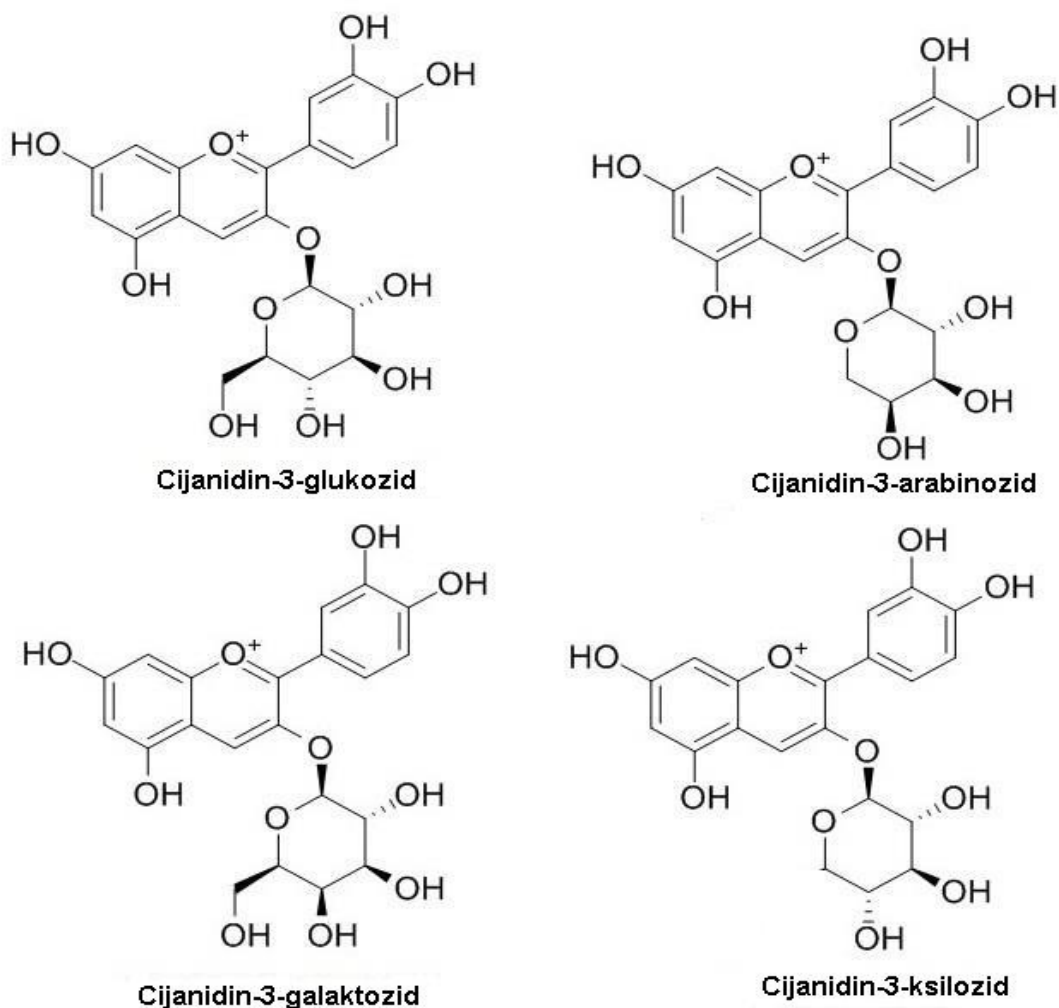
Slika 3. Opšta formula antocijana (Castaneda-Ovando i sar. 2009)

Oko 90% antocijana je pronađeno u glikozidnom obliku, koji kao aglikon sadrže jedan od 6 najčešće prisutnih antocijanidina u prirodi.

Antocijanidini su aglikoni koji se sastoje od aromatičnog prstena, kondenzovanog heterociklusa koji sadrži kiseonik, za koga je takođe vezan C-C vezom treći aromatični prsten (Castaneda-Ovando i sar. 2009, Slika 3). Antocijanidini se uglavnom razlikuju po broju hidroksilnih i metoksi grupa, kao i prirodi, broju i mestima gde se mogu vezati šećeri. Prema literaturnim podacima do sada je poznato više od 23 antocijanidina, od kojih se samo 6 najčešće sreće u prirodi: cijanidin, delfinidin, malvidin, peonidin, petunidin i pelargonidin. Supstitucija sa H, OH i OCH<sub>3</sub> na B prstenu je uzrok postojanja 6 u prirodi najzastupljenijih antocijanidina (Wrolstad 2004).

Glikozidni deo čine šećeri, i to su najčešće glukoza, rutinoza, ramnoza, galaktoza, arabinoza i ksiloza vezani za hidroksilne grupe u položajima 3 i 5 na prstenovima A i C. Varijacije i raznolikost u strukturi antocijana su najviše javljaju zbog acilovanja šećernih grupa različitim kiselinama (Castaneda-Ovando i sar. 2009). Kiseline mogu biti alifatične kao što su sirćetna, p-kumarinska, kafena, malonska, maleinska, ferulinska, oksalna i ćilibarna (Castaneda-Ovando i sar. 2009).

Šest najčešćih antocijanidina u voću i povrću su zastupljeni i distribuirani sledećim redosledom: cijanidin 50%, delfinidin 12%, pelargonidin 12%, peonidin 12%, petunidin 7% i malvidin 7%. U glikozidne derivate najviše rasprostranjene u prirodi spadaju 3-glikozidi, 3,5 i 3,7 diglikozidi (Andersen i sar. 2006; Beliz i sar. 2004; Timberlake i Bridle, 1997; Wrolstad 2004).



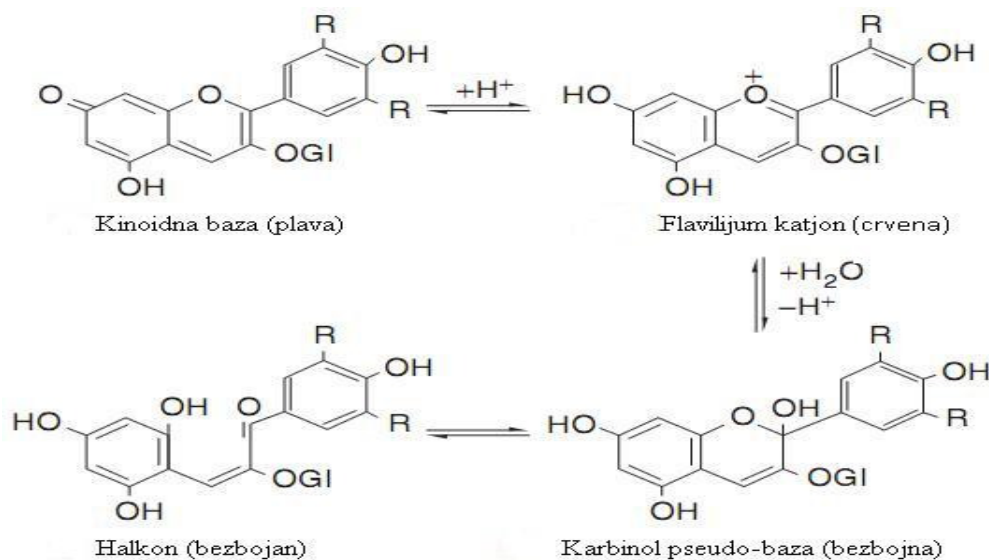
Slika 4. Najčešći antocijani izolovani iz aronije (Cataneda-Ovando i sar. 2009)

Antocijani reverzibilno trpe strukturne transformacije sa promenom pH što ima najveći uticaj na boju. Pojavu boje prvi je objasnio Pauling 1939. godine, koji je objasnio da je rezonantna struktura flavijum jona odgovorna za intenzitet njihove boje (Wrosta 2004; Castaneda-Ovando i sar. 2009).

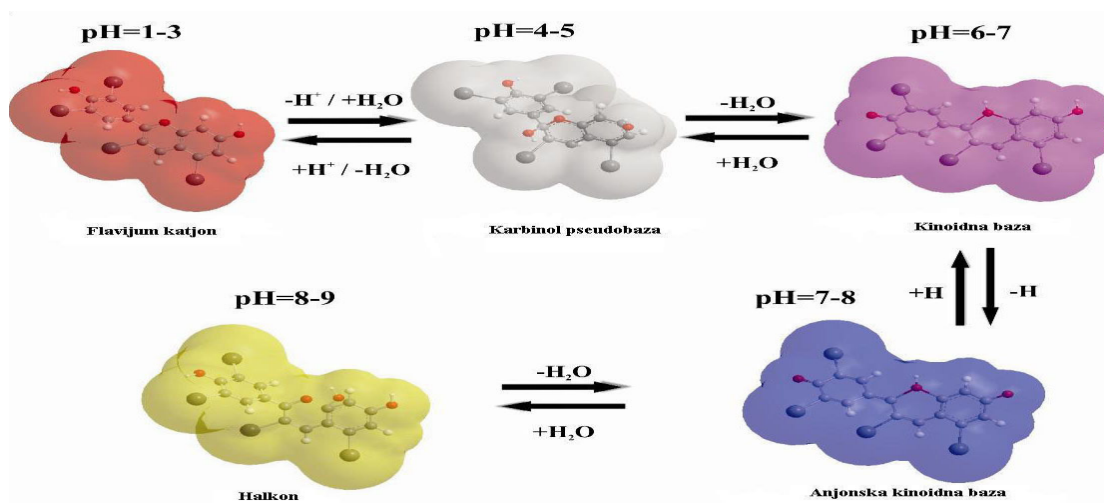
Flavijum katjon je stabilan jedino u veoma niskom području pH (Slika 5). Kako se pH vrednost povećava (4-5), boja flavijum katjona (crvena) prelazi u bezbojan hromenol. Pri pH vrednosti između 6 i 7 boja je ljubičasta, zbog prisustva kinoidalne anhidrobaze, u opsegu pH vrednosti između 7 i 8 zbog prisustva jonske anhidro baze boja je tamno plava, i jonska anhidro baza se transformiše tako što se prsten otvara i dobija se halkon žute boje

(Slika 5). Pri višim pH vrednostima boja se može stabilizovati prisustvom viševalentnih jona  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ . Pri višim vrednostima slobodni antocijanidini se degradiraju preko hromenola i  $\alpha$ -diketona do aldehida i karboksilnih kiselina. Smatra se da su proantocijanidini, prvo nazvani leukoantocijanidinima, bezbojni prekursori antocijanidina (Beliz i sar. 2004).

A



B



Slika 5. Različite forme antocijana u zavisnosti od pH vrednosti, A) hemijske strukture; B) šematski prikaz

Pelargonidin kao najstabilniji antocijanidin je i najviše zastupljen u prirodi (Beliz i sar. 2004; Timberlake i Bridle, 1997). Nasuprot aglikonima, monoglikozidni i diglikozidni

derivati su stabilniji u neutralnoj sredini gde se molekuli šećera ne raspadaju do fenolne kiseline i aldehida.

Aronija se smatra najboljim izvorom antocijana u prirodi i njihov sadržaj se kreće u intervalu 5-10 g/kg sveže mase (Seeram i sar. 2008). Smatra se da antocijani čine 25% od ukupnih polifenolnih jedinjenja prisutnih u plodovima aronije, što je značajno više od sadržaja ostalih prisutnih klasa polifenola.

U poređenju sa ostalim vrstama bobičastog, ali i voća uopšte, spektar prisutnih antocijana u aroniji je prilično jednoličan. To podrazumeva prisustvo gotovo isključivo cijanidin-glikozida i to cijanidin-3-*O*-glukozida, cijanidin-3-*O*-galaktozida, cijanidin-3-*O*-ksilozida i cijanidin-3-*O*-arabinozida (Oszmianski i sar. 2005). Zbog visokog sadržaja, antocijani u najvećoj meri doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti ploda aronije.

Antocijani su veliki molekuli, dobro rastvorljivi u vodi, slabo se resorbuju i ne metabolišu se u istom stepenu kao drugi flavonoidi. Zbog toga se smatra da antocijani imaju malu bioraspoloživost (Del Rio 2010). Ipak antocijani dele i neke zajedničke metaboličke reakcije sa ostalim flavonoidima, i kao i svi flavonoidi prisutni su u hrani uglavnom kao glikozidi. Aglikonski deo je hidrofoban i lako prolazi kroz membrane pasivnom difuzijom. Difuzija hidrofilnog dela antocijana se ne odvija lako kroz membrane. Apsorpcija antocijana se odigrava aktivnim transportom tako što prvo dolazi do hidrolize (Scalbert i Williamson, 2000).

Gastrointestinalni trakt (GIT) je karakterističan kao region sa različitom pH vrednošću i različitom mikroflorom, a oba ova faktora mogu da modifikuju apsorpciju antocijana. pH u želucu je nizak, sa vrednošću između 1 i 2, tako da su antocijani uglavnom prisutni u vidu flavijum jona koji je najstabilnija forma antocijana. Stabilnost antocijana u uslovima sličnim onima u GIT-u je potvrđena različitim *in vivo* studijama (Stanisavljević i sar. 2015). Suprotno od uslova u želucu, okruženje malog i velikog intestinuma je uglavnom u neutralnom pH području gde su prisutne višemolekularne forme antocijana i gde su manji stabilni (Kay 2006).

Antocijani su hranljive bioaktivne komponente sa dvostrukim značajem, prvim tehnološkim, zbog njihovog uticaja na senzorne karakteristike prehrambenih proizvoda i drugim biološkim (Castaneda-Ovando i sar. 2009). Antocijani, kao najvažniji pigmenti mnogih

biljaka, neškodljivi su i lako rastvorni u vodenoj sredini, što ih čini pogodnim za upotrebu. U Evropskoj Uniji svi derivati antocijana su prepoznati kao prirodni pigmenti i klasifikovani kao E163. S druge strane, interesovanje za antocijane je sve veće proteklih par godina zbog njihove antioksidativne aktivnosti. Dnevna potrošnja antocijana je procenjena na 3-215 mg/danu (Chun i sar. 2007). Prema Evropskoj agenciji za bezbednost hrane, bezbedan unos hranom je 36 mg antocijana dnevno (Wrolstad 2004).

Antocijani su zajedno sa ostalim flavonoidima važni nutritivni sastojci zbog svojih antioksidativnih sposobnosti, što ukazuje na njihovu potencijalnu primenu u prevenciji bolesti koje su povezane sa oksidativnim stresom (Del Rio 2010).

Više studija je pokazalo da je sadržaj antocijana povezan sa visokom antioksidativnom aktivnošću, i da doprinose da voće i povrće koji ih sadrže imaju pozitivan efekat kod degenerativnih i hroničnih bolesti. Dosadašnja ispitivanja antocijana su pored antioksidativnog delovanja, pokazala i druga njihova lekovita svojstva, antiinflamatorno (Tabart i sar. 2012), neuroprotektivno i antikonvulzivno (Rodrigues i sar. 2012), hemoprotektivno i antiedematozno (Bishayee i sar. 2011), kao i sposobnost da smanje rizik od nastanka hroničnih nezaraznih bolesti (Ostertag i sar. 2010) i poboljšaju kognitivno ponašanje kod hroničnih bolesti kao što je Alchajmerova (Ebrahimi i Schluesener, 2012). Poznata je pojava da Francuzi, jedni od najvećih konzumenata crvenog vina, bogatog antocijanima znatno manje boluju od kardiovaskularnih oboljenja u odnosu na ostale Evropljane (Wrolstad 2004).

Antocijani pokazuju veću antioksidativnu aktivnost nego vitamini C i E, i imaju sposobnost da uklanjaju slobodne radikale doniranjem vodonika iz fenolnih grupa. Ono što je još primećeno je da postoji linearana korelacija između antioksidativnog kapaciteta i sadržaja antocijana. Osim toga, ekstrakti bobičastog voća imaju veliki potencijal uklanjanja slobodnih radikala, i kod njih je antioksidativna aktivnost proporcionalna sadržaju antocijana (Ćujić i sar. 2013; Castaneda-Ovando i sar. 2009). Dokazano je da aronija ima najvišu antioksidativnu aktivnost u odnosu na sve ostale dijetarne vrste porodice Rosaceae, kojoj u najvećoj meri doprinose antocijani (Kokotkiewicz i sar. 2010; Kong i sar. 2003).

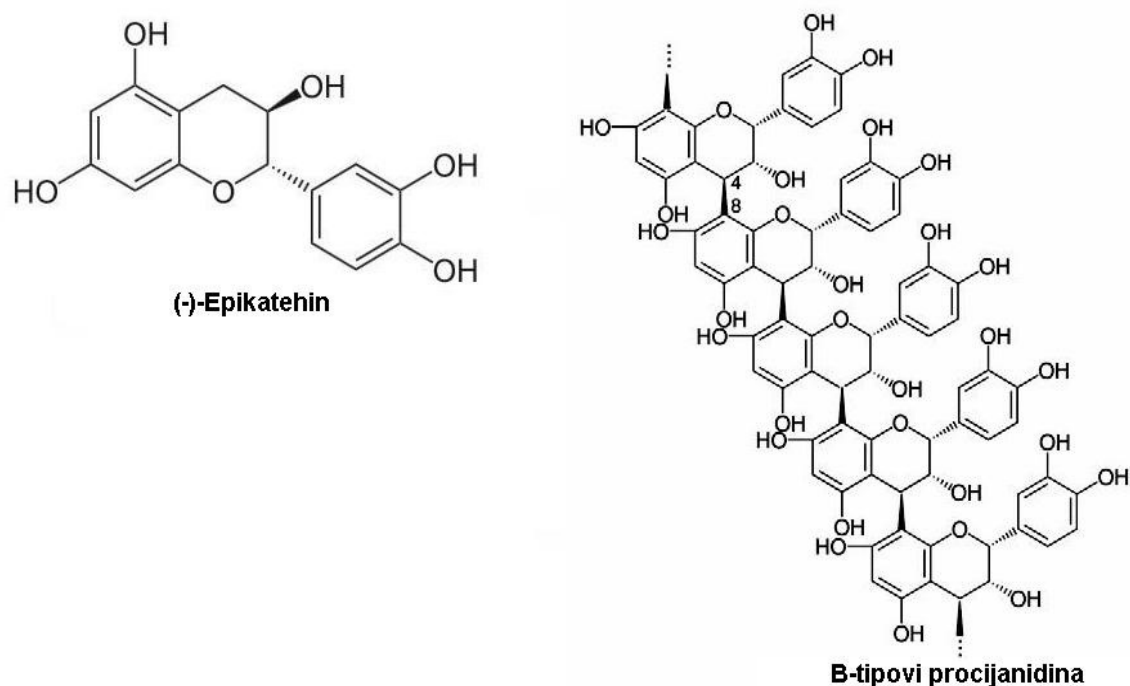
Antocijani su zajedno sa ostalim flavonoidima važni nutritivni sastojci zbog svojih antioksidativnih sposobnosti, što ukazuje na njihovu potencijalnu primenu u prevenciji

bolesti koje su povezane sa oksidativnim stresom (Del Rio 2010). Zbog njihovog pozitivnog efekta na zdravlje, antocijani i biljne vrste koje ih sadrže mogu da predstavljaju osnovu za dijetetske suplemente značajne naročito za ljude sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti ili metaboličkog sindroma. Takođe, konzumacija proizvoda koji sadrže antocijane, s obzirom na njihov visok antioksidativni potencijal, može imati i pozitivne efekte u prevenciji drugih oboljenja što otvara nova polja istraživanja.

Zbog ogromnog potencijala antocijana, kao prirodnih antioksidanasa i neškodljivih pigmenata, sve je veći broj istraživanja u različitim oblastima kao što su razvoj analitičkih metoda, izolovanje, identifikacija, upotreba u hrani i farmaceutskim proizvodima, praćenje promena boje, biosinteza.

### **Proantocijanidini**

Proantocijanidini su biološki aktivna jedinjenja aronije koja su takođe visoko zastupljena. Oni se smatraju bezbojnim antocijanidinima, i to su oligomerni i polimerni epikatehini, nastali asocijacijom više monomernih jedinica. Proantocijanidini se razlikuju međusobno po konfiguraciji i poziciji veza kojim su pojedinačni monomeri spojeni. U slučaju plodova aronije, proantocijanidini su gotovo isključivo tzv. B tipa (C4-C8 veza) sa (-)-epikatehinom kao glavnom monomernom subjedinicom (Oszmianski i Wojdylo, 2005). Do sada je otkriveno 15 podklasa proantocijanidima, međutim samo nekoliko njih je zastupljeno u hrani, biljkama i namirnicama (Porter, 1994). Proantocijanidini ispoljavaju nekoliko bioloških aktivnosti koje imaju ulogu da štite biljne vrste u kojima se nalaze od mikroba, gljivica i životinja, pre svega zahvaljujući adstringentnom delovanju.



Slika 6. Hemijska struktura procijanidina (Castaneda-Ovando i sar. 2009)

Ovi sekundarni biljni metaboliti su pokazali značajno antioksidativno i antiradikalno delovanje, čak veće i od vitamina C i E (Santos-Buelga i Scalbert, 2000; Bagchi i sar. 2000; Bors i sar. 2001; Beninger i Hosfield, 2003). Glavni doprinos antioksidativnoj aktivnosti potiče od prisustva katehol grupe (hidroksilna grupa na B prstenu) (Rice-Evans i sar. 1996). Nekoliko kliničkih studija je pokazalo značajno poboljšanje vaskularnog zdravlja kod pacijenata koji su kratkotrajno ili hronično konzumirali proantocijanidine ili namirnice bogate ovim jedinjenima. Smatra se da su pozitivni efekti na krvne sudove bili posledica vazodilatacije usled povećane produkcije azotnog monoksida (NO), smanjene agregacije trombocita, smanjene osetljivosti na oksidaciju LDL ili modulacije nekoliko reakcija povezanih sa inflamacijom (Beecher, 2004; Santos-Buelga i Scalbert, 2000).

Takođe, rezultati nekoliko eksperimenata su ukazali da proantocijanidini mogu uticati na nekoliko reakcija uključenih u procese kancerogeneze. Inhibicija kancerogeneze je verovatno posledica antioksidativne aktivnosti proantocijanidina (Bagchi i sar. 2002;

Santos-Buelga i Scalbert, 2000). Takođe, proantocijanidini ili njihovi metabolički produkti mogu uticati i na proces ateroskleroze (Lotito i sar. 2000; Beecher, 2004).

Sve ovo ukazuje da proantocijanidini mogu uticati na oksidativne procese koji mogu biti uzročnici razvoja nekoliko hroničnih oboljenja, a pre svega kardiovaskularnih bolesti (Bagchi i sar. 2003).

### **2.3. Biološke aktivnosti aronije**

Pored svoje hranljive vrednosti, aronija pokazuje blagotvorne efekte na zdravlje ljudi. Aktivni principi aronije, tačnije mešavina antocijana, proantocijanidina i fenolnih kiselina, predstavljaju jedan od najpotentnijih prirodnih antioksidanasa.

Antioksidansi su biološki aktivna jedinjenja koja mogu umanjiti negativan efekat slobodnih radikala, ali takođe mogu i da učestvuju u oporavku ćelija koje su već pretrpele oštećenje (Božin i sar. 2007). Uzroci za nastanak slobodnih radikala su mnogobrojni, uključujući izlaganje sunčevom zračenju, lošu ishranu, konzumaciju alkohola i duvana, sve veću izloženost stresu, izlaganje elektromagnetnom zračenju, radijaciji, ali treba naglasiti da oni nastaju i kao produkti pri normalnom metabolizmu ćelije. Slobodni radikali uzrokuju oštećenja na nivou molekula DNK, proteina i masti, i ovo je jedan od načina kako hiperprodukcija slobodnih radikala u organizmu može dovesti do pojave različitih hroničnih oboljenja, kancera i kardiovaskularnih bolesti (Ames i sar. 1993). Jedinjenja koja se lako oksiduju su često najbolji antioksidansi, jer njihovi molekuli mogu da doniraju slobodan elektron. Antioksidativno delovanje, jedna od funkcija kojom aronija ostvaruje svoju biološku aktivnost, može se objasniti prisustvom i dejstvom polifenola uopšte, a posebno prisustvom antocijana.

Zahvaljujući ovome, plodovi aronije i njeni proizvodi smatraju se efikasnim u očuvanju zdravlja, kao i u stanjima i bolestima povezanim sa oksidativnim stresom.

Zainteresovanost za aroniju i njene proizvode je posebno porasla poslednjih godina zbog dokazanih pozitivnih efekata na zdravlje, a pre svega povoljnih efekata koje može imati na kardiovaskularni sistem, smanjujući rizik od nastanka koronarnih bolesti srca i srčanog udara. Takođe, ispoljava delovanje kod kancerogenih bolesti jer aktivni principi iz aronije mogu delovati imunomodulatorno i radioprotektivno. Dobar primer za to je upotreba



ploda aronije u Černobiljskoj katastrofi kod ljudi koji su bili izloženi radijaciji (Kokotkiewicz i sar. 2010). Može pokazati i inhibitorno delovanje na proliferaciju kancerogenih ćelija. Pored navedenih, pokazana su još mnogobrojna pozitivna delovanja jedinjenja aronije, kao što su: antidijabetično kroz smanjenje hiperglikemije i hiperlipidemije, antiedematozno, efekat na permeabilnost kapilara, održavaju normalnu funkciju urinarnog trakta, deluju hepatoprotektivno, antiagregacijski, antiulcerozno, antibakterijski, inhibiraju herpes virus, virus influence, deluju protektivno na endotelne ćelije u odnosu na razne stresne agense, mogu poboljšati vid pri slabijem osvetljenju i poboljšati kognitivne sposobnosti (Chrubasik i Chrubasik, 2010; Beliz i sar. 2004; Timberlake i Bridle 1997; Kong i sar. 2003; Pascual i Sanchez 2008; Wrolstad 2004; Castaneda-Ovando i sar. 2009). U dosadašnjoj literaturi nema podataka o eventualnim neželjenim i toksičnim efektima plodova, soka ili ekstrakata aronije (Valcheva-Kuzmanova i Belcheva, 2006).

U prvom redu aronija ispoljava pozitivno delovanje u tretmanu kardiovaskularnih bolesti, pa se ova oblast danas intenzivno istražuje. Kardiovaskularne bolesti u humanoj populaciji predstavljaju jedan od vodećih uzroka mortaliteta. Gotovo polovina od ukupne smrtnosti usled hroničnih bolesti pripisuje se kardiovaskularnim oboljenjima. Pored tradicionalnih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, brojna patološka stanja se dovode u vezu sa povećanim rizikom i praćena su poremećajima metaboličkog statusa, homeostatske regulacije i funkcije organizma. Pored hipertenzije i ateroskleroze, oksidativni stres i povišena lipidna peroksidacija takođe su prisutni kod kardiovaskularnih oboljenja. Stanje oksidativnog stresa, odnosno povećana koncentracija reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (ROS/RNS) slobodnih radikala i smanjena aktivnost endogene i egzogene antioksidativne zaštite su u tesnoj vezi sa kardiovaskularnim i drugim hroničnim bolestima.

Pored zabrinjavajućeg porasta broja ljudi koji boluju od hipertenzije kao i od drugih oboljenja koja se povezuju sa oksidativnim statusom ćelija, veliki problem pri korišćenju komercijano dostupnih antihipertenziva je i veliki broj njihovih neželjenih efekata. Stoga,

poslednjih godina postoji povećano interesovanje naučne javnosti za pronalaženjem novih supstanci sa antihipertenzivnom aktivnošću, pogotovo biljnog porekla. Veliki broj studija je dokazao povoljan uticaj polifenolnih jedinjenja poreklom iz različitih biljnih vrsta na kardiovaskularni sistem. Ove studije su pokazale antihipertenzivno, hipolipemičko i kardioprotektivno delovanje, kako pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, tako i sinergizam u delovanju ovih komponenti (Mihailovic-Stanojevic i sar. 2013; Hellstrom i sar. 2010; Broncel i sar. 2010; Ciocoiu i sar. 2013; Young i Jeong. 2011; Duchnowicz i sar. 2012).

Kardioprotektivno delovanje aktivnih principa aronije ispoljava se kroz uticaj na faktore rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Ovo je najpre uočeno *in vitro* ispitivanjima, u kojima je pokazano njihovo vazoprotektivno dejstvo, kao i zaštitno delovanje na ćelije endotela i funkciju trombocita (Han i sar. 2005; Olas i sar. 2008). Takođe, u animalnim eksperimentalnim modelima, aronija je pokazala povoljan efekat na hiperlipidemiju, snižavanje povišenog nivoa triglicerida, ukupnog i LDL holesterola (Valcheva-Kuzmanova i sar. 2007). Povoljni efekti aronije potvrđeni su i pri hroničnoj konzumaciji njenih proizvoda u humanim studijama (Kardum i sar. 2015; Kardum i sar. 2014; Šavikin i sar. 2013). Rezultati različitih studija pokazali su povoljno delovanje aronije u prevenciji kardiovaskularnih bolesti smanjenjem nivoa ukupnog holesterola, LDL-a, triglicerida, glukoze, vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska (Broncel i sar. 2010; Simeonov i sar. 2002). Mali broj studija u kojima je ispitivan uticaj hronične konzumacije proizvoda od aronije na oksidativni status kod ljudi pokazao je porast aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima kao i smanjen nivo lipidne peroksidacije (Broncel i sar. 2010). Iako su mehanizmi i dalje nedovoljno proučeni, smatra se da polifenolna jedinjenja ploda aronije deluju na kardiovaskularne faktore rizika tako što poboljšavaju funkciju endotela i dislipidemiju, inhibiraju oksidaciju lipoproteina male gustine i smanjuju krvni pritisak. Studija koja je ispitivala 35000 žena u menopauzi u periodu od 16 godina, dokazala je vezu između unosa antocijana i smanjenja rizika nastanka koronarne bolesti srca kao i stepena smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti (Mink i sar. 2007).

Pokazano je da oksidativni status osoba sa farmakološki nelečenom esencijalnom hipertenzijom karakteriše povećanje nivoa markera lipidne peroksidacije u krvi, povećana produkcija superoksidnih anjona i vodonik-peroksida, kao i smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima (Duthie i sar. 2006; De Camargo i sar. 2014; Ciocoui i sar. 2013; Noguer et al. 2012; Broncel i sar. 2010). Pokazano je da je u stanju hipertenzije smanjena bioraspoloživost NO-a, važnog vazodilatatora, koji sa ROS daje toksična jedinjenja peroksinitrite (Xu i sar. 2004).

Antocijani, dominantna jedinjenja u plodu aronije, mogu delovati na različite puteve koji su uključeni u razvoj ateroskleroze. Poznato je da hemokinski monocit protein 1 (MCP-1) posreduje u aktivaciji makrofaga na mestu infekcije ili upale, što je momenat uključivanja MCP-1 u aterogenezu. Antocijani imaju zaštitno delovanje protiv TNF- $\alpha$  koji je indukovano od strane MCP-1 u endotelnim ćelijama kod ljudi (Croizer i sar. 2010). Jedinjenja iz aronije, pokazuju i endotel zavisnu relaksaciju koronarnih arterija (Del Rio i sar. 2010). Stalnim konzumiranjem aronije povećava se koncentracija glutationa koji je prirodni „sakupljač“ slobodnih radikala u organizmu (Ciocoui i sar. 2013; Noguer i sar. 2012; Broncel i sar. 2010). Antocijani smanjuju povećan nivo holesterola i na taj način štite endotelne ćelije od CD40-indukovane proinflamatorne signalizacije (Xia i sar. 2007).

#### **2.4. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije**

Aronija je na tržištu dostupna u vidu svežih i suvih plodova, soka, džemova, ali je nedovoljno zastupljena u vidu različitih fitopreparata, ekstrakata ili dijetetskih suplemenata (Kokotkiewicz i sar. 2010; Kulling i sar. 2008; Gonzales-Molina i sar. 2008).

Ekstrakti su jedan od najčešće upotrebljivanih biljnih fitopreparata (Evropska Farmakopeja 9.0, 2017; Peta Jugoslovenska farmakopeja, 2000), a oni podrazumevaju preparat dobijen podvrgavanjem biljne droge metodama kao što su ekstrakcija, ceđenje, frakcionisanje, prečišćavanje, koncentrovanje. Ekstrakti mogu biti tečne, polučvrste ili čvrste konzistencije (Evropska Farmakopeja 9.0, 2017; Vuleta i sar. 2012). U biljnim ekstraktima najčešće je

prisutan veliki broj aktivnih supstanci poznatog i nepoznatog sastava koje imaju isto ili slično dejstvo i najčešće deluju sinergistički. Iz tog razloga, ekstrakti najčešće imaju izraženije farmakološko dejstvo od izolovanih pojedinačnih aktivnih komponenti.

Ekstrakcija je prvi i važan korak u izolovanju i prečišćavanju bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala (Stalikas, 2007). Različite metode ekstrakcije se mogu primenjivati, od tradicionalnih do savremenih, a svaka ima niz prednosti i nedostataka, pri čemu je najvažnije ekstrahovati što više aktivnih principa iz polaznog materijala, a pri tome ne narušiti njihovu aktivnost. Očuvanje aktivnosti je posebno važno u slučaju antocijana, koji su izuzetno nestabilna jedinjenja. Ekstrakciona metoda koja će se primeniti zavisi od kvaliteta proizvoda koji se očekuje, kao i od farmaceutskog oblika u koji se ugrađuje ekstrakt. Tradicionalne metode ekstrakcije uključuju maceraciju, maceraciju uz kontinuirano mešanje, perkolaciju, Soxhlet ekstrakciju. Poslednjih godina su sve više aktuelne nove tehnike ekstrakcije, kao što su ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija uz pomoć mikrotalasa, superkritična ekstrakcija (Khoddami i sar. 2013). Za farmaceutsku, kozmetičku, ali i industriju hrane, od ključnog je interesa postići maksimalan prinos polifenolnih jedinjenja pri njihovoj ekstrakciji iz polaznog materijala. Strukturna i fizičko-hemijska raznovrsnost u okviru ove grupe jedinjenja ne dozvoljava mogućnost korišćenja opšteg ekstrakcionog protokola.

Nakon ekstrakcije, dobijeni ekstrakt se može koncentrovati do odgovarajuće konzistencije, a to se obično vrši pod sniženim pritiskom i pri temperaturi na kojoj je degradacija komponenata u sastavu ekstrakta svedena na minimum (Peta Jugoslovenska farmakopeja, 2000).

Brojni su faktori koji utiču na efikasnost ekstrakcije, a najznačajniji među njima su rastvarač, metoda ekstrakcije, temperatura, dužina trajanja ekstrakcije, stepen usitnjenosti biljnog materijala i pH vrednost ekstragensa (Ćujić i sar. 2016; Stalikas, 2007). Supstanca biljnog porekla, koja ulazi u proces ekstrakcije mora biti na adekvatan način prerađena, tj. prečišćena i usitnjena do određenog stepena usitnjenosti. Kvalitet ekstrakta značajno zavisi od stepena usitnjenosti droge, koji se obavezno proverava pre procesa ekstrakcije (Ćujić i sar. 2015).

Odabir rastvarača se vrši na osnovu hemijskog sastava jedne ili grupe komponenata koje se ekstrahuju. Najčešće se koriste sledeći rastvarači: etanol, voda, mešavina etanola i vode u različitim odnosima, mešavina propilen-glikola i vode, etil acetat, dietil etar, aceton i dr (Stalikas, 2007). Polifenolna jedinjenja su polarni molekuli tako da su se kao najefikasniji rastvarači za ekstrakciju pokazale smeše polarnih rastvarača kao što su etanol, metanol i aceton. Korišćenje ovih ekstragenasa najčešće podrazumeva i ekstrakciju nefenolnih jedinjenja, kao što su šećeri, organske kiseline, i proteini što zahteva naknadano prečišćavanje. Iako su metanol, etanol i aceton među najčešće korišćenim ekstragensima za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja, u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji ekstrakcija etanolom, koji ima status bezbednog rastvarača-GRAS status (engl. *Generally recognized as safe*) je metoda izbora u odnosu na metanol zbog njegove toksičnosti (Casteneda-Ovando i sar. 2009).

Mnoge studije do sada su proučavale ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz različitih biljnih materijala, ali literaturni podaci o optimizaciji ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz aronije su veoma oskudni. Optimizacija ekstrakcije ploda aronije i sporednih proizvoda aronije nakon ceđenja soka ultrazvučnom metodom je opisana od strane grupe istraživača (Galvan D'Alessandro i sar. 2012; Galvan D'Alessandro i sar. 2014; Ramić i sar. 2014).

S obzirom da polifenolna jedinjenja aronije ispoljavaju niz blagotvornih efekata na zdravlje, a industrija je postavila zahteve za smanjenje troškova proizvodnje i dobijanja ovih jedinjenja, istraživanje optimalnih uslova za što efikasniju ekstrakciju ploda aronije je u žiži interesovanja.

#### **2.4.1. Primena eksperimentalnog dizajna u optimizaciji ekstrakcije**

Da bi se maksimizovao prinos polifenolnih jedinjenja, neophodno je ispitati optimalne vrednosti pomenutih faktora koji utiču na ekstrakciju. U ovu svrhu se u poslednje vreme sve više koristi softverski alat, faktorijalni dizajn-DOE (Design of Experiments), koji ima za cilj da obezbedi dizajn eksperimenta koji je za odabrane faktore (njihov broj kao i broj nivoa u kojima se variraju) najracionalniji sa stanovišta broja eksperimentalnih ponavljanja koje je

neophodno obaviti. Primena ovog softvera (programa) značajno redukuje dužinu trajanja i troškove eksperimenta.

On takođe određuje i potencijalne interakcije između pojedinačnih faktora a sve u cilju što bolje optimizacije metode ekstrakcije (Ramić i sar. 2015; Ćujić i sar. 2015). To znači, da u slučaju klasične postavke eksperimenta koji podrazumeva ispitivanje uticaja jedne promenljive, dok se ostale održavaju konstantnim, ovakve interakcije ne bi bilo moguće otkriti (Armstrong, 2006). Dizajn eksperimenta je upravo namenjen prevazilaženju ovakvih poteškoća. Cilj je da se omogući istovremena procena uticaja većeg broja promenljivih na odgovor koji se prati, u ovom slučaju prinos ekstrahovanih polifenolnih jedinjenja, uključujući i njihove interakcije.

Dizajn eksperimenata omogućava veću objektivnost u donošenju zaključaka, jer je moguće izabrati faktore koji imaju stvarni uticaj uz saznanje o mogućim interakcijama.

#### **2.4.2. Stabilnost polifenolnih jedinjenja iz ekstrakata**

Primena ekstrakata bogatih polifenolima ima i niz ograničenja, a pre svega nestabilnost, jer aktivni principi iz ekstrakta mogu biti izloženi negativnom uticaju kiseonika, svetlosti, vlage i drugih nepovoljnih faktora, a posebno su među polifenolima iz aronije osetljivi antocijani (Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk, 2011; Ćujić i sar. 2015).

Uprkos velikom potencijalu primene antocijana i uopšte polifenolnih jedinjenja u farmaceutskoj industriji, industriji hrane, kozmetičkoj industriji, njihova upotreba je i dalje ograničena zbog njihove relativne nestabilnosti. Postoje brojni faktori koji ograničavaju primenu ovih jedinjenja kao široko upotrebljivanih antioksidanasa, jer su dosta reaktivni i nestabilni. Na primer, gubitak boje antocijana takođe može biti izazvan prisustvom kiseonika, svetlosti, toplote, ili različitih enzima, ali i zbog podložnosti degradativnim reakcijama. Pored kiseonika, temperature čuvanja, svetla, njihove hemijske strukture, rastvarača, enzima i ostalih flavonoida, proteina i metalnih jona, pH je određen kao uzročnik najveće nestabilnosti antocijana i od pH u najvećoj meri zavisi pigmentacija antocijana. Efektivan pH raspon za većinu antocijana je ograničen na kiselu sredinu zbog promena boje

i nestabilnosti koji se javljaju iznad pH vrednosti 4 (Castaneda-Ovando i sar. 2009; Čujić i sar. 2013).

S tim u vezi, stabilizacija polifenola je danas jedna od glavnih tema istraživanja koja su upravo fokusirana na rešavanje ovih problema. Pored svega navedenog, polifenoli se i slabo apsorbuju nakon oralne primene, pa je cilj povećati njihovu bioraspoloživost.

### **3. Inkapsulacija polifenolnih jedinjenja iz ekstrakata**

Jedna od metoda koja može da se primeni za očuvanje biološki aktivnih jedinjenja ekstrakta ploda aronije i smanjenje njihove nestabilnosti je metoda mikroinkapsulacije.

Mikroinkapsulacija je tehnologija koja se primenjuje od 1930. godine, kada su prvi put inkapsulirani vitamini i arome. Prvi komercijalno dostupan mikroinkapsuliran proizvod bio je primenjen kod mikroinkapsuliranja boje u papir za kopiranje, a patentiran je 1957. godine (Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007). Nešto kasnije inkapsulacija je primenjena i za oblaganje herbicida sa osnovnim ciljem da se postigne kontrolisano otpuštanje kako bi se sprečio rast korova (Wang i Zhao, 2013). Ubrzo nakon toga se javila i ideja o primeni polimernih mikročestica kao sistema za isporuku lekova (1964. godine), a 1989. godine na tržište je plasiran depo preparat Lupron Depot, sa leuprorelinacetatom inkapsuliranim u mikročestice na bazi poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA) polimera (Burges i Hickey 2007; Siepmann i Siepmann, 2006).

Mikroinkapsulacija se može definisati kao proces koji uključuje potpuno obuhvatanje ćelija, enzima i biološki aktivnih supstanci unutar definisanih poroznih, polupropusnih materijala korišćenjem različitih tehnika (Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007). Inkapsulacijom se može dobiti širok dijapazon veličina čestica sa inkapsuliranom aktivnom komponentom od svega nekoliko nanometara pa sve do nekoliko milimetara, a najčešće nastaju čestice veličine 1–1000  $\mu\text{m}$  (Thies 2005). Ovim postupkom se aktivne komponente fizičkim ili hemijskim putem smeštaju unutar strukture određenog nosača (matriksa).

Glavni cilj ove metode je očuvanje stabilnosti aktivnih principa, produženje roka trajanja, zaštita ekstrahovanih aktivnih principa od negativnih uticaja spoljašnje sredine, kontrolisano oslobađanje iz mikročestica, pokrivanje gorkog ukusa polifenola, i sprečavanje negativnog dejstva gastrointestinalnog trakta (Fang i Bhandari, 2010). Uzimajući u obzir kratko poluvreme života, kratak period metabolizma i eliminacije, stabilizacija polifenola inkapsulacijom se pokazala kao adekvatna metoda za očuvanje biološke aktivnosti.

Mikroinkapsulacija može da dovede i do poboljšanja biorasploživosti velikog broja polifenola za koje je poznato da su niske biorasploživosti (Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk, 2011; Belščak-Cvitanović i sar. 2011).

Sve je veći broj studija koje se odnose na dizajn novih inkapsulacionih sistema za stabilizaciju i očuvanje aktivnosti polifenola, ali i za postizanje njihovog produženog i kontrolisanog oslobađanja. Na ovaj način dobija se forma u kojoj je aktivna komponenta obavijena nosačem.

Mikroinkapsulacija danas ima veoma važnu ulogu u poljoprivredi, hemijskoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Inkapsulacija se može koristiti za izvođenje različitih procesa u oblasti proizvodnje hrane i aditiva, fermentisanih pića, aminokiselina, farmaceutskih proizvoda koji treba da obezbede kontrolisano oslobađanje lekovitih supstanci. U tekstilnoj industriji inkapsulacija se najviše primenjuje za kontrolisano otpuštanje parfema i omekšivača (Nelson 2002). Poslednjih decenija tehnologija inkapsulacije sve veći značaj dobija i u biomedicini i oblasti inženjerstva tkiva i organa, npr. pankreasa, kože, hrskavice, srca i krvnih sudova (Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007; Obradović i sar. 2005). Ipak, najvažnija primena mikročestica uključuje biomedicinsku isporuku aktivnih supstanci, snimanja, a i osnovna istraživanja u biomedicini i biotehnologiji (George i sar. 2005).



Prednosti inkapsulacije su mnogobrojne (Zuidam i Shimoni 2010, Čalija, 2013; Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007):

- stabilizacija aktivnih komponenti,
- zaštita aktivnih komponenti od nepovoljnih uticaja spoljašnje sredine (kiseonik, pH, svetlost, vlaga, toplota) tokom procesa proizvodnje, pakovanja, čuvanja, ali i nakon aplikacije,
- maskiranje neprijatnog ukusa koji aktivna komponenta može da ima,
- lakše rukovanje aktivnom komponentom (konverzija iz tečnog u čvrstu formu, što je dalje pogodnije za manipulaciju tokom procesa proizvodnje, ali i jednostavnije za čuvanje gotovog proizvoda i kasniju aplikaciju),
- ciljano oslobađanje aktivne komponente,
- kontinuirano i produženo oslobađanje aktivne komponente,
- smanjivanje veličine čestica,
- poboljšanje protočnosti (inkapsulacijom u mikročestice sferičnog oblika, glatke površine i ujednačenih dimenzija znatno se poboljšava protočnost, postiže bolja uniformnost sadržaja, čime se olakšava dalja manipulacija tokom proizvodnog procesa, npr. punjenje u komercijalne kapsule),
- sprečavanje inkompatibilnosti (fizičkim razdvajanjem aktivnih principa polimernom membranom moguće je sprečiti da dođe do neželjenih interakcija),
- produženje roka trajanja konačnog proizvoda (proizvod dužeg roka trajanja u odnosu na konvencionalne),
- korigovanje organoleptičkih osobina.

Ipak pored svih prednosti, industrijska primena inkapsulacije je ograničena relativno visokim cenama inkapsulacionih tehnologija i složenim procesima ovakve proizvodnje, međutim i pored toga inkapsulacija je našla primenu u mnogim sferama industrije u kojima ima različite ciljeve. Najšira primena inkapsulacije je u farmaceutskoj industriji gde se koristi za inkapsulaciju aktivnih komponenti i lekova sa terapeutskim efektom.

### 3.1. Mikročestice

Mikročestice, kao čvrsti nosači aktivnih supstanci, poslednjih pola veka, privlače interesovanje brojnih istraživača i postale su jedan od najznačajnijih sistema za kontrolisano oslobađanje zahvaljujući mikrometarskim dimenzijama, manje ili više pravilnom sferičnom obliku i velikom odnosu površine i zapremine (Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007). Iako se konvencionalni farmaceutski oblici, poput tableta i kapsula, dugo koriste kod različitih indikacija, razvoj novih tehnologija i metoda karakterizacije doveo je do pojave novih, sofisticiranih farmaceutskih oblika.

Nakon 1989. i pojave prvog leka na bazi polimernih mikročestica, na tržištu su se pojavili i drugi farmaceutski preparati sa mikročesticama, ali bili su uglavnom namenjeni za parenteralnu primenu (Siepmann i Siepmann, 2006).

Uprkos velikom broju literaturnih podataka o mikročesticama, a i nanočesticama, za sada u literaturi ne postoji jasna univerzalna granica između nano i mikročestica. Dizajniranje bilo kog minijaturizovanog sistema zavisi od primene (Thies 2005).

Iako ne postoji jedinstvena definicija opšte je prihvaćeno da su mikročestice čvrste čestice, sferičnog ili približno sferičnog oblika, čiji se dijametar kreće između 1 i 1000  $\mu\text{m}$ , mada neki podaci navode da se mikročesticama mogu smatrati i čestice veličine i do 2000  $\mu\text{m}$  (Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007; Xiaoling i Jasti, 2006).

U literaturi se često pod terminom mikročestice podrazumevaju mikrokapsule i mikrosfere ili mikromatriksi (Burges i Hickey 2007; Thies 2005).

Zajednički su im sferičan, ili blago deformisan sferičan oblik, mikrometarske dimenzije, a razlikuju se prema načinu na koji je aktivni sastojak (lekovita supstanca) raspoređena u njima. Ovo je osnovni kriterijum koji se koristi za klasifikaciju mikročestica na **mikrokapsule i mikrosfere (mikromatrikse)**.

**Mikrokapsule** se definišu kao mikročestice kod kojih je aktivna supstanca smeštena u jezgro okruženo sa jednim ili više slojeva zaštitnog filma, sačinjenog najčešće od nekog makromolekula ili polimera (Burges i Hickey 2007; Thies 2005).

**Mikrosfere** se definišu kao matriksne mikročestice, obično sferičnog oblika, kod kojih je aktivna supstanca homogena ili heterogena dispergovana u polimernom materijalu, koji ispunjava ceo volumen kapsule (najčešće se koriste sintetski polimeri i kopolimeri glikolne ili mlečne kiseline, ili prirodni polisaharidni polimeri) (Burges i Hickey 2007; Milić i Petrović, 2003).

Postupak inkapsulacije se sastoji u dispergovanju aktivne komponente u odgovarajućem nosaču u cilju dobijanja finih sfera (kapljica, čestica).

Mikročestice ne moraju nužno da imaju sferičan oblik, moguće je postići, a nekad je čak i poželjno dobiti i cilindrične oblike ili čestice nepravilnog oblika (Zuidam i Shimoni 2010).

Osnovne prednosti mikročestica u odnosu na konvencionalne nosače lekova ogledaju se u karakterističnom obliku, mikrometarskim dimenzijama i velikom odnosu površine i zapremine, mogućnosti postizanja produženog ili kontrolisanog oslobađanja.

Otkriće i primena brojnih metoda karakterizacije, a i samih tehnika mikroinkapsulacije, novih biokompatibilnih sintetskih i polusintetskih polimera doveli su do pojave mikročestica novih i naprednijih karakteristika. Ove karakteristike se uglavnom odnose na pravilan, sferičan oblik, ujednačen sadržaj lekovite supstance, stabilnost u *in vitro* i *in vivo* uslovima, odgovarajući profil oslobađanja inkapsulirane lekovite supstance i visoku selektivnost na mestu delovanja (Hawkins i sar. 2005; Cerroni i sar. 2011; Suri i sar. 2013; Agnihotri i sar. 2012).

Različiti biomolekuli kao aktivne supstance se mogu koristiti kao mikrosistemi, uglavnom za snimanje (dijagnostiku) ili ciljanu isporuku hormona, vakcina sa antigenima i adjuvansima, peptida i antiinflamatornih agenasa. Mikročestice se mogu koristiti i kao biosenzori, za izvođenje imunoloških testova, kao i za obeležavanje ćelija (Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007).

Danas se sve više pažnje poklanja inkapsulaciji prirodnih bioaktivnih jedinjenja u mikročestice (Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk, 2011; Belščak-Cvitanović i sar. 2011).

Za inkapsulaciju se može koristiti široki spektar materijala, ali najveću primenu u opisanim procesima imaju prirodni polimeri, voskovi, ali i drugi materijali, poput biodegradabilnih

sintetskih polimera i modifikovanih prirodnih proizvoda (skrobovi, gume, proteini, masti i voskovi) (Malafayai sar. 2007).

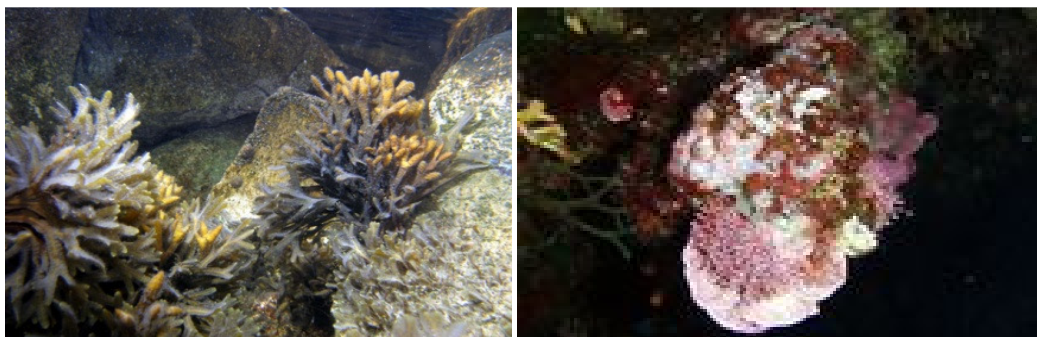
### 3.2. Materijali koji se koriste za izradu mikročestica

Izbor biomaterijala za sintezu mikročestica zavisi od njihove primene, bioaktivnih supstanci koje se inkorporiraju u sistem za isporuku i hemijskih procesa koji su potrebni za dalju funkcionalizaciju i modifikaciju čestica (Suri i sar. 2013). Posebna pažnja prilikom izbora materijala za izradu mikročestica poklanja se prirodnim, netoksičnim i biodegradabilnim polimernim materijalima kao što su albumini, želatin, hitozani, derivati skroba, dekstrani, lipidi i alginati (Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007; Milić i Petrović, 2003; Suri i sar. 2013).

#### Alginat

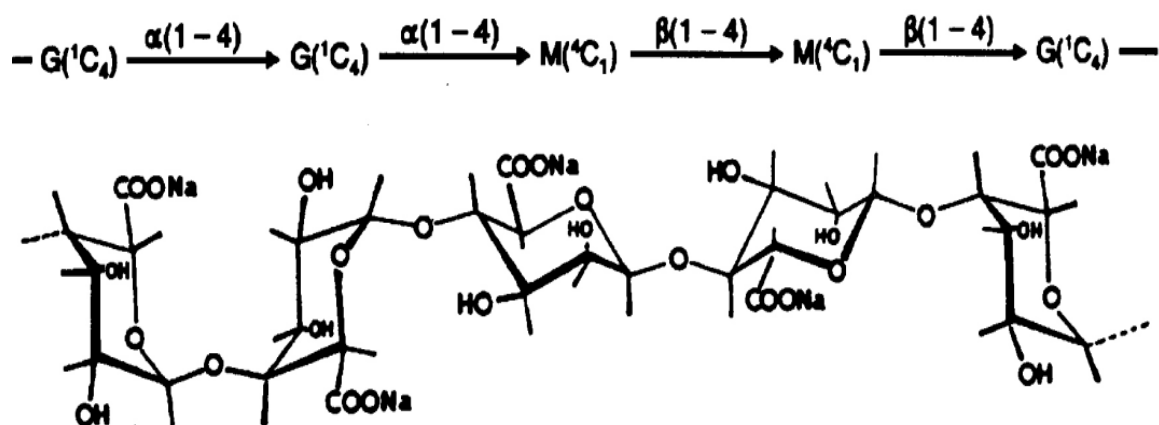
Alginat je prvi otkrio britanski hemičar Stanford 1881. godine kada je istraživao supstance iz algi. On je razvio proces alkalne ekstrakcije viskoznog materijala, algina, a kasnije uspešno istaložio alginat pomoću mineralnih soli. Čist alginat je izolovan tek 15 godina nakon pronalaska. Najzastupljeniji alginat u prirodi je polisaharid koji se nalazi u smeđim morskim algama familije Phaeophyceae (Slika 7).

Osnovna funkcija alginatnih gelova jeste da daju čvrstinu i savitljivost algama koja je neophodna za njihov rast i pokretljivost u moru (Suri i sar. 2013).



Slika 7. Smeđe alge ([www.medicaledu.com/alginaaph.html](http://www.medicaledu.com/alginaaph.html))

Alginat je nerazgranati heterogeni kopolimer D-manuronske (M blokovi) i L-guluronske kiseline (G blokovi) vezanih  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glikozidnim vezama (Slika 8) (Suri i sar. 2013). Uobičajena molekulska masa alginse kiseline se kreće između 20 000 i 240 000 (Rowe i sar. 2009; Čalija 2013). Molekulska masa alginata, kao i zastupljenost manuronske i guluronske kiseline u njihovoj građi, može da varira, a zavisi od vrste algi iz kojih se dobijaju (Suri i sar. 2013). Ovo je naročito značajno zbog činjenice da alginati različite strukture formiraju hidrogelove različitih karakteristika i da mogućnost njihove primene zavisi od njihovog sastava (Tonessen i Karlsen, 2002).



Slika 8. Struktura natrijum alginata (G–guluronska kiselina; M–manuronska kiselina) (Suri i sar. 2013)

Rastvaranjem alginata u vodi dobijaju se viskozni rastvori, čija viskoznost raste sa porastom dužine alginatnih lanaca, odnosno sa porastom broja monomernih jedinica. Duži makromolekulski lanci daju viskoznije rastvore u odnosu na kraće lance, pri istim koncentracijama alginata (Tonessen i Karlsen, 2002).

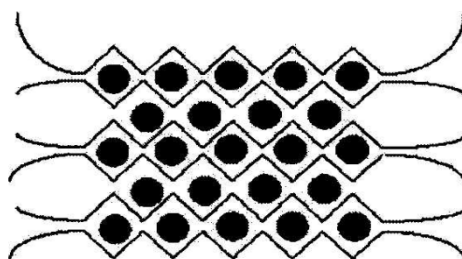
Ovaj polimer je do sada dobro ispitan i istražen i široko se primenjuje zbog svoje biokompatibilnosti, niske imunogenosti i jedinstvene sposobnosti tranzicije *sol* $\leftrightarrow$ *gel* stanje u prisustvu viševalentnih katjona ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{+2}$ ).

Priprema alginatnih mikročestica ne zahteva posebne uslove, čime se minimizira ili eliminiše, upotreba organskih rastvarača i visokih temperatura koji bi smanjili biološku aktivnost lekovitih supstanci.

Izrada mikročestica na bazi alginata zasnovana je na njihovom svojstvu da u vodenim rastvorima u prisustvu dvo i trovalentnih katjona (izuzev  $Mg^{2+}$  jona) obrazuju hidrogelove (Morch i sar. 2006). Naročito je ispitana mogućnost primene  $Ca^{2+}$  jona za dobijanje ovakvih gelova s obzirom na njihovu netoksičnost i znatno pravilniji, sferičan oblik kalcijum-alginatnih mikročestica u odnosu na mikročestice izrađene primenom drugih gelirajućih jona.

Ovaj fenomen se naziva jonotropno geliranje (engl. *ionotropic gelation*) (Suri i sar. 2013). Umrežavanje se odvija razmenom jona natrijuma sa dvovalentnim katjonima (Morch i sar. 2006).

Prva teorija o strukturi kalcijum-alginatnih hidrogelova objavljena je 1973. godine. Model “kutije za jaja“ (*egg-box*), prva je teorija koja tumači strukturu kalcijum-alginata. Ovaj model, uz manje izmene prihvata se i danas. Sam naziv “kutija za jaja“ potiče od načina pakovanja  $Ca^{2+}$  jona u šupljinu između monomera guluronske kiseline susednih lanaca (engl. *egg-box dimer*), a koji podseća na način pakovanja jaja u zaštitne kartonske kutije. Na ovaj način nastaje polimerna mreža (Slika 9).



Slika 9. *Egg-box* model (Morch i sar. 2006)

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

Koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  jona u medijumu za geliranje je jedan od parametara koji ima veliki uticaj na poroznost i stabilnost Ca-alginatnih mikročestica (Morch i sar. 2006; Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007).

Alginska kiselina i natrijum-alginat imaju GRAS status (engl. *Generally Recognized As Safe*-generalno prihvatljivi kao bezbedni). Osim toga, u Evropi je dozvoljena njihova primena kao aditiva u hrani (Rowe i sar. 2009).

Najviše se upotrebljava u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Primena alginata u biomedicini vezana je za njihovu biokompatibilnost, biodegradabilnost, netoksičnost i najčešće svojstva građenja gelova, bubrenja, a i povećanja viskoziteta vodenih rastvora (Stojanović i sar. 2012; Čujić i sar. 2016).

Sve veći značaj natrijum-alginat ima u razvoju novih preparata sa usporenim oslobađanjem lekovite supstance (Rowe i sar. 2009; Tonessen i Karlsen, 2002). Jedna od prednosti primene natrijum-alginata prilikom mikroinkapsulacije aktivnih supstanci, ogleda se u mogućnosti inkapsulacije na sobnoj temperaturi, bez primene visokih temperatura, toksičnih i reaktivnih agenasa (Čujić i sar. 2016; Suri i sar. 2013).

Alginat, kao nosač aktivnih komponenti, ima i svojih nedostataka. Osnovni nedostatak je njegova smanjena hemijska stabilnost u prisustvu jedinjenja koja dovode do obrazovanja helatnih kompleksa. Tako je kalcijum-alginatni gel osetljiv i hemijski nestabilan u prisustvu fosfata, citrata i laktata, kao i u prisustvu katjona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Ovaj nedostatak koristi se u cilju rastvaranja gela i oslobađanja aktivne komponente (Suri i sar. 2013; Morch i sar. 2006).

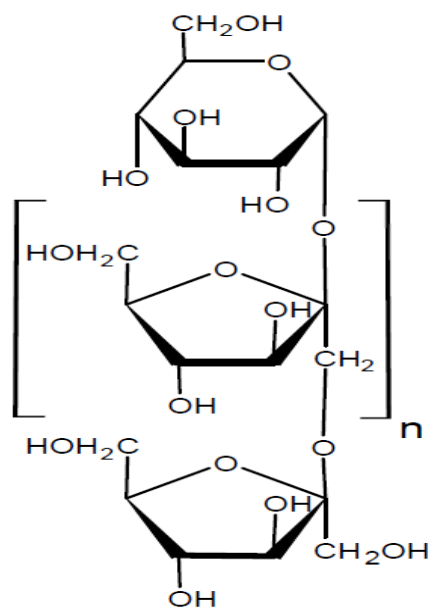
Sušeni oblici mikročestica dobijenih iz alginata obično imaju veću stabilnost i mehaničku otpornost u poređenju sa hidrogel mikročesticama, tako da su poželjnije za primenu u industriji hrane i farmaceutskih proizvoda (Stojanović i sar. 2012; Čujić i sar. 2016). Međutim, dehidracija koja je posledica procesa sušenja remeti strukturni integritet kalcijum-alginatnog matriksa, što posledično vodi do smanjenja sferičnosti mikročestica. Kao način da se prevaziđe ovaj nedostatak, neki istraživači su predložili dodatak supstanci koje imaju ulogu punioca ili filera, kao što je to inulin (Stojanović i sar. 2012; Vlaseva i sar. 2014).

## Inulin

Inulin je heteropolisaharid, izgrađen uglavnom od monosaharidnih jedinica D-fruktoze, a u poslednje vreme je konstatovano da osim fruktoze sadrži i D-glukozu. Prema tome, osnovni polisaharidni niz inulina je polifruktozan, koji je nastao uspostavljanjem  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) glikozidnih veza, dok su ostaci D-glukoze vezani na krajevima niza (Stojanović i sar. 2012).

Inulin zadovoljava GRAS standard, po principima FDA (U.S. Food and Drug Administration) (Agnihotri i sar. 2004).

Pored toga što se inulin upotrebljava kao filer i stabilizator alginatnih mikročestica, on ima potencijal i kao funkcionalna hrana. U farmaceutskoj industriji se koristi kao izvor dijetetskih vlakana, što ga svrstava u probiotike. To je rastvorljiv, prirodni polisaharid niske kalorične vrednosti, koji poseduje snažan uticaj na imuni sistem stimulacijom crevne mikroflore (Vlaseva i sar. 2014; Beirao-Da-Kosta i sar. 2013; Silva i sar. 2004).



Slika 10. Strukturna formula inulina (Rowe i sar. 2009)



### 3.3. Izrada mikročestica

Pod terminom mikroinkapsulacija podrazumevaju se različiti procesi tokom kojih se čvrste supstance, tečnosti ili gasovi okružuju polimernom membranom ili matriksom, na način koji dovodi do formiranja čvrstih, sferičnih ili približno sferičnih čestica mikrometarskih dimenzija (Suri i sar. 2013; Manojlović i sar. 2008).

Tehnike koje se koriste za dobijanje mikročestica variraju od jednostavnih postupaka, koji podrazumevaju mešanje polimera i lekovite supstance, pa do vrlo složenih postupaka polimerizacije.

Ove tehnike obuhvataju jednostruke i dvostruke emulzione metode koje uključuju ekstrakciju i uparavanje rastvarača, koacervaciju, sušenje raspršivanjem (engl. *spray dry*), jonsko geliranje i unakrsno umrežavanje suspenzija.

S obzirom na raznovrsnost i brojnost postupaka inkapsulacije, ne postoji jedinstven i opšte prihvaćen sistem njihove klasifikacije (Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007).

#### 3.3.1. Elektrostatička ekstruzija

Među mnogobrojnim metodama mikroinkapsulacije, elektrostatička ekstruzija se izdvojila devedesetih godina 20. veka kao jednostavna, precizna i isplativa metoda za dobijanje mikročestica odgovarajućih organoleptičkih i farmakoloških karakteristika, koje se kasnije mogu primeniti i u industriji (Manojlović i sar. 2008; Prüsse i sar. 2008). To je disperziona tehnika kojom se na relativno jednostavan način mogu proizvesti čestice mikrometarskih veličina (Manojlović i sar. 2006). Danas se koristi u oblasti farmacije, prehrambene tehnologije, biotehnologije i biomedicine.

Elektrostatička ekstruzija je metoda koja se zasniva na primeni elektrostatičke sile koja deluje na površinu meniskusa rastvora polimera na vrhu igle/kapilare, usled čega dolazi do generisanja velikog broja kapljica, koje formiraju mikročestice u tzv. rastvoru za očvršćavanje (Manojlović i sar, 2008; Poncelet i sar. 1999; Kostić i sar. 2012).

Jedna od prednosti ove tehnike jeste mogućnost inkapsulacije termolabilnih materija, jer ne zahteva primenu visokih temperatura i izvodi se pod blagim uslovima bez upotrebe

organskih rastvarača koji bi mogli da inhibiraju aktivnost biološki aktivnih jedinjenja (Prusse i sar. 2008).

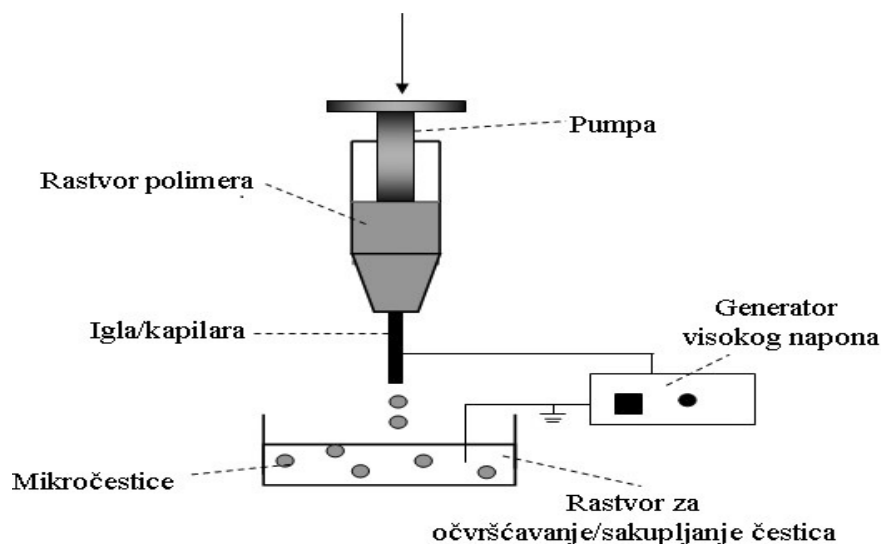
Ova metoda inkapsulacije je zasnovana na fizičko-hemijskoj metodi poznatoj pod nazivom jonsko geliranje, gde pojedini polimeri imaju osobinu da u kontaktu sa jonima metala obrazuju gelove (Prusse i sar. 2008). Kod ove metode jonski polielektroliti (ili naelektrisani polimeri) heliraju sa multivalentnim kontra jonima, proizvodeći poprečne veze ili mreže (engl. *cross link*).

Jonsko geliranje se široko upotrebljava sa polisaharidima poput hitozana i natrijumove soli alginatne kiseline, zbog svoje jednostavnosti i lake primene. Proces jonskog geliranja uključuje ukapavanje rastvora polimera u rastvor gelirajućih jona (Kostić i sar. 2012).

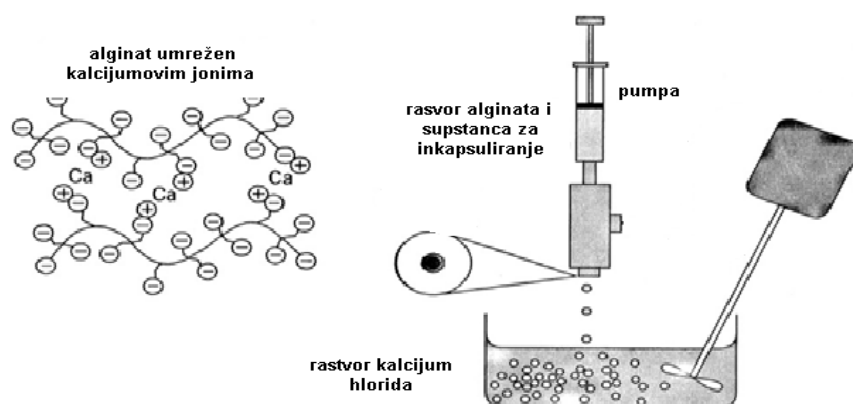
Aktivna supstanca koju treba inkapsulirati obično se rastvara ili disperguje u rastvoru ili disperziji polimera pre nego što dođe u kontakt sa gelirajućim jonima. Ređe se uvodi kroz pore u nastale mikročestice nakon njihovog formiranja difuzijom iz koncentrovanih rastvora (metoda apsorpcije) (Stojanović i sar. 2012; Kostić i sar. 2012).

Jedan od nedostataka ove tehnike jeste nemogućnost ekstruzije viskoznih rastvora polimera (Ćujić i sar. 2016).

Osnovne delove aparature za ekstruziju sačinjavaju pumpa i kapilara ili igla od nerđajućeg čelika (koja može biti različitog prečnika). Elektrostatički potencijal koji može biti konstantan ili pulsni, primenjuje se između kapilare (igle) i rastvora u kome se sakupljaju čestice, korišćenjem generatora visokog napona, a rastojanje između vrha kapilare (igle) i rastvora za sakupljanje čestica moguće je varirati (Slika 11). Oprema koja se koristi za elektrostatičku ekstruziju nije skupa, proces se odvija pri atmosferskom pritisku i sobnoj temperaturi.



Slika 11. Aparatura za izvođenje metode elektrostatičke ekstruzije (Kostić i sar. 2012)



Slika 12. Šema dobijanja mikročestica jonskim geliranjem metodom elektrostatičke ekstruzije (Suri i sar. 2013)

U poslednje dve decenije, značajno mesto u proizvodnji mikročestica zauzela je upravo ekstruziona tehnika usled relativno jednostavne proizvodnje mikročestica (Manojlović i sar. 2008; Kostić i sar. 2012).

Ovom metodom do sada su inkapsulirana Langerhansova ostrvca pankreasa, hepatociti, hondrociti hrskavice, enzimi, arome, boje, soli, zaslađivači, vitamini, antioksidansi i

prirodni antioksidansi kao što su polifenoli iz ekstrakata različitog lekovitog bilja, kao npr. majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.), koprive (*Urtica dioica* L.), gloga (*Crataegus laevigata* L.), lista maline (*Rubus idaeus* L.), lista masline (*Olea europea* L.), hajdučke trave (*Achillea millefolium* L.). Ovi ekstrakti su inkapsulisani u mikročestice, čime je ostvaren značajan stepen inkapsulacije polifenola i pre svega očuvana njihova antioksidativna aktivnost (Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk, 2011; Belščak-Cvitanović i sar. 2011; Trifković i sar. 2014; Stojanović i sar. 2012).

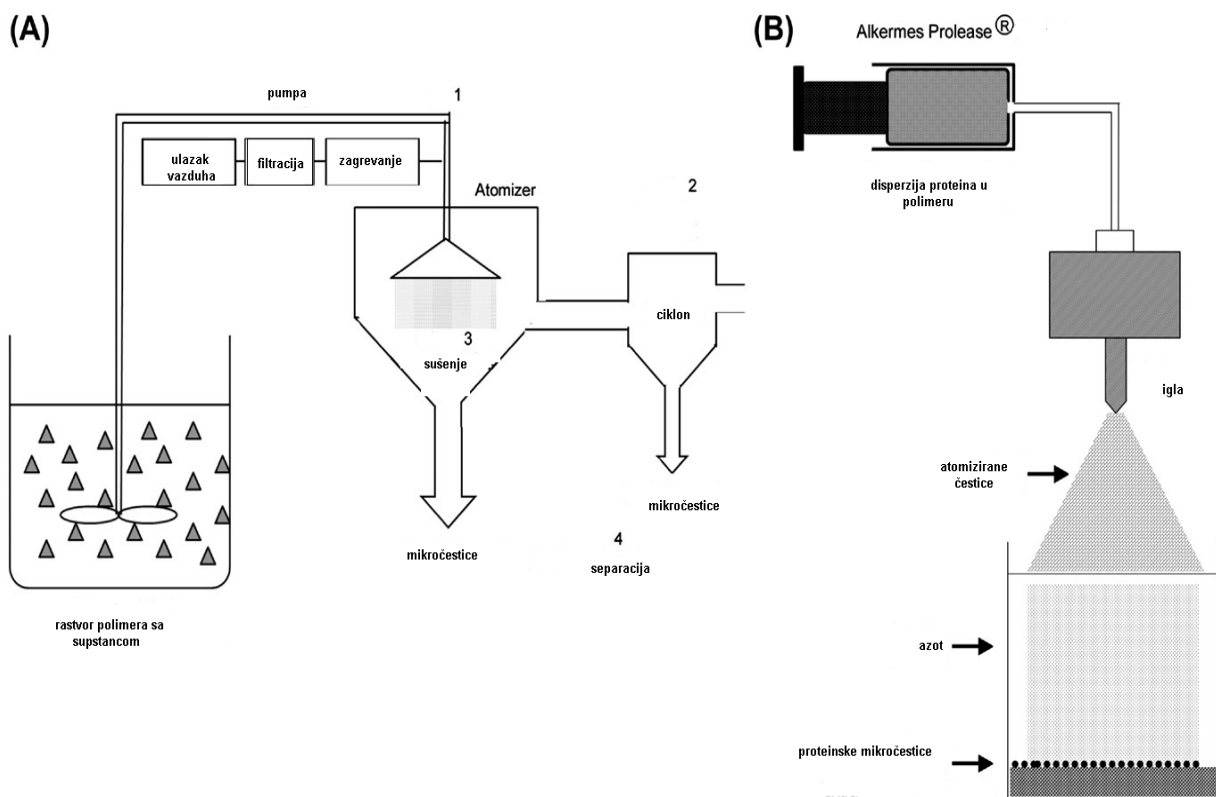
### **3.3.2. Mikroinkapsulacija metodom sušenjem raspršivanjem**

Još jedna metoda za mikroinkapsulaciju je metoda sušenja raspršivanjem (engl. *Spray drying* metoda).

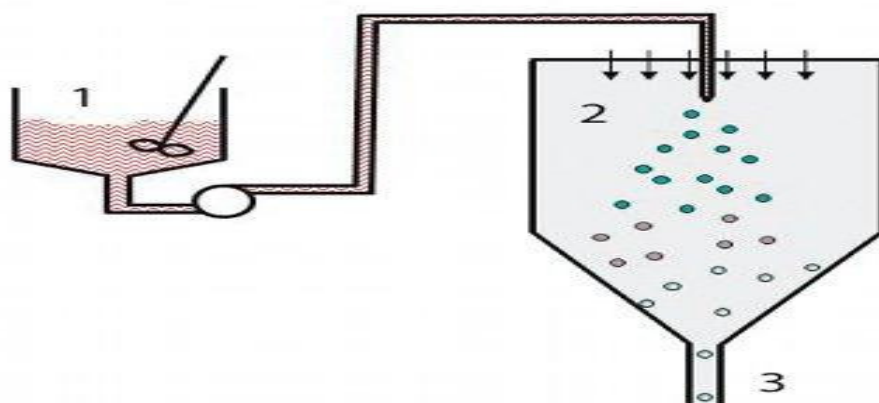
Sušenje raspršivanjem je postupak kojim se medijum u vidu sitnih kapljica uvodi u struju zagrejanog gasa koji dovodi do brzog formiranja čvrstih čestica (Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007; Suri i sar. 2013).

Sušenje raspršivanjem je brza, efikasna tehnika za mikroinkapsuliranje sa različitim nosačima. Tečnost koja se uvodi u komoru može da bude rastvor, emulzija ili disperzija supstance koja se inkapsulira, a inkapsuliranje može da se vrši sa jednim ili više polimera.

Konvencionalne metode za dobijanje mikročestica kao što su dvostruke (dvo-stepene) emulzije i koacervacije često imaju ograničenja, uključujući agregaciju čestica kao rezultat izuzetno visokih površinskih energija i uzajamne adhezije čestica, neefikasnost inkapsulacije, izrade koja zahteva više koraka, zaostali organski rastvarači. Sušenje raspršivanjem je efikasan postupak za inkapsuliranje lekovitih supstanci u polimerne mikročestice. Ova tehnika uključuje dispergovanje hidrofilnih lekovitih supstanci ili direktno dodavanje hidrofobnih supstanci u rastvor polimera, koji se nakon toga raspršuje kroz mlaznicu u komoru gde rastvarač isparava, a čestice se sakupljaju (Slike 13 i 14) (Suri i sar. 2013).



Slika 13. Priprema mikročestica korišćenjem metode sušenja raspršivanjem (A) konvencionalna metoda; (B) metoda sa sniženom temperaturom (Suri i sar. 2013).



Slika 14. Šematski prikaz dobijanja mikročestica metodom sušenjem raspršivanjem (Burges i Hickey, 2007)

Najčešće korišćen rastvarač je voda, s obzirom da su organski rastvarači obično lako zapaljivi, lako isparljivi i toksični (Thiesi 1996). Kao zagrejani gas u koji se uvode kapljice

tečnosti najčešće se koristi vazduh, ali ukoliko je potrebno postići inertnu sredinu koriste se gasovi poput azota (Slika 13 B).

Ovom tehnikom se generalno dobijaju mikročestice veličine 1-100  $\mu\text{m}$  i postiže se efikasnost inkapsulacije čak do 99%, u zavisnosti od interakcije supstance i nosača, viskoziteta rastvora nosača i karakteristika mlaznice (Burges i Hickey 2007; Park i Yeo, 2007).

Osnovne prednosti sušenja raspršivanjem su jednostavnost metode, veliki kapacitet proizvodnje i mogućnost komercijalne primene, međutim ova metoda ima i nedostatke i ograničenja. Ograničenja se uglavnom odnose na osetljivost supstanci na povišenu temperaturu, pogotovo termolabilnih polifenolnih jedinjenja. Takođe, mikroinkapsuliranje je ograničeno na primenu nosača koji nisu izrazito viskozni. Prilikom izbora polimera za inkapsulaciju potrebno je razmotriti reološke karakteritike njegovih rastvora. Viskozni rastvori polimera za inkapsulaciju, ograničavaju mogućnost dobijanja sitnih kapi, tj. mikročestica zadovoljavajuće veličine i pravilnog oblika (Burges i Hickey, 2007; Park i Yeo, 2007; Fang i Bhandari 2010; Flores i sar. 2014; Horswald i sar. 2013).

### 3.4. Kriterijumi za izbor metode inkapsulacije

Za različite aktivne supstance ne postoji univerzalna metoda mikroinkapsulacije. Prilikom izbora mikroinkapsulacije neophodno je razmotriti fizičko-hemijske, biofarmaceutske, farmakodinamičke i farmakokinetičke karakteristike supstance koja se inkapsulira, ali i svojstva polimera koji se koriste za inkapsulaciju.

Pošto je voda najčešće korišćen rastvarač, rastvorljivost leka u vodi obično je dobra polazna osnova za izbor polimera i metode inkapsulacije (Burges i Hickey, 2007; Park i Yeo, 2007). Polimer za inkapsulaciju i postupak inkapsulacije treba odabrati tako da sledeće karakteristike mikročestica odgovaraju njihovoj nameni (Thies i sar. 2005; Čalija 2013):

- **Veličina mikročestica.** Veličina treba da odgovara načinu primene mikročestica, a takođe veličina ima direktan uticaj na brzinu kojom se inkapsulirana supstanca oslobađa iz mikročestica. Manje mikročestice imaju veću ukupnu površinu, pa je brže i oslobađanje

inkapsulirane supstance, dok je kod većih mikročestica ukupna površina manja, a duži difuzioni put iz jezgra mikročestica (Burges i Hickey, 2007; Park i Yeo, 2007).

- **Efikasnost inkapsulacije.** Efikasnost inkapsulacije podrazumeva stepen iskorišćenosti leka tokom procesa inkapsulacije i poželjno je da ona ima vrednost što bližu 100%. Rastvorljivost lekovite supstance je jedna od osnovnih karakteristika koju je potrebno razmotriti prilikom odabira postupka inkapsulacije kako bi se postigla što veća vrednost efikasnosti inkapsulacije. Nekada je rešenje čuvati mikročestice u medijumu od koga su napravljene, koji ima istu koncentraciju aktivne supstance, čime se sprečava “curenje” iz same mikročestice (Kostić i sar. 2012).

- **Sadržaj lekovite supstance.** Pod sadržajem lekovite supstance podrazumeva se udeo lekovite supstance u ukupnoj masi mikročestica, a obično se izražava u procentima. Poželjno je da mikročestica ima što veći sadržaj inkapsulirane supstance.

- **Stabilnost.** Kao i u slučaju izrade drugih konvencionalnih preparata, prilikom odabira polimera za inkapsulaciju i metode inkapsulacije neophodno je razmotriti stabilnost lekovite supstance. Tako npr. prilikom inkapsulacije termolabilnih aktivnih principa nije moguće koristiti metode inkapsulacije koje zahtevaju primenu visokih temperatura. Takođe, potrebno je voditi računa da postupak inkapsulacije ne ugrozi stabilnost mikročestica.

### 3.5. Karakterizacija mikročestica

Karakterizacija mikročestica nosača podrazumeva niz analiza mikročestica sa ciljem da se dizajnira mikročestica sa pogodnim nosačem za različite aktivne supstance.

Ponašanje čestica zavisi od velikog broja faktora (površinsko naelektrisanje, morfologija, veličina, hemijski sastav kao i tendencija za agregaciju) i male izmene mogu dovesti do značajnih promena.

Metode koje se najčešće koriste za fizičko-hemijsku karakterizaciju mikročestica su elektronska mikroskopija (SEM, TEM), dinamičko rasejavanje svetlosti (DLS), merenje

zeta potencijala, fotoelektronska spektroskopija X-zraka (XPS), mikroskopija sile atoma (AFM) kao i optička svetlosna i fluorescentna mikroskopija.

Mikroskopske tehnike kao što su optička, fluorescirajuća, transmisiona i skenirajuća elektronska mikroskopija se veoma često koriste prilikom izučavanja površine čestice, morfologije, oblika, veličine (Suri i sar. 2013; Kostić i sar. 2012; Burges i Hickey, 2007; Park i Yeo, 2007).

Primenom različitih mikroinkapsulacionih tehnika za proizvodnju mikročestica, kao i pogodnim metodama njihove karakterizacije, moguće je dobiti čestice željenih karakteristika, koje mogu potencijalno imati i širu komercijalnu upotrebu.

### **3.6. Mikroinkapsulacija polifenola iz ploda aronije**

Prema dosadašnjim saznanjima, literaturni podaci o mikroinkapsulaciji polifenola aronije su veoma oskudni i gotovo da i ne postoje. Veoma mali broj studija opisuje inkapsulaciju jedinjenja aronije i to metodom kompleksiranja (Howard i sar. 2013) ili različitim metodama sušenja. Horswald i sar. 2013. su ispitivali uticaj različitih metoda sušenja (sušenje raspršivanjem, zamrzavanjem i vakum sušenje) na očuvanje polifenola iz aronije. Međutim, sušenje raspršivanjem podrazumeva visoke temperature, oko 100°C i više, kada se može javiti degradacija aktivnih jedinjenja iz aronije, od kojih su naročito osetljivi antocijani (Leong i Oei. 2012; Stojanović i sar. 2012). Do sada polifenoli aronije nisu inkapsulirani u nosače metodom elektrostatičke ekstruzije.



## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja u okviru ove disertacije bila su usmerena ka sledećim ciljevima:

### 1. Optimizacija ekstrakcije polifenola aronije

Optimizacija ekstrakcije suvog ploda aronije sa ciljem dobijanja ekstrakta sa visokim prinom polifenola. Cilj je optimizovati ekstrakcioni proces variranjem različitih faktora ekstrakcije.

### 2. Mikroinkapsulacija ekstrakta

Cilj je bio razvoj sistema za mikroinkapsulaciju polifenolnih jedinjenja iz ekstrakta ploda aronije i kontrolisano oslobađanje polifenola. U tu svrhu su ispitivane dve metode mikroinkapsulacije, kako bi se dobile čestice pogodne za farmaceutsku primenu. Ispitan je uticaj različitih procesnih parametara na elektrostatičku ekstruziju kako bi se definisale mikročestice sa najvećom količinom aktivnih principa, tj. polifenola. Varirani su različiti nosači i različiti promeri igle. Takođe, ispitan je i uticaj različitih nosača za mikroinkapsulaciju korišćenjem tehnike sušenja raspršivanjem u cilju dobijanja čestica željenih karakteristika.

### 3. Ispitivanje delovanja ekstrakta dobijenog optimizacijom ekstrakcije na modelu eksperimentalne hipertenzije

Cilj je ispitati potencijalno antihipertenzivno i antioksidativno delovanje ekstrakta aronije (praćenjem sistemskih i regionalnih hemodinamskih, kao i biohemijskih parametara) u eksperimentalnom modelu esencijalne hipertenzije. Budući da je predmet istraživanja veoma aktuelna biljna vrsta, po prvi put bi se ispitali *in vivo* efekti ekstrakta suvog ploda aronije na krvni pritisak, protoke i otpore u odgovarajućim vaskularnim koritima, lipidni status i parametre oksidativnog stresa kod pacova sa urođenom hipertenzijom.

## 3.MATERIJALI I METODE

### 3.1. Biljni materijal

Plodovi vrste *Aronia melanocarpa* (Michx.) čine biljni materijal koji je korišćen za analize tokom istraživanja. Plodovi su sakupljeni u periodu pune zrelosti, od jula do avgusta, tokom 2013. i 2014. godine, u zavisnosti od potreba eksperimenata (Slika 15). Biljni materijal je prikupljen sa plantaže koja se nalazi na planini Suvobor, Zapadna Srbija. Nadmorska visina ovog područja iznosi 779 m, na koordinatama 44° 08' 16.04" severne geografske širine i 20° 10' 56.28" istočne geografske dužine. Tip zemljišta na kome je uzgajana aronija je Calcocambisol, okarakterisan kao slabo stenovito zemljište (<25%), suvo, sa prosečnom pH vrednošću 6.2. Klimatski uslovi, koji karakterišu ovu oblast su kontinentalnog tipa, sa prosečnim nivoom padavina od 50 mm/m<sup>2</sup> i prosečnom minimalnom i maksimalnom godišnjom temperaturom između 3.3–27.3°C tokom vegetacionog perioda (mart-septembar). Pored redovnog orezivanja stabala, nisu bile primenjivane druge agrotehničke metode. Sakupljeni plodovi su sušeni u sušnici (Instrumentaria ST 01/02, Zagreb, Hrvatska) na 40°C u trajanju od 48 h. Sadržaj vlage je iznosio 10.65±1.39% (IR vlagomer Denver Instruments). Osušeni bobičasti plodovi aronije su usitnjeni u industrijskom mlinu (UMČ-20, Biljotehnika), u proizvodnom pogonu Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, u Pančevu. Nakon usitnjavanja, čestice su razdvojene sistemom standardnih sita (6, 3, 2, 1, 0.75mm), koja odgovaraju propisu Pete Jugoslovenske farmakopeje (Yugoslavian Pharmacopoeia-Ph Yug V, 2000). Tako dobijeni uzorci su skladišteni i čuvani na sobnoj temperaturi pre ekstrakcije i daljih analiza.



Slika 15. Osušen plod aronije korišćen u eksperimentima

### 3.2. Hemikalije i reagensi

Galna kiselina, katehin, natrijum-karbonat, kalijum-bromid, metanol, mravlja, ortofosforna, glacijalna sirćetna, hlorovodonična, tiobarbiturna kiselina (4,6-dihidroksi-2-merkaptopirimidin), 2,2-azobis (3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat) (ABTS), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), proizvođač Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka. Folin-Ciocalteu reagens, litijum-heparin, p-dimetilaminocinamaldehyd reagens, nitratna reduktaza (NAD[P]H) iz crnog *Aspergillus*-a, (N-(1-naftil) etilenediamin, sulfanilamid i Griess-ov reagens (Sigma Chemicals Co, SAD). Za potrebe HPLC analiza, etanol i acetonitril su bili analitičke čistoće (Merck, Darmstadt, Nemačka), dok je prečišćena voda za HPLC analize pripremljena uz pomoć uz Milli-Q sistema za prečišćavanje (Millipore, Francuska). Standardi antocijana, cijanidin-3-*O*-galaktozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-arabinozid, i flavonoida kvercetin-3-*O*-rutinozid (rutin), kvercetin-3-*O*-galaktozid (hiperozid) i kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercetin), proizvođač Extrasynthese, Cedex, Francuska. Za pripremu mikročestica korišćene su u praškastom obliku soli natrijum-alginata, niskog i srednjeg viskoziteta (Sigma-Aldrich, Velika Britanija). Alginska kiselina se sastojala od 61% manuronske kiseline (M) i 39% guluronske kiseline (G), u odnosu M/G 1.56. Inulin, u praškastom obliku je dobijen iz fabrike mleka, Fibruline, COSUCRA grupacija, Warcoing, Belgija, dok tačan sastav inulina proizvođač nije definisao. Kalcijum-hlorid dvohidrat (Acros organics, SAD), a natrijum-citrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i oba su bila analitičkog stepena čistoće.

Natrijum-pentobarbital (Nembutal) (Serva, Heidelberg, Nemačka), arapska guma (Hi Media Laboratories, India), mleko u prahu (Bioshop, Beograd), maltodekstrin (Davisco Foods International, Le Sueur, Minesota, SAD). Glicerol koji se koristio za potrebe eksperimenata (Commcen, Zemun, Srbija). Komercijalni Drabkinov reagnes, EDTA pufer, TRIS hidroksi metil aminometan, terc-butil hidroksi peroksid, glutation reduktaza (Sigma, Chemicals). Enzim peroksidaza (Acros Organics, Belgija). Hloroform (Hemica), vodonik peroksid (Hemos).

### **3.3. Hemijske analize ukupnih aktivnih principa**

#### **3.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola**

Sadržaj ukupnih fenola (TP), engl. *Total phenolics* u ekstraktima određivan je modifikovanom metodom po Waterman i Mole, 1994., spektrofotometrijski na osnovu reakcije sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom. 200 µl ekstrakta (u odgovarajućem razblaženju) dodato je u 1 ml razblaženog FC reagensa (1:10). Nakon 4 min dodato je 800 µl natrijum-karbonata (75 g/l). Nakon 2h inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi izmerena je apsorbancija na 765 nm prema slepoj probi (2 ml destilovane vode ili odgovarajućeg ekstragensa umesto uzorka), na spektrofotometru (Hewlett Packard, 400N). Serije razblaženja galne kiseline (0-100 mg/l) su korišćene za kalibraciju i konstrukciju kalibracione krive ( $A=0.10281xC$ ,  $r>0.99$ ). Određivanja su vršena u tri ponavljanja, a rezultati izraženi kao srednja vrednost.

Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu suve materije (droge) u ekstraktu tokom faze optimizacije ekstrakcije, mg GAE po mililitru ekstrakta (mg GAE/ml) koji se koristio za mikroinkapsulaciju, i mg GAE po mg liofilizovanog ekstrakta (mg GAE/g) koji se koristio za ispitivanje bioloških efekata.

### 3.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana

Određivanje ukupnih antocijana (TA), engl. *Total anthocyanins* u ekstraktima rađeno je po propisu Evropske Farmakopeje 6.0 (2008) uz male modifikacije. Ekstrakti u odgovarajućim razblaženjima su u normalnom sudu od 10 ml dopunjeni smešom, 0.1% rastvorom HCl u metanolu (V/V) do crte. Apsorbanca ovako dobijenog rastvora se merila na 528 nm, a kao slepa proba se koristio 0.1% rastvor HCl u metanolu (V/V). Sadržaj ukupnih antocijana (TA) izražen preko cijanidin-3-*O*-glukozida se izračunava prema formuli:

$$\% \text{ TA} = (A \times V_1 \times V_2) / (718 \times m)$$

gde je A-apsorbanca ispitivanog uzorka na 528 nm,  $V_1$ -zapremina normalnog suda,  $V_2$ -zapremina razblaženja, 718-specifična apsorbanca cijanidin-3-*O*-glukozid hlorida na 528 nm, m-masa odmerenog usitnjenog uzorka (biljne droge) tokom faze optimizacije ekstrakcije, masa mikročestica dobijenih tokom faze mikroinkapsulacije metodom sušenja raspršivanjem ili masa liofilizovanog ekstrakta koji se koristio za ispitivanje bioloških efekata na životinjama.

### 3.3.3. Određivanje ukupnih proantocijanidina

Sadržaj ukupnih proantocijanidina u ekstraktu određen je spektrofotometrijski korišćenjem *p*-dimetilaminocinamaldehyd (*p*-DMACA) reagensa uz male modifikacije (Li i sar. 1996). 100  $\mu$ l ekstrakta je pomešano sa 80  $\mu$ l *p*-DMACA reagensa, 2 ml metanola i dodata je kap glicerola (radi stabilizacije boje). Nakon 7 minuta, apsorbanca je merena na 640 nm. Sadržaj proantocijanidina u ekstraktu je prikazan kao miligrami katehina kao ekvivalenta po gramu liofilizovanog ekstrakta (mg CE/g liofilizovanog ekstrakta). Sva određivanja su vršena u tri ponavljanja, a rezultat izražen kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom.

### 3.3.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta aronije

#### (FRAP i ABTS metoda)

FRAP test (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*) liofilizovanog ekstrakta dobijenog od suvog ploda aronije, a koji se koristio u *in vivo* studiji na životinjama rađen je po metodi koja je prethodno opisana od strane Jagtap i sar. 2010. Vodeni rastvori  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1-2.5  $\mu\text{M}$ ) su korišćeni za dobijanje kalibracione krive i rezultati su izraženi kao mmol Fe (II) po gramu liofilizovanog ekstrakta (mmol Fe (II)/g liofilizovanog ekstrakta). Antioksidativna sposobnost liofilizovanog ekstrakta ispitivana je i pomoću ABTS testa (engl. *Free Radical Scavenging ability*) korišćenjem 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS•+) spektrototomertijskim merenjem na 734 nm (Re i sar. 1999). Rezultati su izraženi kao mmol Trolox ekvivalenta (TE) po gramu liofilizovanog ekstrakta (mmol TE/g liofilizovanog ekstrakta), uz pomoć kalibracione krive određene za Trolox (0.1-2.5 mM). Kao pozitivane kontrolne vrednosti, korišćeni su konvencionalni antioksidansi kao što su vitamin C i butil hidroksitoluen (BHT). Sva određivanja su vršena u tri ponavljanja.

### 3.4. Hemijska analiza pojedinačnih jedinjenja-HPLC metoda

#### 3.4.1. Kvantitativna analiza antocijana

Detekcija i kvantifikacija antocijana vršena je visoko efikasnom tečnom hromatografijom, na HPLC aparatu (Agilent 1200 RR, Waldbronn, Germany), uz upotrebu DAD detektora, na reverzno-faznoj koloni Lichrospher RP-18 (250 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$  veličina pora, Agilent). Mobilnu fazu A činio je 0.1% rastvor mravlje kiseline u vodi, a kao mobilna faza B je korišćen acetonitril. Razdvajanje antocijana je vršeno sledećim gradijentom: 1% B 0-0.5 min; 1-7% B 0.5-1 min; 7% B 1-4 min; 7-10% B 4-7.5 min; 10-14% B 7.5-11.5 min; 14-25% B 11.5-15.5 min; 25-40% B 15.5-18.5 min; 40-75% B 18.5-22 min; 75% B 22-25 min, sa protokom od 1 ml/min. Detekcija je vršena na 290, 350 i 520 nm. Sadržaj antocijana je određen na osnovu kalibracione krive, koja je konstruisana na osnovu standarda antocijana, cijanidin-3-*O*-galaktozida, cijanidin-3-*O*-glukozida i

cijanidin-3-*O*-arabinozida. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom, u mg po gramu suve materije-droge (mg/g). Sva određivanja su vršena u tri ponavljanja.

### **3.4.2. Kvantitativna analiza flavonoida**

Detekcija i kvantifikacija flavonoida vršena je visoko efikasnom tečnom hromatografijom, na HPLC aparatu (Agilent 1200 RR, Waldbronn, Germany), uz upotrebu DAD detektora, na reverzno-faznoj koloni Lichrospher RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm veličina pora, Agilent). Mobilnu fazu A činio je 1% rastvor ortofosforne kiseline u vodi, a kao mobilna faza B je korišćen acetonitril. Razdvajanje je vršeno sledećim gradijentom: 90-80% A 0-5min, 80% A 5-20 min, 80-40% A 20-30 min, 40-0% A 30-35 min, sa protokom od 1 ml/min. Detekcija je vršena na talasnim dužinama od 260 i 350 nm. Sadržaj flavonoida je određen uz pomoć kalibracione krive, koja je konstruisana na osnovu standarda, kvercetin-3-*O*-rutinozida (rutin), kvercetin-3-*O*-galaktozida (hiperozid), kvercetin-3-*O*-glukozida (izokvercetin). Sva određivanja su rađena u tri ponavljanja. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom, u mg po gramu suve materije-droge (mg/g).

### **3.5. Optimizacija ekstrakcije**

Ekstrakcija biljne droge, ploda aronije se vršila tradicionalnom metodom ekstrakcije, maceracijom u erlenmajeru zapremine 100 ml, mešanjem na laboratorijskom šejkeru (Unimax 1010, Heidolph, Germany) (Slika 16). Rotacija šejkera je tokom celog eksperimenta bila fiksirana na 170 rpm, a sve ekstrakcije su vršene na sobnoj temperaturi. Prvu fazu ispitivanja ekstrakcije je činilo određivanje optimalne i racionalne dužine trajanja ekstrakcije, jer je maceracija ekstrakciona metoda koja obično zahteva duži vremenski period. Eksperimentalni uslovi za početni deo ispitivanja su određeni na osnovu literaturnih podataka i istraživanja koja su se već bavila ekstrakcijom ploda aronije (Galvan D' Alesandro i sar. 2012, Ramić i sar. 2015, Cacace i Mazza, 2003). Optimalna dužina trajanja ekstrakcije je ispitivana korišćenjem 50% etanola kao rastvarača, odnos droga-rastvarač je bio fikisiran na 1:20, a veličina čestica je bila 2 mm (srednja veličina čestica). Ekstrakcija je

vršena u trajanju od 15, 30, 60, 90 minuta, 2 h, 2,5h, 5h, 10h i 18h. Kako vreme ekstrakcije nakon 90 minuta nije pokazalo značajan uticaj na ekstrakciju polifenolnih jedinjenja, dalja optimizacija ekstrakcije je vršena na 15, 30, 60 i 90 minuta. Sva ispitivanja su rađena u ponavljanjima od tri puta.



Slika 16. Šejker za izvođenje maceracije

### 3.5.1. Ispitivanje optimalnih uslova ekstrakcije

U narednim fazama optimizacije ekstrakcije ploda aronije, ispitivan je uticaj svakog pojedinačnog faktora na proces ekstrakcije, **na svim nivoima i u svim kombinacijama (4 x 3 x 4 x 5 dizajn)**. Radi određivanja najboljeg ekstragensa, ekstrakcija je vršena sa četiri različita rastvarača, destilovanom vodom, 50%, 70%, 96% mešavinama etanol-voda, a sve u zapremini od 25 ml. Ispitivana su 3 odnosa droga-rastvarač (1:10, 1:20, 1:30), i 5 stepena usitnjenosti biljne droge (6, 3, 2, 1, 0.75 mm) u cilju dobijanja ekstrakta sa najvećom količinom aktivnih principa.



### 3.5.2. Dizajn eksperimenta

#### 3.5.2.1. Definisane (izbor) nivoa nezavisno promenljivih koje će biti korišćene u eksperimentalnom dizajnu

Analiza uticaja varirajućih faktora na ekstrakciju ukupnih fenola (TP) i ukupnih antocijana (TA) je izvršena. Statistička značajnost između nivoa je procenjena na svim uzorcima u tri ponavljanja jednofaktorijskom analizom varijanse (One-way Anova), uz Dankanov test i značajnost  $p < 0.05$ . Po dva varirajuća faktora svakog nivoa sa najvećim prinosom oba posmatrana parametra kvaliteta (TP i TA) su odabrana za sledeću fazu istraživanja optimizacije ekstrakcije.

#### 3.5.2.2. Faktorijski dizajn

Faktorijski dizajn se može definisati kao strategija postavke eksperimenata na način koji će omogućiti da se do željenih informacija dođe na što efikasniji i precizniji način (Lewis i sar. 1999). Konvencionalni pristup postavlja eksperimenta podrazumeva ispitivanje uticaja jedne promenljive na određeni odgovor tako što se vrednosti ostalih promenljivih održavaju konstantnim. Međutim, moguće je da postoji određen oblik interakcije više različitih promenljivih i faktorijski dizajn upravo za cilj ima prevazilaženje ovih nedostataka klasičnih postavki eksperimenata.

Tri eksperimentalna dizajna su korišćena za optimizaciju procesnih faktora koji utiču na ekstrakciju. Prvi, prethodno naveden (4 x 3 x 4 x 5) testirao je uticaj svakog pojedinačnog faktora na proces ekstrakcije, na svim nivoima i u svim kombinacijama. U drugom faktorijskom dizajnu  $2^4$ , 4 nezavisne promenljive (vreme ekstrakcije, odnos droga-rastvarač, vrsta rastvarača, stepen usitnjenosti ploda aronije), su ispitivane, a svaka na dva nivoa (Tabela 1). Svrha ovog koraka je bila identifikacija promenljive koja ima značajan uticaj na prinos TP i TA. Bazirano na rezultatima dobijenim pomoću drugog faktorijskog dizajna, novi  $2^3$  faktorijski dizajn je uključen da bi se odabrale optimalne vrednosti odnosa droga-rastvarač (1), vrste rastvarača (2) i stepena usitnjenosti (3) koji će dati najbolji prinos TP i

TA. Svaki faktor je testiran na dva nivoa koristeći najniže i najviše vrednosti izabrane na osnovu prethodnog eksperimentalnog dizajna.

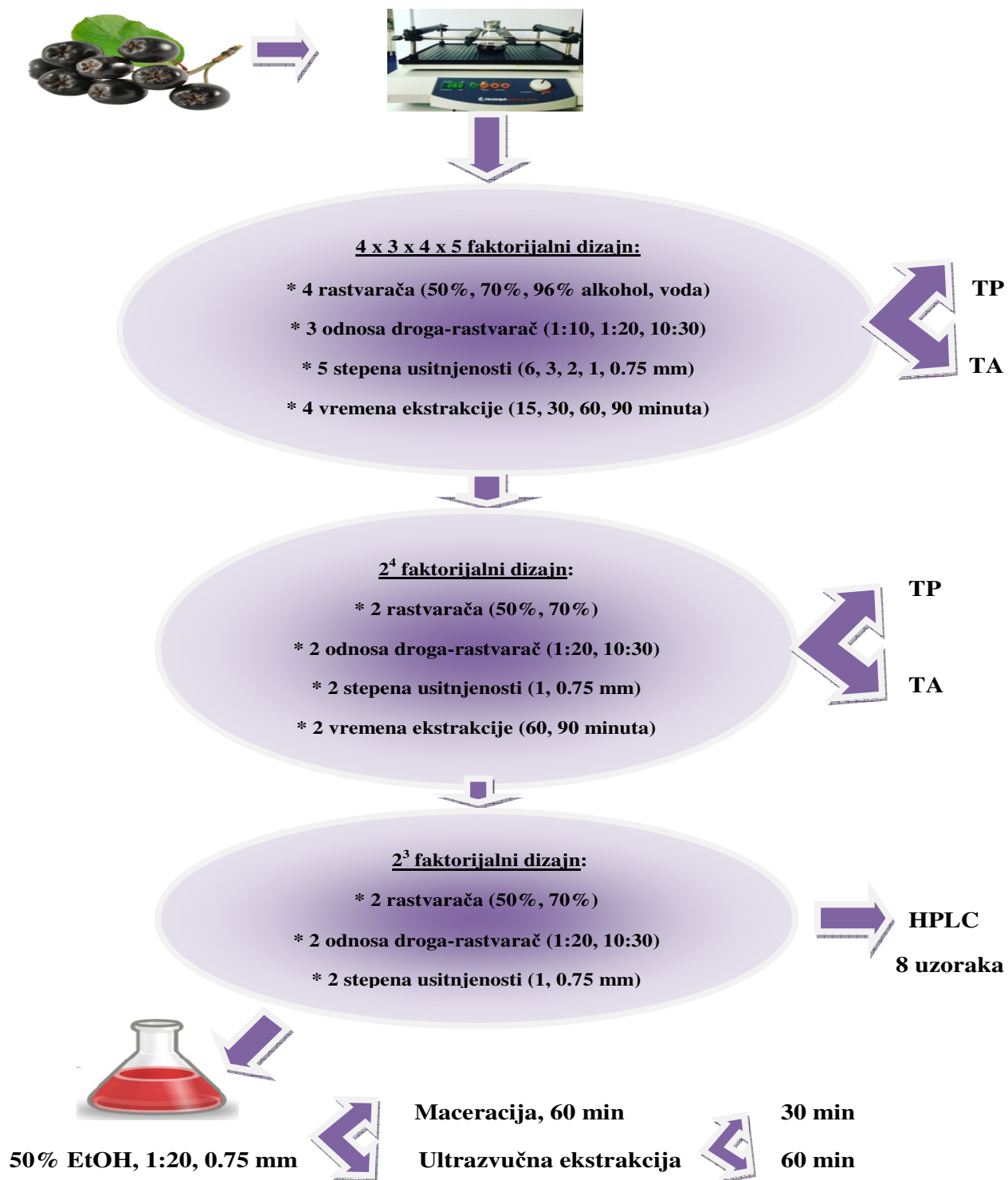
**Tabla 1.** Prikaz faktora i nivoa korišćenjem  $2^4$  faktorijalnog dizajna

Faktori	Obelažavanje	Nivoi	
		(-)	(+)
Odnos droga-rastvarač	1	1:20	1:30
Koncentracija etanola (%)	2	50	70
Sito (mm)	3	1.00	0.75
Vreme (min)	4	60	90

### 3.6. Poređenje metoda ekstrakcije-maceracija i ultrazvučna metoda

Radi poređenja metoda ekstrakcije, tradicionalne i savremene, druga metoda ekstrakcije vršena je u ultrazvučnom kupatilu (Maget, Bela Palanka, Srbija), sa jačinom struje od 35 W snage od i frekvencom od 40 kHz. Generator ultrazvuka bio je postavljen sa bočnih strana ultrazvučnog kupatila, a erlenmajer (100 ml) je bio pozicioniran na istoj razdaljini od sve tri strane kupatila. Smeša droga/rastvarač je bila postavljena 5 cm ispod površine vode. Tokom poređenja dve metode ekstrakcije, ekstrakcioni uslovi su bili fiksirani. Zapremina ekstragensa (50% etanol) je bila 25 ml, odnos droga rastvarač 1:20 i 0.75 mm stepen usitnjenosti biljne droge.

Prikaz eksperimenata po svim fazama tokom optimizacije ekstrakcije prikazan je na Šemi 1.



Šema 1. Prikaz eksperimenata po svim fazama tokom optimizacije ekstrakcije

### **3.7. Mikroinkapsulacija ekstrakta**

#### **3.7.1. Priprema ekstrakta za inkapsulaciju**

Na osnovu rezultata prve faze istraživanja, ekstrakt sa najvećom količinom polifenola dobijen nakon optimizacije ekstrakcije je inkapsuliran u odgovarajuće nosače, radi očuvanja stabilnosti polifenola. Nakon optimizacije, odabrana metoda ekstrakcije bila je maceracija na šejkeru, uz korišćenje 50% etanola kao ekstragensa, odnosa droga-rastvarač 1:20, stepena usitnjenosti ploda aronije 0.75 mm, u trajanju od 60 minuta. Nakon izvršene maceracije, u cilju uspešnog inkorporiranja u nosače, etanol iz ekstrakta je uparen na rotirajućem vakuum uparivaču (Büchi CH, Switzerland) (Slika 17). Tako dobijen ekstrakt je korišćen za mikroinkapsulaciju, dvema različitim metodama, elektrostatičkom ekstruzijom i sušenjem raspršivanjem.

Količina ukupnih fenola uparenog ekstrakta određuje se po već prethodno opisanoj metodi (3.3.1), a rezultati (TP) su izraženi kao mg ekvivalent galne kiseline po mililitru ekstrakta (mg GAE/ml).

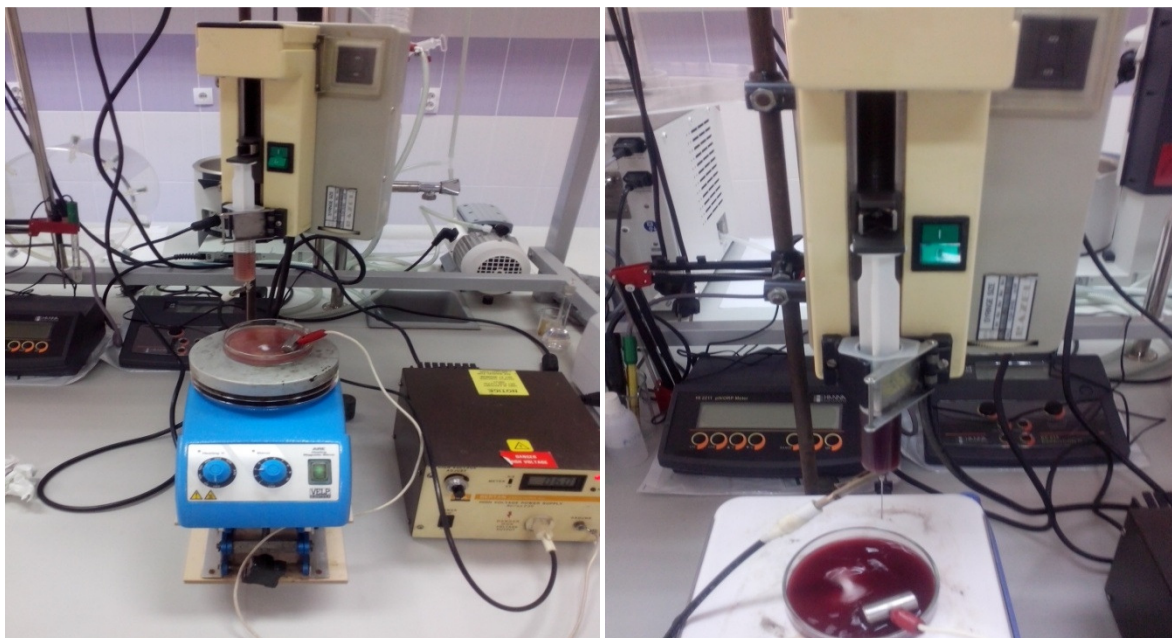


Slika 17. Vakuum uparivač

### 3.8. Inkapsulacija polifenola aronije u alginat i alginat/inulin sisteme metodom elektrostatičke ekstruzije

Čestice sa inkapsuliranim ekstraktom aronije su dobijene metodom mikroinkapsulacije, elektrostatičkom ekstruzijom. Natrijum-alginat i inulin su rastvoreni u prethodno pripremljenom ekstraktu (3.7.1) i rastvori su ostavljeni tokom noći da se mešaju na magnetnoj mešalici. Svaki od pripremljenih rastvora je prebačen u plastični špric zapremine 20 ml i istiskivan kroz iglu infuzionom pumpom (Razel, Scientific Instruments, Stamford, USA), stalnim zapreminskim protokom od 39.3 ml/h. Iz generatora visokog napona (Model 30R, Bertan Associates, Inc., New York) izvedena je pozitivna elektroda i povezana sa iglom izrađenom od nerđajućeg čelika, a u rastvor za skupljanje uronjena je uzemljena elektroda, 3 cm udaljena od vrha igle. Na ovaj način se između vrha igle i gornjeg nivoa rastvora kalcijum-hlorida stvara određeno električno polje, pa se tečnost koja se potiskuje pumpom kroz špric do vrha igle otkida od nje u obliku mlaza sitnih naelektrisanih kapljica, pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile. Upotrebljavane su tri različite veličine igle (18, 20, 22). Napon od 6 kV je bio konstantan i kontrolisan generatorom visokog napona. Kapi su sakupljane u 2% rastvoru kalcijum-hlorida rastvorenom u ekstraktu aronije (rastvor za skupljanje i geliranje), uz konstantno mešanje magnetnom mešalicom, pri čemu je dolazilo do očvršćavanja kapi u čestice sfernog oblika, u čijoj se unutrašnjosti nalazi imobilisan ekstrakt aronije (Slika 18). Za pripremanje rastvora za prikupljanje čestica je korišćen kalcijum-hlorid-dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ). Kada je proces dobijanja čestica elektrostatičkom ekstruzijom završen, isključen je generator napona i čestice su ostavljene u rastvoru kalcijum-hlorida sat vremena, uz mešanje magnetnom mešalicom. Nakon isteka jednog sata formirane mikročestice se čuvaju u mraku na 4°C, u rastvoru kalcijum-hlorida u ekstraktu. Formulacije dobijenih čestica su predstavljene u Tabeli 2. U toku prve faze eksperimenata, ispitivanju efikasnosti inkapsulacije i oslobađanju polifenola, kao i veličine dobijenih čestica ispitivan je uticaj svih variranih nosača (formulacija) i veličine igala **4 x 3** eksperimentalnim dizajnom.

Prazne čestice (kontrola) se dobijaju istim postupkom, ali rastvaranjem alginata ili smeše alginat/inulin u vodi umesto u ekstraktu.



Slika 18. Uređaj za elektrostatičku ekstruziju

Tabela 2. Formulacije pripremljenih čestica

Oznake formulacija	Tip alginata *	Koncentracija inulina
	Koncentracija alginata**	(%)
F1	Nisko* viskozni	/
F2	Srednje* viskozni	/
F3	Nisko* viskozni	5
F4	Srednje* viskozni	5

\* Viskozitet alginata zasnovan na sertifikatu proizvođača (Sigma-Aldrich)

\*\* 1.5% rastvor alginata u ekstraktu aronije

### 3.8.1. Sušenje čestica metodom sušenja zamrzavanjem (liofilizacijom)

U cilju dobijanja suvih čestica, hidrogel čestice su zamrznute na  $-80^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 1 h pre sušenja zamrzavanjem, zatim na  $-60^{\circ}\text{C}$  (pritisak od 0.011 mbar) u toku od 24 h i na  $-75^{\circ}\text{C}$  (pritisak od 0.0012 mbar) u trajanju od 1h u cilju uklanjanja kapilarne rezidualne vode (Beta 1-8 Freeze Dryer, Martin Christ, GmbH, Osterode am Harz, Germany) (Slika 19).



Slika 19. Liofilizator

### **3.8.2. Karakterizacija čestica**

#### **3.8.2.1. Određivanje veličine čestica**

Veličina hidrogel i osušenih čestica je određena pomoću optičkog mikroskopa (Carl Zeiss model AxioImager A1). Srednja vrednost dijametra čestica i standardna devijacija su izračunate iz izmerenih vrednosti. Uvid u sferičnost hidrogel čestica dobijen je takođe pomoću optičkog mikroskopa, a osušenih čestica (liofilizacijom) pomoću lupe (Nikon SMZ 18, kamera Nikon DS-Fi1C, objektiv SHR Plan Apo).

#### **3.8.2.2. Određivanje efikasnosti inkapsulacije polifenola**

Efikasnost inkapsulacije polifenola-TPe (*Total content of encapsulated polyphenols*) je stvarna količina inkapsuliranih polifenolau mikročestice. Količina polifenolnih jedinjenja u mikročesticama je određivana nakon rastvaranja mikročestica u rastvoru natrijum-citrata (2%) tako što je 0.5 g svežih, sušenih u sušnici ili liofilizovanih čestica je homogenizovano sa 3.5 ml natrijum-citrata 15 min uz energično mešanje, koristeći

Vortex (Tehnica, Železniki, Slovenija), kako bi se hemijski rastvorile. Nakon rastvaranja i dezintegriranja čestica, tako dobijeni polifenolno-citratni rastvori se analiziraju na sadržaj ukupnih polifenola spektrofotometrijski, koristeći Folin-Ciocalteu metodu, prema proceduri opisanoj u poglavlju (2.4). Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu čestica (mg GAE/g).

### **3.8.2.3. Oslobađanje polifenola u *in vitro* uslovima**

#### **Preliminarna ispitivanja oslobađanja polifenola**

Alginatne čestice (F1, F2, F3, F4) izdvojene su iz rastvora u kom su čuvane, 5 g čestica je potopljeno u sud u kome se nalazilo 100 ml destilovane vode. Zatim je, u određenim vremenskim intervalima (2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180 minuta) uzorkovano po 1 ml supernatanta uz pomoć šprica. Ovi uzorci su dalje korišćeni za određivanje kinetike oslobađanja polifenola iz alginatnih čestica, ispitivanjem uticaja svakog faktora, 4 x 3 eksperimentalni dizajn (veličina igle, tip nosača).

#### **Ispitivanje uticaja sušenja i različitih pH vrednosti medijuma na oslobađanje polifenola iz hidrogel i liofilizovanih čestica**

U ovom setu ispitivanja, hidrogel i liofilizovane, F2 i F4 čestice, dobijene uz pomoć igle 20, testirane su na oslobađanje polifenola u medijumima sa različitim pH vrednostima (destilovana voda pH 7.1 i zakišeljena voda na pH 2.2) u vremenskim intervalima (10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 minuta). Pet grama hidrogel ili 0.3 g liofilizovanih čestica je potopljeno u sud u kome se nalazilo 100 ml medijuma.

Rezultati u oba ispitivanja su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu čestica (mg GAE/g).



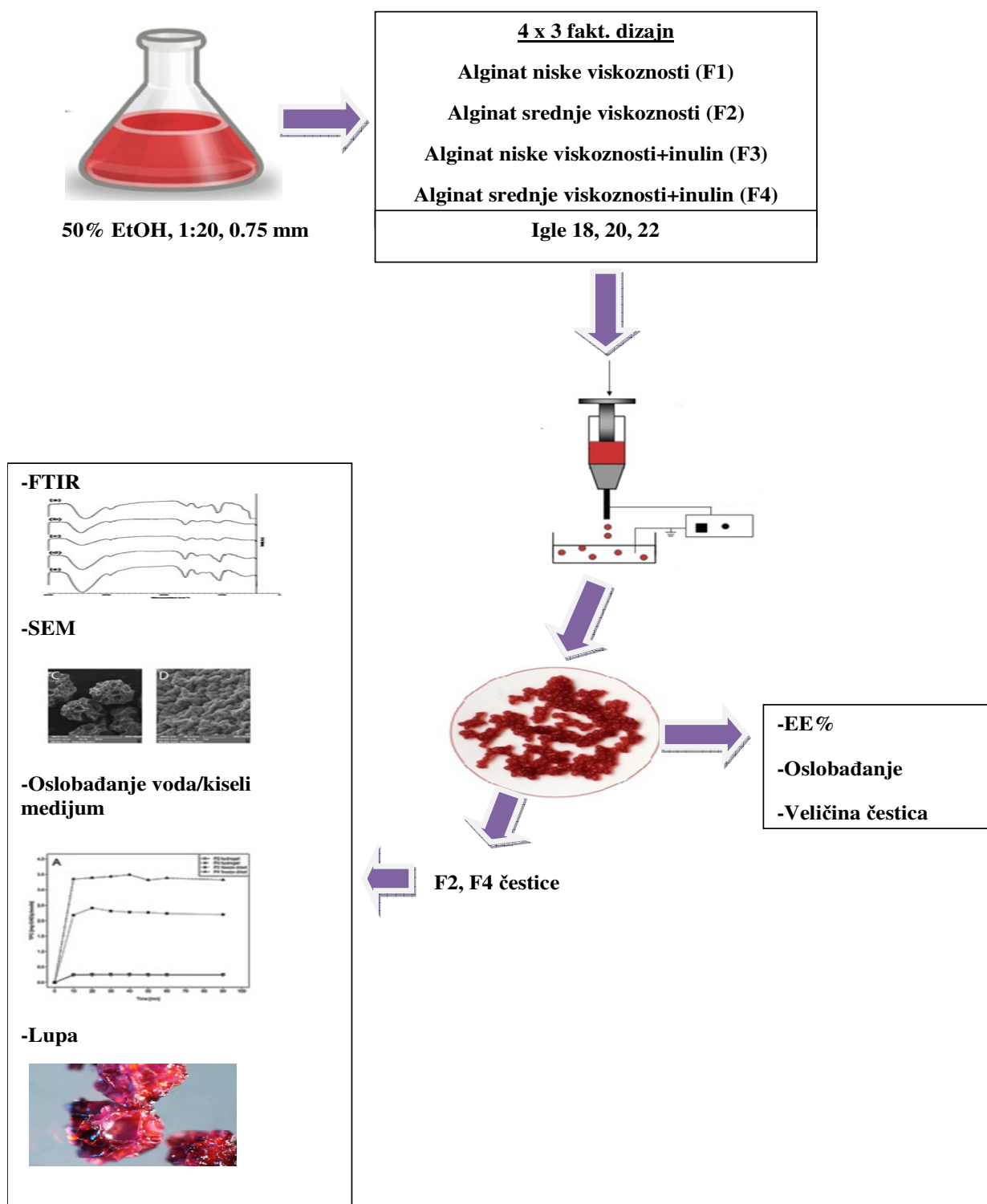
### 3.8.2.4. FTIR analiza

Transmisioni spektri pripremljenih i odabranih liofilizovanih čestica (F2 i F4 formulacije, igla 20) su snimljeni na FTIR spektrofotometru (BOMEM, Hartmann & Braun, Frankfurt, Nemačka), metodom Furijerove Transmisionne Infracrvene Spektroskopije (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), korišćenjem KBr diska. Liofilizovane čestice su pomešane sa KBr prahom i komprimovane u disk koristeći ručnu presu za tabletiranje. Disk je zatim smešten u držač uzorka i uzorci su snimani na talasnim dužinama od 4000 do 450  $\text{cm}^{-1}$ , sa rezolucijom od 4 $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.8.2.5. SEM analiza čestica

Površinska morfologija čestica je ispitivana korišćenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa (engl. *Scanning electron microscopy*) (Tescan Mira3 XMU, Cranberry Township, USA). Čestice su pažljivo liofilizovane do tačke u kojoj su uglavnom u svom prvobitnom obliku i dehidrovane dovoljno da budu ispitane pomoću SEM (2.8.1). Liofilizovane čestice (F2 i F4 formulacije, igla 20), prazne ili inkapsulirane ekstraktom aronije se prenose na držač uzorka i njihova površina presvlači zlatom (15/85), koristeći vakumski uređaj za "presvlačenje", Polaron SC502, a zatim se podvrgavaju SEM analizi. Tom prilikom upotrebljena su različita uveličanja što je naglašeno na mikrografijama.

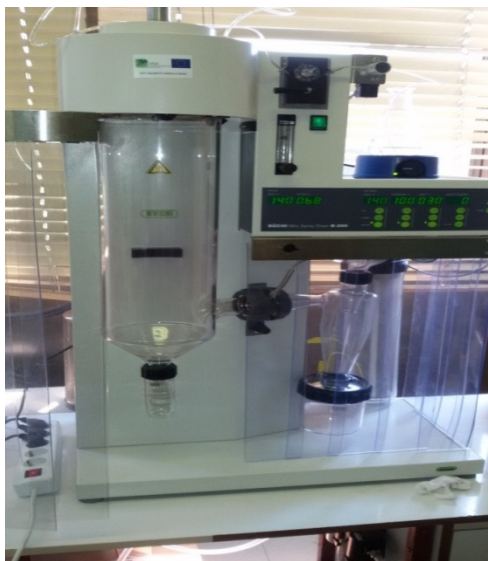
Prikaz mikroinkapsulacije metodom elektrostatičke ekstruzije po svim fazama, kao i metode kojima je vršena karakterizacija čestica dat je na Šemi 2.



Šema 2. Faze eksperimentalnog rada tokom mikroinkapsulacije metodom elektrostatičke ekstruzije

### 3.9. Inkapsulacija polifenola aronije metodom sušenja raspršivanjem

Metoda sušenja raspršivanjem je primenjena za mikroinkapsulaciju 50% etanolnog ekstrakta aronije sa 3 različita nosača, arapskom gumom (5%, m/m), maltodekstrinom (20%, m/m) i mlekom u prahu (obrano mleko, 20%, m/m). Biopolimeri za inkapsulaciju su pripremljeni tako što je odgovarajuća količina svakog nosača rastvorena u prethodno pripremljenom ekstraktu aronije (2.7.1). Pripremljeni rastvori su ostavljeni da se mešaju tokom noći na magnetnoj mešalici, na temperaturi  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Za mikroinkapsulaciju se koristio uređaj za sušenje raspršivanjem, engl. *Spray dryer* (Büchi mini B-290, Büchi Labortechnik AG, Switzerland) (Slika 20), sa dijametrom igle od 0.7 mm, temperaturom ulaznog ( $130\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) i izlaznog ( $56\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) vazduha, relativno slabim protokom vazduha (536 l/h), protokom tečnosti (8 ml/min), pritiskom atomizacije (6 psi). Niska temperatura izlaznog vazduha je izabrana sa ciljem da obezbedi dobru atomizaciju čestica i dobar protok tečnosti kako bi se dobile mikročestice koje su stabilne (što je i najvažnije, posebno za antocijane koji su izuzetno osetljivi na visoke temperature) i postigla visoka efikasnost inkapsulacije. Nakon što se završila mikroinkapsulacija metodom sušenja raspršivanjem, formirane mikročestice su prikupljene u prihvatni sud, a zatim čuvane u plastičnim bočicama, u mraku, do analiziranja.



Slika 20. Uređaj za sušenje raspršivanjem

### **3.9.1. Karakterizacija mikročestica**

#### **3.9.1.1. Oslobađanje polifenola i antocijana iz mikročestica u *in vitro* uslovima**

Za ispitivanje oslobađanja inkapsuliranih polifenola, 500 mg čestica rastvoreno je u 100 ml destilovane vode, a u cilju ispitivanja oslobođenih antocijana, 200 mg mikročestica je rastvoreno u 10 ml rastvora 5% mravlje kiseline u destilovanoj vodi. Mikročestice su se trenutno rastvorile u medijumu za ispitivanje oslobađanja, a potom je izvršeno centrifugiranje u trajanju od 10 minuta na 2000 obrtaja. Supernatant je korišćen za dalja određivanja sadržaja ukupnih polifenola i antocijana koji su oslobođeni iz mikročestica, po već opisanim metodama (3.3.1. i 3.3.2., poštujući redosled).

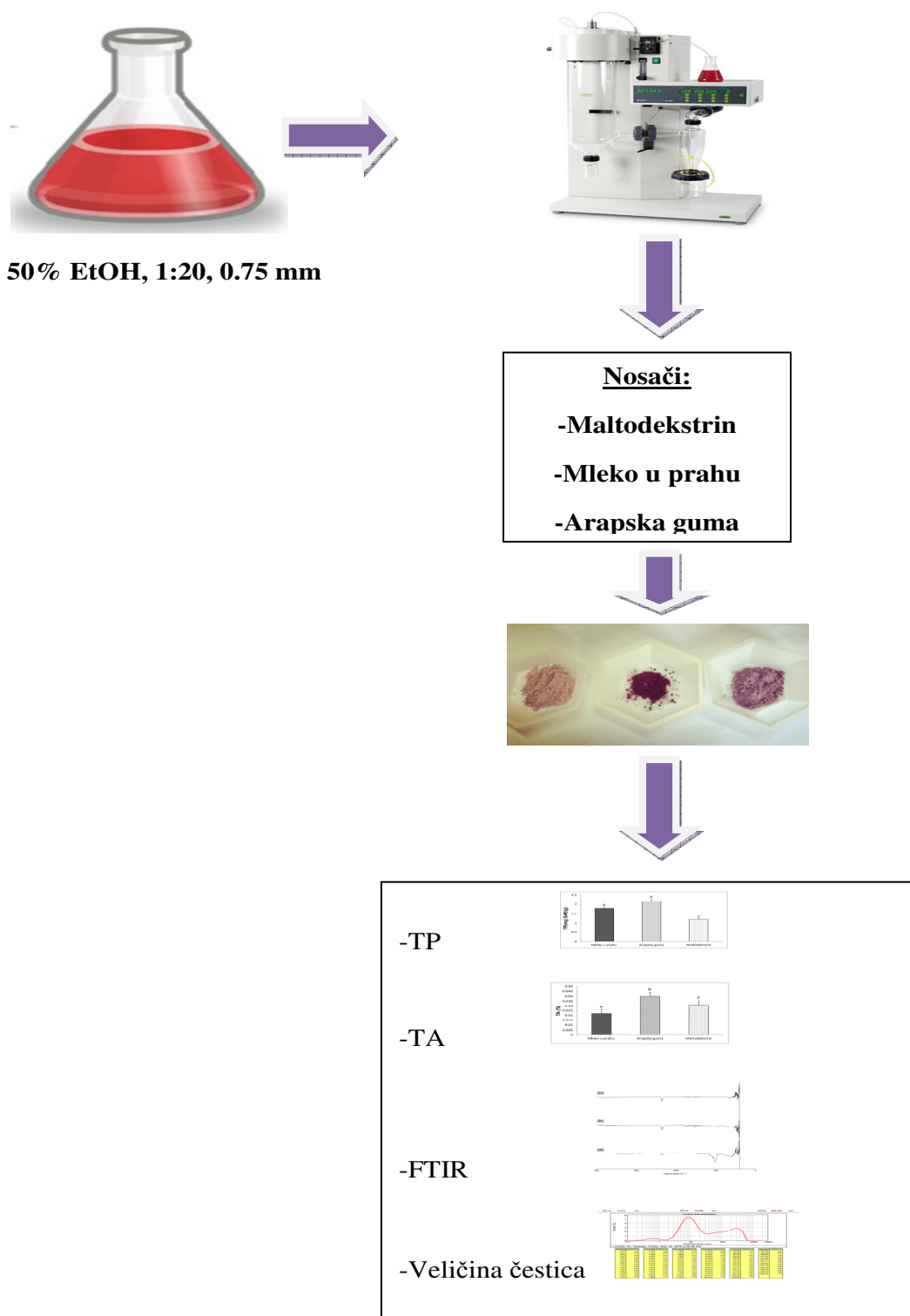
#### **3.9.1.2. FTIR analiza**

Transmisioni spektri pripremljenih čestica su snimljeni na FTIR spektrofotometru (BOMEM, Hartmann & Braun, Frankfurt, Nemačka) korišćenjem metode pomoću KBr diska. Mikročestice su pomešane sa KBr prahom i kompresovane u disk koristeći ručnu presu za tabletiranje. Disk je zatim smešten u držač uzorka i uzorci snimani na talasnoj dužini od 4000 do 450  $\text{cm}^{-1}$ , sa rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **3.9.1.3. Određivanje veličine mikročestica**

Veličina mikročestica je analizirana korišćenjem uređaja Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcester-shire, UK). Srednja vrednost dijametra čestica i standardna devijacija su izračunate iz izmerenih vrednosti, preko zapremine, koja je još poznata i kao DeBroukere-ova vrednost.

Faze eksperimentalnog rada tokom mikroinkapsulacije metodom sušenja raspršivanjem, kao i metode kojima je vršena karakterizacija čestica prikazane su na Šemi 3.



Šema 3. Faze eksperimentalnog rada tokom mikroinkapsulacije metodom sušenjem raspršivanjem

### **3.10. Potvrda delovanja ekstrakta dobijenog optimizacijom ekstrakcije na modelu eksperimentalne hipertenzije**

Hronična studija ispitivanja hipotenzivnog delovanja ekstrakta aronije rađena je na modelu esencijalne hipertenzije kod spontano hipertenzivnih pacova-engl. *Spontaneously hypertensive rats-SHR*. U svrhu *in vivo* ispitivanja, korišćen je ekstrakt sa najvećim sadržajem polifenola koji je dobijen optimizacijom ekstrakcije. Iz ekstrakta je uklonjen etanol na vakuum uparivaču (2.7.1.), a zatim je ostatak liofilizovan (Beta 1-8 Freeze Dryer, Martin Christ, GmbH, Osterode am Harz, Germany, metoda opisana u Odeljku 2.8.1.) u cilju lakšeg aplikovanja eksperimentalnim životinjama i okarakterisan na sadržaj ukupnih fenola, antocijana i proantocijanidina (po prethodno opisanim metodama, 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3, poštujući redosled). Tako pripremljen ekstrakt je neposredno pre aplikacije rastvaran u vodi.

#### **3.10.1. Životinje**

Za ispitivanje hroničnog dejstva ekstrakta aronije, korišćeni su mužjaci SHR pacova (soj Okamoto-Aoki), uzgajani u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni protokol na životinjama je sproveden u skladu sa Zakonom o dobrobiti oglednih životinja ("Sl.gl.RS" No6/10), uz strogo pridržavanje protokola odobrenog od strane Etičkog komiteta Instituta za Medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu i Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (br.323-07-02448/2014-05).

Šest meseci stari mužjaci SHR pacova, težine 300-350 g, čuvani u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja, bili su smešteni u polietilenske kaveze, u prostoriji sa kontrolisanom temperaturom i vlažnosti vazduha, sa 24-časovnim dnevno-noćnim režimom, a eksperimentalne životinje su u svakom trenutku imale pristup hrani i vodi (*ad libitum*).

Životinje su raspoređene u dve eksperimentalne grupe:

SHR-K (n=9) spontano hipertenzivni pacovi kontrolna grupa, koja je svakodnevno gastričnom sondom primala 1 ml vode u trajanju od četiri nedelje.

SHR-A (n=10) spontano hipertenzivni pacovi tretirani sa ekstraktom aronije, koji su tokom četveronedeljnog tretmana primali 50 mg/kg/dan liofilizovanog ekstrakta aronije rastvorenog u 1 ml vode (doza je izabrana na osnovu prethodno objavljenih rezultata-Hellstrom i sar. 2010) (Slika 21).

Na kraju tretmana, pacovi su bili smešteni u metaboličke kaveze (Tecniplast™ Metabolic Cage Systems for Rodents, Tecniplast USA, Inc) u cilju prikupljanja 24h urina. Meren je takođe i 24-časovni unos vode.

Nakon toga, životinje su bile anestetizirane opštim anestetikom (natrijum-pentobarbital, Nembutal, i.p.) u dozi od 35mg/kg telesne mase radi izvođenja hemodinamskih merenja.



Slika 21. Primenjivanje gavaže kod spontano hipertenzivnih pacova

### **3.10.2. Merenje sistemskih hemodinamskih parametara**

U svrhu određivanja sistemskih hemodinamskih parametara-sistolnog krvnog pritiska-SP, dijastolnog krvnog pritiska-DP, srednjeg arterijskog pritiska-SAP i frekvence rada srca, primenjena je hiruška intervencija. Femoralna arterija je preparirana i u nju je ubačen polietilenski kateter (PE-50, Clay-Adams Parsippany, NY, USA) ispunjen fiziološkim rastvorom sa heparinom, koji je spojen sa uređajem za registraciju hemodinamskih signala (9800TCR Cardiobox III-TCR, Columbus Instruments', USA). Za potrebe registrovanja minutnog volumena srca, preparirana je i kanulirana desna jugularna vena preko koje je

vršena infuzija hladnog (7-17°C) fiziološkog rastvora (u bolusu), dok je u levu karotidnu arteriju plasiran termosenzor za registraciju telesne temperature životinje, čiji je drugi kraj bio prikopčan za uređaj Cardiomax III-TCR. Metodom termodilucije određivan je minutni volumen srca (ml/min), a prema telesnoj masi životinje preračunavan je indeks minutnog volumena i izražavan u ml/min/kg. Pulsni pritisak-PP je definisan i izračunat iz razlike sistolnog i dijastolnog pritiska. Ukupni periferni otpor je izračunat na osnovu izmerenih vrednosti za minutni volumen (ml/min/kg) i srednjeg arterijskog pritiska.

### **3.10.3. Merenje regionalnih hemodinamskih parametara**

Protok krvi kroz karotidnu i renalnu arteriju, kao i aortu kod eksperimentalnih životinja određen je direktnom metodom pomoću uređaja Transonic T106 Small Animal Flowmeter (Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA). Desna karotidna arterija je pažljivo odvojena od okolnog tkiva i ultrazvučna sonda dijametra 1RB-1 mm pozicionirana je oko nje. Hirurški rez u abdominalnoj regiji omogućio je pristup abdominalnoj aorti, u nivou iznad odvajanja renalne arterije, a obe su pažljivo odvojene od okolnog tkiva, kako bi na njih bile pozicionirane ultrazvučne sonde odgovarajućeg dijametra (1RB-1 mm oko renalne arterije, tj. 2RB-2 mm oko aorte).

Na osnovu izmerenih protoka kroz ispitivane krvne sudove i srednjeg arterijskog pritiska u momentu registrovanja odgovarajućih protoka određivan je otpor u odgovarajućim krvnim sudovima, u karotidnoj i renalnoj arteriji i aorti.

### **3.10.4. Određivanje biohemijskih parametara**

Nakon hemodinamskih merenja, uzorkovana je krv punkcijom iz račve abdominalne aorte, i čuvana u tubama koje su sadržale antikoagulans litijum-heparin (Sigma, USA), za dalje biohemijske analize. Krv je centrifugirana na 4000 rpm, na temperaturi od 4°C, u trajanju od 20 minuta i čuvana na -20°C. Nakon uklanjanja plazme, preostali eritrociti su ispirani tri puta, podeljeni na jednake delove i skladišteni na -80°C do daljih analiza. Prethodno prikupljeni uzorci 24-časovnog urina su takođe centrifugirani na 4000 rpm, na temperaturi 4°C u trajanju od 20 minuta, a supernatanti su odvojeni i čuvani na -20°C do daljih analiza.



Uticaj ekstrakta aronije na bubrežnu funkciju je procenjivana na osnovu određivanja klirensa endogenog kreatinina (pokazatelja brzine glomerulske filtracije-engl. *Glomerular filtration rate*) i proteinurije. Mereni su: kreatinin, urea i proteini u plazmi i urinu, dok su klirensi kreatinina i uree, kao i proteinurija izračunati na osnovu standardnih formula.

Klirens endogenog kreatinina kao i klirens uree izračunavani su kao odnos koncentracije kreatinina izlučenog urinom i koncentracije kreatinina u plazmi, tj. odnos koncentracije uree izlučene urinom i koncentracije uree u plazmi, preračunato na kg telesne mase pacova, prema formulama:

$$C_{cr} = (U_{cr} \times U_v / P_{cr}) \times 1000 / t.m.$$

$$C_u = (U_u \times U_v / P_u) \times 1000 / t.m.$$

Ispitivan je i uticaj ekstrakta aronije na lipidni status SHR određivanjem ukupnog holesterola, HDL, LDL i triglicerida.

Nivo glukoze u plazmi, neorganski fosfat, kalcijum, magnezijum, unutrašnji antioksidansi (bilirubin i mokraćna kiselina), gvožđe, sposobnost vezivanja nezasićenog gvožđa (deo transferina koji nije zasićen gvožđem) kao i ukupni kapacitet vezivanja gvožđa su takođe određivani.

Svi biohemijski parametri su analizirani komercijalnim testovima i mereni na automatskom analizatoru Cobas integra 400 plus (Hoffmann-La Roche, Elitech Diagnostic, Germany).

### **3.10.5. Određivanje stepena lipidne peroksidacije metodom TBARS u plazmi i eritrocitima**

Stepen lipidne peroksidacije u plazmi i eritrocitima je procenjivan na osnovu određivanja reaktivnih jedinjenja tiobarbiturne kiseline (engl. *Thiobarbituric acid reactive substances*), metodom po Ohkawa i sar. 1979. Metoda je zasnovana na reakciji malondialdehida i ostalih TBARS supstanci sa tiobarbiturnom kiselinom (2,6-dihidroksi pirimidin-2-tiol, Arcos, Organic) na visokoj temperaturi i u kiseloj sredini pri čemu nastaje hromogeni kompleks sa apsorpcionim maksimumom na 540 nm. Preciznije, 300 µl uzorka za ispitivanje pomešano je sa 600 µl tiobarbiturnog reagensa (0.917 mmol/l trihlorsirćetne kiseline; 2.6 mol/l

tiobarbiturne kiseline, 0.25 mol/l HCl u destilovanoj vodi) i inkubirano u vodenom kupatilu na 100°C. Nakon hlađenja i centrifugiranja (10 min, 10000 obrtaja, 4°C), apsorbancija je očitana na 540 nm u odnosu na slepu probu, pripremljenu pod istim reakcionim uslovima (destilovana voda umesto uzorka). Za izračunavanje koncentracije korišćen je ekstincioni koeficijent od  $156000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , a rezultati su izraženi u nmol/ml.

### **3.10.6. Određivanje antioksidativnog kapaciteta plazme pomoću FRAP i ABTS metode**

Ukupni antioksidativni kapacitet plazme i sposobnost redukovanja gvožđa u plazmi određivani su ABTS metodom i FRAP testom (prethodno opisani u Odeljku 3.3.4. za liofilizovani ekstrakt). Prisustvo antioksidanasa u plazmi obezbojilo je plavo-zeleno obojenje koje potiče od ABTS katjonskog radikala, a koji je proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Kinetika je merena na 734 nm kao što je prethodno opisano od strane Re i sar. 1999. Rezultati su izraženi kao mmol Trolox ekvivalenta (TE) po litru plazme. Rezultati dobijeni uz pomoć FRAP testa dobijeni po istom postupku kao i za liofilizovani ekstrakt opisanom u Odeljku 3.3.4., a izraženi su kao mmol Fe (II) po litru plazme.

### **3.10.7. Određivanje enzima antioksidativne zaštite**

U cilju analiziranja enzima antioksidativne zaštite, u špric sa 0.2 ml heparina uzima se 5 ml krvi. Kompletna krv se centrifugira 15 min na 4°C na 3000 obrtaja posle čega se odvaja plazma od eritrocita. Istaloženi eritrociti su resuspendovani i tri puta isprani fiziološkim rastvorom uz centrifugiranje 15 min na 3000 obrtaja, a zatim zamrznuti na -80°C do analize. Od ovih eritrocita pripremljen je lizat u zapreminskom odnosu 1:3 sa hladnom vodom, koji je sledećih 30 minuta stajao na ledu. U zavisnosti od analize, lizat se razblaživao, i u njemu se određivala količina hemoglobina i aktivnost enzima antioksidativne zaštite GSH-Px, CAT, GR.

### 3.10.7.1. Određivanje hemoglobina metodom Drabkina i Austina

Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima izražena je u jedinicama po g hemoglobina, pa je zbog toga bilo potrebno odrediti koncentraciju hemoglobina (Hb). Za određivanje koncentracije hemoglobina u lizatu krvi primenjena je kolorimetrijska cijanomethemoglobinska metoda. Princip ove metode zasnovan je na oksidaciji hemoglobina u prisustvu alkalnog kalijum-fericijanida do methemoglobina, koji potom reaguje sa kalijum-cijanidom i formira cijanomethemoglobin sa apsorpcionim maksimumom na 540 nm. Za određivanje je korišćen komercijalno dostupan *Drabkinov reagens*, koji sadrži 132 mg kalijum-heksa-fericijanida (III) (Sigma Chemicals), 130.4 mg kalijum-cijanida (Fluka), 20 ml 0.5 M fosfatnog pufera i vode do 100 ml.

U 5 ml Drapkinovog reagensa dodalo se 20  $\mu$ l lizata krvi, mešanje je vršeno uz pomoć uređaja Vortex, rastvor je stajao 15 min u mraku, a nakon toga se merila apsorbanca na spektrofotometru (Ultrospec 3300 pro, Amersham, Biosciences) na talasnoj dužini 545 nm u odnosu na vodu kao slepu probu.

Izračunavanje koncentracije hemoglobina je urađeno prema sledećoj jednačini:

$$[C] = A_{545} \times 36.77$$

### 3.10.7.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD određena je indirektnom metodom koja se zasniva na smanjenju brzine redukcije citohroma C. Prethodno dobijeni lizat eritrocita potrebno je dodatno razblažiti dodavanjem 1 ml etanola (Zorka Šabac) i 0.6 ml hloroforma (Hemica). Etanol i hloroform su se dodavali hladni, a hloroform se dodavao u kapima, uz neprestano mućkanje na Vortex-u. Zatim se vršilo centrifugiranje 15 minuta na 3000 obrtaja. Supernatant u kome se određivala aktivnost enzima se odvojio.

Reagensi potrebni za određivanje aktivnosti superoksid dismutaze bili su natrijum-karbonat (ICN Galenika), EDTA pufer sa pH vrednošću 10.2 i adrenalin (Sigma, Chemicals) rastvoren u 0.1 M HCl tako da  $\Delta A/\text{min}$  ima vrednosti 0.020-0.022. U staklenu kivetu se dodao karbonatni pufer, uzorak u količini koja je neophodna za redukciju linearnog dela

krive autooksidacije adrenalina 30-40% i adrenalina u količini da  $\Delta A/\text{min}$  tokom autooksidacije u linearnom delu bude 0.02-0.022. Radi određivanja aktivnosti SOD prati se  $\Delta A/\text{min}$  na 480 nm, do završetka linearnosti krive. Aktivnost SOD izražena je u jedinicama SOD aktivnosti po g hemoglobina (U/g Hb, specifična aktivnost).

Izračunavanje aktivnosti vršeno je po sledećoj jednačini:

$$\text{SOD (U/g Hb)} = 2 (\Delta K - \Delta A) \times R \times 100/\text{Hb} \times V \times \Delta K$$

gde je:

$\Delta K$ -promena apsorbance slepe probe;  $\Delta A$ -promena apsorbance uzorka; Hb-količina hemoglobina (g/100 ml); V-zapremina uzorka koji se sipa u reakcionu smešu (ml); R-razblaženje.

### 3.10.7.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze u lizatu krvi određivana je metodom po Beutlera (1982). Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje vodonik peroksida u prisustvu katalaze na 230 nm. Na toj talasnoj dužini vodonik peroksid apsorbuje svetlost. Određivanje aktivnosti katalaze vrši se u TRIS/EDTA puferu (pH 8.0), gde je TRIS hidroksi metil aminometan (Sigma Chemicals). Rastvor vodonik-peroksida pravio se od 30 % vodenog rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hemos) tako da apsorbance bude 0.860 na 230 nm.

Određivanje koncentracija vodonik peroksida vršeno je na sledeći način: u kvarcnu kivetu sipalo se 50  $\mu\text{l}$  pufera, uzorak u količini takvoj da  $\Delta A/\text{min}$  iznosi 0.03-0.06 i 1 ml rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Na spektrofotometru se prati promena apsorbance svakih 30 sekundi, tokom 3 minuta na 230 nm. Koncentracija vodonik peroksida izračunavana je na osnovu ekstinkcionog koeficijenta, koji za  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 230 nm iznosi 0.071, po formuli:

$$\text{CAT} = 100 \times R \times \Delta A/\text{Hb} \times V \times 0.071, \text{ gde je:}$$

$\Delta A$ -promena absorbance u minuti; R-razblaženje; V-zapremina uzorka koji se sipa u reakcionu smešu (ml); Hb-količina hemoglobina (g/ 100 ml). Jedinice je  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/g Hb}$ .

### 3.10.7.4. Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze (GPx)

Aktivnost glutathion peroksidaze određivana je metodom Paglia i sar. 1967.

Princip metode se zasniva na aktivnosti GPx, koja katalizuje oksidaciju glutathiona (GSH) u glutathion-disulfid (GSSG) uz redukciju organskih hidroperoksida i glutathion reduktaze (GR), koja katalizuje redukciju GSSG u GSH uz oksidaciju NADPH kao koenzima.

Ovom metodom se prati potrošnja NADPH, odnosno oksidacija NADPH uz glutathion reduktazu na 340 nm.

Ova indirektna metoda koja meri promenu proizvoda reakcije pokazala se veoma reproduktivnom u poređenju s drugim metodama određivanja GSH-Px aktivnosti.

Neophodni rastvori potrebni za ovu reakciju su: 0.5 M fosfatni pufer pH 7.0, 0.2 mM NADPH u 1% NaHCO<sub>3</sub>, 1mM GSH (Sigma, Chemicals), 0.03M terc-butilhidroperoksid (Sigma, Chemicals), Drapkinov reagens, GR glutathion reduktaza (Sigma, Chemicals) (tip II) specifične aktivnosti 105 internacionalnih jedinica-IU/mg proteina.

Reakciona smeša: U staklenu kivetu naliva se 1.6 ml vode, 0.3 ml rastvora GSH, 0.6 ml rastvora NADPH, 0.3 ml fosfatnog pufera, 0.1 ml terc-butilhidroperoksida, 50 µl Drapkinovog reagensa i oko 50 µl uzorka. Reakcija otpočinje dodatkom 5 µl GR. Reakcija se odvijala na temperaturi 37°C.

Apsorpcija se očitavala na 340 nm, a reakcija je trajala 150 sekundi. Uporedo se radila i kontrolna reakcija (slepa proba). U kiveti slepe probe nalazili su se svi reagensi osim uzorka.

Aktivnost GSH-Px izračunavala se na sledeći način:

$$\text{GSH-Px} = (\Delta A - \Delta B) \times 1000 / 6.22 \times 0.835 \times \text{Hb}, \text{ gde je:}$$

$\Delta A$ -promena apsorbance/min za uzorak;  $\Delta B$ -promena apsorbance/min za slepu probu; Hb-količina hemoglobina (g/100 ml); 6.22-molarna ekstincija; 1/0.833-koeficjent.

Aktivnost je izražena u µmol NADPH/min/g Hb.

### 3.10.7.5. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR)

Određivanje aktivnosti glutation reduktaze rađeno je metodom po Glatzle i sar. 1974. Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovanog u redukovani glutation.



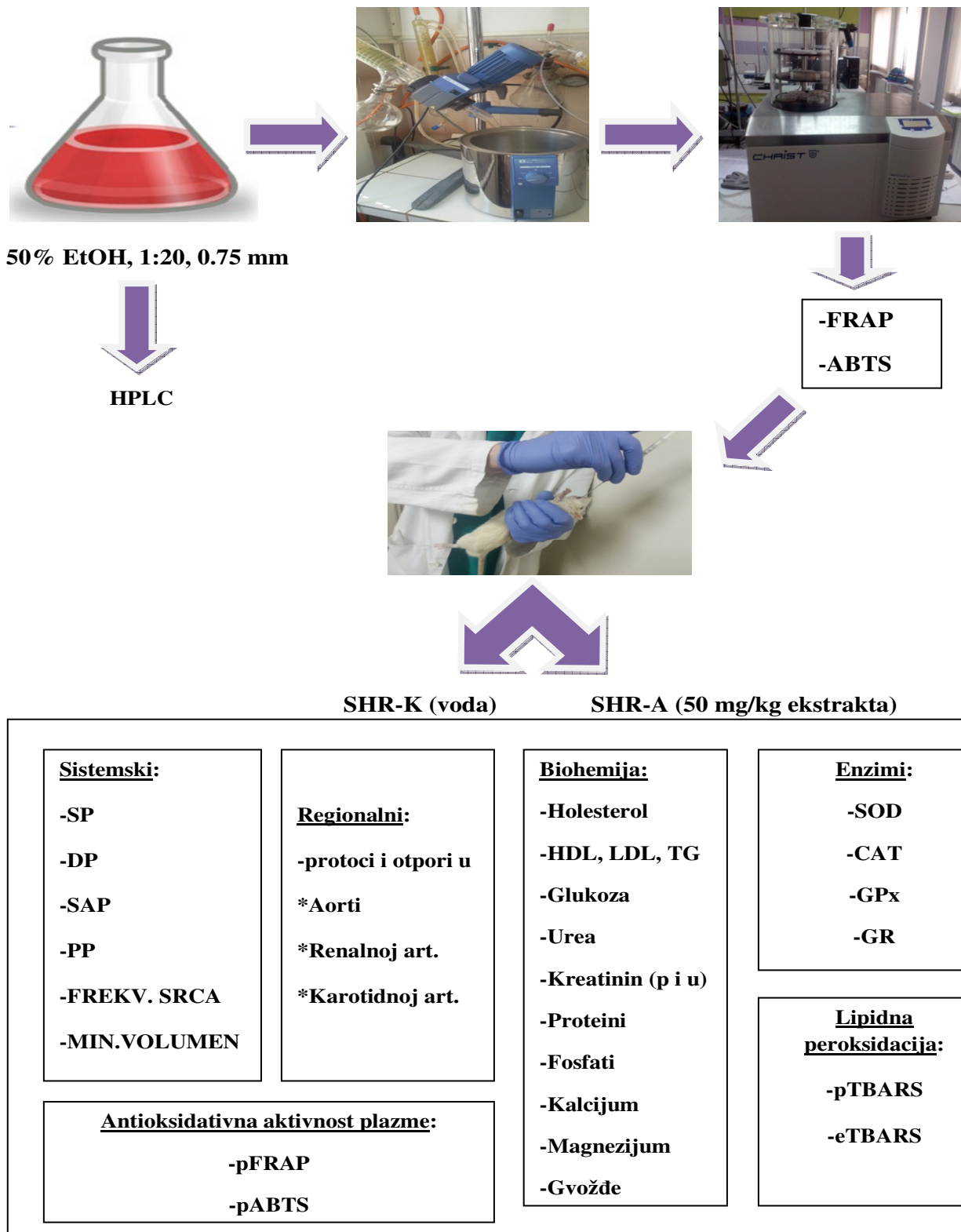
Reagensi potrebni za ovu reakciju su 0.5 M fosfatni pufer sa pH vrednošću 7.4, 0.5 mM EDTA; 2 mM GSSG (Sigma, Chemicals), 0.1 mM NADPH. U spektrofotometrijsku kivetu sipalo se 0.6 ml fosfatnog pufera, 0.1 ml GSSG, 0.1 ml uzorka i vode do 3 ml (2 ml). Reakcija otpočinje dodatkom 0.1 ml NADPH. Optimalna temperatura reakcije bila je 37°C. Pratila se promena apsorbance u toku 3 minuta, na 340 nm, a aktivnost izračunavala pomoću jednačine:

$$\text{GR} = (\Delta A - \Delta B) \times 3 \times 10^5 / 6.22 \times V \times \text{Hb}, \text{ gde je:}$$

$\Delta A$ -promena absorbance/minutu u uzorku;  $\Delta B$ -promena absorbance/minutu u kontrolnom uzorku; V-zapremina uzorka (ml); Hb-količina hemoglobina (g/100 ml); 6.22-molarna ekstincija.

Aktivnost je izražena u  $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g Hb}$ .

Prikaz *in vivo* eksperimenata na modelu eksperimentalne hipertenzije po svim fazama prikazan je na Šemi 4.



Šema 4. Prikaz *in vivo* eksperimenata na modelu eksperimentalne hipertenzije

## 4. STATISTIČKA ANALIZA

Sva merenja u okviru disertacije vršena su u tri ponavljanja. Podaci u tabelama i graficima su predstavljeni kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Za statističke analize korišćen je softver STATISTICA 7.0.

U prvoj fazi istraživanja (optimizacija ekstrakcije) ocenjeni su uticaji pojedinačnih faktora na posmatrane parametre kvaliteta ekstrakta (ukupne fenole i ukupne antocijane) putem jednofaktorske ANOVA, primenom 4 x 3 x 4 x 5 eksperimentalnog dizajna, dok su razlike između aritmetičkih sredina upoređivane Dankanovim *post-hoc* testom, na nivou statističke značajnosti od  $p < 0.05$ . Od svih posmatranih nivoa faktora za dalje uključivanje u eksperimentalni dizajn odabrana su po dva, sa najvišim vrednostima za posmatrane parametre.

U drugoj fazi istraživanja u ispitivanju optimalnih uslova ekstrakcije primenjen takođe je eksperimentalni dizajn. Po dva nivoa svakog od posmatranih faktora u eksperimentu prvo su bili uključeni u  $2^4$  faktorski dizajn, iz koga su ocenjena najznačajnija tri faktora za uključivanje u finalni  $2^3$  pun faktorski eksperimentalni dizajn. Statistička značajnost uticaja faktorana posmatrana obeležja je ocenjiva na preko vrednosti standardizovanih efekata, koje su u svojim apsolutnim vrednostima prikazivane na Pareto graficima. Takođe, za  $2^3$  faktorijalni dizajn, ispitivane su dobijene i predviđene vrednosti za svaku zavisnu promenljivu, kao i regresioni koeficijenti i interakcije među faktorima.

U fazi istraživanja vezanoj za ispitivanje optimalnih uslova mikroinkapsulacije, takođe su ocenjeni uticaji pojedinačnih faktora na posmatrane parametre i karakteristike mikročestica putem jednofaktorske ANOVA, primenom 4 x 3 faktorskog dizajna, dok su razlike između aritmetičkih sredina upoređivane Dankanovim *post-hoc* testom, na nivou statističke značajnosti od  $p < 0.05$ . Uticaj faktora na posmatrana obeležja vizuelno je predstavljen 3D grafikom površine odgovora.

U okviru faze istraživanja ispitivanja bioloških efekata ekstrakta, za obradu rezultata, koristio se jednostrani Studentov t-test (podrazumevano jednakih varijansi). Statistički značajnim su smatrane razlike aritmetičkih sredina na nivou od  $p < 0.05$ .



## **5. REZULTATI I DISKUSIJA**

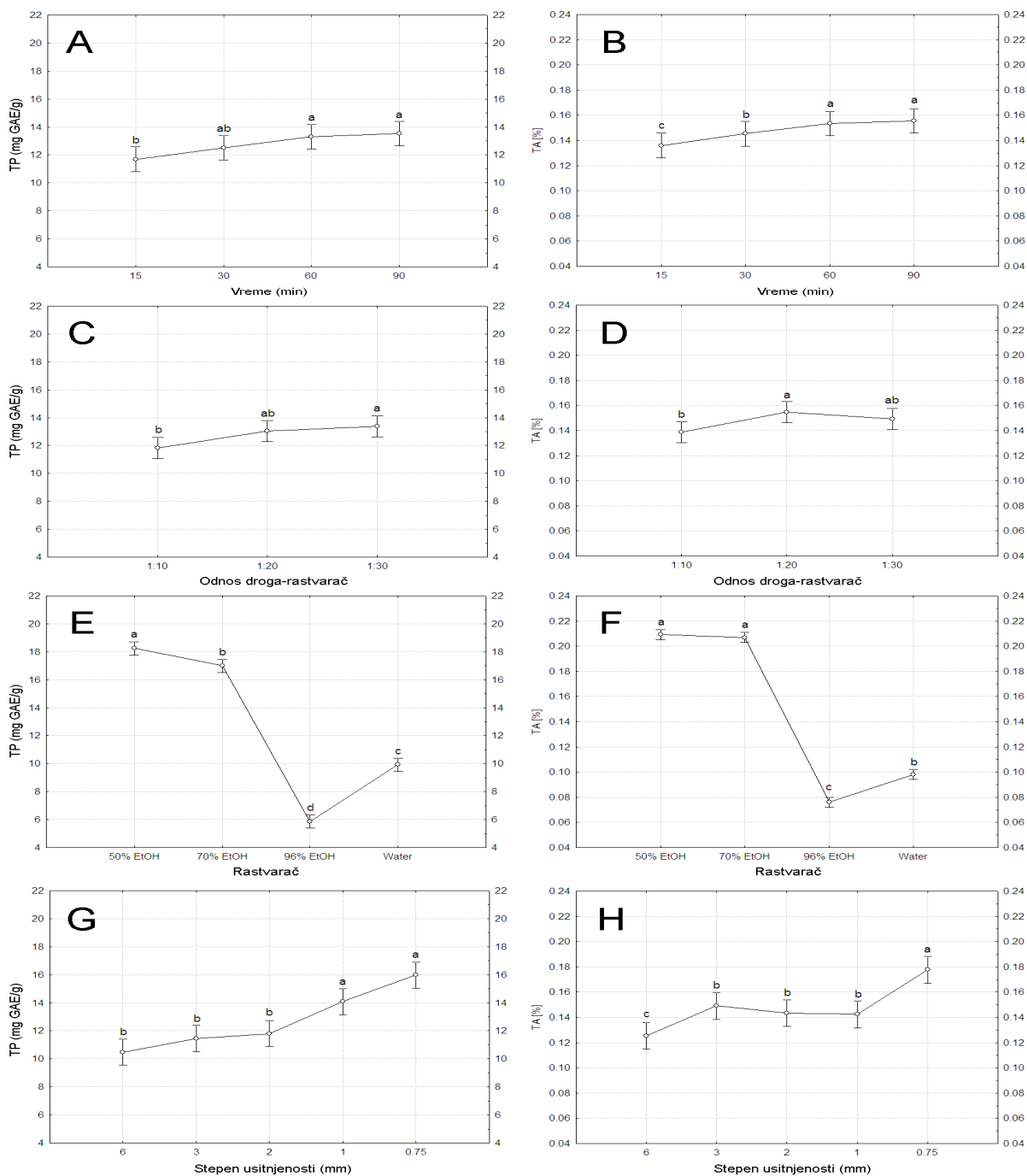
### **5.1. Optimizacija ekstrakcije ploda aronije**

#### **5.1.1. Optimalni uslovi ekstrakcije (preliminarna ispitivanja)**

Za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz suvog ploda aronije korišćena je maceracija, kao jedna od tradicionalnih metoda ekstrakcije. Efekti 4 različita ekstrakciona parametra su ispitivani u cilju optimizacije eksperimentalnih uslova maceracije. Kao nezavisne promenljive odabrani su različiti tipovi rastvarača (50 %, 70 %, 96 % etanol i voda), odnos droga-rastvarač (1:10, 1:20, 1:30), vreme ekstrakcije (15, 30, 60, 90 minuta) i stepen usitnjenosti (6, 3, 2, 1, 0.75).

Da bi se odredio optimalni nivo svakog ispitivanog faktora na ekstrakciju ukupnih fenola (TP) i ukupnih antocijana (TA), najpre je izvršen preliminarni presek uz pomoć 4 x 3 x 4 x 5 faktorijalnog dizajna. Preliminarna ispitivanja su imala za cilj da izaberu po dva najuticajnija nivoa svakog ispitivanog faktora koji imaju značajan uticaj na ekstrakciju ukupnih fenola i antocijana, a koji su dalje uključeni u drugi faktorijalni dizajn (Slika 22).

Rezultati uticaja svih ispitivanih faktora na prinos ekstrahovanih ukupnih fenola (TP) i ukupnih antocijana (TA) su dati u Prilogu 1.



Slika 22. Preliminarana ispitivanja uticaja pojedinačnih faktora na sadržaj ukupnih fenola (TP) i ukupnih antocijana (TA) tokom ekstrakcije suvog ploda aronije, gde su <sup>a,b,c,d</sup> značajne razlike među ispitivanim faktorima, zasnovane na Dankan-ovom testu, sa nivoom značajnosti  $p < 0.05$ .

#### 5.1.1.1. Uticaj vremena na ekstrakciju

Uticaj dužine trajanja ekstrakcije, sa 4 različita posmatrana vremena (15, 30, 60, 90 minuta) na sadržaj TP i TA prikazan je na Slikama 22 A i 22 B, respektivno.

Efikasnost ekstrakcije je porasla u oba slučaja kako se povećavala dužina trajanja ekstrakcije. Maksimalni prinos obe posmatrane zavisne promenljive, i TP i TA je postignut na 90 minuta ekstrakcije (13.3 mg GAE/g droge za TP i 0.15% TA), ali nije primećena značajna razlika između 60 i 90 minuta ekstrakcije.

Na Slici 22. se mogu zapaziti dve faze ekstrakcije, prva faza predstavlja početni porast koncentracije polifenolnih jedinjenja, a zatim sledi druga faza koja je praćena sporom fazom ekstrakcije (posle 60 minuta), koju karakteriše plato, odnosno neznatan porast ekstrahovanih polifenola produženjem ekstrakcije. Galvan D'Alessandro i sar. 2012. su ispitivali uticaj različitih faktora pri ultrazvučnoj ekstrakciji ploda aronije i pokazali su da prinos ukupnih fenola rapidno raste u prvih 15 minuta ekstrakcije, a zatim ulazi u sporu fazu tokom naredna 4h.

S obzirom da se u slučaju oba posmatrana parametra (TP i TA) maksimalan prinos ekstrahovanih jedinjenja postiže dužom ekstrakcijom (60 min i 90 min), ovi nivoi su izabrani da budu uključeni u dalji pun faktorijalni dizajn.

#### 5.1.1.2. Uticaj odnosa droga-rastvarač

Uticaj zapremine rastvarača koji se koristi za ekstrakciju, odnosno 3 različita odnosa droga-rastvarač (1:10, 1:20, 1:30) na količinu ekstrahovanih ukupnih fenola i antocijana su ispitivani i rezultati su prikazani na slikama (Slike 22 C i 22 D, respektivno).

Dobijeni rezultati su pokazali da se prinos TP povećava postepeno od odnosa 1:10 i da dostiže najveću vrednost sa odnosom 1:30 (13.4 mg GAE/g suvog ploda aronije). S druge strane, primećen je različit fenomen u prinosu TA, gde je prisutan rast poređenjem odnosa 1:10 i 1:20, a prati ga blagi pad sa odnosom 1:30. Za oba posmatrana parametra, TP i TA, sa odnosom droga-rastvarač 1:10 postignuta je znatno niža količina ekstrahovanih aktivnih principa, nego što je to postignuto sa odnosima 1:20 i 1:30. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima Galvan D'Alessandro i sar. 2012. gde je takođe pokazano

da viši odnosi droga-rastvarač dovode do većeg prinosa polifenolnih jedinjenja prilikom ekstrakcije ploda aronije ultrazvučnom ekstrakcijom (Galvan D'Alessandro i sar. 2012). S druge strane, treba napomenuti da veći odnos droga-rastvarač dovodi do smanjene potrošnje biljnog materijala i smanjenja troškova proizvodnje, što je svakako značajno sa aspekta industrijske proizvodnje ekstrakta aronije.

Pošto se sa odnosom droga-rastvarač 1:10 dobio niži prinos za oba posmatrana parametara, odnosi 1:20 i 1:30 su odabrani za dalje uključenje u 2<sup>4</sup> faktorijalni dizajn.

### 5.1.1.3. Uticaj različitih rastvarača na ekstrakciju

Da bi se ispitao uticaj različitih rastvarača na efikasnost ekstrakcije, etanol u različitim koncentracijama (50, 70 i 96%) i voda su korišćeni u ovoj fazi istraživanja (Slika 22 E i 22F). Za oba posmatrana faktora (TP i TA), najveći prinos je dobijen korišćenjem 50% etanola (18.2 mg GAE/g droge za TP i 0.21% za TA) (Slika 22 E i 22 F), ali i neznatno manji prinos ekstrakcijom sa 70% etanolom. U slučaju ekstrahovane količine TP, primećeno je statistički značajno smanjenje prinosa sa porastom koncentracije etanola od 96% (Slika 22 E). Statistički značajno niži prinosi TA takođe su dobijeni sa etanolom najviše koncentracije (96%) i vodom kao ekstragensima. Galvan D'Alessandro i sar. 2012. i Simić i sar. 2016. su takođe u svojim radovima pokazali da je upotreba etanola srednje koncentracije (50%) rezultirala višim prinosom ukupnih fenola u poređenju sa vodom ili smešom etanol/voda u drugim odnosima, u uslovima ultrazvučne i mikrotalasima potpomognute ekstrakcije, poštujući redosled.

Rezultati ranijih istraživanja su pokazala da binarni sistemi rastvarača (dvokomponentni) koji se sastoje iz vode i organskog rastvarača u kombinaciji, su superiorniji ekstragensi od monokomponentnih (čista voda ili etanol) za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja (Zhang i sar. 2007, Cacace i Mazza 2003). Voda igra važnu ulogu u bubrenju i vlaženju biljnog materijala, dok je etanol odgovoran za destrukciju veza u samom biljnom materijalu, omogućavajući bolji transfer jedinjenja koja se ekstrahuju.

Iako je prema dosadašnjim dostupnim literaturnim podacima, najčešće korišćen rastvarač za ekstrakciju antocijana iz bobičastog voća bio zakišeljani metanol, etanol je s druge strane u

industriji hrane i farmaceutskih proizvoda klasifikovan kao GRAS reagens (engl. *Generally recognized as safe*-generalno priznat kao bezdedan) i ekstragens je izbora u odnosu na metanol zbog njegove toksičnosti. U tom smislu, smeša etanol-voda je izabrana kao ekstragens i sa ekološkog i biotehnološkog aspekta.

Na osnovu svega navedenog, a i dosadašnjih literaturnih podataka, smeša vode i etanola, pokazuje sinergističko dejstvo koje omogućava bolju ekstrakciju fenolnih jedinjenja (Simić i sar. 2016; Galvan D'Alessandro i sar. 2012 i 2014; Vauchel i sar. 2015; Ramić i sar. 2015).

Uzimajući u obzir da su prinosi TP i TA dobijeni sa 50% i 70% etanolom bili znatno veći od prinosa dobijenih sa 96% etanolom i vodom, ovi nivoi su izabrani da budu uključeni u dalji faktorijalni dizajn.

#### 5.1.1.4. Uticaj stepena usitnjenosti

Uticaj veličine čestica na ekstrakciju polifenolnih jedinjenja nije mnogo proučavan do sada zbog pretpostavke da se ekstrakcijom manjih čestica dobijaju viši prinosi i smanjuje vreme trajanja ekstrakcije. Međutim, postoje literaturni podaci u kojima se navodi da upotreba suviše malih čestica prilikom ekstrakcije može omogućiti ekstrakciju balastnih materija kao što su pektini, ili s druge strane da manje čestice mogu aglomerisati čime dovode do snižavanja efikasnosti ekstrakcije, što je prikazano u slučaju ekstrakcije polifenola iz semenki grožđa i antocijana iz hibiskusa (Bucić-Kojić i sar. 2007; Cissé i sar. 2012).

Stoga, ideja je bila ispitati uticaj veličine čestica na ekstrakciju ukupnih fenola i antocijana iz suvog ploda aronije.

Efikasnost ekstrakcije u pogledu sadržaja ekstrahovanih ukupnih fenola-TP pokazala je poboljšanje smanjenjem veličine čestica odnosno povećanjem stepena usitnjenosti (Slika 22 G). Prinosi ukupnih fenola-TP koji su dobijeni ekstrakcijom iz droge stepena usitnjenosti 1 i 0.75 mm su bili statistički značajno viši (14.0 i 16.0 mg GAE/g droge, respektivno) od onih dobijenih ekstrakcijom čestica manjeg stepena usitnjenosti, 2, 3 i 6 mm (11.8, 11.4 i 10.5 mg GAE/g droge, respektivno). Sličan trend je primećen i u slučaju ekstrakcije ukupnih antocijana, gde su čestice najmanje veličine (0.75 mm) dale najveći prinos TA (0.18 %), dok su se sa česticama drugih veličina (1, 2 i 3 mm) postigli niži prinosi bez statistički značajnih

razlika među njima (Slika 22 H). Značajno niži prinos ukupnih antocijana je dobijen ekstrakcijom frakcija suvog ploda aronije veličine 6 mm (0.13 %).

Dobijeni rezultati su u skladu sa radom koji su objavili Galvan D'Alessandro i sar. 2012., a koji su pokazali da je ultrazvučna ekstrakcija iz samlevenog ploda aronije bila znatno efikasnija u odnosu na ekstrakciju kod koje je plod bio isečen na polovinu. Objašnjenje za ovaj fenomen je činjenica da čestice manjeg promera imaju veću kontaktnu površinu sa ekstragensom, što omogućava bolju difuziju rastvarača i transfer jedinjenja koja se ekstrahuju.

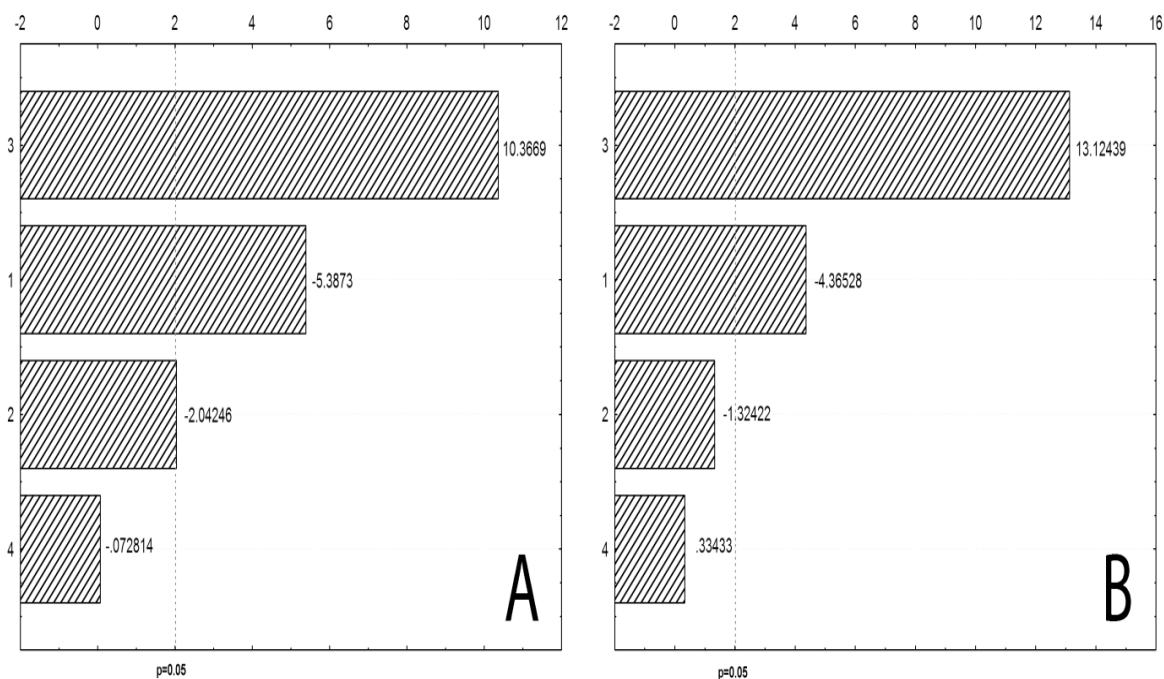
Pošto su se maksimalni prinosi i u slučaju TP i TA postigli sa česticama većeg stepena usitnjenosti, za dalji tok istraživanja odabrane su čestice stepena usitnjenosti 1 i 0.75 mm.

### **5.1.2. Pun faktorijalni dizajn u optimizaciji ekstrakcije**

U cilju dalje procene uticaja odabranih faktora na ekstrakciju tj. prinos ukupnih fenola i antocijana, kao uticaja njihovih interakcija na efikasnost ekstrakcije, primenjen je faktorijalni dizajn  $2^4$ .

Optimizacija ekstrakcije na osnovu eksperimentalnog dizajna uključuje istovremena variranja i ispitivanja svih eksperimentalnih faktora. Nivoi nezavisnih faktora ekstrakcije polifenola su odabrani na osnovu rezultata dobijenih iz preliminarnih eksperimenata, odnosno  $4 \times 3 \times 4 \times 5$  faktorijalnog dizajna i oni su dalje uključeni u  $2^4$  faktorijalni dizajn (Tabela 1). Ispitivan je uticaj 4 promenljive, a svaka od njih je bila varirana na dva nivoa (dve granične vrednosti).

Na stubičnom pareto grafiku (Slika 23) su predstavljeni faktori koji su pokazali značajan uticaj sa nivoom značajnosti  $p < 0.05$ . Horizontalni stubovi na grafiku su proporcionalni apsolutnoj vrednosti ispitivanih faktora, a vrednosti koje se nalaze sa desne strane isprekidane linije su one koje su pokazale statističku značajnost u procesu ekstrakcije.



Slika 23. Pareto dijagram ispitivanja uticaja faktora na prinos ekstrahovanih ukupnih fenola-TP (A) i ukupnih antocijana-TA (B). Faktori: 1-odnos droga-rastvarač, 2-tip rastvarača, 3-stepen usitnjenosti, 4-vreme ekstrakcije

Sa grafika se vidi da su stepen usitnjenosti (Faktor 3) i odnos droga-rastvarač (Faktor 1) najznačajniji faktori koji su uticali na prinos kako ukupnih polifenola tako i ukupnih antocijana (Slika 23). Cacace i Mazza, 2003. su takođe došli do sličnih rezultata. U njihovoj studiji, koncentracija etanola i odnos droga-rastvarač su imali značajnu ulogu u ekstrakciji ukupnih fenola iz crne ribizle, dok je glavni faktor koji je uticao na ekstrakciju antocijana bio upravo odnos droga-rastvarač.

U našem istraživanju, vreme trajanja ekstrakcije (Faktor 4) se pokazao kao najmanje važan pojedinačni faktor koji ima uticaj na prinos ekstrahovanih TP i TA.

Stoga, ovaj faktor je u daljem toku istraživanja isključen i optimalno vreme ekstrakcija je fiksirano na 60 minuta, s obzirom da duže vreme ekstrakcije nije pokazalo statistički značajne efekte na prinos ukupnih fenola i antocijana.

Nakon odabranih najznačajnijih faktora koji utiču na proces ekstrakcije suvog ploda aronije, prešlo se na  $2^3$  faktorijalni dizajn.

$2^3$  pun faktorijalni dizajn je rađen sa ciljem da bi se dodatno ispitao uticaj najznačajnijih faktora na ekstrakciju ukupnih fenola i antocijana TP i TA (Tabela 3), a to su: odnos droga-rastvarač, vrsta rastvarača i stepen usitnjenosti, kao i da se odrede optimalne vrednosti. Ovaj metod optimizacije ekstrakcije takođe omogućava procenu mogućih interakcija između faktora.

Glavni efekti koji utiču na ekstrakciju, interakcije među faktorima, koeficijenti modela i verovatnoće za  $2^3$  faktorijalni dizajn prikazani su u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Eksperimentalni dizajn  $2^3$  za ispitivanje faktora koji utiču na ekstrakciju ukupnih fenola (TP) i ukupnih antocijana (TA), sa eksperimentalno dobijenim i predviđenim vrednostima

Odnos droga      Rastvarač      Sito rastvarač      (%)      (mm)			Ukupni polifenoli (mg GAE/g droge)		Ukupni antocijani (%)	
			Eksperimentalno dobijene vrednosti	Predviđene vrednosti	Eksperimentalno dobijene vrednosti	Predviđene vrednosti
1:20 (-1)	50% (-1)	1.00 (-1)	21.31	21.41	0.208	0.208
<b>1:20 (-1)</b>	<b>50% (-1)</b>	<b>0.75 (+1)</b>	<b>27.82</b>	<b>27.72</b>	<b>0.273</b>	<b>0.272</b>
1:20 (-1)	70% (+1)	1.00 (-1)	21.85	21.74	0.210	0.210
1:20 (-1)	70% (+1)	0.75 (+1)	26.30	26.41	0.258	0.259
1:30 (+1)	50% (-1)	1.00 (-1)	20.37	20.27	0.203	0.202
1:30 (+1)	50% (-1)	0.75 (+1)	24.79	24.89	0.244	0.245
1:30 (+1)	70% (+1)	1.00 (-1)	19.64	19.75	0.205	0.206
1:30 (+1)	70% (+1)	0.75 (+1)	22.83	22.73	0.235	0.234

\* vrednosti (nivoi) nezavisno promenljivih prikazani su realnim i kodiranim vrednostima



Eksperimentalno dobijene i predviđene vrednosti sadržaja ukupnih fenola i ukupnih antocijana dobijenih pomoću faktorijalnog dizajna prikazane su u Tabeli 3.

Najveći prinos za oba posmatrana faktora, TP i TA (27.82 mg GAE/g droge i 0.273%, poštujući redosled) dobijen je pod sledećim ekstrakcionim uslovima, korišćenjem 50% etanola kao rastvarača, odnosom droga-rastvarač 1:20 i stepenom usitnjenosti droge 0.75 mm.

Najniži sadržaj ekstrahovanih ukupnih fenola (19.64 mg GAE/g droge) dobijen je sa 70% etanolom kao rastvaračem, odnosom droga-rastvarač 1:30 i stepenom usitnjenosti čestica od 1 mm, dok je najmanji prinos antocijana dobijen ekstrakcijom u kombinaciji faktora, 50% etanolom kao rastvaračem, 1:30 odnosom droga-rastvarač i veličinom čestica od 1 mm (0.203 %).

Iz Tabele 3. se vidi da postoji korelacija između eksperimentalno dobijenih i predviđenih (teorijskih) vrednosti za TP i TA. Faktorijalni dizajn je predvideo maksimalnu ekstrakciju i TP i TA (27.72 mg GAE/g droge i 0.272%, respektivno) u istoj kombinaciji faktora (50% etanol, 1:20 odnos droga-rastvarač i stepen usitnjenosti 0.75 mm).

Dobra korelacija između eksperimentalno dobijenih i predviđenih rezultata je potvrdila da je faktorijalni dizajn bio adekvatan metod za ispitivanje optimizacije ekstrakcije.

Iz Tabele 4. se vidi da je stepen usitnjenosti ploda aronije najvažniji faktor koji utiče na količinu ekstrahovanih ukupnih fenola.

**Tabela 4.** Statistička analiza optimizacije ekstrakcije upotrebom 2<sup>3</sup> faktorijalnog dizajna

	Efekti	Standarna greška	Procene	Koeficijent	Koeficijent standardne greške	<i>p</i>
<b>Ukupni fenoli</b>				23.115	0.259	0.000
<u>Glavni faktori</u>						
Odnos droga-rastv. (1)	-2.797	0.517	-5.404	-1.398	0.259	<b>0.000</b>
Rastvarač (2)	-0.988	0.517	-1.909	-0.494	0.259	<b>0.073</b>
Sito (3)	4.320	0.517	8.346	2.160	0.259	<b>0.000</b>
<u>Interakcije 2 faktora</u>						
1 i 2	0.308	0.517	0.595	0.154	0.259	0.560
1 i 3	-0.792	0.517	-1.531	-0.396	0.259	0.144
2 i 3	-0.268	0.517	-0.517	-0.134	0.259	0.611
<b>Ukupni antocijani</b>				0.230	0.001	0.000
<u>Glavni faktori</u>						
Odnos droga-rastv. (1)	-0.015	0.003	-5.125	-0.008	0.001	<b>0.000</b>
Rastvarač (2)	-0.005	0.003	-1.555	-0.002	0.001	0.128
Sito (3)	-0.046	0.003	-15.408	-0.023	0.001	<b>0.000</b>
<u>Interakcije 2 faktora</u>						
1 i 2	0.001	0.003	0.462	0.001	0.001	0.646
1 i 3	0.011	0.003	3.532	0.005	0.001	<b>0.001</b>
2 i 3	0.007	0.003	2.393	0.004	0.001	<b>0.021</b>

Drugi po važnosti faktor koji utiče na dobijanje visokih prinosa ukupnih fenola je odnos droga-rastvarač (Tabela 4) čija apsolutna vrednost je bila niža od vrednosti za stepen usitnjenosti, odnosno sito.

Glavni faktor, vrsta rastvarača kao i interakcije između sva tri ispitivana faktora nisu pokazali statističku značajnost s obzirom da su pokazali nivo značajnosti  $p < 0.05$  (Tabela 4). Najveći uticaj na ukupan sadržaj ekstrahovanih antocijana, kao najznačajniji faktor pokazao se stepen usitnjenosti čestica. Odnos droga-rastvarač je takođe bio značajan faktor za dobijanje visokih prinosa antocijana, sa manjom apsolutnom vrednošću u poređenju sa ispitivanim faktorom stepenom usitnjenosti. Treći po značajnosti faktor je bila interakcija između odnosa droga-rastvarač i veličine usitnjenih čestica, koju je pratila interakcija

između vrste rastvarača i stepena usitnjenosti čestica. Tip rastvarača i interakcija između rastvarača i odnosa droga-rastvarač su se pokazali kao faktori koja nemaju statistički značaj ( $p < 0.05$ ) (Tabela 4).

### **5.1.3. HPLC karakterizacija odabranih ekstrakta**

Ekstrakti odabrani na osnovu rezultata preliminarnih ispitivanja, kao i nakon oba faktorijalna dizajna ( $2^4$  i  $2^3$ ) su dalje analizirani HPLC metodom, a sve u cilju odabira optimalnog ekstrakta sa najvećim prinosom ekstrahovanih polifenolnih jedinjenja.

Vršena je identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih antocijana i flavonoida u ekstraktima ploda aronije korišćenjem HPLC metode, a rezultati su prikazani u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Identifikacija i sadržaj pojedinačnih antocijana i flavonoida (mg/g droge) u ekstraktima aronije određenih HPLC analizom

Odnos	Sito	Rastvarač	Cij-gal	Cij-gluk	Cij-arab	Rutin	Hiperozid	Izokverc
1:20	0.75	50%	0.81 ± 0.06 a	0.14 ± 0.02 a	0.30 ± 0.01 a	0.42 ± 0.01 a	0.27 ± 0.03 a	0.15 ± 0.07 a
1:20	0.75	70%	0.85 ± 0.06 a	0.13 ± 0.01 a	0.32 ± 0.03 a	0.36 ± 0.05 d	0.25 ± 0.02 b	0.13 ± 0.05 b
1:20	1	50%	0.40 ± 0.04 d	0.08 ± 0.01 c	0.14 ± 0.01 d	0.38 ± 0.01 c	0.27 ± 0.01 a	0.14 ± 0.01 a
1:20	1	70%	0.48 ± 0.01 c	0.08 ± 0.01 c	0.17 ± 0.01 c	0.31 ± 0.01 e	0.22 ± 0.01 c	0.12 ± 0.01 b
1:30	0.75	50%	0.74 ± 0.08 b	0.13 ± 0.01 a	0.29 ± 0.01 b	0.41 ± 0.05 b	0.23 ± 0.01 c	0.12 ± 0.02 b
1:30	0.75	70%	0.71 ± 0.12 b	0.11 ± 0.01 b	0.27 ± 0.03 b	0.40 ± 0.01 b	0.22 ± 0.01 c	0.12 ± 0.01 b
1:30	1	50%	0.42 ± 0.01 d	0.07 ± 0.01 c	0.15 ± 0.01 d	0.32 ± 0.02 e	0.17 ± 0.01 d	0.10 ± 0.01 c
1:30	1	70%	0.40 ± 0.01 d	0.07 ± 0.01 c	0.14 ± 0.01 d	0.36 ± 0.01 d	0.22 ± 0.01 c	0.12 ± 0.01 b

<sup>a</sup> značajnost obeležena različitim slovima, zasnovana na Džankanovom testu,  $p < 0.05$ .

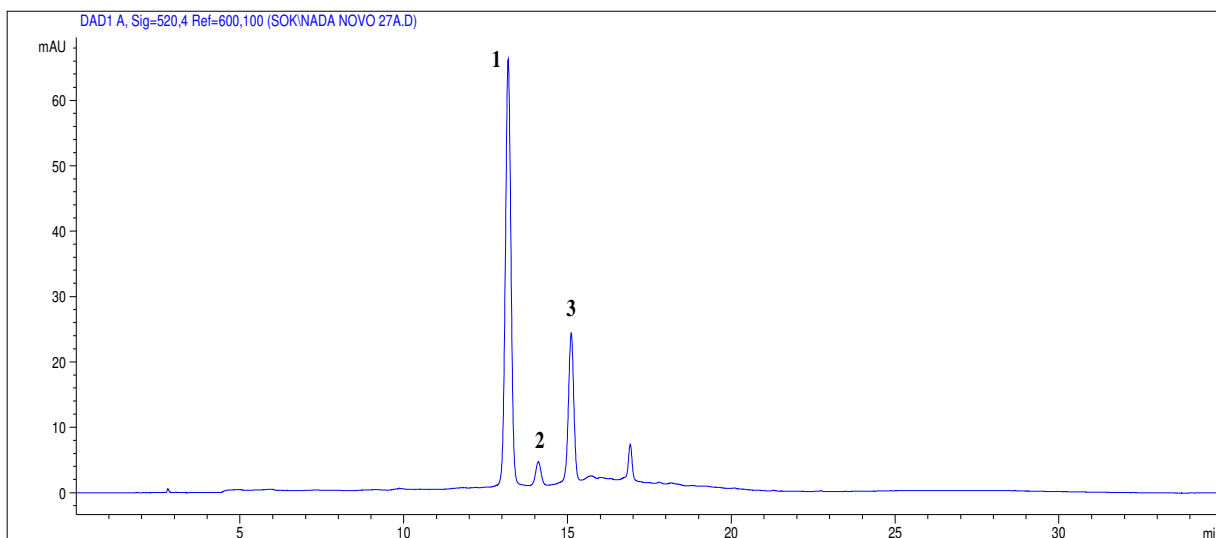
Dominantna jedinjenja antocijanskog tipa bila su: cijanidin-3-*O*-galaktozid, zatim cijanidin-3-*O*-arabinozid i cijanidin-3-*O*-glukozid. Među flavonoidima, dominantna jedinjenja bila su derivati kvercetina, kao što su kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercetin), kvercetin-3-*O*-galaktozid (hiperozid) i kvercetin-3-*O*-rutinozid (rutin).

Najveći sadržaj skoro svih pojedinačnih jedinjenja je dobijen ekstrakcijom sa 50% etanolom kao ekstragensom, odnosom droga-rastvarač 1:20 i stepenom usitnjenosti ploda aronije 0.75 mm, kao što je prethodno prikazano i u slučaju sadržaja ukupnih fenola i ukupnih antocijana. Jedino u slučaju cijanidin-3-*O*-galaktozida i cijanidin-3-*O*-arabinozida najveći prinos je ostvaren u uslovima sa 70% etanolom, odnosom droga-rastvarač 1:20 i veličinom čestica 0.75 mm.

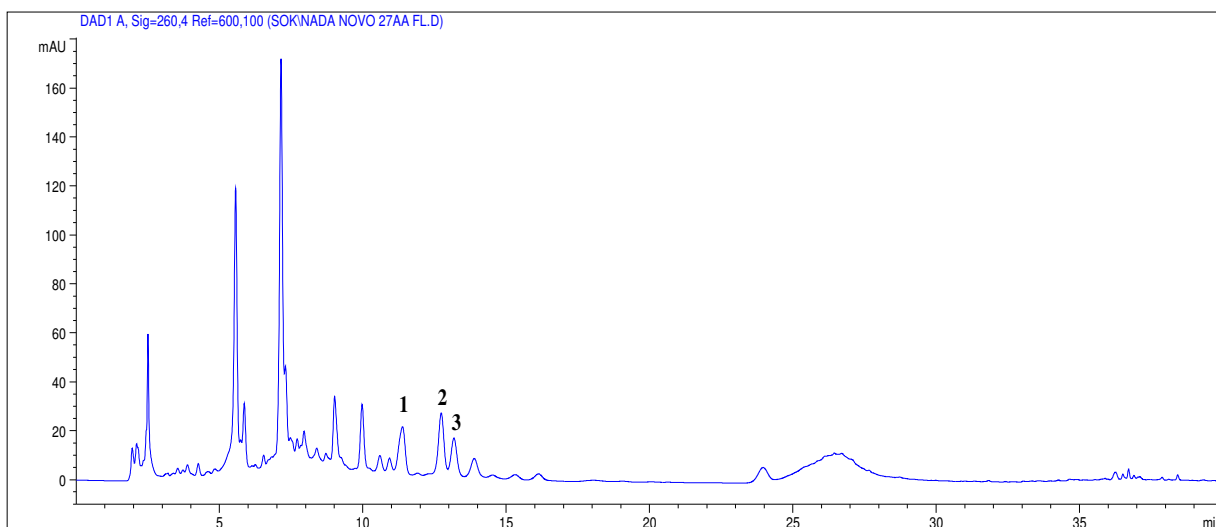
Ekstrakti dobijeni ekstrakcijom droge koja je bila usitnjena na stepen usitnjenosti 0.75 mm su sadržali veću količinu antocijana u poređenju sa ekstraktima dobijenim ekstrakcijom droge stepena usitnjenosti 1 mm. Ovaj rezultat potvrđuje već pomenuti prethodni zaključak da je stepen usitnjenosti bio najvažniji faktor koji utiče na ekstrakciju i ukupnih antocijana i ukupnih fenola.

Karakterizacija i kvantifikacija pojedinačnih antocijanskih i flavonoidnih jedinjenja urađena HPLC-DAD metodom i hromatogrami ekstrakta koji je odabran kao optimalni su prikazani na Slici 24, dok su hromatogrami svih ispitivanih ekstrakata dati u Prilogu 2.

**A**



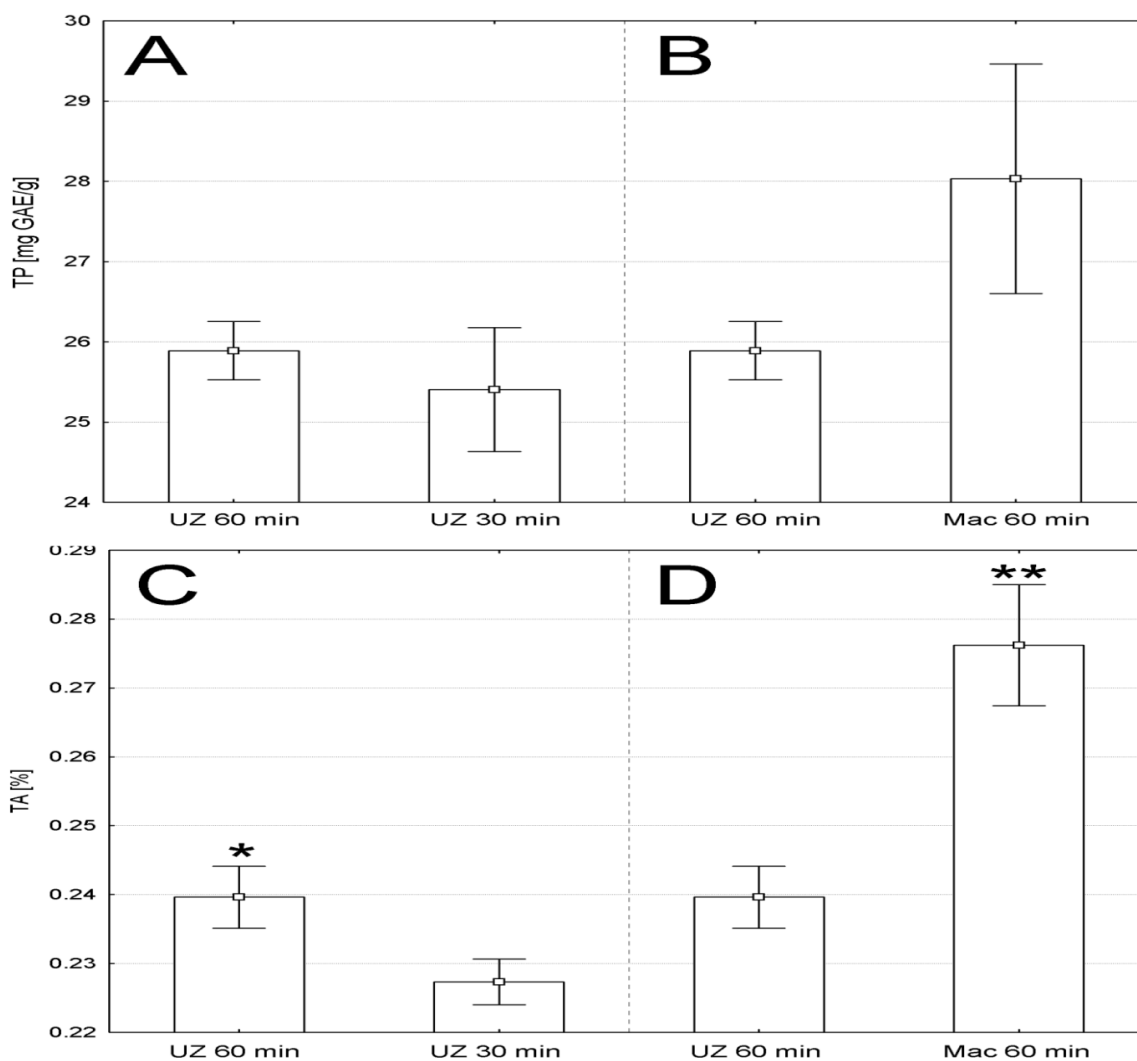
**B**



**Slika 24.** Identifikacija pojedinačnih antocijana (A) i flavonoida (B) u ekstraktu ploda aronije (50% etanol, 1:20 odnos droga-rastvarač, 0.75 mm stepen usitnjenosti) HPLC-DAD metodom. (A) (1) Cijanidin-3-*O*-galaktozid (2) Cijanidin-3-*O*-glukozid (3) Cijanidin-3-*O*-arabinozid; (B) (1) Kvercetin-3-*O*-rutinozid (rutin) (2) Kvercetin-3-*O*-galaktozid (hiperozid) (3) Kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercetin)

#### 5.1.4. Poređenje metoda ekstrakcije-maceracija i ultrazvučna ekstrakcija

U cilju procene efekta ultrazvuka na prinos ekstrahovanih ukupnih fenola i antocijana pod optimalnim uslovima koji su odabrani faktorijalnim dizajnom, ispitivana je ekstrakcija u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 30 i 60 minuta, a rezultati su prikazani na Slici 25.



Slika 25. Poređenje maceracije i ultrazvučne ekstrakcije i uticaj na prinos ukupnih fenola (TP)-A i B, ukupnih antocijana (TA)-C i D, kao i poređenje uticaja dužine ultrazvučne ekstrakcije (A i C). Značajnost je određena pomoću Studentovog t-testa, \* za  $p < 0.05$ , \*\* za  $p < 0.01$ .

Ekstrakt dobijen maceracijom sadržao je veću količinu ukupnih fenola-TP (27.6 mg GAE/g droge) nego u oba ekstrakta dobijena ultrazvučnom ekstrakcijom i na 30 i 60 minuta (25.4 i 25.9 mg GAE/g droge, poštujući redosled).

Sadržaj ukupnih antocijana-TA (Slika 25) bio je značajno viši ( $p < 0.01$ ) u ekstraktu dobijenom maceracijom (0.27%) u odnosu na ekstrakte dobijene ultrazvučnom ekstrakcijom, za oba ispitivana vremena, 30 i 60 minuta (0.23 i 0.24%, poštujući redosled).

Upoređivanjem dobijenih rezultata u slučaju ukupnih fenola, a i ukupnih antocijana, veća količina ekstrahovanih jedinjenja je dobijena maceracijom nego ultrazvučnom ekstrakcijom, za isto vreme trajanja ekstrakcije (60 minuta), iako su se očekivali suprotni rezultati, jer se ultrazvučna ekstrakcija smatra savremenijom i boljom metodom ekstrakcije. Pretpostavka za ovako dobijene rezultate to je moguća degradacija polifenolnih jedinjenja, a naročito antocijana dejstvom generatora ultrazvuka.

Svi ovi rezultati su pokazali da je maceracija metoda izbora za ekstrakciju i dobijanje većeg prinosa polifenolnih jedinjenja suvog ploda aronije, pod prethodno prikazanim odabranim eksperimentalnim uslovima.

Za potrebe daljeg toka istraživanja, izrađena je veća količina ekstrakta koji je izrađen pod prethodno opisanim optimalnim uslovima ekstrakcije (50% etanol, 1:20 odnos droga-rastvarač, stepen usitnjenosti 0.75 mm).

## **5.2. Mikroinkapsulacija ekstrakta aronije u sisteme alginat i alginat/inulin metodom elektrostatičke ekstruzije**

Optimizacijom ekstrakcije ploda aronije u prethodnoj fazi istraživanja, dobijen je ekstrakt sa najvećim sadržajem polifenolnih jedinjenja. Kako aronija pokazuje niz pozitivnih efekata na zdravlje, zbog velike količine prirodnih antioksidanasa, polifenola koje sadrži, interes za povećano korišćenje aronije, a i njenih proizvoda sve više raste poslednjih godina. Međutim, kako su polifenoli relativno nestabilna jedinjenja, a posebno antocijani, mikroinkapsulacija



predstavlja obećavajuću metodu kojom se može unaprediti stabilnost, funkcionalnost, ali i bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta aronije.

Primenom mikroinkapsulacione tehnike, elektrostatičke ekstruzije, pripremljene su čestice sa inkapsuliranim ekstraktom aronije, kao i uzorci čestica bez ekstrakta koji su služili kao kontrolni.

Dobijene čestice su dalje ispitivane i upoređivane sa stanovišta veličine, stepena inkapsulacije, oslobađanja inkapsuliranih polifenola, morfologije, kao i mogućih interakcija između nosača i inkapsuliranog ekstrakta.

## **Optimizacija mikroinkapsulacije**

### **5.2.1. Uticaj različitih eksperimentalnih faktora na veličinu čestica**

U ovoj fazi istraživanja, u cilju optimizacije mikroinkapsulacije, radi dobijanja čestica željene veličine i karakteristika (Tabela 2), varirani su i ispitivani 4 x 3 eksperimentalnim dizajnom:

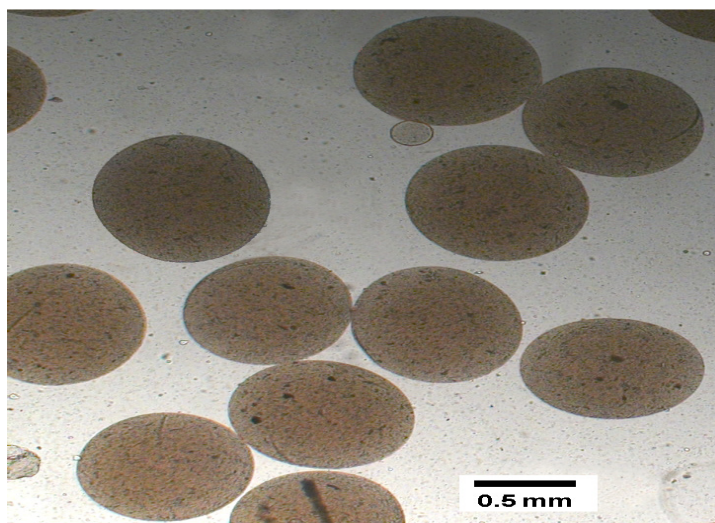
1. uticaj tri različite veličine igala (18, 20, 22)
2. uticaj viskoziteta alginata (niske i srednje viskoznosti, u koncentraciji od 1.5%)
3. uticaj dodatka inulina (u koncentraciji od 5%)

Igla 18 je imala najveći promer otvora, a za njom slede igle 20 i 22, poštujući redosled.

U zavisnosti od buduće primene i aplikacije, poželjni su različiti dijometri čestica. Veće čestice omogućavaju produženo oslobađanje inkapsuliranih polifenola, dok manje čestice imaju bolje organoleptičke karakteristike što je važno sa aspekta farmaceutske i industrije hrane (Stojanović i sar. 2012; Trifković i sar. 2014). Optimizacijom različitih procesnih parametara, kao što su jačina struje, promer igle, viskozitet rastvora polimera koji se inkapsulira, moguće je dobiti čestice uniformne veličine i željenog dijametra (Stojanović i sar. 2012; Belščak-Cvitanović i sar. 2011).

U ovom istraživanju, ispitan je uticaj dva pojedinačna faktora (veličina igle, tip nosača) na veličinu čestica. Veličina hidrogel i liofilizovanih alginatnih mikročestica je zatim ispitivana pomoću optičkog mikroskopa u cilju optimizacije veličine čestica.

Posmatranjem pod mikroskopom, zaključuje se da su čestice sferičnog oblika, što je prikazano na Slici 26. Mikročestice u koje je inkapsuliran ekstrakt aronije, a koje su dobijene elektrostatičkom ekstruzijom i posmatrane pod mikroskopom pokazali su sferičan oblik i visok uniformitet (Slika 26).



Slika 26. Mikrografija hidrogel mikročestica (igla 20, F2 formulacija) sa inkapsuliranim ekstraktom aronije, optički mikroskop,  $2.5 \times 10$  ( $500 \mu\text{m}$  bar)

Veličine dobijenih čestica izmerene su pomoću optičkog mikroskopa i prikazane u Tabeli 6, gde su prikazani rezultati za sve ispitivane formulacije (F1-F4).

**Tabla 6.** Veličina hidrogel čestica izrađenih različitim veličinama igle i alginatima različite viskoznosti, sa ili bez dodatka inulina (4 x 3 eksperimentalni dizajn)

Veličina igle	Formulacije			
	F1	F2	F3	F4
	Veličina čestica [µm]	Veličina čestica [µm]	Veličina čestica [µm]	Veličina čestica [µm]
18	1176.7±11.6 a	1267.7±30.5 a	1190.0±81.8 a	1340.0±27.8 a
20	1123.3±15.1 b	1173.3±30.6 b	1140.1±13.8 b	1226.7±24.6 b
22	800.0±10.0 c	840.0±30.0 c	898.3±36.8 c	933.3±15.2 c

<sup>a, b, c</sup> statistička značajna razlika među česticama različitih veličina, zasnovana na Dankanovom testu  $p < 0.05$

F1-alginat niske viskoznosti

F2-alginat srednje viskoznosti

F3-alginat niske viskoznosti uz dodatak inulina

F4-alginat srednje viskoznosti uz dodatak inulina

Veličina čestica se razlikovala zavisno od formulacije i bila je u opsegu od 800 µm do 1340 µm (Tabela 6).

Kao što se i očekivalo, uz pomoć igle sa najvećim dijametrom formirale su se najveće čestice a i suprotno (1176.7-1340.0 µm, 1123.3-1226.7 µm i 800.0-933.3 µm, za igle 18, 20 i 22, respektivno), bez obzira na tip formulacije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa Aizpurua-Olaizola i sar. 2016, kod kojih su veće čestice dobijene korišćenjem igle sa većim dijametrom i obrnuto. Korišćenjem igala većeg i manjeg dijametra, veličine 150 i 300 µm, dobijene su dve različite veličine čestica, od 278 i 600 µm.

Iz Tabele 7. se vidi da je za ispitivani faktor-različiti nosači bilo statistički značajne razlike između F4 i F1 formulacija, ali ne i značajnih razlika između ostalih formulacija.

**Tabela 7. Uticaj sušenja na veličinu čestica\***

Formulacije	Hidrogel čestice [ $\mu\text{m}$ ]	Liofilizovane čestice [ $\mu\text{m}$ ]
F1	1123.3 $\pm$ 15.1 <sup>b</sup>	889.1 $\pm$ 22.7 <sup>b</sup>
F2	1173.3 $\pm$ 30.6 <sup>ab</sup>	894.7 $\pm$ 31.8 <sup>b</sup>
F3	1140.1 $\pm$ 13.8 <sup>ab</sup>	921.1 $\pm$ 27.6 <sup>b</sup>
F4	1226.7 $\pm$ 24.6 <sup>a</sup>	998.4 $\pm$ 38.7 <sup>a</sup>

\*Sve čestice su dobijene iglom veličine 20

<sup>a,b</sup> statistički značajna razlika obeležena različitim slovima među česticama izrađenih različitim formulacijama, zasnovano na Dankanovom testu, sa značajnošću  $p < 0.05$ .

F1-alginat niske viskoznosti

F2-alginat srednje viskoznosti

F3-alginat niske viskoznosti uz dodatak inulina

F4-alginat srednje viskoznosti uz dodatak inulina

Dodatak inulina kao punioca u rastvor alginata je uticao na veličinu čestica (Tabele 6 i 7). U formulacijama F3 i F4, uzrokovao je povećanje čestica (npr. za iglu veličine 20, sa 1123.3 na 1140.1  $\mu\text{m}$  za F1 i F3 formulacije i sa 1173.3 na 1226.7  $\mu\text{m}$  za F2 i F4 formulacije).

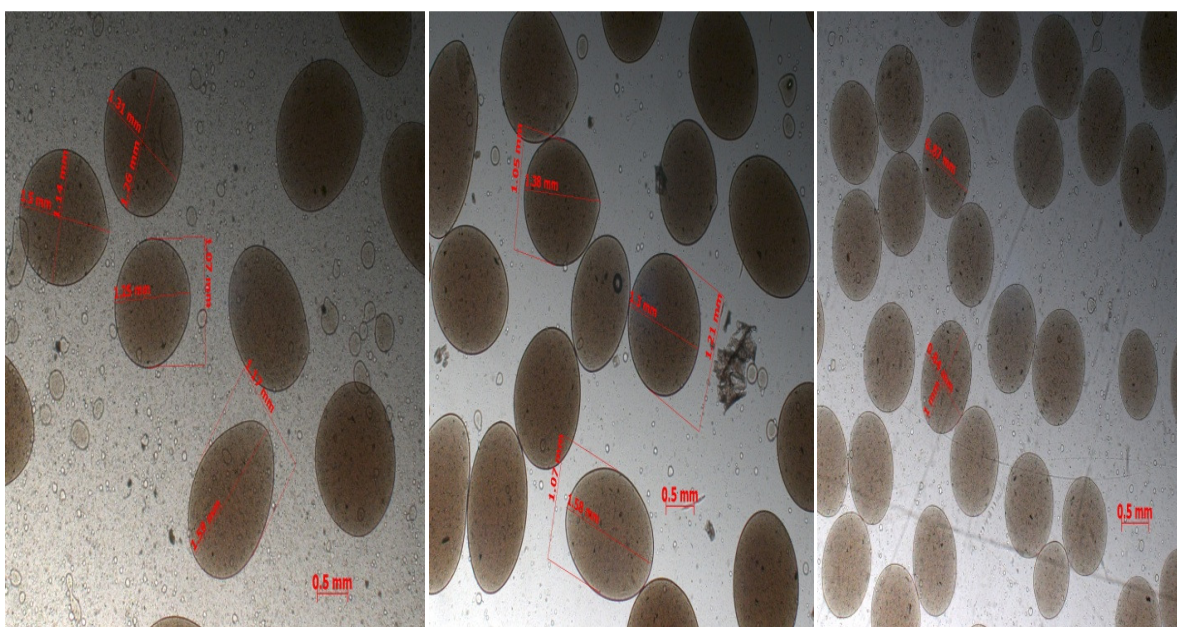
Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se najveće čestice dobijaju upotrebom alginata srednjeg viskoziteta uz dodatak inulina (F4 formulacija).

Veliki viskozitet rastvora polimera alginata i ekstrakta, čiji uzrok može biti veliko prisustvo šećera u ekstraktu aronije (ranije opisano od strane Kokotkiewicz i sar. 2010; Kulling i sar. 2008), može biti objašnjenje za dobijanje relativno velikih čestica (800.0-1340.0  $\mu\text{m}$ ), u slučaju svih formulacija. Ovako viskoznan rasvor je težak za ekstrudovanje, što je posebno bilo primećeno u slučaju F2 i F4 formulacija, gde je inulin dodatno povećao viskozitet smeše za ekstruziju.

Poredeći veličine kontrolnih F2 i F4 čestica (prazne, bez inkapsuliranog ekstrakta), 689.7  $\mu\text{m}$  i 771.03  $\mu\text{m}$ , respektivno, dobijenih pomoću igle 20, sa veličinama inkapsuliranih čestica, dobijenih iglom iste veličine i istom formulacijom, povećanje veličine čestica nakon inkapsulacije ekstrakta je bilo evidentno (Tabela 6). Stojanović i sar. 2012 su takođe dobili slične rezultate ispitivanjem alginatnih čestica, sa ili bez dodatka inulina, prilikom mikroinkapsulacije ekstrakta majčine dušice. Cordoba i sar. 2013. su dobili velike čestice (3.69-3.87 mm), inkapsuliranjem ekstrakta *Ilex paraguariensis* u alginat, takođe zbog velike

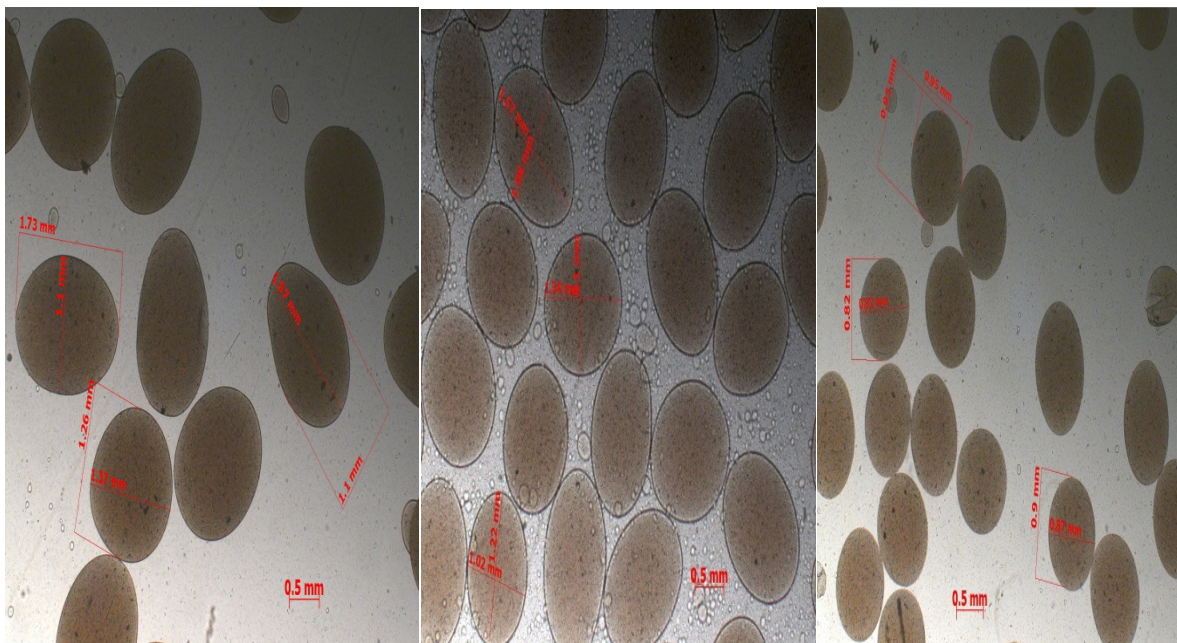
viskoznosti, dok su Chatterje i Bhattacharjee 2015. dobili čestice veličine 800  $\mu\text{m}$ , inkapsuliranjem pigmenata kore plavog patlidžana u viskozni rastvor alginata. Sanna i sar. 2015. su ispitivali optimizaciju inkapsulacije poli- $\epsilon$ -kaprolaktona u polimerne nanočestice, sa tri različite koncentracije rastvora alginata (0.1%, 0.5%, 1.0%). U njihovom slučaju povećanje koncentracije alginata dovelo je formiranja većih čestica.

Na Slikama 27. i 28. su prikazane mikrografije inkapsuliranih hidrogel mikročestica izrađenih sa F2 i F4 formulacijama pomoću sve tri veličine igala (18, 20, 22), slikane sa medijumom za čuvanje (ekstrakt), dok su na Slici 29. prikazane mikrografije hidrogel mikročestica izrađenih sa F2 formulacijom i iglom 20, a koje su slikane bez medijuma za čuvanje.

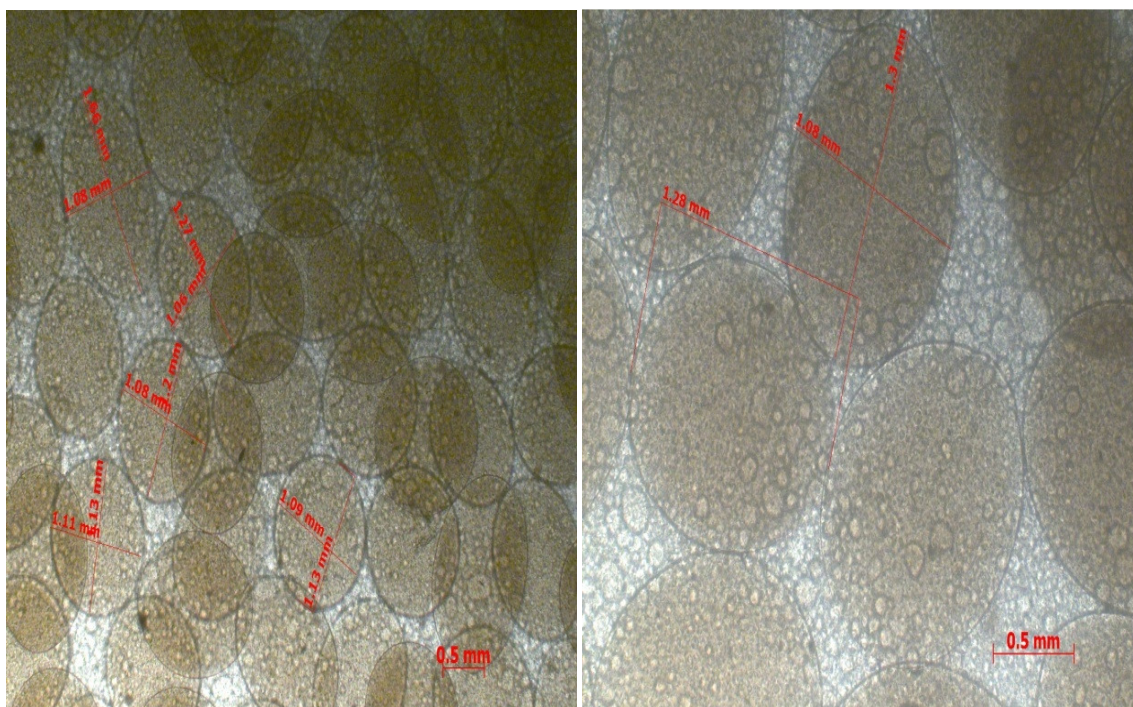


Slika 27. Mikrografije inkapsuliranih hidrogel F2 čestica (u medijumu) dobijenih iglama 18, 20, 22, uvećanje 2.5 x 10 (bar 500 $\mu\text{m}$ )





Slika 28. Mikrografije inkapsuliranih hidrogel F4 čestica (u medijumu) dobijenih iglama 18, 20, 22, uvećanje 2.5 x 10 (bar 500µm)



Slika 29. Mikrografije inkapsuliranih hidrogel F2 čestica (bez medijuma) dobijenih iglom 20, uvećanja 2.5 x 10, 5 x 10, respektivno (bar 500µm)

Posmatranjem čestica izrađenih sa formulacijom F2 i uz pomoć igle veličine 20 koje se nalaze u medijumu za čuvanje i van njega (Slika 27. i 29), jasno je vidljiva redukcija veličine čestica koje se nalaze na vazduhu u odnosu na one koje se nalaze u medijumu, što je karakteristično za alginat.

### **5.2.2. Uticaj sušenja na veličinu čestica**

Kako su osušene čestice poželjnije forme za potencijalnu aplikaciju u farmaceutskoj ili industriji hrane, u ovoj fazi istraživanja ispitivan je uticaj sušenja na veličinu mikročestica, a rezultati su prikazani u Tabeli 7.

Kao metoda sušenja odabrana je liofilizacija zbog niza prednosti. S obzirom da je jedan od ciljeva ovog istraživanja bila zaštita nestabilnih i osetljivih jedinjenja iz ekstrakta aronije, a naročito antocijana, liofilizacija je metoda izbora za sušenje. Aronija sadrži sastojke visoke vrednosti, pa je očuvanje ovih aktivnih principa od interesa (Gouin i sar. 2004).

Iako je sušenje zamrzavanjem ili liofilizacija ekonomski skup i zametan proces, ovo je pogodna metoda za sušenje u industriji, pre svega zbog mogućnosti očuvanja termolabilnih jedinjenja (antocijana u ekstraktu aronije), kao i očuvanja nutritivnih i zdravstvenih vrednosti aktivnih principa. Konvencionalne metode sušenja koje su na izgled industrijski isplativije (npr. sušenje u sušnici) obično podrazumevaju korišćenje visokih temperatura koje uzrokuju dehidraciju materijala, promene u kvalitetu i kvantitetu biološki aktivnih principa (posebno iz biljnih ekstrakata) i smanjenje njihovih bioloških aktivnosti. Takođe mogu uzrokovati i promene u vidu organoleptičkih svojstava (lepljivost, higroskopnost), aglomeraciju čestica, koje mogu ograničiti primenu u industriji hrane i farmaceutskoj industriji.

Liofilizacija nije neuobičajena metoda sušenja u industriji, jer postoje mnogi registrovani i komercijalno dostupni preparati (vaccine, antibiotici, parenteralni preparati, veterinarski i biotehnološki lekovi, dijagnostička sredstva) koji su dobijeni ovom metodom sušenja (Pržić i sar. 2004).

U ovom istraživanju, nakon liofilizacije, veličina mikročestica je redukovana za 18-24% u poređenju sa veličinom hidrogel čestica, naročito onih izrađenih sa dodatkom inulina.

Najmanja redukcija veličine čestica primećena je u slučaju čestica dobijenih sa F4 formulacijom, ukazujući na to da inulin pokazuje uticaj tokom procesa sušenja (Tabela 7). Stojanović i sar. 2012. su nakon sušenja alginatnih čestica inkapsuliranih ekstraktom majčine dušice metodom liofilizacije i nakon dehidratacije čestica, redukovali veličinu čestica za oko 40%.

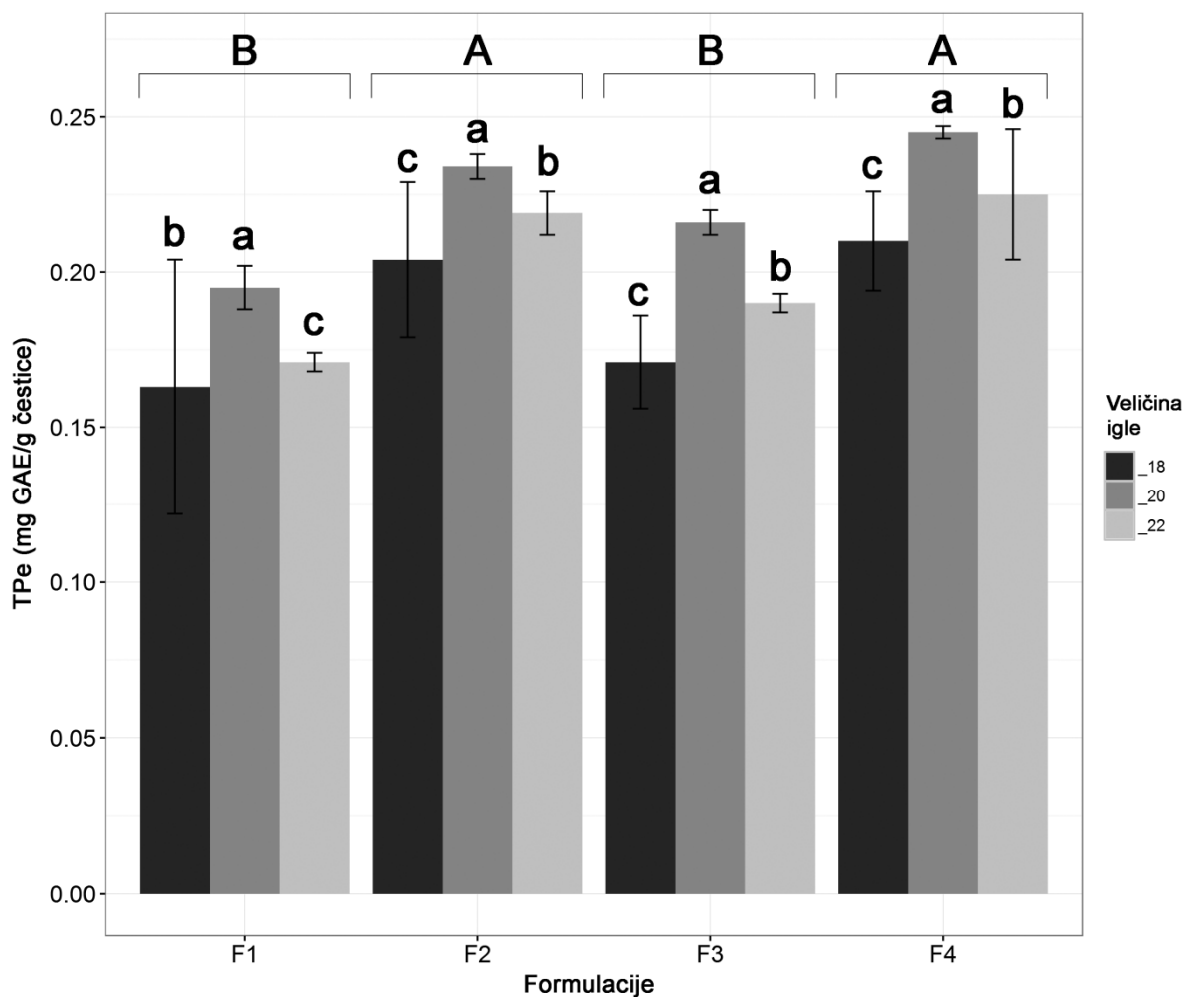
Uticaji tri različita načina sušenja (sušnica, sušenje raspršivanjem, liofilizacija) na mikroinkapsulaciju polifenola iz soka aronije objavljeni su od strane Aizpurua-Olaizola i sar. 2016. Na osnovu njihovih rezultata, najmanja redukcija polifenola je postignuta metodom sušenja zamrzavanjem, odnosno liofilizacijom.

### **5.2.3. Efikasnost inkapsulacije polifenola u sisteme alginat i alginat/inulin**

#### **5.2.3.1. Ispitivanje procesnih parametara na efikasnost inkapsulacije**

Efikasnost inkapsulacije je stvarna količina inkapsuliranih polifenola ( $TP_e$ ), a određena je na osnovu sadržaja ukupnih fenola nakon rastvaranja mikročestica u rastvoru natrijum-citrata. Razlike u količini inkapsuliranih polifenola između čestica dobijenih različitim formulacijama (F1-F4) i pomoću igala različitih promera (18, 20, 22), pomoću 4 x 3 eksperimentalnog dizajna gde su ispitivane kombinacije svih variranih faktora, prikazane su na Slici 30.





Slika 30. Bar-plotovi na kojima je prikazana efikasnost inkapsulacije polifenola ( $TP_e$ ) u F1-F4 hidrogel čestice gde su: F1-alginat niske viskoznosti; F2-alginat srednje viskoznosti; F3-alginat niske viskoznosti uz dodatak inulina; F4-alginat srednje viskoznosti uz dodatak inulina. Statistički značajne razlike obeležene su različitim slovima među česticama izrađenim različitim formulacijama (A, B, C) i česticama izrađenim različitim iglama (a, b, c), zasnovane na Dankanovom testu  $p < 0.05$ .

Ekstrakt aronije dobijen nakon optimizacije ekstrakcije i uparavanja etanola (Odeljak 3.7.1) sadržao je  $2.552 \pm 0.536$  mg GAE/ml ekstrakta.

Čestice izrađene sa alginatom srednjeg viskoziteta su imale veći stepen inkapsulacije polifenola u poređenju sa česticama izrađenim sa alginatom niskog viskoziteta za sve

testirane kombinacije veličine igala. Isailović i sar. 2013. su takođe postigli veću efikasnost inkapsulacije resveratrola sa mikročesticama izrađenim od alginata visoke ili srednje viskoznosti u sistemima alginat-lipozomi, u poređenju sa sistemima izrađenim od alginata niske viskoznosti.

Povećanje viskoznosti alginata kao nosača, dovelo je do veće efikasnosti inkapsulacije, što se objašnjava činjenicom da alginat srednje viskoznosti ima mnogo koncentrovaniju mrežu glukuronske i manuronske kiseline, manje je porozan, formira tanju membranu koja okružuje čestice, pa je mogućnost inkapsulacije polifenola veća u poređenju sa niskoviskoznim alginatom. Porozna struktura niskoviskozitnog alginata omogućava laku i slobodnu difuziju inkapsuliranih jedinjenja u rastvor za čuvanje. Primenom srednje viskoznog alginata može se sprečiti ovakav gubitak, odnosno „curenje“ aktivnih principa iz čestica (Isailović i sar. 2013).

Najbolji stepen inkapsulacije (0.24 mg GAE/g čestice) postignut je sa F4 formulacijom, korišćenjem igle 20. Veća količina polifenola inkapsulirala se u čestice izrađene sa inulinom (0.23 mg GAE/g i 0.24 mg GAE/g za F2 i F4, respektivno) nego bez dodatka inulina (0.19 mg GAE/g i 0.21 mg GAE/g za F1 i F3, respektivno) (Slika 30). Razlog ovome može biti naknadna interakcija između inulina i polifenola koji se inkapsuliraju (prikazano na FTIR, Slika 36).

Inulin kao punilac je povećao stepen inkapsulacije, što su pokazali i Balanč i sar. 2016., objasnivši da polifenoli imaju veći afinitet za alginat/inulin sistem kao nosač u poređenju sa čistim alginatom, a razlog može ležati u interakciji između polarnih delova polifenolnih grupa i hidrosilnih grupa u inulinu (Balanč i sar. 2016). Cordoba i sar. 2013. su dodatkom skroba kao punioca postigli veću efikasnost inkapsulacije u kalcijum-alginatnim mikročesticama, ali nije bila pokazana razlika u efikasnosti inkapsulacije dodatkom punioca (skroba) različitih koncentracija (1 i 2%). Stojanović i sar. 2012. su postigli značajno veću efikasnost inkapsulacije polifenola iz ekstrakta majčine dušice u alginatnim česticama sa inulinom nego bez njegovog dodatka (51-79%). Slične rezultate su objavili i Rasis i sar. 2002, prilikom proučavanja dodatka različitih punilaca u alginatne mikročestice.

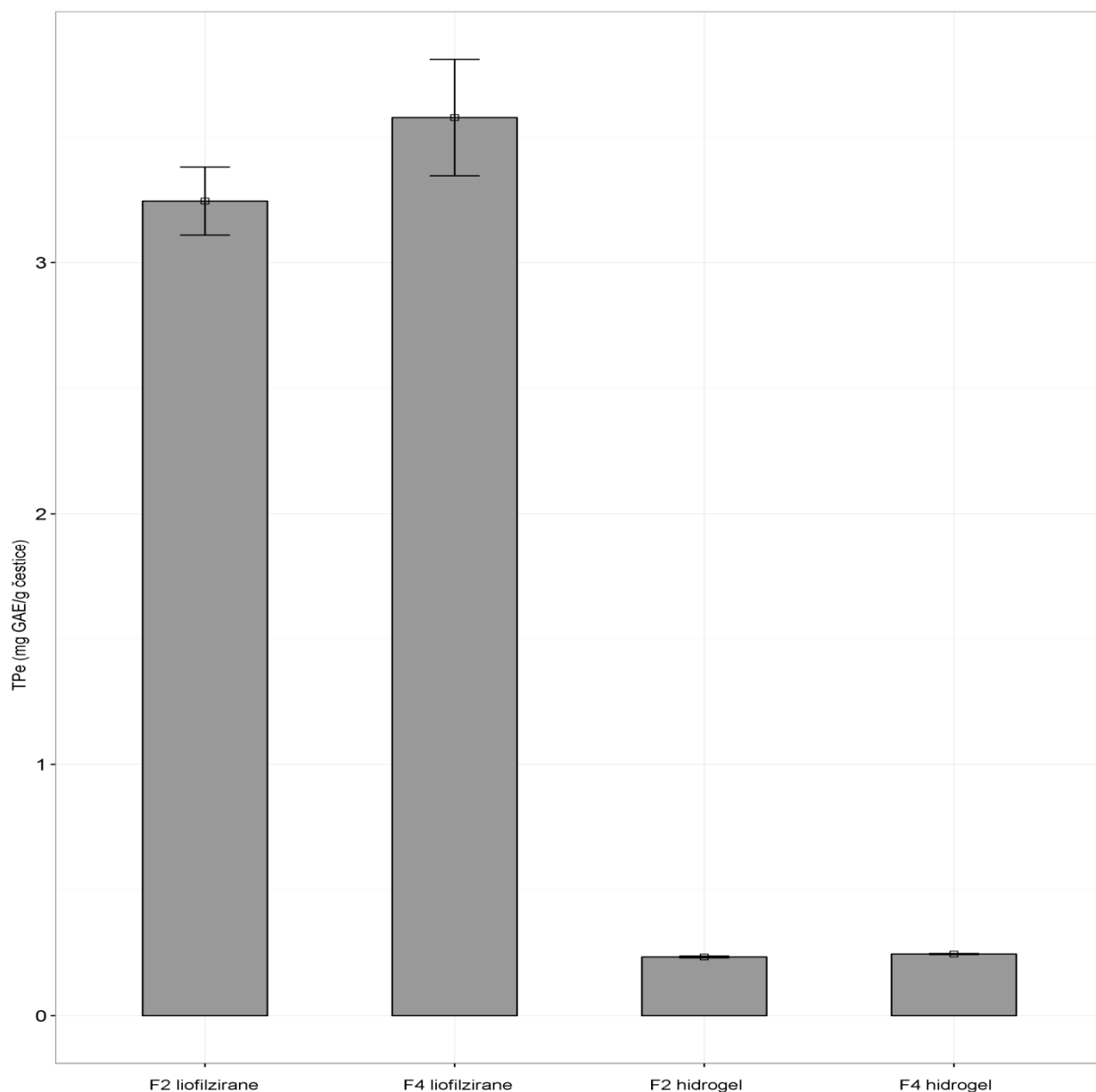
Takođe, primena različitih veličina igala je pokazala statistički značajnu razliku u stepenu inkapsulacije polifenola. Kao što se može videti sa Slike 30, najveća efikasnost inkapsulacije je postignuta upotrebom igle 20 za sve testirane kombinacije nosača.

Efikasnost inkapsulacije u mikročesticama dobijenih iglama različitih veličina, većom i manjom (150 i 300  $\mu\text{m}$ ) je bila ispitivana od strane Aizpurua-Olaizola i sar. 2016. Oni su postigli veći stepen inkapsulacije polifenola iz ekstrakta dobijenog ekstrakcijom ostataka posle ceđenja grožđa prilikom proizvodnje vina, korišćenjem igle većeg dijametra. Efikasnost inkapsulacije je bila 30% za čestice dobijene većom iglom, a 20% za čestice dobijene iglom manjeg promera. Dobijene vrednosti efikasnosti inkapsulacije su niže u odnosu na naše rezultate dobijene inkapsulacijom ekstrakta aronije (oko 37%) iako se radi o sličnom tipu inkapsuliranih polifenola. Sanna i sar. 2015. su takođe postigli efikasnost inkapsulacije oko 30% inkapsulacijom ekstrakta belog čaja u nanočestice.

#### **5.2.3.2. Uticaj sušenja zamrzavanjem (liofilizacije) na količinu inkapsuliranih polifenolnih jedinjenja**

Čestice dobijene iglom 20 su dalje bile odabrane kao optimalne i ova veličina čestica je korišćena za dalji tok eksperimenata u cilju ispitivanja uticaja sušenja liofilizacijom na stepen inkapsulacije polifenola. Takođe, za dalje ispitivanje, odabrane su F2 i F4 formulacije, koje su na osnovu rezultata u prethodnom poglavlju, pokazale najbolji stepen inkapsulacije polifenola.

Ispitan je uticaj procesa sušenja mikročestica liofilizacijom na stepen inkapsulacije u poređenju sa stepenom inkapsulacije hidrogel mikročestica istog tipa, s obzirom da su osušene forme čestice mnogo važnije sa aspekta farmaceutske i industrije hrane. Količina inkapsuliranih polifenola ( $TP_e$ ) je prikazana na Slici 31.



Slika 31. Stepen inkapsulacije polifenola aronije u hidrogel i liofilizovane F2 i F4 čestice (sve čestice su dobijene iglom 20), gde su F2-alginat srednje viskoznosti; F4-alginat srednje viskoznosti uz dodatak inulina.

Stepen inkapsulacije u česticama bio je u opsegu 0.23-3.57 mg GAE/g čestica, u zavisnosti od sadržaja vode, tipa nosača (alginat srednje viskoznosti), dodatka inulina, kao i procesa sušenja.

Hidrogel čestice su sadržale 0.23 i 0.24 mg GAE/g polifenola za F2 i F4 mikročestice, respektivno, dok su liofilizovane čestice sadržale 3.24 i 3.57 mg GAE/g čestica za F2 i F4 mikročestice, respektivno. Veća količina polifenola je inkapsulirana u čestice sa inulinom. Ovo je posebno vidljivo u slučaju liofilizovanih čestica (Slika 31). S obzirom da su do sada literaturni podaci o mikroinkapsulaciji aronije ili njenih produkata vrlo oskudni, najbližiji do sada objavljeni rezultati bili su vezani za mikroinkapsulaciju polifenola borovnice, metodom sušenja raspršivanjem (Flores i sar. 2014), gde je stepen inkapsulacije bio 0.67 mg GAE/g za arapsku gumu i 0.87 mg GAE/g za protein surutke kao nosače.

Generalno, stepen inkapsulacije zavisi od nekoliko faktora: hidrofilnosti i poroziteta polimera, mogućnosti umrežavanja (*crosslinking*), a ponekad i najvažnijeg, interakcije između polimera i komponenti iz ekstrakta (Stojanović i sar. 2012; Trifković i sar. 2014).

Mali kapacitet inkapsulacije vodeno rastvornih komponenti, kao što su polifenoli koji su dominantna jedinjenja u aroniji, može se pripisati činjenici da polifenoli mogu lako da difunduju iz čestica u rastvor za geliranje i čuvanje. Čuvanjem mikročestica u originalnom ekstraktu koji je istovremeno inkapsuliran i u same čestice, može se sprečiti gubitak odnosno „curenje“ polifenola u okolni medijum, jer je koncentracija polifenola u česticama i medijumu ista. Slična metoda je prethodno opisana od strane Istenič i sar. 2015., koji su postigli efikasnost inkapsulacije resveratrola od 24.5% u kalcijum-alginatne submikronske čestice. Oni su objasnili da je gubitak resveratrola bio posledica difuzije kroz velike specifične alginatne pore u spoljašnju uljanu fazu, koja je bila iste, lipofilne prirode kao i sam resveratrol. Neznatno veću efikasnost inkapsulacije od 42.6% u odnosu na naše istraživanje su postigli Young i Young 2015. inkapsuliranjem 70% etanolnog ekstrakta aronije u nanočestice izrađene sa lecitinom.

Prethodno objavljene studije su pokazale da proces sušenja može da utiče na kvalitativne parametre i sadržaj bioaktivnih jedinjenja inkapsuliranih u mikročestice (Kastube i sar. 2009).

Liofilizovane čestice su sadržale 14-15 puta veću količinu polifenola u poređenju sa hidrogel česticama istog tipa. Ovi rezultati pokazuju da liofilizacija u alginatnim ili alginat/inulin česticama nije dovela do degradacije inkapsuliranih polifenola.

Stojanović i sar. 2012. su takođe pokazali da je količina inkapsuliranih polifenola iz ekstrakta majčine dušice bila dvostruko veća u liofilizovanim (4.15 mg GAE/g) nego u hidrogel česticama (2.04 mg GAE/g). Aizpurua-Olaizola i sar. 2016. su ispitivali više načina sušenja i pokazali da je liofilizacija najbolje rešenje za dobijanje finih čestica, sa malim gubitkom polifenola (30%) u poređenju sa druge dve metode sušenja (sušenje u sušnici i sušenje raspršivanjem), gde je gubitak polifenola bio oko 70%, a mikročestice su ostale aglomerisane, što nije preporučljivo kod oralne primene.

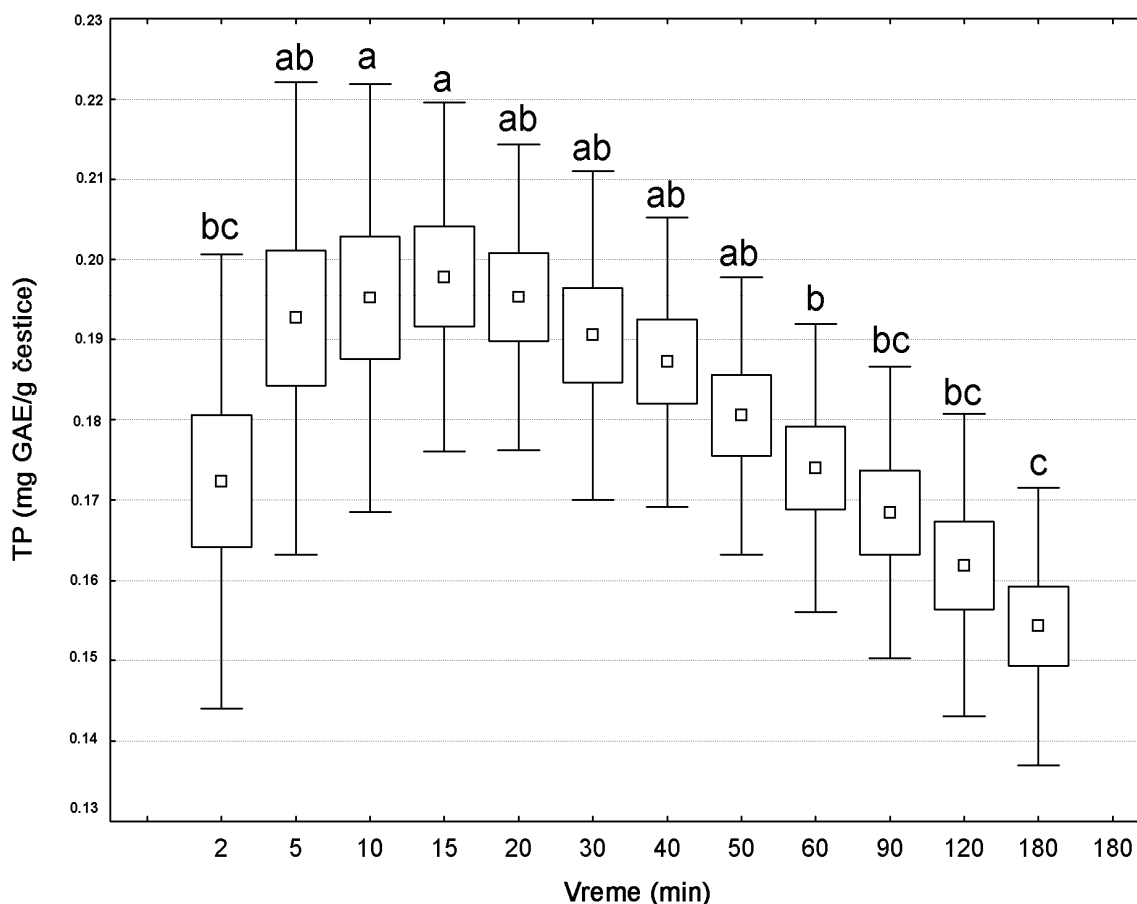
## **5.2.4. Ispitivanje oslobađanja inkapsuliranih polifenola**

### **5.2.4.1. Optimizacija eksperimentalnih uslova koji su uticali na oslobađanje polifenola**

Za preliminarna ispitivanja oslobađanja polifenola, izabrana je destilovana voda kao medijum, obzirom da se najveći broj aktivnih supstanci za oralnu upotrebu aplicira sa vodom.

Ranija istraživanja su pokazala da kinetika oslobađanja polifenola zavisi od oblika i veličine čestica, polimera za inkapsuliranje, a takođe i sadržaja inkapsuliranih aktivnih principa (Stojanović i sar. 2012; Belščak-Cvitanović i sar. 2011).

Oslobađanje polifenola iz hidrogel čestica inkapsuliranih ekstraktom aronije, kao i uticaj različitih faktora na oslobađanje (različiti tipovi nosača, sa ili bez dodatka inulina kao punioca, uticaj veličine igle), prikazano je na Slici 32. Kinetika oslobađanja polifenola praćena je tokom 180 minuta.



Slika 32. Kinetika oslobađanja inkapsuliranih polifenola (TP) iz svih tipova mikročestica (F1-F4) i svi testiranih veličina igala (18, 20, 22) prikazana kao srednje vrednosti, a varirane formulacije su: F1-alginat niske viskoznosti; F2-alginat srednje viskoznosti; F3-alginat niske viskoznosti uz dodatak inulina; F4-alginat srednje viskoznosti uz dodatak inulina.

<sup>a,b,c</sup> predstavljaju statistički značajne razlike obeležene različitim slovima u različitim vremenskim intervalima, zasnovane na Dankanovom testu  $p < 0.05$ .

Sa Slike 32. (kombinacije svih tipova nosača i igala) se vidi da postoji određeni trend u oslobađanju polifenola, što je bilo u skladu sa rezultatima drugih autora (Stojanović i sar. 2012). Oslobađanje se dešavalo u kratkom vremenskom intervalu, tj. u prvih 15 minuta, u slučaju svih čestica, što je i bilo očekivano. Ovakav rezultat potiče od velikog gradijenta koncentracije između unutrašnjosti inkapsuliranih mikročestica i okolnog medijuma za oslobađanje. Ovaj gradijent predstavlja silu koja inicira difuziju polifenola kroz alginat.

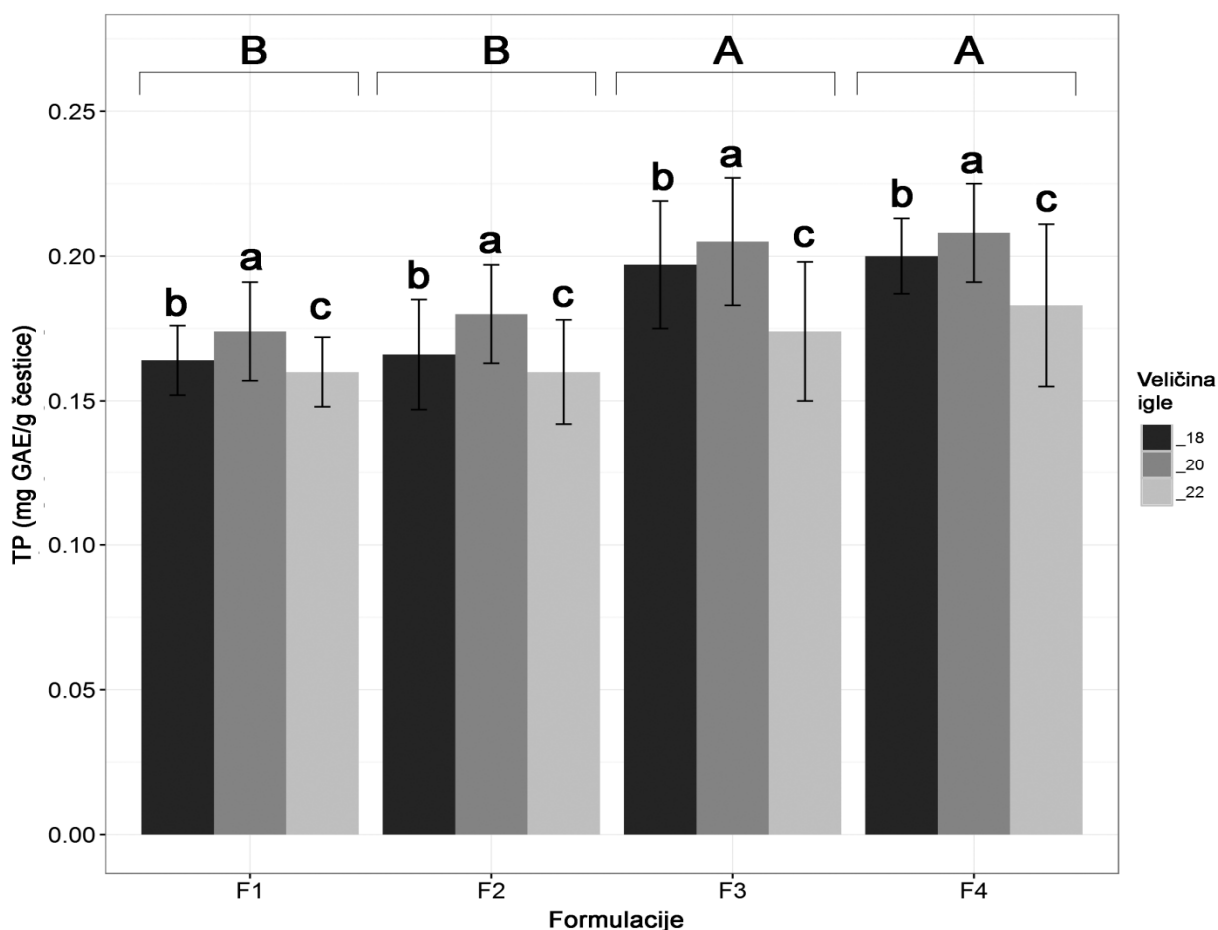
Nakon 15 minuta, koncentracija polifenola u sudu za oslobađanje postaje konstantna i polako opada, verovatno zbog zasićenja medijuma za oslobađanje.

Na osnovu dosadašnjih literaturnih podataka, indirektan uticaj različitog dijametra igle na oslobađanje inkapsuliranih jedinjenja, nije do sada ispitivan, pogotovo u slučaju mikroinkapsulacije ekstrakta aronije. Različitim dijametrima igle dobijaju se mikročestice različitih veličina iz kojih se oslobađaju polifenoli u različitoj količini.

Najbolji rezultati su postignuti sa veličinom igle 20 (0.17, 0.18, 0.20 i 0.21 mg GAE/g čestica za F1, F2, F3, F4 formulacije, respektivno) (Slika 33). Najmanje polifenola se oslobodilo iz čestica najmanjeg promera dobijenih sa iglom 22 (0.16, 0.16, 0.17 i 0.18 mg GAE/g čestica za F1, F2, F3, F4 formulacije, respektivno). Alsberg i sar. 2003 su pokazali da veće čestice obezbeđuju sporije oslobađanje, što je poželjno u slučaju kada se želi postići produženo oslobađanje.

Takođe je ispitivan uticaj različitih tipova nosača (4 formulacije) na oslobađanje polifenola iz mikročestica (Slika 33).

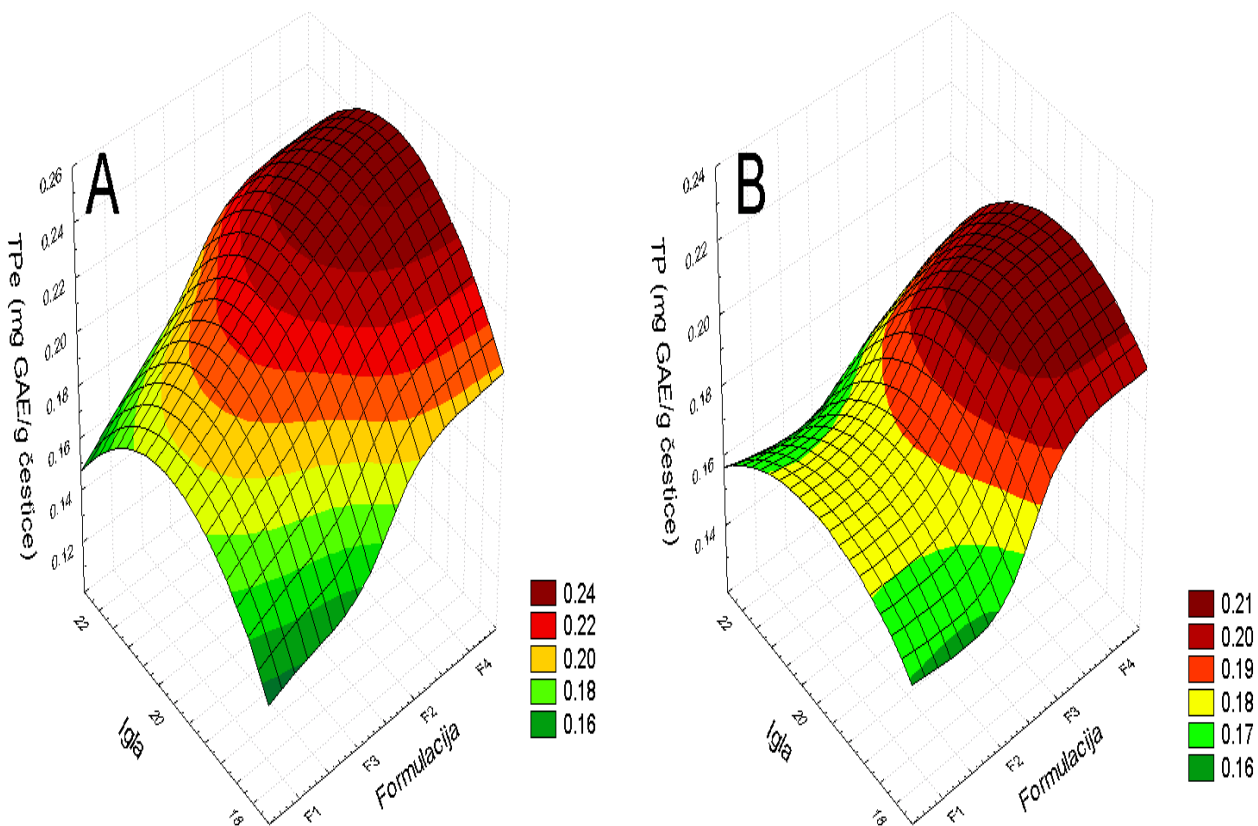




Slika 33. Ispitivanje uticaja tipova nosača (F1-alginat niske viskoznosti; F2-alginat srednje viskoznosti; F3-alginat niske viskoznosti uz dodatak inulina; F4-alginat srednje viskoznosti uz dodatak inulina) i veličine igala na oslobađanje polifenola iz mikročestice (bar plot). Statistički značajne razlike obeležene su različitim slovima među česticama izrađenim različitim formulacijama (A, B, C) i česticama izrađenim različitim iglama (a, b, c), zasnovane na Dankanovom testu  $p < 0.05$ .

Iz čestica dobijenih sa F3 i F4 formulacijama se oslobodila veća količina polifenola nego iz F1 i F2 mikročestice. Statistički značajne razlike nisu primećene među formulacijama koje su sadržale čist alginat kao nosač (F1 i F2 formulacije) i kombinaciju alginat/inulin (F3 i F4 formulacije). Alginat niske viskoznosti se pokazao kao pogodan nosač kada je cilj obezbediti brzo oslobađanje veće količine polifenola, a alginati srednjeg viskoziteta su poželjni u slučaju produženog oslobađanja (Aizpurua-Olaizola i sar. 2016).

Dobijeni eksperimentalni podaci su upotrebljeni za konstrukciju modela površine odgovora (engl. *Response surface quadratic model-RSM*) (Slika 34), ilustrujući time uticaj kategoričkih promenljivih (veličina igle, tip nosača) na oslobađanje polifenola. Primenom modela predloženi su uslovi koji bi obezbedili najveću količinu polifenola tokom oslobađanja.



Slika 34. Model površine odgovora-RSM uticaja varirajućih faktora na A) stepen inkapsuliranja polifenola B) oslobađanje polifenola iz hidrogel čestice, gde su mikročestice izrađene: F1-alginatom niske viskoznosti; F2-alginatom srednje viskoznosti; F3-alginatom niske viskoznosti uz dodatak inulina; F4-alginatom srednje viskoznosti uz dodatak inulina.

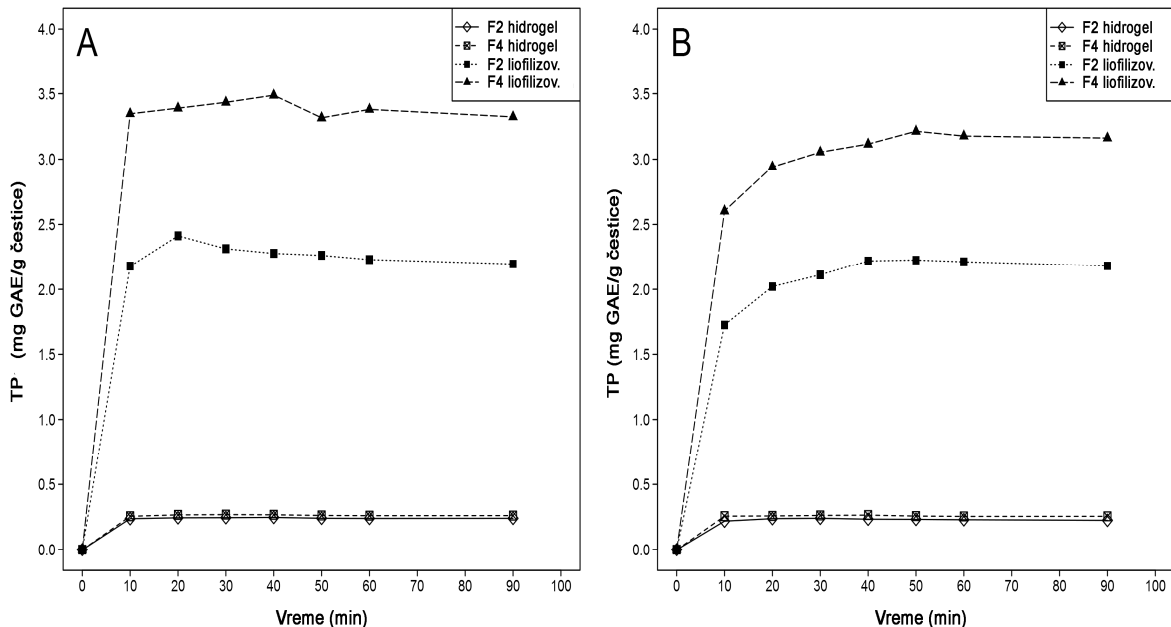
Pokazano je da se najveća količina polifenola oslobodila iz mikročestica F4 formulacije (alginat srednjeg viskoziteta uz dodatak inulina), dobijenih iglom veličine 20. Za razliku od

naših rezultata, Stojanović i sar. 2012. nisu dobili poboljšano oslobađanje polifenola dodatak inulina u formulaciju.

RSM model je korišćen i u analizi količine inkapsuliranih polifenola. Pokazano je da čestice F4 formulacije, dobijene iglom veličine 20 imaju najveći stepen inkapsuliranih polifenola, što je u saglasnosti sa činjenicom da one pokazuju i najveći stepen oslobađanja polifenola (Slika 34). Sve površine i konture (plotovi) su pokazale linearnu vezu između testiranih nezavisnih promenljivih (tip nosača, veličina igle).

#### 5.2.4.2. Uticaj sušenja i različitih pH vrednosti medijuma na oslobađanje polifenola iz mikročestica

F2 i F4 hidrogel i liofilizovane čestice, dobijene iglom veličine 20, iz kojih se postiglo najveće oslobađanje polifenola, odabrane su za dalja ispitivanja uticaja različitih pH vrednosti medijuma na oslobađanje inkapsuliranih polifenola, što je prikazano na Slici 35.



Slika 35. Kinetika oslobađanja polifenola aronije iz hidrogel i liofilizovanih mikročestica u A) vodi B) u zakišljenom medijumu gde su F2-mikročestice izrađene sa alginatom srednje viskoznosti, a F4-mikročestice izrađene sa alginatom srednje viskoznosti uz dodatak inulina.

U destilovanoj vodi kao medijumu za oslobađanje (pH 7.1) (Slika 35), nije bilo statistički značajne razlike u količini oslobođenih polifenola između F2 (0.24 mg GAE/g) i F4 (0.26 mg GAE/g) hidrogel čestica. Maksimalni plato oslobađanja je postignut nakon 10 minuta, što je u saglasnosti sa kinetikom oslobađanja koje su objavljene u prethodnim studijama (Istenič i sar. 2015; Stojanović i sar. 2012; Chatterje i Bhattacharjee, 2015).

U slučaju čestica osušenih liofilizacijom, primećena je statistički značajna razlika u oslobađanju polifenola između F2 (2.19 mg GAE/g) i F4 (3.32 mg GAE/g) mikročestica sa maksimalno dostignutim platom oslobađanja između 10 i 20 minuta.

Kao što se i očekivalo, ukupna količina polifenola koja se oslobodila iz čestica osušenih liofilizacijom je bila 10-13 puta veća u poređenju sa oslobađanjem polifenola iz hidrogel čestica. Varijacije u oslobađanju polifenola su bile veoma male u vremenskom intervalu između 10 i 90 minuta. Slični trendovi u oslobađanju polifenola su dobijeni u zakišeljnom medijumu za oslobađanje (pH 2.2), sa F2 (0.22 mg GAE/g) i F4 (0.25 mg GAE/g) hidrogel mikročesticama, a maksimalni plato oslobađanja je postignut nakon 10 minuta (Slika 35).

U slučaju liofilizovanih čestica, bilo je statistički značajne razlike u oslobađanju polifenola između F2 (2.18 mg GAE/g) i F4 (3.16 mg GAE/g) čestica. Slično kao u vodi, oslobađanje polifenola iz liofilizovanih čestica je bilo 9-12 puta veće u poređenju sa oslobađanjem iz hidrogel čestica.

Sa liofilizovanim česticama je postignuto produženo oslobađanje polifenola na 40 minuta u slučaju F2 i F4 formulacija.

Poredeći rezultate oslobađanja polifenola iz alginatnih i alginat/inulin mikročestica u vodi i medijumu sa kiselom reakcijom (Slika 35), otpuštanje polifenola je bilo veće u vodi, ali nije pokazalo statističku značajnost. Ipak, bolje oslobađanje polifenolnih jedinjenja u vodi kao medijumu je važno sa stanovišta apsorpcije i bioraspoloživosti u ljudskom organizmu, ukazujući na to će se mikroinkapsulirani polifenoli aronije lakše apsorbovati u alkalnijem intestinalnom fluidu (sredini) nego u želudačnom soku. Ovo je posebno važno uzimajući u obzir da su Stanisavljević i sar. 2015. pokazali redukciju ukupnih fenola, antocijana, kao i proantocijanidina iz soka aronije tokom simulirane gastro-intestinalne digestije, iako je digestiran sok zadržao antioksidativni i antiproliferativni potencijal u određenoj meri.

Poznato je da su antocijani kao dominantna polifenolna jedinjenja aronije najstabilniji u formi flavijum jona u kiseloj sredini, kao i da najveći prinos ekstrakcije postižu sa rastvaračima niske pH vrednosti, međutim drugačiji rezultati se dobijaju kada se antocijani i polifenoli aronije oslobađaju iz inkapsuliranih alginatnih čestica.

Alginat ima osobinu pH zavisnog i kontrolisanog otpuštanja (Chang i sar. 2015). Objašnjenje za ovo ponašanje verovatno potiče od destrukcije alginatnih hidrogel čestica u zakišljenom medijumu i bubrenju u neutralnoj i baznoj sredini, verovatno zbog prisustva jedinica D-manuronske i L-glukuronske kiseline. Veliki broj karboksilnih grupa iz ovih kiselina je protonovan u kiseloj sredini, dok su u baznoj sredini karboksilne grupe u jonizovanom stanju. Jonizovane karboksilne grupe se odbijaju, što dovodi do bubrenja alginatnih mikročestica, čime se postiže maksimum apsorpcije vode u same mikročestice i s druge strane oslobađanje inkapsuliranih polifenola.

Cordoba i sar. 2013. su takođe pokazali redukciju inicijalne veličine alginatnih hidrogel čestica tokom simuliranih gastričnih uslova. Abd El-Ghaffar i sar. 2012. su dobili slične rezultate sa alginatnim česticama inkapsuliranih riboflavinom, koje su redukovale veličinu i smežurale se pri niskim pH vrednostima.

Ove karakteristike alginatnih čestica da su osetljive na promene pH vrednosti, čine ih obećavajućim nosačima za kontrolisano otpuštanje. Leick i sar. 2011. su pokazali da su antocijani pozitivno naelektrisani na pH 3, ali da je s druge strane alginat negativno naelektrisan zbog prisustva jonizovanih karboksilnih grupa, koje se nalaze u obliku anjona. Sve ovo može biti razlog boljeg oslobađanja polifenolnih jedinjenja u vodenom medijumu u odnosu na zakišljeni.

Primećeno je da su čak i posle 18 h ispitivanja oslobađanja, čestice i dalje ostale crvene boje zbog prisustva i dalje inkapsuliranih polifenola, odnosno pigmenata antocijana koji se nisu oslobodili. Određena količina polifenola je ostala zarobljena u česticama u svim testiranim formulacijama (oko 15%). Moguće objašnjenje je da neki antocijani i polifenoli polimerizuju, i da se kao takvi veliki molekuli teško oslobađaju pa neki od njih ostaju zarobljeni u česticama.

Martinsen i sar. 1989. su pokazali da mnogi faktori mogu uticati na oslobađanje polifenola iz čestica, pre svega struktura polifenola, veličina molekula ili specifične hidroksilne ili

karboksilne grupe. Još jedan faktor koji može uticati kako na efikasnost inkapsulacije, a tako i oslobađanje je moguća interakcija polifenolnih komponenti sa uronskim i glukozaminskim ostacima (reziduama) alginata, što takođe može objasniti zarobljenost i neoslobađanje određene količine polifenola (Martinsen i sar. 1989; Stojanović i sar. 2012). Osim toga, sterne interakcije mogu biti još jedan razlog limitiranog oslobađanja polifenola, a ova pojava je verovatno uzrokovana “zarobljavanjem” polifenola u mrežu kalcijum-alginata. Ove šupljine su manjih dimenzija od velikih molekula polifenola. Sličan fenomen su uočili Stojanović i sar. 2012. i Rousseau i sar. 2004. Ipak, većina inkapsuliranih polifenolnih jedinjenja se brzo oslobodi iz mikročestica (Slika 32 i Slika 35), i onda dostižu plato.

Oslobađanje polifenola aronije iz hidrogel mikročestica (Slika 32 i Slika 35) je prvo imalo fazu brzog oslobađanja u prvih 10 minuta (*burst* efekat), praćenog periodom konstantnog oslobađanja između 10-20 minuta (period sporog oslobađanja-*lag time*), a zatim je nastupio blagi pad brzine oslobađanja polifenola verovatno uzrokovano zasićenjem (saturacijom) medijuma za oslobađanje samim polifenolima.

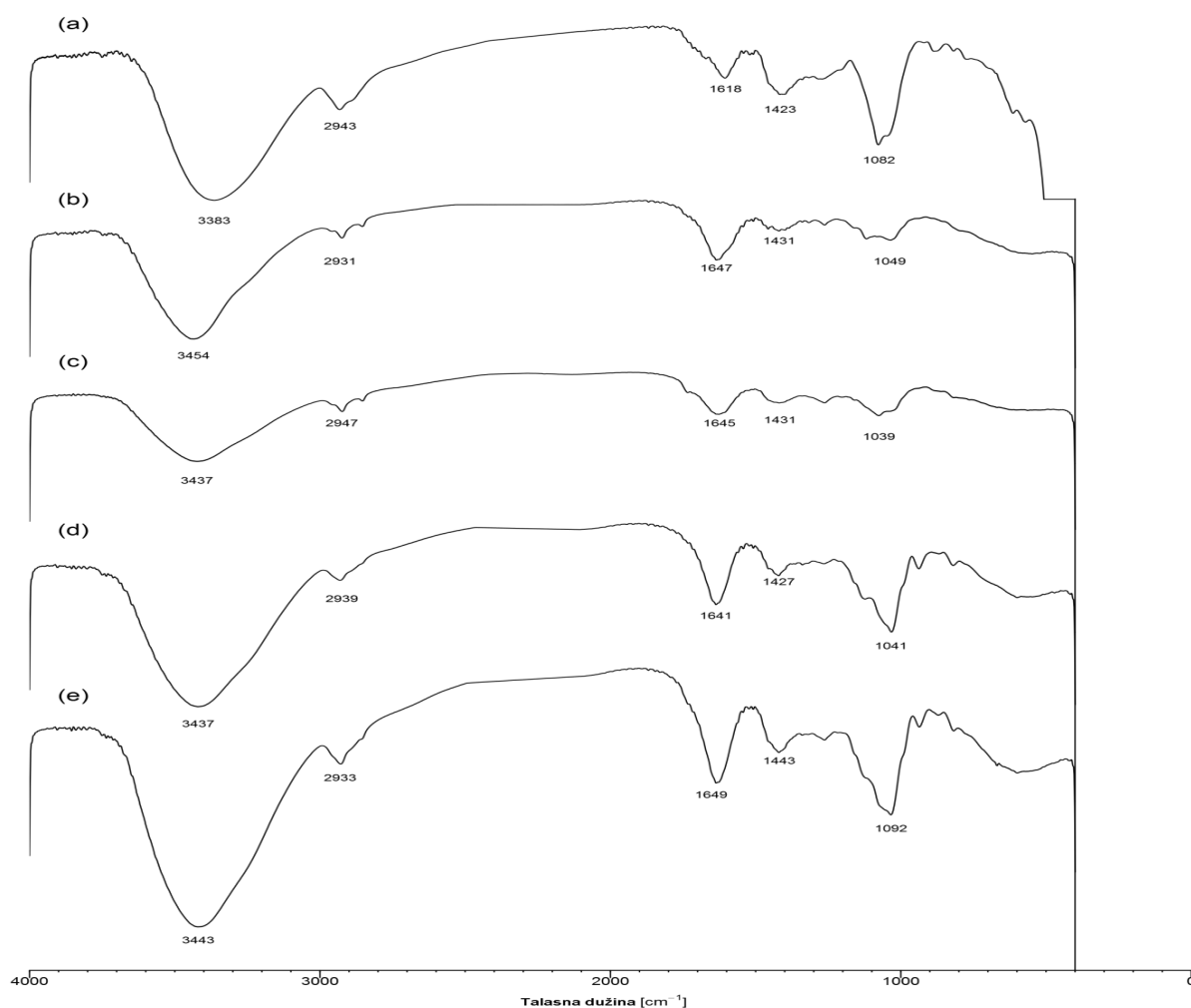
Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim studijama, gde su polifenoli kao vodeno rastvorne komponente, oslobođeni veoma brzo iz mikročestica u medijum koji ih okružuje (Stojanović i sar. 2012; Belščak-Cvitanović i sar. 2011; Beirao-da-Costa i sar. 2013).

U slučaju liofilizovanih čestica dobijenih uz dodatak inulina kao punioca (Slika 35), postignuto je produženo oslobađanje polifenola u odnosu na hidrogel mikročestice, što je i bio cilj. Ovakav rezultat potiče od činjenice da inulin kao punilac „obavija“ alginatnu mikročesticu, formirajući na taj način dodatni sloj koji predstavlja prepreku za difuziju polifenola iz unutrašnjosti mikročestice u okolni medijum.

Koncentracija polifenola u okolnom medijumu postaje konstantna nakon 20 minuta u slučaju hidrogel čestica i nakon 40 minuta u slučaju liofilizovanih čestica. Cordoba i sar. 2013. su postigli kontinuirano oslobađanje polifenola iz ekstrakta *Ilex paraguariensis* na 100 minuta sa skrobom kao puniocem u poređenju sa čistim alginatnim česticama (60 minuta).

### 5.2.5. Furijerova transmisiona infracrvena spektroskopska analiza mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom

FTIR analiza je korišćena za karakterizaciju dobijenih mikročestica u cilju identifikacije i analize funkcionalnih grupa polimera i ekstrakta aronije, kao i ispitivanja mogućih interakcija između jedinjenja iz ekstrakta i matriksa u koji je ekstrakt inkorporiran. Spektar prikazan na Slici 36. prikazuje nekoliko karakterističnih pikova.



Slika 36. FTIR spektri (a) liofilizovanog ekstrakta (b) praznih F2 čestica (c) praznih F4 čestice (d) F2 čestice inkapsulirane ekstraktom (e) F4 čestice inkapsulirane ekstraktom, gde je F2-alginat srednjeg viskoziteta, F4-alginat srednjeg viskoziteta uz dodatak inulina.

Očigledno i vidljivo je širenje apsorpcionih pikova u regionu talasnih dužina između 3383-3454  $\text{cm}^{-1}$ , čiji su uzrok valencione vibracije koje potiču od -OH grupa (Stojanović i sar. 2012; Cordoba i sar. 2013; Istenič i sar. 2015), naročito u uzorku u kome je ekstrakt inkapsuliran u alginat/inulin sistem (Slika 36 e). Intenzitet pika se naročito povećao dodatkom inulina, jer inulin sadrži veliki broj -OH grupa. Pikovi u spektru F4 mikročestica, kako praznim tako i inkapsuliranih ekstraktom su posmatrani na 3437  $\text{cm}^{-1}$  i 3443  $\text{cm}^{-1}$  (Slika 36 c, 36 e).

Na spektru F2 mikročestica, uočljivi su pikovi na 3454  $\text{cm}^{-1}$  za prazne čestice i na 3437  $\text{cm}^{-1}$  za inkapsulirane (Slika 36 b i 36 d). Pik slabog intenziteta u regionu talasnih dužina između 2931-2947  $\text{cm}^{-1}$ , verovatno potiče od prisutnih  $-\text{CH}_2$  grupa (C-H vibracije istezanja), što su slično opisali i Istenič i sar. 2015.

Veliki asimetrični valencioni apsorpcioni pikovi u regionu od 1618 do 1649  $\text{cm}^{-1}$  i od 1423 do 1443  $\text{cm}^{-1}$  verovatno potiču od prisustva karboksilnih anjona  $\text{COO}^-$  (Slika 36 b, 36 c, 36 d, 36e), posebno u slučaju F4 mikročestica inkapsuliranih ekstraktom (Stojanović i sar. 2012; Istenič i sar. 2015). Pikovi u regionu 1041-1092  $\text{cm}^{-1}$  (Slika 36 a, 36 d, 36 e) se mogu pripisati -C-O grupama cikličnih etara i alkoholnih grupa iz polifenola.

Veliki broj pikova karakterističnih za prisustvo hidroksilnih grupa, a naročito onih koje su karakteristične za polifenole, potiču od ekstrakta aronije. To se vidi na spektru čistog ekstrakta aronije (Slika 36 a), a takođe i na spektrima inkapsuliranih F2 a posebno F4 čestica. Pikovi ovih intenziteta nisu prisutni u slučaju kontrolnih F2 i F4 čestica, u koje nije inkapsuliran ekstrakt.

Upoređivanjem spektara čistog ekstrakta aronije (Slika 36 a) i spektara čestica izrađenih od alginata ili alginat/inulina inkapsuliranih ekstraktom, odnosno inkapsuliranih F2 i F4 čestica (Slika 36 d i e), jasno se vidi da nisu prisutne hemijske interakcije između jedinjenja iz ekstrakta i nosača, nisu uočljive nikakve značajne promene i ekstrakt je uspešno inkapsuliran bez deformacija. Sve ovo ukazuje da su F2 i F4 formulacije pogodni nosači za inkapsulaciju polifenola aronije. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima od strane Stojanović i sar. 2012 i Istenič i sar. 2015, koji su ispitivali slične sisteme za inkapsulaciju polifenola majčine dušice i resveratrola, respektivno.



Na FTIR spektrima kontrolnih (Slika 36 b, 36 c) i inkapsuliranih mikročestica (Slika 36 d, 36 e) uočljive su neke razlike u izgledu i intenzitetu pikova u opsegu talasnih dužina između 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$ . Razlog ovim promenama su deformacije veza u ugljenohidratnoj oblasti, a koje su posebno izražene u inkapsuliranim F2 i F4 česticama, više nego u neinkapsuliranim česticama istog tipa.

Pik slabog intenziteta na 1618  $\text{cm}^{-1}$  iz liofilizovanog ekstrakta (Slika 36 a) postao je izraženiji u spektrima inkapsuliranih alginatnih čestica, posebno onih koje sadrže inulin (Slika 36 e), što ukazuje na to da su polifenoli aronije uspešno inkapsulirani u sistem alginat/inulin. Dva pika, na oko 2930 i 1040  $\text{cm}^{-1}$ , karakteristična za inulin, potiču od alifatičnih  $-\text{CH}_2$  i C-O-C grupa, a izraženi su u FTIR spektrima inkapsuliranih alginat/inulin čestica.

Slični rezultati o promenama pikova hidroksilnih grupa koji postaju vidljivi na nižim talasnim dužinama nakon inkapsuliranja u nosače su objavljeni od strane drugih autora, Istenič i sar. 2015, Cho i sar. 2014 i Nadavala i sar. 2009.

Iz svih prethodno prikazanih rezultata može se zaključiti da su alginat i kombinacija alginat/inulin kompatibilni materijali i pogodni nosači za mikroinkapsulaciju polifenola iz ekstrakta aronije.

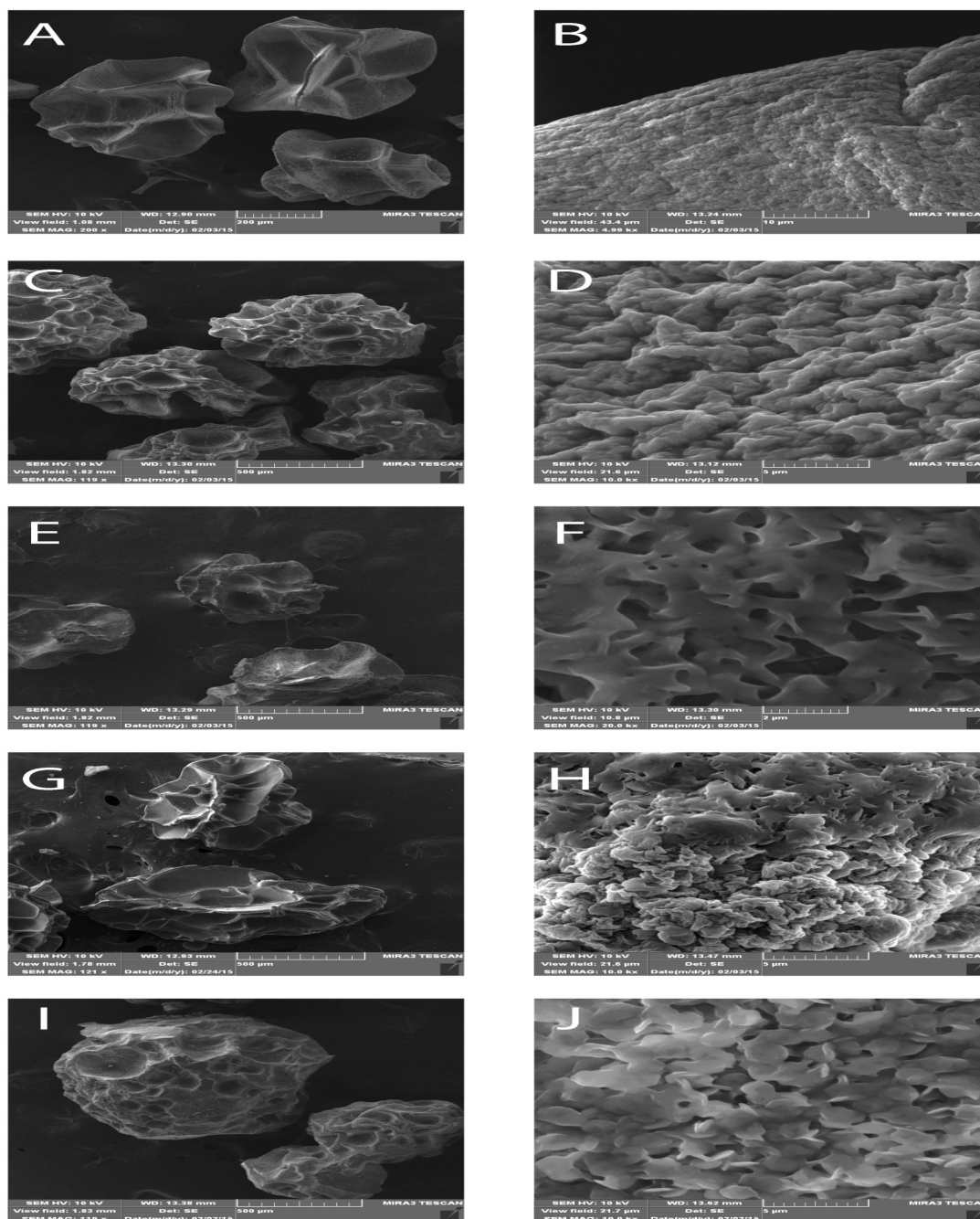
## 5.2.6. Morfologija čestica

### 5.2.6.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija mikročestica-SEM analiza

Osobine mikročestica kao što su oblik i morfologija mogu značajno uticati na protok čestica, što je izuzetno važno prilikom proizvodnje nekih farmaceutskih oblika, npr. konvencionalnih čvrstih kapsula. SEM analiza je široko korišćena metoda za karakterizaciju mikročestica u cilju dobijanja detaljnijih informacija o morfologiji čestica.

U ovom istraživanju, ispitivana je površinska morfologija i oblik mikročestica dobijenih od alginata i alginat/inulin sistema, odnosno F2 i F4 formulacije (praznih čestica-kontrolnih kao i onih inkapsuliranih) korišćenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa, a takođe je ispitivan i uticaj inulina na inkapsulirane sisteme.

Alginatne hidrogel mikročestice sa inkapsuliranim ekstraktom aronije, posmatrane golim okom i optičkim mikroskopom su bile sferičnog oblika sa relativno glatkom površinom, što je bilo prikazano na Slici 26.



Slika 37. SEM mikrografije (A) kontrolne F2 mikročestice, 200 x (B) kontrolne F2, 4990 x (C) F2 inkapsulirane ekstraktom, 119 x (D) F2 inkapsulirane ekstraktom, 10.000 x (E) kontrolne F4, 119 x (F) kontrolne F4, 20.000 x (G) kontrolne F4, 121 x (H) F4 inkapsulirane ekstraktom, 10.000 x (I) F4 inkapsulirane ekstraktom, 119 x (J) F4 inkapsulirane ekstraktom, 10.000 x, gde su F2 čestice dobijene od alginata srednje viskoznosti, a F4 od alginata srednje viskoznosti uz dodatak inulina.

Rezultati dobijeni nakon SEM analize su ukazali na poroznu strukturu čestica uzrokovanu isparavanjem vode nakon liofilizacije. Poređenjem neinkapsuliranih alginatnih čestica (Slika 37 A, 37 B) sa inkapsuliranim (Slika 37 C, 37 D), uočava se manja poroznost kod inkapsuliranih mikročestica, koja je verovatno uticaj polifenolnih jedinjenja na smanjeno isparavanja vode, što su primetili i Stojanović i sar. 2012.

Sličan fenomen se uočava i poređenjem praznih alginat/inulina čestica (Slika 37 E, 37 F, 37 G) i alginat/inulin čestica inkapsuliranih ekstraktom aronije (Slika 37 H, 37 I, 37 J). Na mikročesticama sa inkapsuliranim ekstraktom uočava se pravilnija površina sa manje pukotina i brazdi u poređenju sa neinkapsuliranim česticama. Tokom procesa sušenja liofilizacijom stvaraju se dodatne pukotine i površina postaje više naborana u odnosu na hidrogel čestice (Slika 26, Slika 37), tako da izgleda kao da na njima postoje krateri oivičeni izbočenim zidovima. Liofilizacija indukuje destrukciju zidova pora mikročestica, što uzrokuje smanjenje čestica, gubitak sferičnosti i aglomeraciju čestica.

Na svim slikama liofilizovanih mikročestica (Slika 37), jasno je vidljiva porozna struktura, što se i očekivalo kao posledica liofilizacije.

Analiza pomoću SEM-a nije pokazala pojavu kristalnih struktura u česticama, a koje bi mogle nastati kao posledica viška kalcijum-hlorida, koji se koristio kao umreživač. Slične rezultate su objavili i Paques i sar. 2013. i 2014. i Deladino i sar. 2008.

Efekti dodavanja inulina kao punioca, sa ciljem da se poboljšaju konačne karakteristike mikročestica takođe s ispitivani. Destrukcija inkapsuliranih hidrogel čestica tokom liofilizacije je u značajnoj meri smanjena dodatkom inulina. Ovo se jasno uočava poređenjem uzoraka F2 i F4 mikročestica, naročito onih inkapsuliranih ekstraktom.

Čestice izrađene sa inulinom pokazuju glatkiju i homogeniju površinsku morfologiju (Slika 37 H, 37 I, 37 J), kao i veću sferičnost u odnosu na čestice izrađene bez inulina (Slika 37 C, 37 D).

Mikročestice izrađene formulacijom F4 pokazale su najbolje karakteristike, uniformu strukturu i zadržavanje oblika tokom liofilizacije. Slični rezultati su prethodno objavljeni u slučaju inkapsuliranja ekstrakta majčine dušice u alginatne čestice, kada su se kao punioci koristili inulin ili saharoza (Stojanović i sar. 2012)

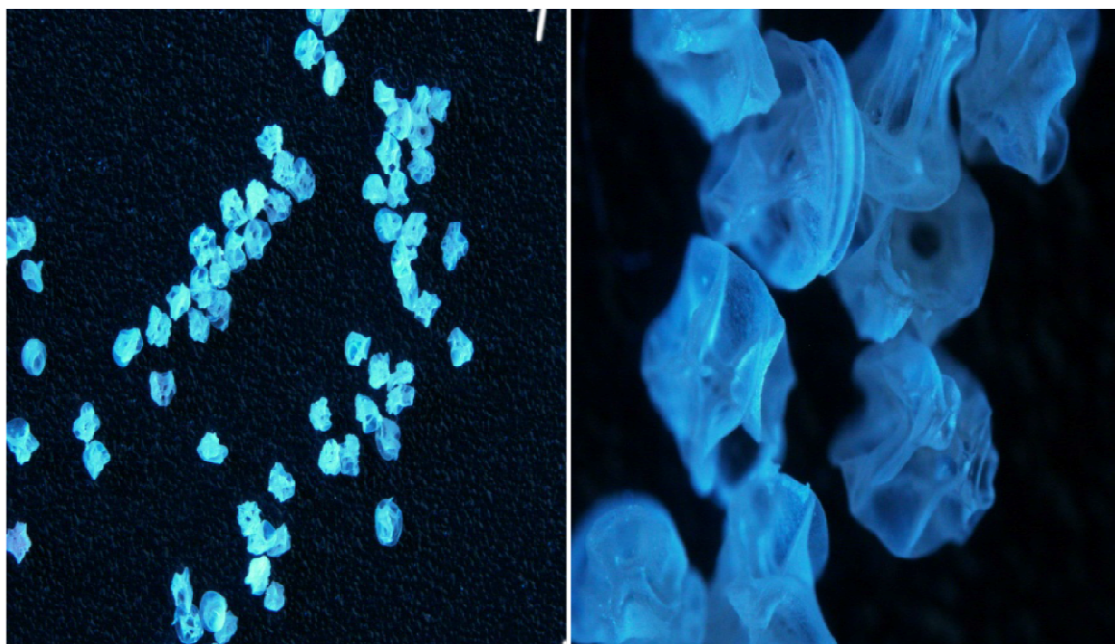
Generalno posmatrano, SEM mikrografije su pokazale da liofilizacija može da se koristi kao obećavajuća metoda za sušenje i očuvanje mikročestica, gde dodavanje inulina kao punioca omogućava zadržavanje sferičnosti čestica i homogenosti njihove strukture.

Među ispitivanim formulacijama, čestice dobijene sa F4 formulacijom su bile najmanje modifikovane procesom liofilizacije, u smislu očuvanja sferičnosti, originalnog oblika čestica, oštećenja, raspada i promena strukture mikročestica.

Na SEM mikrografijama nije primećena agregacija čestica, niti su uočene čestice nepravilnog oblika. Ovo je jedan od relevantnih rezultata u ovom istraživanju, jer je od ključnog značaja za dalju industrijsku i farmaceutsku primenu.

### 5.2.6.2. Analiza mikročestica pod lupom

Mikročestice dobijene postupkom elektrostatičke ekstruzije analizirane su i na specijalizovanoj lupi (Nikon SMZ 18, kamera DS-Fi1C, objektiv SHR Plan Apo) i odabrane mikrografije prikazane su na Slikama 38-41.

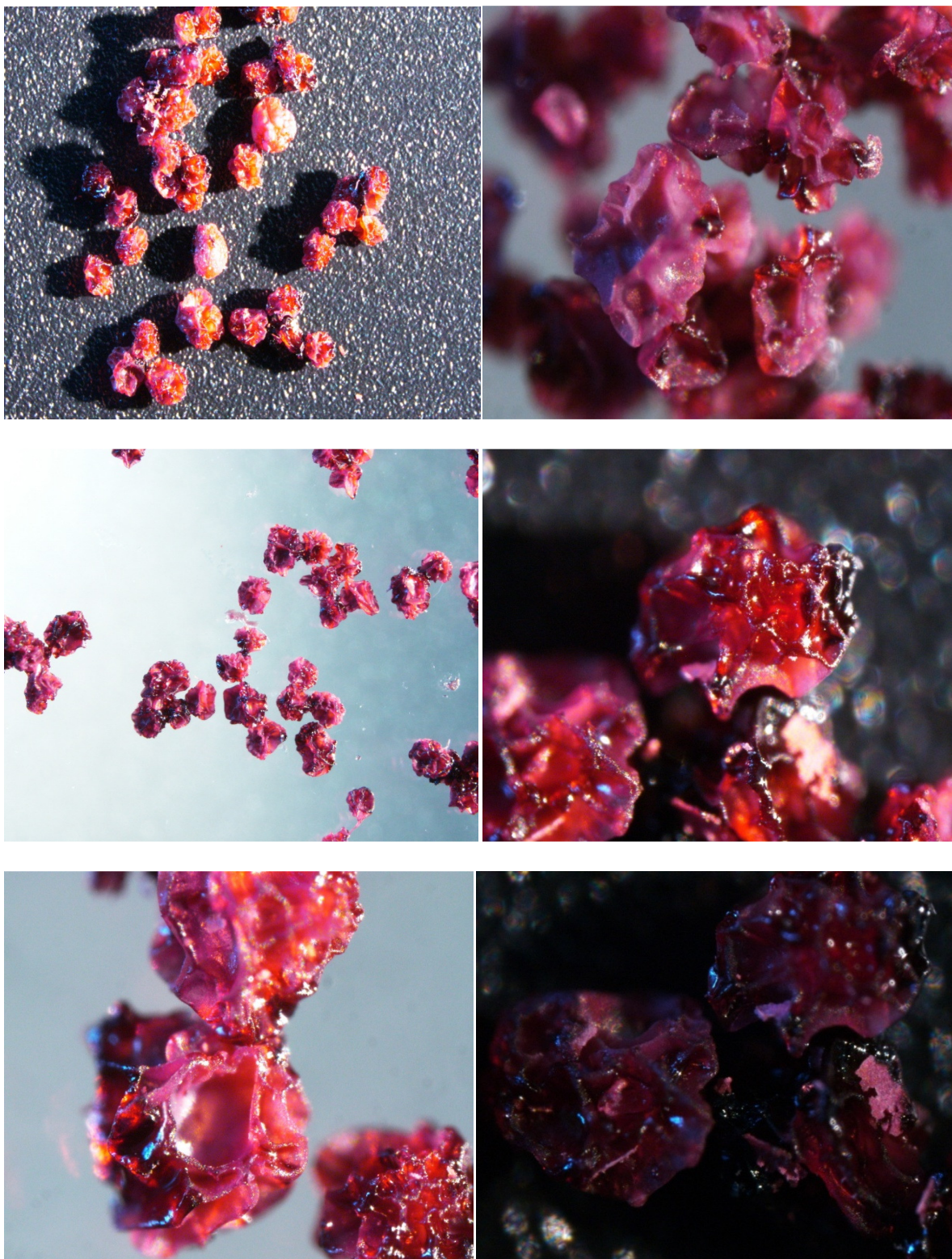


Slika 38. Prazne F2 (alginat srednje viskoznosti) čestice, različitih uvećanja, 1x i 6x



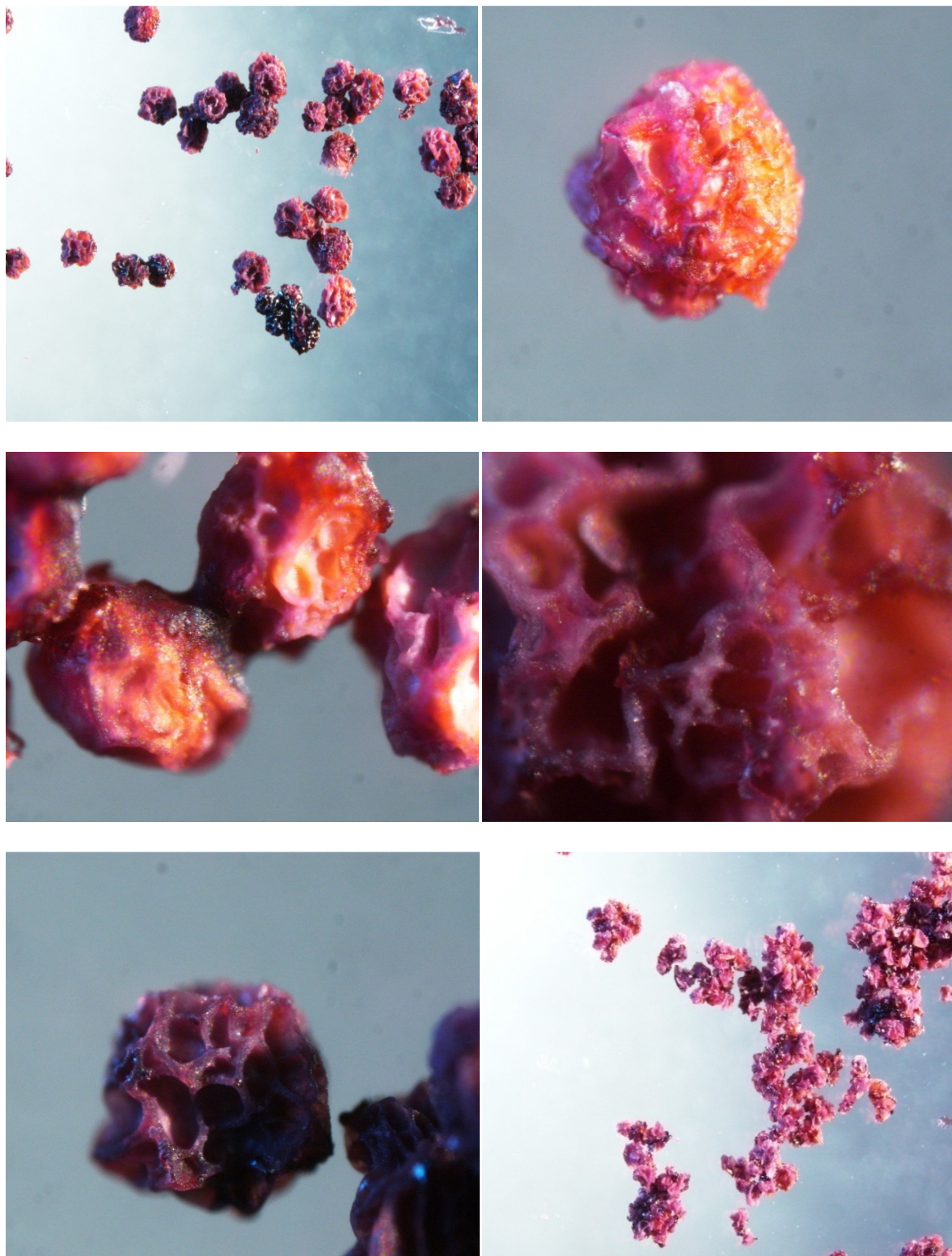
Slika 39. Prazne F4 (alginat srednje viskoznosti uz dodatak inulina) čestice, različitih uvećanja, 6 x i 13 x, respektivno





Slika 40. F2 (alginat srednje viskoznosti) čestice inkapsulirane ekstraktom aronije, različitih uvećanja, 1x, 6x, 1x, 6x, 6x, 3x, posmatrane s leva na desno





Slika 41. F4 (alginat srednje viskoznosti uz dodatak inulina) čestice inkapsulirane ekstraktom aronije, različitih uvećanja, 1x, 6x, 6x, 13x, 6x, 1x, posmatrane s leva na desno



Na mikrografijama dobijenih pomoću lupe, vide se razlike među česticama, što je bilo primećeno i uz pomoć skenirajućeg elektronskog mikroskopa.

Poređenjem placebo (praznih) F2 i F4 čestica, u prvom slučaju izrađenih bez, a u drugom sa dodatkom inulina, vidi se da su čestice sa dodatkom punioca, sferičnije i manje porozne. Poređenjem inkapsuliranih F2 i F4 čestica, uočljivo je da nije došlo do aglomeracije, što je značajno za buduću primenu i aplikaciju.

Inulin popunjava unutrašnji prostor i formira strukturu sa manje pora i na taj način utiče na sporije oslobađanje polifenola iz ovih sistema, što je pokazano u ovom istraživanju. Na slikama F4 čestica primećuje se da površinski sloj ima gušću, manje poroznu strukturu, što je direktna posledica oblaganja inulinom i interakcija koje se javljaju između polifenola i inulina.

Slike svih čestica ne pokazuju nikakva oštećenja niti destrukcije, a dodatak inulina poboljšava organoleptičke karakteristike čestica, pa su slike dobijene pomoću lupe samo potvrdile ono što je već detaljno pokazala SEM analiza.

### **5.3. Mikroinkapsulacija ekstrakta aronije metodom sušenjem raspršivanjem**

Već je pomenuto da se problem nestabilnosti polifenola u ekstraktu može rešiti mikroinkapsulacijom, koja ima tendenciju da poboljša stabilnost ekstrakata tokom skladištenja i obrade.

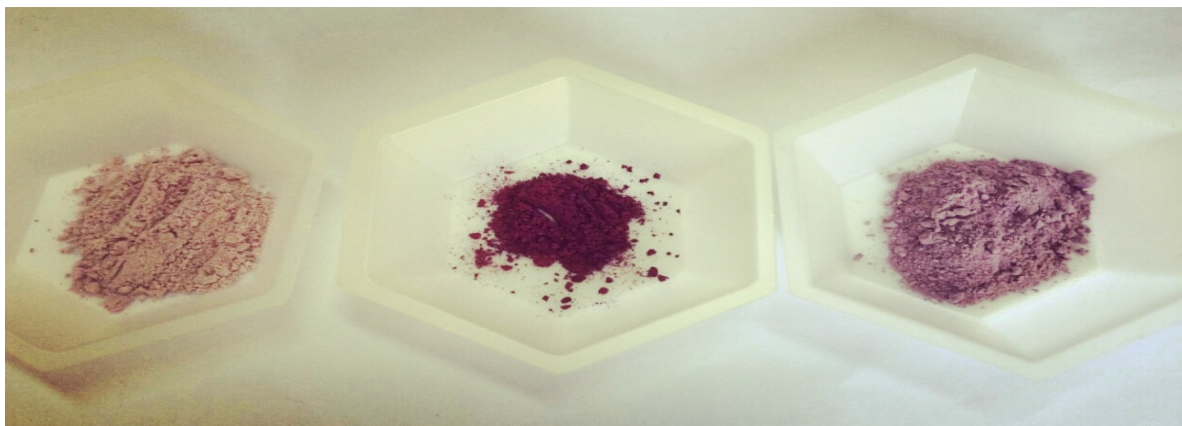
Pored mnogobrojnih metoda mikroinkapsulacije, i već pomenute elektrostatičke ekstruzije, još jedna tehnika mikroinkapsulacije je sušenje raspršivanjem.

To je postupak kojim se medijum za inkapsuliranje u vidu sitnih kapljica uvodi u struju zagrejanog gasa koji dovodi do brzog formiranja čvrstih čestica. Sušenje raspršivanjem je jednostavan, relativno jeftin i jedan od najpogodnijih načina kontrolisane proizvodnje uniformnih čestica željene veličine.

U našem radu je ispitivana mikroinkapsulacija ekstrakta aronije (2.7.1) sa različitim nosačima, a inkapsulirani sistemi okarakterisani su sa ciljem da bi se odabrao optimalni.

Ispitivan je pre svega uticaj nosača (matriksa) na stabilnost i sadržaj inkapsuliranih aktivnih principa.

Korišćena su tri različita biopolimera kao nosači: arapska guma, maltodekstrin i mleko u prahu. Izgled dobijenih čestica ovom metodom mikroinkapsulacije prikazan je na Slici 42.



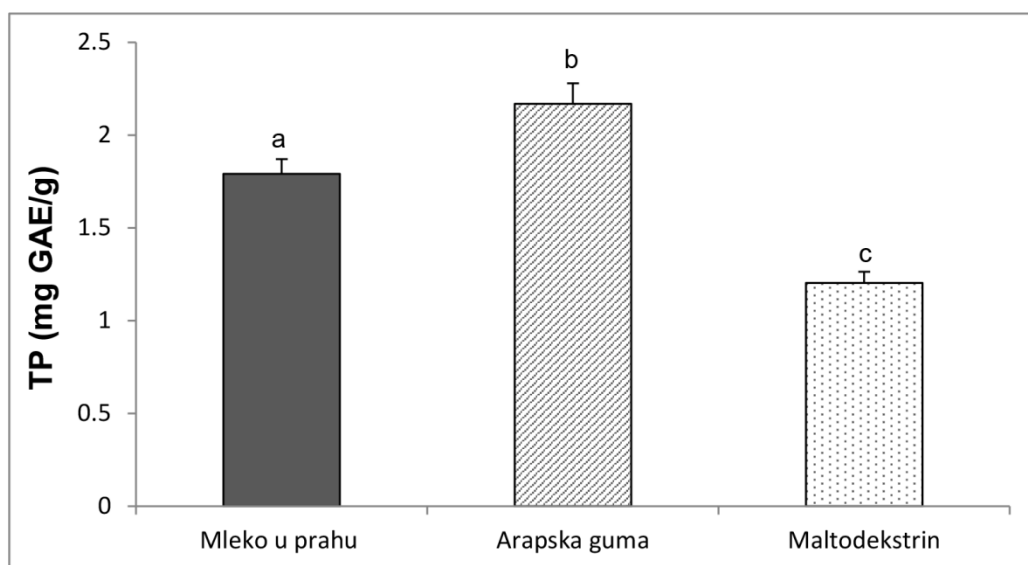
Slika 42. Izgled mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem u koje je inkapsuliran ekstrakt aronije u nosače maltodekstrin, arapska guma, mleko u prahu, respektivno

## **Karakterizacija mikročestica**

### **5.3.1. Ispitivanje oslobađanja ukupnih fenola i ukupnih antocijana iz mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem**

Za ispitivanja oslobađanja polifenola, destilovana voda je izabrana kao medijum za oslobađanje, jer su polifenoli, kao i nosači u koje su inkorporirani, lako rastvorni u vodi.

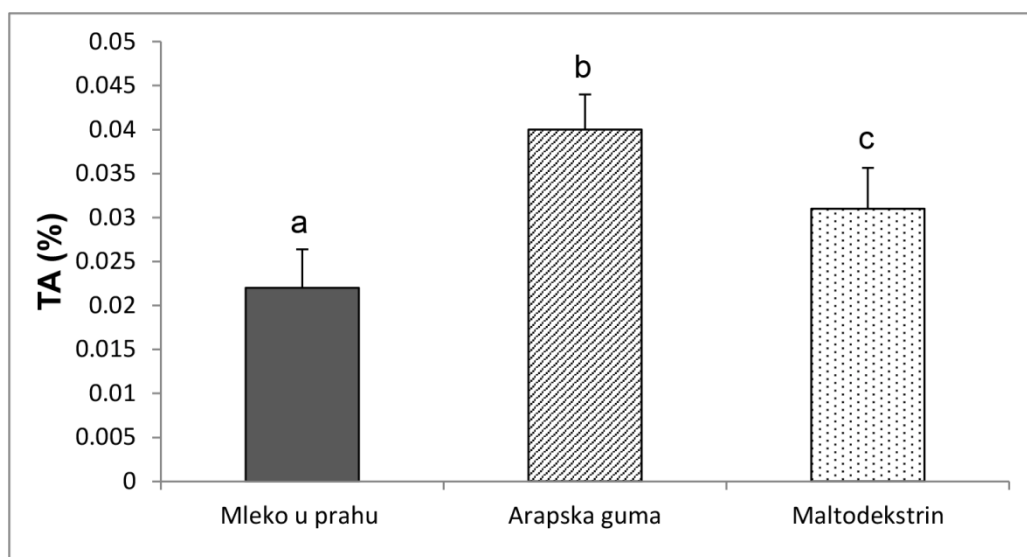
Za razliku od mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom, oslobađanje polifenola iz čestica dobijenim sušenjem raspršivanjem, kao što je i bilo očekivano, desilo se znatno brže. Različiti tipovi nosača imali su uticaj na oslobađanje polifenola (Slika 43).



Slika 43. Količina oslobođenih polifenola iz mikročestica u koje je inkapsuliran ekstrakt aronije u tri različita nosača metodom sušenja raspršivanjem, gde <sup>a,b,c</sup> označavaju statistički značajne razlike među grupama, obeležena različitim slovima, zasnovane na Dankanovom testu,  $p < 0.001$ .

Najbolji rezultati oslobađanja polifenola (TP) su postignuti sa arapskom gumom kao nosačem (2.168 mg GAE/g čestica), zatim sa mlekom u prahu (1.790 mg GAE/g čestica) i na kraju sa maltodekstrinom (1.203 mg GAE/g čestica). Količina oslobođenih polifenola je pokazala statistički značajnost između sva tri nosača ( $p < 0.001$ ). Slične rezultate su objavili i Tolun i sar. 2016. koji su pokazali da je prilikom inkapsulacije ekstrakta grožđa u arapsku gumu i maltodekstrin kao i kombinaciju ovih nosača, najbolje rezultate pokazala kombinacija sa većim udelom arapske gume. Takođe, bolji rezultati su postignuti i kada se maltodekstrinu dodala određena količina arapske gume u poređenju sa čistim maltodekstrinom.

Oslobađanje ukupnih antocijana (TA) iz inkapsuliranih mikročestica ispitivano je u zakišeljnom medijumu, jer su antocijani stabilniji u formi flavijum jona u kiseloj sredini (Slika 44). Postignut je isti trend oslobađanja kao i u slučaju ukupnih fenola (TP).



Slika 44. Količina otpuštenih antocijana iz mikročestica u koje je inkapsuliran ekstrakt aronije, u tri različita nosača metodom sušenja raspršivanjem

<sup>a,b,c</sup> statistički značajne razlike među nosačima obeležene različitim slovima, zasnovane na Dankanovom testu,  $p < 0.001$ .

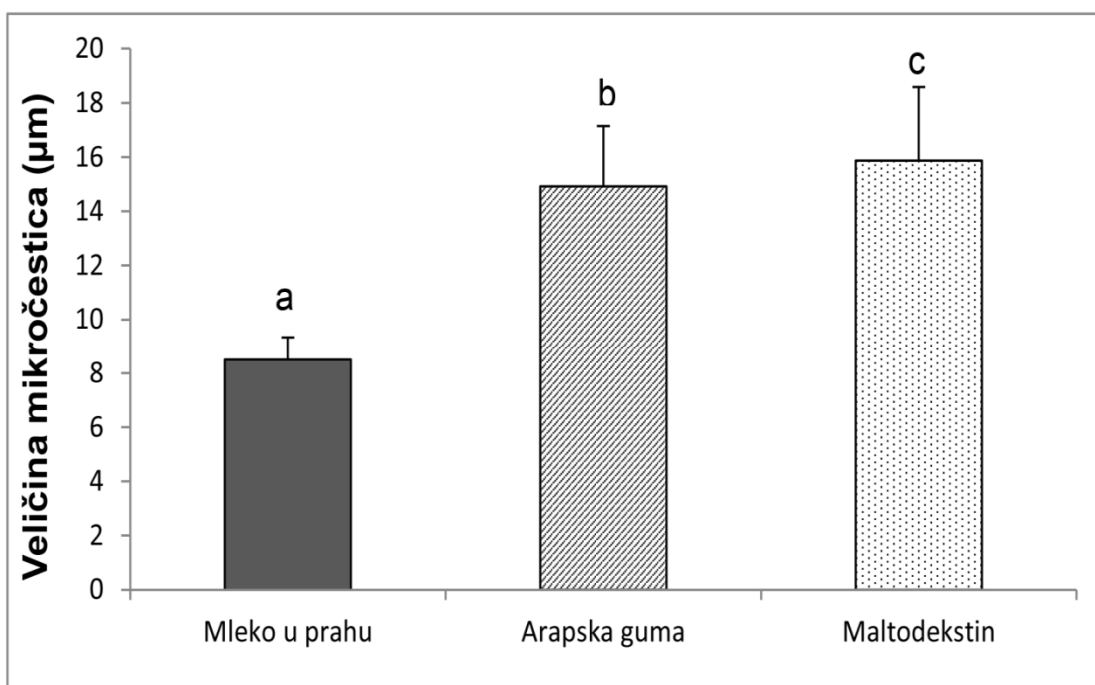
Arapska guma je pokazala najbolje rezultate u vidu količine oslobođenih antocijana (0.040%), u poređenju sa maltodekstrinom (0.031%) i mlekom u prahu (0.022%) (Slika 44). Ovi rezultati, su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima od strane Balšček-Cvitanović i sar. 2015. gde je pokazano da polifenolna jedinjenja imaju veći afinitet vezivanja za nosače polisaharidnog tipa kao što je guma, nego za nosače proteinskog tipa. To se može objasniti mogućim interakcijama polifenola i antocijana sa ovim polisaharidima. Robert i sar. 2010. su takođe pokazali bolju inkapsulaciju, a i bolje oslobađanje soka i ekstrakta nara iz proteina soje kao nosača nego iz maltodekstrina. S druge strane, Bakowska-Barczak i sar. 2011. su inkapsulirali najveću količinu i polifenola i antocijana u maltodekstrin u poređenju sa arapskom gumom, a samim tim sa ovim nosačem obezbedili najveću količinu oslobođenih aktivnih principa. Fang i sar. 2010. su značajno povećali stabilnost i antioksidativnu aktivnost polifenola inkapsuliranjem u maltodekstrin kao nosač, i obezbedili visoku koncentraciju oslobođenih jedinjenja.

### 5.3.2. Određivanje veličine čestica

Veličina mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem ispitivana je pomoću uređaja Mastersizer 2000. U zavisnosti od primene i aplikacije mikročestica, poželjni su različiti dijametri čestica.

Optimizacijom različitih procesnih parametara kod metode sušenja raspršivanjem, kao što su karakteristike mlaznice, dijametar igle, temperatura ulaznog i izlaznog vazduha, protok vazduha i tečnosti, pritisak atomizacije, moguće je dobiti čestice uniformne veličine i željenog dijametra.

U ovom radu je ispitivan uticaj različitih tipova nosača na veličinu čestica, što je prikazano na Slici 45, a detaljan prikaz veličine i distribucije čestica dat je u Prilogu 3.



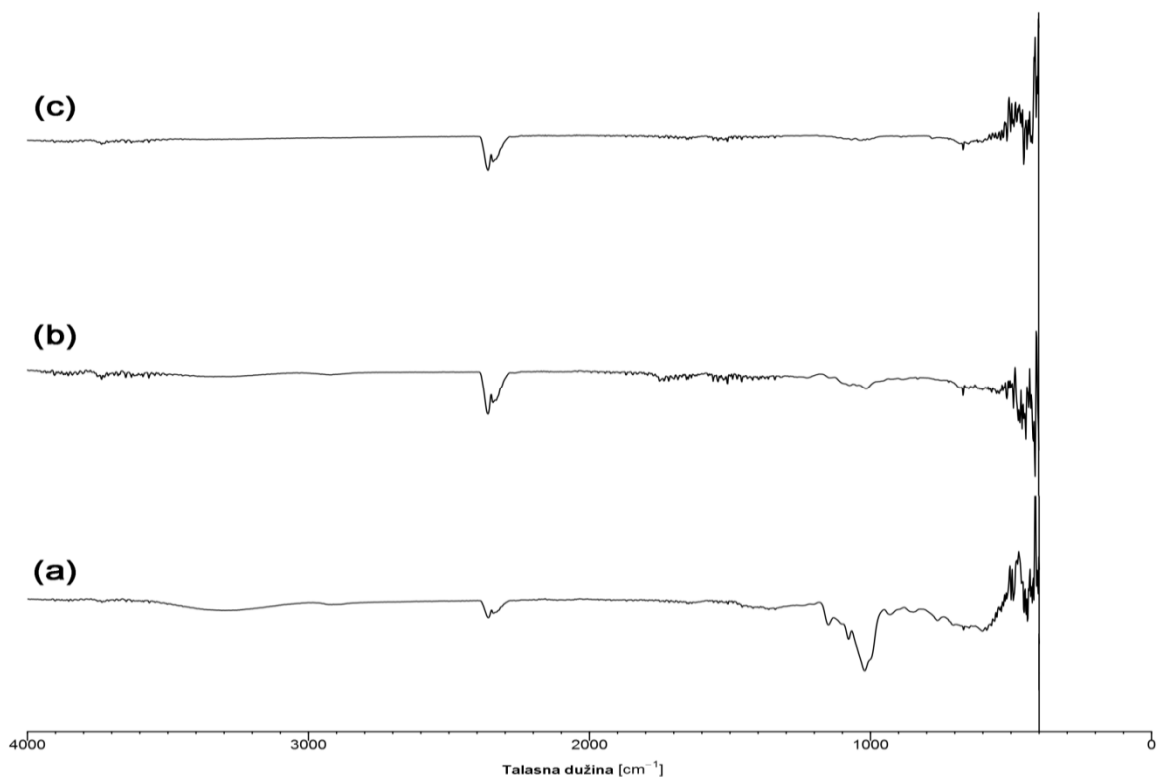
Slika 45. Veličine mikročestica dobijenih metodom sušenja raspršivanjem  
gde <sup>a,b,c</sup> predstavljaju statistički značajne razlike među nosačima obeležene različitim slovima,  
zasnovano na Dankanovom testu,  $p < 0.001$ .

Veličine dobijenih mikročestica bile su 8.50  $\mu\text{m}$  za mleko u prahu, 14.92  $\mu\text{m}$  za arapsku gumu i 15.87  $\mu\text{m}$  za maltodekstrin, poštujući redosled (Slika 45). Ovi rezultati su potvrdili da je sušenje raspršivanjem pogodna metoda za proizvodnju malih i uniformnih mikročestica.

Mikročestice izrađene sa mlekom u prahu kao nosačem su bile značajno manje u odnosu na one izrađene sa arapskom gumom ili maltodekstrinom. Sve inkapsulirane mikročestice su bile malog dijametra i homogene distribucije veličine čestica, što je jako značajno sa aspekta buduće farmaceutske primene, ali i primene u industriji hrane.

### 5.3.3. FTIR analiza mikročestica dobijenih metodom sušenjem raspršivanjem

FTIR analiza je korišćena u cilju identifikacije funkcionalnih grupa i karakterisanja veza između nosača i aktivnih principa ekstrakta aronije. Spektri prikazani na Slici 46. pokazuju nekoliko relevantnih pikova.



Slika 46. FTIR spektri (a) maltodekstrina (b) arapske gume (c) mleka u prahu u koje je inkapsuliran ekstrakt aronije

Pik na oko 1000 cm<sup>-1</sup> se može pripisati -C-O grupi cikličnog etra i alkoholnim grupama iz polifenola, koji je naročito izražen u slučaju inkapsuliranog maltodekstrina (Slika 46 a).

U slučaju spektra arapske gume, u opsegu talasnih dužina 1200 do 1700 cm<sup>-1</sup> uočljive su valencione vibracije, a razlog ovim promenama su deformacije veza u ugljenohidratnoj oblasti, karakteristične za hidrokoloidnu gumu.

FTIR analiza je pokazala da je ekstrakt aronije uspešno inkorporiran u čestice metodom sušenja raspršivanjem, verovatno međumolekulskim interakcijama između polifenolnih jedinjenja i nosača. Visoke temperature nisu narušile strukturu polifenolnih jedinjenja, a posebno antocijana jer su oni uspešno inkapsulirani. Može se zaključiti da su ispitivani nosači kompatibilni materijali za inkapsulaciju ekstrakta aronije.

Svi prethodno prikazani rezultati ukazuju na to da stabilnost polifenola može biti poboljšana korišćenjem mikroinkapsulacije kao metode kojom se može očuvati stabilnost polifenola u ekstraktu.

Obe ispitivane metode mikroinkapsulacije imaju i svoje prednosti i nedostatke. Prednost elektrostatičke ekstruzije je pre svega produženo oslobađanje aktivnih principa, a nedostatak što je proces veoma zametan i skup. Sa druge strane, tehnika sušenja raspršivanjem ne omogućava produženo oslobađanje aktivnih sastojaka, već je ono praktično trenutno ali je proces značajno brži a troškovi proizvodnje manji.



## 6. Ispitivanje bioloških efekata ekstrakta aronije

U okviru ove faze istraživanja, ispitivani su potencijalni blagotvorni efekti hronične upotrebe ekstrakta dobijenog iz suvog ploda aronije na hemodinamske parametre, lipidni status i oksidativni stres na modelu spontano hipertenzivnih pacova. Za ispitivanje su se koristili mužjaci pacova sa urođenom hipertenzijom.

Izrađena je veća količina ekstrakta na osnovu najboljih rezultata ispitivanih iz prve faze istraživanja tj. faze optimizacije ekstrakcije. Dobijen ekstrakt je zatim liofilizovan radi lakše aplikacije kod eksperimentalnih životinja.

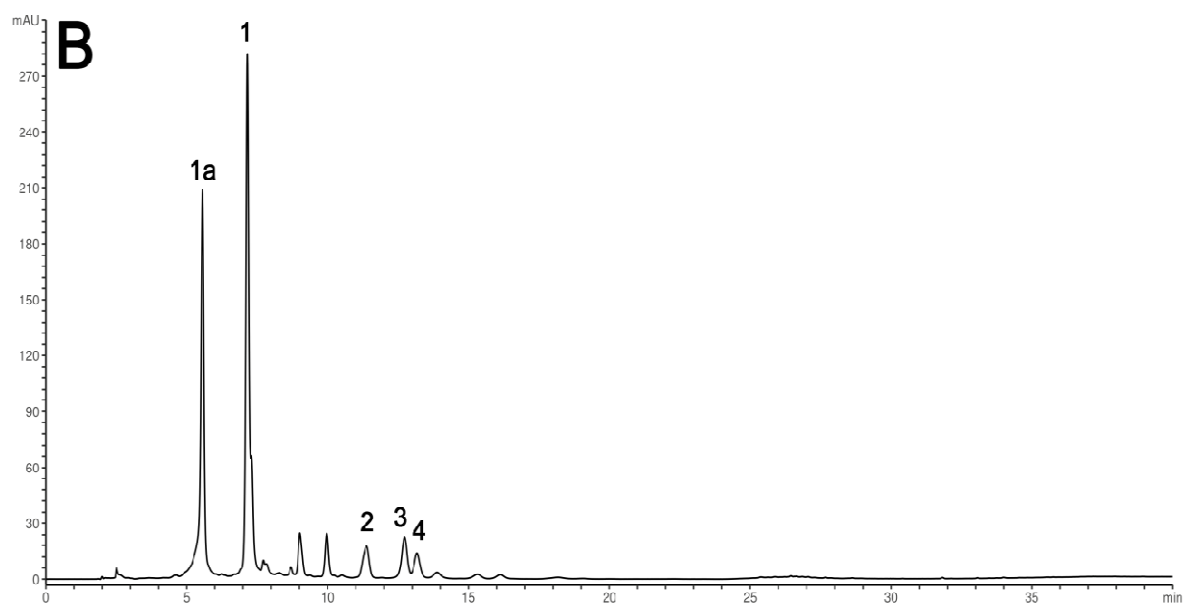
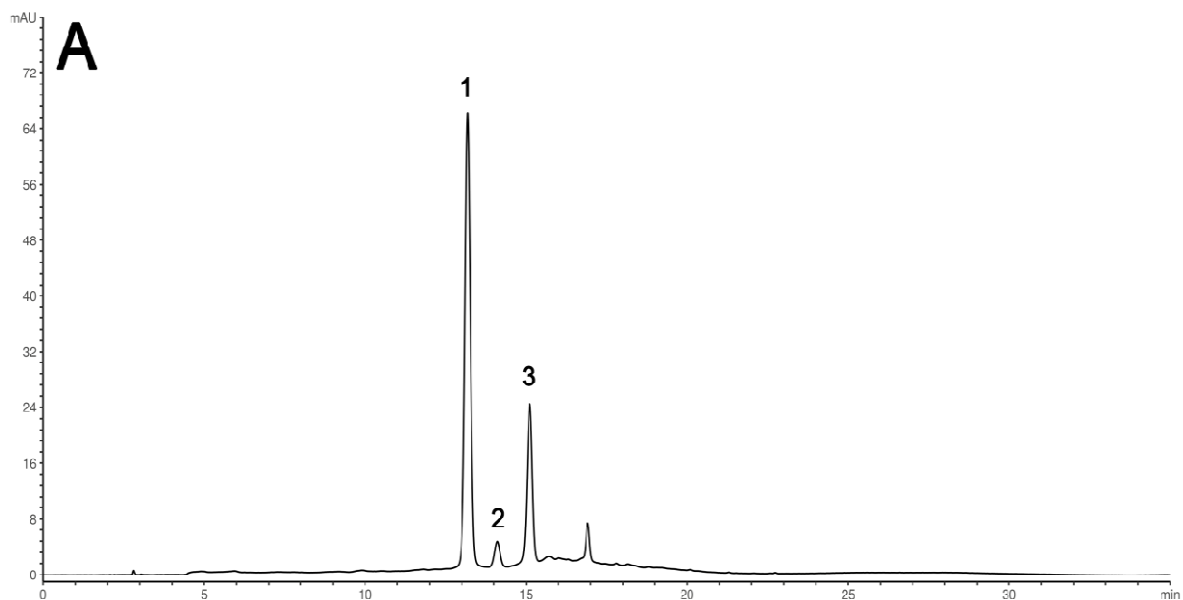
Vršena je karakterizacija liofilizovanog ekstrakta tako što je određen sadržaj ukupnih fenola, antocijana i proantocijanidina. Takođe, određen je i sadržaj pojedinačnih jedinjenja u osnovnom etanolnom ekstraktu HPLC/DAD metodom.

### 6.1. Karakterizacija ekstrakta aronije koji se primenjivao kod eksperimentalnih životinja

U poglavlju 5.1.3. prikazana je karakterizacija pojedinačnih jedinjenja HPLC/DAD analizom u ekstraktima suvog ploda aronije koji su bili odabrani eksperimentalnim dizajnom (Tabela 5).

Ekstrakt dobijen maceracijom u trajanju od 60 minuta, pomoću 50% etanola kao rastvarača, 1:20 odnosa droga-rastvarač, 0.75 mm stepena usitnjenosti, pokazao je najveći sadržaj ukupnih aktivnih principa.

Pojedinačna jedinjenja iz ovog ekstrakta su identifikovana upoređivanjem UV spektara sa onima iz literature, kao i poređenjem retencionih vremena sa standardima (Slika 24, Slika 47). Tri dominantna antocijana (Slika 47 A), flavonoida kao i fenolna kiselina i njeni derivati (Slika 47 B) su identifikovani.



Slika 47. HPLC-DAD hromatogrami antocijana (A) i fenolnih kiselina i flavonoida (B) u etanolnom ekstraktu dobijenom iz suvog ploda. (A) (1) Cijanidin-3-*O*-galaktozid (2) Cijanidin-3-*O*-glukozid (3) Cijanidin-3-*O*-arabinozid, (B) (1) Hlorogena kiselina (1a) Derivat hlorogene kiseline (2) Kvercetin-3-*O*-rutinozid (rutin) (3) Kvercetin-3-*O*-galaktozid (hiperozid) (4) Kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercetin)

Kao što se vidi na Slici 47, cijanidin-3-*O*-galaktozid, cijanidin-3-*O*-arabinozid i cijanidin-3-*O*-glukozid su bili dominantni antocijani u etanolnom ekstraktu suvog ploda aronije, u količinama od  $0.81 \pm 0.06$ ,  $0.14 \pm 0.02$ ,  $0.30 \pm 0.01$  mg GAE/g droge, respektivno, što je prikazano u Tabeli 8.

Među flavonoidima, dominantna jedinjenja bili su derivati kvercetina, kvercetin-3-*O*-rutinozid (rutin), kvercetin-3-*O*-galaktozid (hiperozid) i kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercetin), u količinama od  $0.42 \pm 0.01$ ,  $0.27 \pm 0.03$ ,  $0.15 \pm 0.07$  mg GAE/g droge, respektivno, što je prikazano u Tabeli 8.

Od fenolnih kiselina dominantno je bila prisutna hlorogena kiselina, kao i derivat hloragene kiseline (Tabela 8, Slika 47).

**Tabela 8.** Sadržaj ukupnih fenola, antocijana, proantocijanidina u liofilizovanom ekstraktu aronije i sadržaj pojedinačnih antocijana, flavonoida i fenolne kiseline u etanolnom ekstraktu suvog ploda aronije određenih HPLC metodom

Jedinjenja	Sadržaj
Ukupni fenoli*	55.2±3.25
Ukupni antocijani**	62.0±1.52
Ukupni antocijani***	23.4±1.68
Hlorogena kiselina <sup>#</sup>	4.09±0.82
Cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid <sup>###</sup>	0.81±0.06
Cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid <sup>###</sup>	0.14±0.02
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid <sup>###</sup>	0.30±0.01
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid (rutin) <sup>##</sup>	0.42±0.01
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid (hiperozid) <sup>##</sup>	0.27±0.03
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid (izokvercetin) <sup>##</sup>	0.15±0.07

\* mg GAE/g, \*\* mg cijanidin-3-*O*-glukozid ekvivalenta/g, \*\*\* mg katehin ekvivalenta/g liofilizovanog ekstrakta.

<sup>#</sup> mg hlorogene kiseline/g suve droge, <sup>##</sup> mg/g suve droge

Svaka vrednost je dobijena ponavljanjem od  $n=3 \pm$  standardna devijacija.

Poređenjem sa dosadašnjim dostupnim literaturnim podacima, objavljenim od strane nekoliko grupa istraživača, sadržaji pojedinačnih aktivnih principa bili su isti ili slični sa onima dobijenim u ovom istraživanju. U liofilizovanom soku aronije koji su koristili

Hellstrom i sar. 2010. takođe su cijanidin-3-*O*-galaktozid i cijanidin-3-*O*-arabinozid bila dominantna jedinjenja.

Komercijalno dostupan ekstrakt aronije, Aronox, koji je upotrebljavan u nekoliko studija, dominantno je sadržao cijanidin-galaktozid, cijanidin-arabinozid, cijanidno-ksilozid i cijanidin-glukozid, respektivno (Duchnovicz i sar. 2012; Sikora i sar. 2014; Park i Park, 2011).

Ekstrakt aronije okarakterisan od strane Ciocoiu i sar. 2013., dominantno je sadržao sledeće flavonoide: rutin, hiperozid i kvercetin, u sličnom odnosu i sastavu kao 50% etanolni ekstrakt aronije korišćen u ovoj *in vivo* studiji.

Dominantno prisutni antocijani u ekstraktu su verovatno odgovorni za aktivnost samog ekstrakta suvog ploda aronije kod kardiovaskularnih bolesti (Braunlich i sar. 2010; Kulling i Ravel, 2008; Kokotkievicz i sar. 2010). Pored toga i flavonoidi su pokazali antioksidativno dejstvo i efikasnost u eliminaciji štetnih slobodnih radikala (Ciocoiu i sar. 2013).

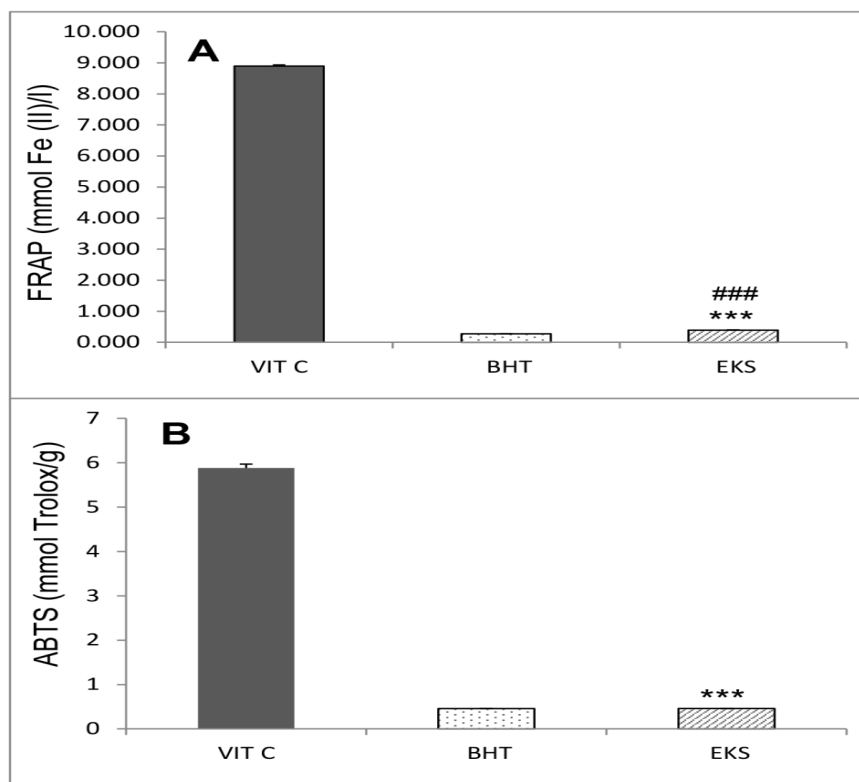
Polifenoli imaju sposobnost da neutrališu ROS, pa stoga mogu biti uspešni antioksidansi koji imaju sposobnost da smanje krvni pritisak (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Hlorogena kiselina kao i njen derivat, takođe mogu izazvati pad krvnog pritiska i poboljšanje vaskularnog zdravlja povećanjem biorasploživosti azot oksida (NO) i poboljšanjem endotelne funkcije arterijskih krvnih sudova (Mubaraka i sar. 2012; Zhao i sar. 2012).

## **6.2. Sadržaj ukupnih fenola, antocijana i proantocijanidina u liofilizovanom ekstraktu aronije**

Količina ukupnih fenola, antocijana i proantocijanidina u liofilizovanom ekstraktu koji se koristio u *in vivo* studiji bila je: 55.2 mg GAE/g, 62.0 mg cijanidin-3-*O*-glukozida/g, 23.4 mg katehina/g liofilizovanog ekstrakta, respektivno, što je prikazano u Tabeli 8. Dobijeni rezultati za ekstrakt suvog ploda aronije su u saglasnosti sa sastavom i količinom polifenola u već pomenutom komercijalno dostupnom ekstraktu Aronox (100 mg), čiji je sadržaj 50 mg za ukupne fenole i 20 mg za ukupne antocijane, a koji je korišćen u više humanih kao i studija na životinjama (Duchnovicz i sar. 2012; Sikora i sar. 2014).

### 6.3. FRAP i ABTS aktivnost liofilizovanog ekstrakta

Antioksidativni potencijal liofilizovanog ekstrakta suvog ploda aronije je određen merenjem antiradikalske aktivnosti uz pomoć FRAP i ABTS testova. Rezultati su prikazani na Slici 48 A i 48 B. Na osnovu rezultata dobijenih pomoću ABTS testa, ekstrakt je pokazao nisku antiradikalsku aktivnost. U poređenju sa komercijalnim antioksidansima, vitaminom C i BHT, antiradikalska aktivnost ekstrakta je bila statistički značajno manja, posebno u poređenju sa vitaminom C ( $p < 0.001$ ), što se vidi na Slici 48 B. Suprotno od rezultata dobijenih uz pomoć ABTS testa, antiradikalska aktivnost ekstrakta određena FRAP metodom je bila veća u poređenju sa BHT, ali i dalje mnogo manja u odnosu na antiradikalsku aktivnost vitamina C (Slika 48 A). Antioksidativni potencijal ploda aronije, ekstrakata, kao i sokova je takođe objavljen od strane Rugina i sar. 2012 i Kulling i Ravel, 2008.



**Slika 48.** FRAP i ABTS liofilizovanog ekstrakta koji se koristio u *in vivo* studiji kod SHR.

\*\*\*statistička značajnost između liofilizovanog ekstrakta aronije i vitamina C,  $p < 0.001$ .

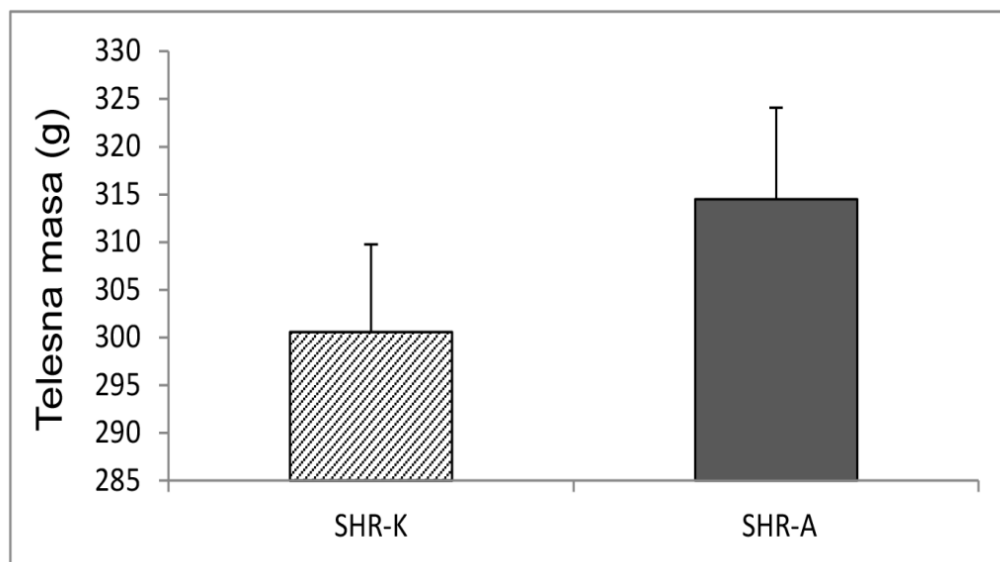
### statistička značajnost između liofilizovanog ekstrakta aronije i BHT,  $p < 0.001$ .

U daljem toku istraživanja ispitivan je efekat četvoronedeljnog konzumiranja liofilizovanog ekstrakta aronije na sistemske i regionalne hemodinamske parametre, lipidni status i oksidativni stres u modelu esencijalne hipertenzije.

#### 6.4. Uticaj primene ekstrakta aronije na diurezu, dnevni unos vode i telesnu masu

Najpre su ispitivani uticaji ekstrakta na telesnu masu, diurezu i dnevni unos vode, što je prikazano na Slikama 49 i 50.

Telesna masa (Slika 49) kao i dnevni unos vode (Slika 50) grupe koja je tretirana ekstraktom (SHR-A) nisu pokazale značajnu razliku u poređenju sa kontrolnom grupom (SHR-K).



Slika 49. Uticaj primene ekstrakta suvog ploda aronije na telesnu masu kod SHR, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt.

Telesna masa u grupi tretiranoj ekstraktom bila je nepromenjena u odnosu na kontrolnu grupu. Ovi rezultati su u skladu sa brojnim ranijim istraživanjima koja su pokazala da konzumacija različitih proizvoda aronije (sokovi, ekstrakti) nije pokazala uticaj na telesnu masu (Shindo i sar. 2007; Kardum i sar. 2015; Kardum i sar. 2014; Šavikin i sar. 2013; Broncel i sar. 2010; Sikora i sar. 2014). Shindo i sar. 2007 su pokazali u svojoj studiji da

ishrana bogata antocijanima nije dovela do promena u telesnoj težini, niti dnevnom unosu hrane kod odraslih spontano hipertenzivnih pacova.

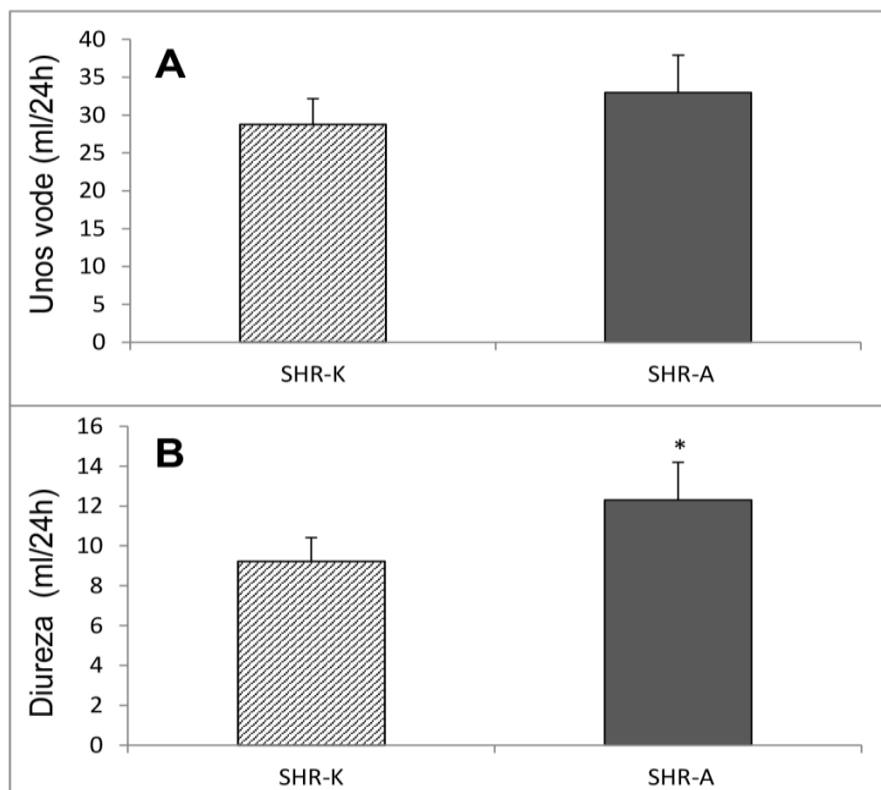
Slični rezultati su dobijeni i u humanim studijama. Zdravi volonteri, sa visokim normalnim krvnim pritiskom ili hipertenzijom prvog reda, a farmakološki netretiranom, konzumirali su 200 ml soka aronije dnevno u studiji objavljenoj od strane Kardum i sar. 2015. Na kraju ispitivanja, telesne mase ispitanika su bile neznatno promenjene nakon 4 nedelje konzumacije soka poređenjem sa bazalim vrednostima pre početka studije.

Isti autori (Kardum i sar. 2014) su u drugoj studiji pokazali da sok aronije, čak i nakon dugotrajnog konzumiranja (12 nedelja) nije uticao na promenu telesne mase kod zdravih žena.

Šavikin i sar. 2013. takođe nisu zapazili promene u telesnoj težini pre i posle tretmana sokom aronije u dugoročnom ispitivanju (90 dana) efekta soka aronije na morfologiju kože i celulit kod zdravih žena.

Primena komercijalnog ekstrakta aronije, Aronox u trajanju od 1 i 2 meseca nije promenila telesnu masu zdravih volontera i pacijenata sa metaboličkim sindromom, u studijama koje su objavili Broncel i sar. 2010. i Sikora i sar. 2014.

Sve ove prethodno pomenute studije, a povezane sa rezultatima ovog istraživanja su pokazali da ekstrakt aronije ne utiče na promene telesne težine kod ljudi i životinja sa normalnim telesnim statusom.



Slika 50. Efekat konzumacije liofilizovanog ekstrakta suvog ploda aronije na dnevni unos vode (A) i diurezu (B) kod spontano hipertenzivnih pacova, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt.

\* statistička značajnost između grupa  $p < 0.05$ .

Primena liofilizovanog ekstrakta aronije značajno je uticala na povećanje diureze (Slika 50) u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p < 0.05$ ). Istovremeno, iako je diureza bila povećana, četvoronedeljni tretman nije značajno uticao na dnevni unos vode (Slika 50). O povećanju diureze nakon hronične primene ekstrakta, kao i njenom uticaju na hemodinamske parametre, biće više reči u narednom poglavlju.

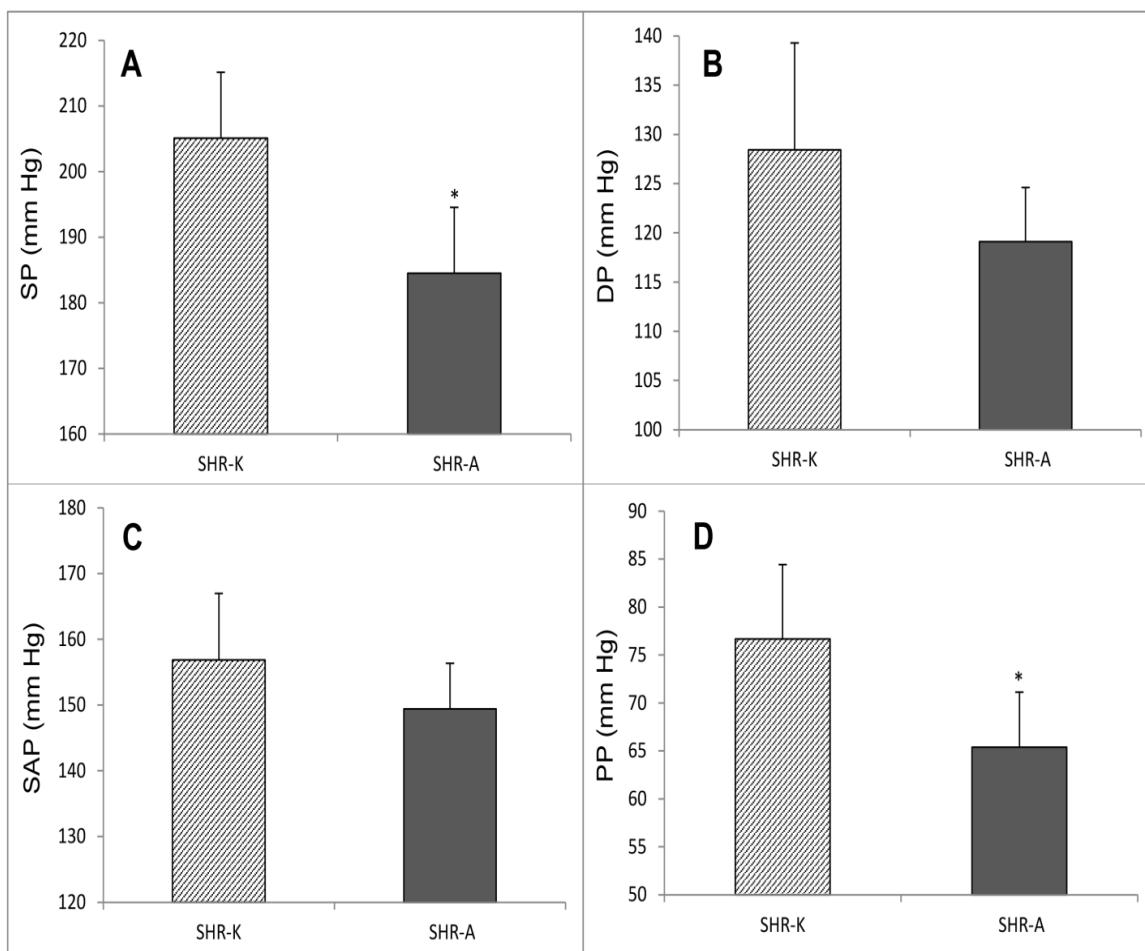
U ovoj studiji, ispitivani su takođe i efekti liofilizovanog ekstrakta aronije na masu izolovanih organa, jetre i bubrega. Četvoronedeljni tretman ekstraktom aronije nije uticao na promenu mase jetre i bubrega (SHR-K:  $10.49 \pm 0.5$  g, u poređenju sa tretiranom SHR-A grupom  $10.79 \pm 0.80$  g za jetru; SHR-K:  $2.10 \pm 0.16$  g, u poređenju sa SHR-A grupom  $2.177$



$\pm 0.19$  g za bubrege). Park i Park su takođe 2011. pokazali da primena komercijalno dostupnog ekstrakta aronije Aronox nije uticala na promenu bubrežne mase.

### 6.5. Delovanje ekstrakta aronije na sistemske i regionalne hemodinamske parametre

Ispitivanje sistemskih hemodinamskih parametara prikazano je na Slici 51.



Slika 51. Uticaj ekstrakta aronije na sistemske hemodinamske parametre (A) sistolni arterijski pritisak, (B) dijastolni arterijski pritisak, (C) srednji arterijski pritisak, (D) pulsni pritisak u eksperimentarnim grupama, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt.

\*statistička značajnost između grupa  $p < 0.05$ .

Hronični tretman ekstraktom aronije smanjio je sistolni arterijski pritisak-SP, dijastolni arterijski pritisak-DP i srednji arterijski pritisak-SAP kod spontano hipertenzivnih pacova. Statistička značajnost zabeležena je samo u slučajevima sistolnog pritiska (SHR-K:  $205.1 \pm 20.5$  mm Hg za kontrolnu grupu, u poređenju sa SHR-A:  $184.5 \pm 10.09$  mm Hg,  $p < 0.05$ ) i pulsog pritiska (SHR-K:  $76.66 \pm 7.76$  mm Hg za kontrolnu grupu, u poređenju sa SHR-A:  $65.40 \pm 5.72$  mm Hg,  $p < 0.05$ ) (Slika 51).

Slične rezultate uticaja komercijalnog ekstrakta aronije, Aronox na sniženje sistolnog pritiska dobili su Park i Park, 2011. Za obe primenjene doze ekstrakta, veću i manju (100 i 200 mg/kg) nije primećen dozno zavisani uticaj na sniženje sistolnog pritiska ( $202.2 \pm 10.2$  mm Hg u grupi koja je primala manju dozu,  $202.0 \pm 12.6$  mm Hg u grupi koja je primala veću dozu, u odnosu na kontrolnu grupu  $224.4 \pm 12.6$  mm Hg). Isti autori su takođe pokazali da je komercijalno dostupni antihipertenziv, amlodipin smanjio sistolni krvni pritisak kod spontano hipertenzivnih pacova slično kao i jednomesečni tretman liofilizovanim ekstraktom aronije u ovoj studiji.

Statistički značajno smanjenje sistolnog pritiska i smanjenje dijastolnog pritiska bez statističke značajnosti, primenom Aronox (100 mg) u humanoj studiji na pacijentima sa metaboličkim sindromom pokazali su Sikora i sar. 2014. Hellstrom i sar. 2010. su u svojoj studiji opisali efekte liofilizovanog soka aronije i kombinacije polifenola na modelu spontano hipertenzivnih pacova, u poređenju sa negativnom kontrolnom grupom koja je tretirana skrobom i pozitivnom kontrolnom grupom koja je primala komercijalni ACE (inhibitor angiotenzin konvertujućeg enzima) antihipertenziv, Enalapril. Smanjenje sistolnog pritiska je bilo evidentno u oba slučaja, ali značajnije u grupi koja je tretirana sokom aronije nego u grupi koja je primala kombinaciju polifenola. Objašnjenje za ovaj fenomen, najverovatnije leži u činjenici da sok aronije, kao i neprečišćeni ekstrakt u našoj studiji, ima pored glavnodelujućih aktivnih principa, polifenola i druga jedinjenja (flavonoide, vitamine, minerale) koji takođe mogu uticati na sniženje krvnog pritiska, nezavisno ili sinergistički sa polifenolima. Komercijalni ekstrakt Aronox je pokazao značajan uticaj na smanjenje sistolnog pritiska u studiji na normotenzivnim *Wistar* pacovima objavljenoj od strane Broncel i sar. 2010. Mihailović-Stanojević i sar. 2013. su pokazali da ekstrakt majčine dušice (*Thymus serpyllum*), bogat polifenolima, takođe može značajno smanjiti sistolni pritisak, zbog jake vazodilatacije nezavisne od azot-monoksida.

U studiji objavljenoj od strane Ciocoiu i sar. 2013. upotreba suvog etanolnog ekstrakta aronije značajno je smanjila sistolni i dijastolni pritisak kod *Wistar* pacova sa L-NAME indukovanom hipertenzijom, što se pripisuje snažnom kapacitetu ekstrahovanih polifenola da smanje produkciju ROS *in vivo*. Mnoge druge studije, kako humane tako i na pacovima takođe su pokazale sniženje sistolnog arterijskog pritiska primenom polifenola i flavonoida (Erlund i sar. 2008; Deiblot i sar. 2001; Mihailović-Stanojević i sar. 2016; Kardum i sar. 2015).

Hronični tretman liofilizovanim ekstraktom aronije je doveo do statistički neznačajnog smanjenja dijastolnog pritiska, srednjeg arterijskog pritiska (Slika 51), srčane frekvence, minutnog volumena i ukupnog perifernog otpora (Tabela 9).

**Tabela 9.** Efekat četvoronedeljnog konzumiranja liofilizovanog ekstrakta aronije na sistemske i regionalne hemodinamske parametre kod spontano hipertenzivnih pacova (SHR), gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt.

	SHR-K	SHR-A
Frekvencija rada srca (bpm)	400.33 ± 11.26	391.4 ± 21.38
Minutni volumen*	200.79 ± 24.71	209.1 ± 37.7
Ukupni periferni otpor**	0.96 ± 0.13	0.98 ± 0.12
Protok krvi kroz karotidnu arteriju*	14.69 ± 3.72	14.64 ± 4.82
Otpor kroz karotidnu arteriju**	13.13 ± 3.21	14.16 ± 4.22
Protok krvi kroz aortu*	107.38 ± 31.69	91.43 ± 24.6
Otpor kroz aortu**	1.67 ± 0.43	1.81 ± 0.63
Protok krvi kroz bubrežnu arteriju*	19.74 ± 8.93	16.01 ± 4.89
Otpor kroz bubrežnu arteriju**	10.56 ± 5.20	11.65 ± 5.05

\* ml/min/kg

\*\*mmHg x min x kg/ml

Primena ekstrakta nije uticala na hemodinamske parametre karotidne i renalne arterije, kao ni aorte (Tabela 9).

U ovom istraživanju, pokazano je da je primena ekstrakta aronije značajno povećala diurezu (9.25 ml/dnevno za kontrolnu grupu i 12.30 ml/dnevno za grupu tretiranu ekstraktom, diureza se povećala za oko 32.97%) (Slika 50), ali povećanje diureze nije uticalo na sistemske i regionalne protoke kao ni na otpor kroz krvne sudove.

Upravo povećana diureza može biti objašnjenje mehanizma delovanja ekstrakta aronije na pad sistolnog pritiska kod spontano hipertenzivnih pacova, jer je pokazano da ekstrakt nema efekta na regionalne hemodinamske parametre i dijastolni pritisak, i nije doveo do značajne vazodilatacije u krvnim sudovima.

Mnoge naučne studije do sada su razmatrale potencijalni mehanizam dejstva aronije na pad krvog pritiska.

Sikora i sar. 2014. su objavili studiju u kojoj je ispitivani ekstrakt aronije pokazao slabu inhibiciju angiotenzin konvertujućeg enzima-ACE, koji je uključen u regulaciji krvnog pritiska. Hellstrom i sar. 2010. su takođe pokazali nisku ACE inhibitornu aktivnost liofilizovanog soka aronije u *in vitro* uslovima. Oni su sugerisali da polifenoli aronije mogu uticati na povećanu produkciju endotelnog NO i da bi to mogao biti potencijalni mehanizam delovanja jedinjenja aronije. S druge strane, Broncel i sar. 2010. su sugerisali da je sniženje krvnog pritiska konzumacijom aronije povezano sa smanjenjem serumskog endotelina-1.

Na osnovu dosadašnjih literaturnih podataka, diureza kao mogući mehanizam hipotenzivnog delovanja ekstrakta aronije nije poznata, ali neki podaci ukazuju na to da sok aronije pokazuje blagi diuretički efekat zahvaljujući prisustvu kalijuma (Chrubasik i sar. 2010). Određivanje kalijuma u ekstraktu, kao ni praćenje njegove koncentracije u plazmi nije bilo predmet ove teze, ali uzimajući u obzir da je ranije pokazano da primena kalijuma može da utiče na smanjenje krvnog pritiska kod ljudi i pacova (Smith i sar. 1992), moglo bi se pretpostaviti da je kalijum, barem delimično, odgovoran za diuretički efekat liofilizovanog ekstrakta aronije korišćenog u ovoj studiji.

Povećana diureza, sa svoje strane dovela je do smanjenja volumena ukupne cirkulišuće tečnosti, što je imalo za posledicu sniženje sistolnog krvnog pritiska.

Potencijalni diuretski efekat pojedinačnih antocijana ili hlorogene kiseline, dominantno zastupljenih jedinjenja u ekstraktu aronije opisan je od strane Jimenez-Ferrer i sar. 2012 i Vidlar i sar. 2010. Četvoronedeljni tretman ekstraktom aronije je povećao diurezu ali nije pokazao uticaj na dnevni unos vode, što rezultira u smanjenju cirkulišućeg volumena tečnosti ali bez ugrožavanja hemodinamske ravnoteže.

Povećanje pulsog pritiska-PP je nezavisan faktor rizika za progresiju kardiovaskularnih oboljenja, pa je i ovaj parametar ispitivan. Hroničnom upotrebom ekstrakta aronije postignuto je statistički značajno smanjenje pulsog pritiska u SHR-A grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (SHR-K:  $76.66 \pm 7.76$  mm Hg za kontrolnu grupu u poređenju sa SHR-A:  $65.4 \pm 5.72$  mm Hg za grupu koja je primala ekstrakt,  $p < 0.05$ ) (Slika 51), čime se smanjuje rizik od kardiovaskularnih komplikacija kod ovog modela hipertenzije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima od strane Kardum i sar. 2015. gde je 24-časovni pulsni pritisak bio značajno smanjen u odgovoru na tretman sokom aronije.

S druge strane, četvoronedeljna upotreba ekstrakta aronije nije pokazala uticaj na frekvencu rada srca (Tabela 9), a slični rezultati dobijeni su i u drugim istraživanjima. Studije na mužjacima *Wistar* pacova tretiranih ekstraktom *Crataegus aronia* (Shatoor, 2013), kao i na SHR koji su primali liofilizovan sok aronije ili kombinaciju polifenola aronije (Hellstrom i sar. 2010) pokazale su da nije bilo značajnih promena u frekvenci rada srca u poređenju sa kontrolnim grupama. Dosadašnji literaturni podaci o uticaju aronije ili drugih polifenolima bogatih biljka na srčanu frekvencu i delovanju na autonomni nervni sistem su veoma oskudni.

Na osnovu iznetih rezultata može se pretpostaviti da sniženje sistolnog i pulsog pritiska kod SHR nakon tretmana ekstraktom u trajanju od 4 nedelje, može biti pripisano visokom sadržaju antocijana, dominantnih jedinjenja u ekstraktu aronije, a naročito cijanidin-3-O-galaktozida. I visoko zastupljenja hlorogena kiselina, kao i njeni derivati značajno doprinose

snižanju krvnog pritiska i poboljšanju endotelne funkcije arterijskih krvnih sudova povećanjem bioraspoloživosti azot-monoksida (Mubarakisar 2012; Zhao i sar. 2012).

### **6.6. Ispitivanje uticaja ekstrakta aronije na biohemijske parametare**

U Tabeli 10. sumirani su efekti ekstrakta aronije na biohemijske parametre kod spontano hipertenzivnih pacova nakon četiri nedelje tretmana.

Funkcija bubrega kod SHR je poboljšana nakon hronične konzumacije liofilizovanog ekstrakta aronije. Glomerulska filtracija-GFR, procenjena kroz klirens endogenog kreatinina je bila gotovo značajno veća u grupi tretiranoj ekstraktom u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0.059$ ). Pored toga, odnos proteina i kreatinina u urinu je bio značajno smanjen u tretiranoj grupi u poređenju sa kontrolnom ( $p<0.01$ ), što takođe doprinosi poboljšanju bubrežne funkcije.

U ovoj studiji, ekstrakt aronije nije izazvao značajnu promenu endogenih antioksidanasa, mokraćne kiseline i bilirubina (Tabela 10). Mokraćna kiselina, krajnji proizvod u metabolizmu purina, dobar je sakupljač peroksinitrita i prirodni je antioksidans.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da neželjeni i štetni efekti ova dva parametra nisu uočeni u eksperimentalnoj grupi tretiranoj ekstraktom aronije, ali takođe nisu pokazali ni antioksidativno dejstvo.

Broncel i sar. 2010. su takođe pokazali nepromenjen nivo mokraćne kiseline merenjem bazalnih vrednosti nakon 1 i 2 meseca tretmana ekstraktom aronije u humanoj studiji na zdravim dobrovoljcima i pacijentima sa metaboličkim sindromom.

Primena ekstrakta nije značajno modifikovala nivo ukupnog holesterola, HDL, LDL, triglicerida, glukoze, fosfata, kalcijuma ili nivo magnezijuma u plazmi, a takođe nije uticala ni na nivoe endogenih antioksidansa, bilirubina i mokraćne kiseline.

Primećeno je značajno povećanje koncentracije gvožđa u plazmi tretirane grupe ( $p<0.05$ ), uz istovremeno smanjenje kapaciteta vezivanja nezasićenog gvožđa u tretiranoj grupi u

odnosu na kontrolnu ( $p < 0.05$ ), tako da je ukupna količina gvožđa koja može da se veže za transferin ostala nepromenjena.

<b>Tabela 10.</b> Efekat ekstrakta aronije na biohemijske parameter kod spontano hipertenzivnih pacova (SHR)		
	SHR-K	SHR-A
Klirens kreatinina (ml/min/kg)	2.34 ± 0.85	2.89 ± 0.57
Klirens uree (ml/min/kg)	2.73 ± 0.84	2.82 ± 1.38
<b>u-Proteini/kreatinin (g/g)</b>	<b>3.54 ± 1.05</b>	<b>2.38 ± 0.62<sup>**</sup></b>
p-Fosfati (mmol/l)	1.81 ± 0.42	1.77 ± 0.17
p-Kalcijum (mmol/l)	2.18 ± 0.17	2.09 ± 0.51
p-Magnezijum (mmol/l)	0.85 ± 0.07	0.89 ± 0.11
p-Holesterol (mmol/l)	0.98 ± 0.09	0.97 ± 0.08
p-HDL ( mmol/l)	0.70 ± 0.05	0.66 ± 0.06
p-Trigliceridi (mmol/l)	0.29 ± 0.05	0.28 ± 0.06
p-LDL ( mmol/l)	0.14 ± 0.06	0.17 ± 0.07
p-Glukoza (mmol/l)	14.59 ± 3.18	14.68 ± 4.20
p-Mokraćna kiselina (μmol/l)	72.32 ± 27.54	72.54 ± 33.66
p-Bilirubin (μmol/l)	0.79 ± 0.51	1.42 ± 0.17
<b>p-Gvožđe (μmol/l)</b>	<b>26.5 ± 6.10</b>	<b>33.23 ± 7.58<sup>*</sup></b>
p-Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (μmol/l)	74.83 ± 27.24	80.81 ± 7.57
<b>p-Kapacitet vezivanja nezasićenog gvožđa (μmol/l)</b>	<b>56.06 ± 10.77</b>	<b>49.02 ± 4.69<sup>*</sup></b>

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  označavaju značajne razlike između kontrolne (SHR-K) i tretirane (SHR-A) grupe

### Uticaj primene ekstrakta na lipidni status

Hronična *in vivo* studija gde je primenjivan liofilizovani ekstrakt aronije nije pokazala povećanje nivoa HDL, ali nije uticala ni na promenu nivoa ukupnog holesterola, LDL i kao ni triglicerida u plazmi (Tabela 10).

Ranije je pokazano da tretman antocijanima pored prevencije hipertenzije, srčane hipertrofije, kao i stvaranja ROS, takođe može uticati i na insulinsku rezistenciju i hipertrigliceridemiju (Al-Awwadiet i sar. 2005).

Treba naglasiti da su životinje koje su korišćene u ovoj *in vivo* studiji urođeno hipertenzivne, ali normalnog lipidnog statusa. Ovom hroničnom studijom je potvrđeno da upotreba liofilizovanog ekstrakta aronije ne remeti normalni lipidni status. U protivnom ovo bi uticalo na fiziološki nivo masti u organizmu, što bi se posledično odrazilo na strukturu fosfolipidnih membrana i funkcionisanje mnogobrojnih procesa i mehanizama u organizmu (Al-Awwadiet i sar. 2005).

Slični rezultati su objavljeni u nekoliko različitih studija na ljudima koji su konzumirali sok aronije (Kardum i sar. 2015; Kardum i sar. 2014; Šavikin i sar. 2013).

### Uticaj primene ekstrakta aronije na glikemiju

Nivo glukoze nije bio značajno promenjen u grupi koja je dobijala liofilizovani ekstrakt aronije u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 10). U obe grupe nivo glukoze je bio u skladu sa vrednostima dobijenim u studiji Braslasu i sar. 2007., koji su objasnili fenomen hiperglikemije uzrokovane opštom anestezijom u studiji na mužjacima i ženkama *Wistar* pacova, koji su bili tretirani ksilazinom i ketaminom kao anesticima.

Hroničnom primenom komercijalnog ekstrakta Aronox nije se promenio nivo glukoze u krvi ispitanika u istraživanju objavljenom od strane Broncel i sar. 2010. uz obrazloženje da polifenoli nemaju značajan uticaj na smanjenje nivoa glukoze kod pacijenata sa odsustvom dijabetesa tipa 2.



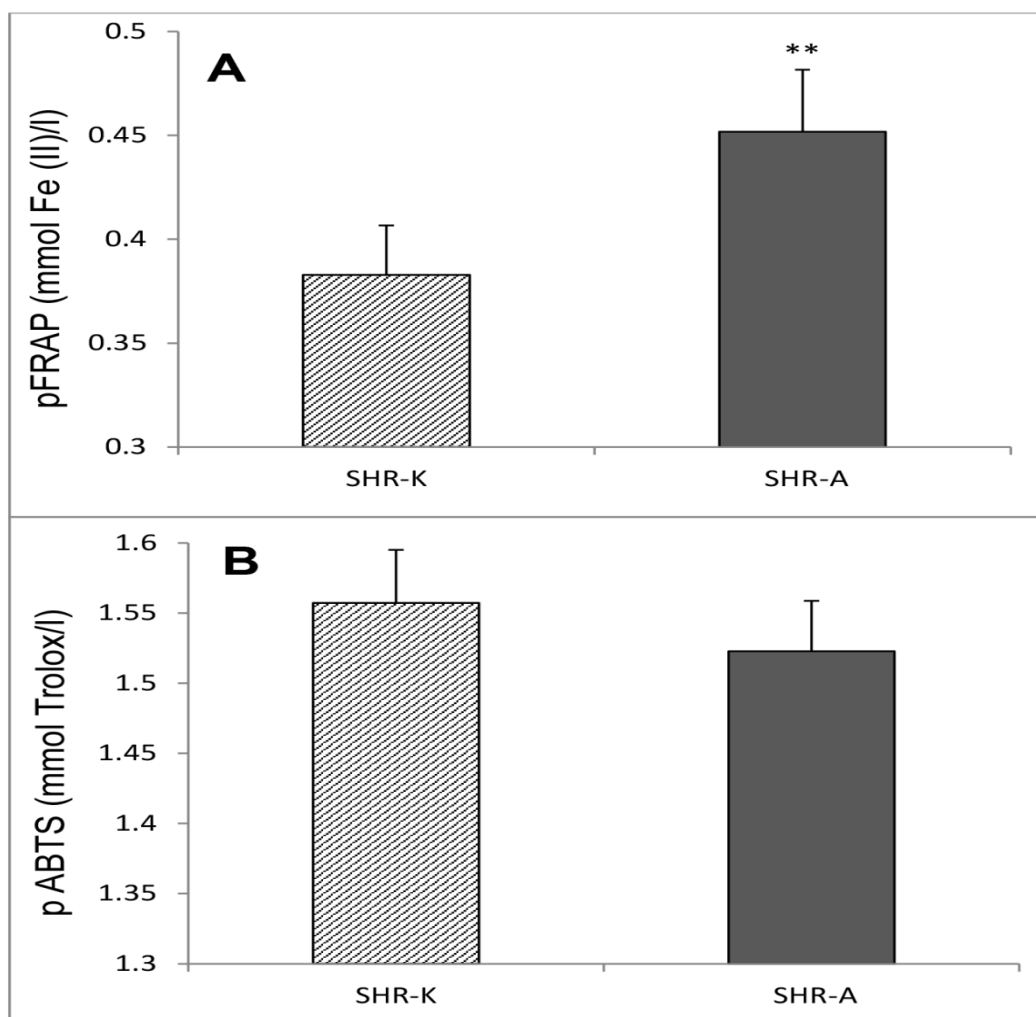
### **6.7. Ispitivanje uticaja ekstrakta aronije na antioksidantni kapacitet i redukujući potencijal plazme**

Efekti ekstrakta aronije na FRAP i ABTS u plazmi, su prikazani na Slici 52. Hronična upotreba ekstrakta aronije je značajno povećala FRAP aktivnost u plazmi u tretiranoj grupi kod spontano hipertenzivnih pacova ( $p < 0.01$ ), dok s druge strane nije uticala na aktivnost ABTS u plazmi (Slika 52).

Primenom liofilizovanog ekstrakta aronije i povećanjem FRAP aktivnosti u plazmi, smanjuje se osetljivost plazme SHR prema lipidnoj peroksidaciji, koja ima uticaj na krvni pritisak. Gvožđe ima sposobnost da katalizuje oksidaciju proteina i lipida (De Camargo i sar. 2014).

Zapravo, fenolna jedinjenja identifikovana u etanolnom ekstraktu aronije su pokazala antioksidativno dejstvo, a hlorogena kiselina, kvercetin, kao i derivati cijanidina su efikasni skupljači slobodnih radikala hvatači i helatori gvožđa koji mogu biti odgovorni za inhibiciju lipidne peroksidacije što su objasnili i Ciocoui i sar. 2013.

Ekstrakt suvog ploda aronije može povećati antioksidativni kapacitet plazme i smanjiti osetljivosti plazme prema lipidnoj peroksidacijikod spontano hipertenzivnih pacova, što je važno za snižavanje krvnog pritiska i sprečavanje nastanka aterosklerotskog procesa.

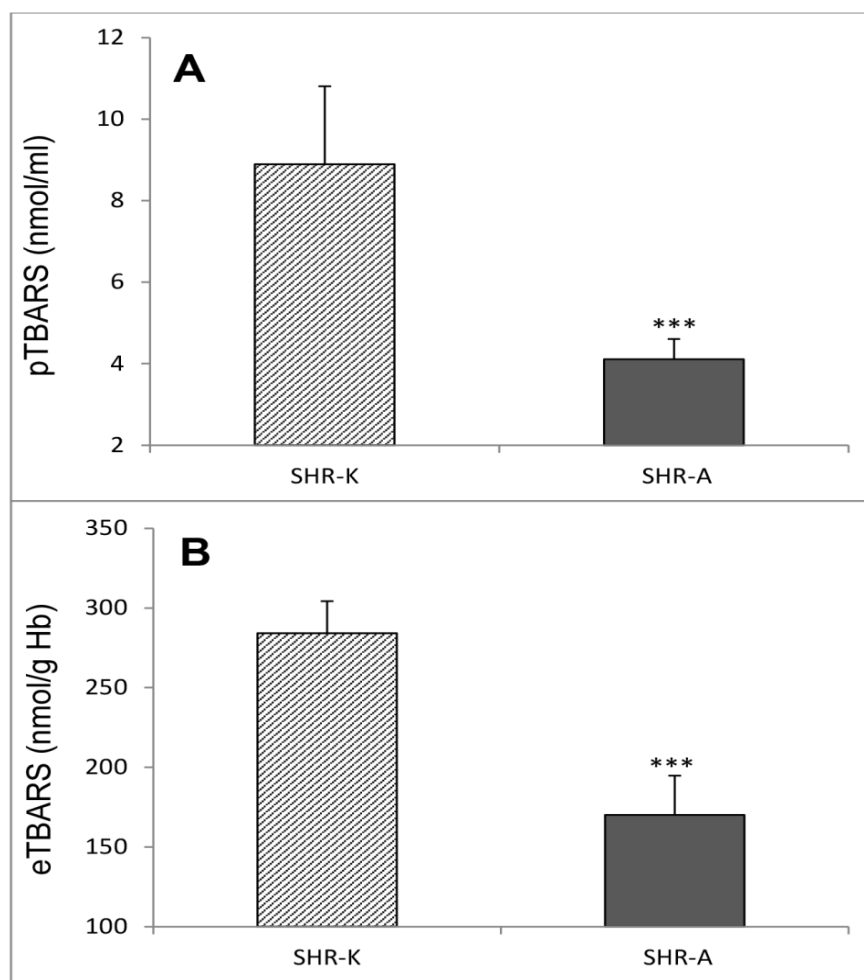


Slika 52. FRAP i ABTS aktivnosti u plazmi, nakon primene liofilizovanog ekstrakta aronije, \*\* $p < 0.01$  statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt aronije.

### 6.8. Uticaj ekstrakta aronije na smanjenje lipidne peroksidacije

Efekti primene liofilizovanog ekstrakta aronije na markere oksidativnog stresa, TBARS u plazmi i eritrocitima su prikazani na Slici 53.

Četvoronedeljni tretman ekstraktom aronije doveo je do statistički značajnog smanjenja TBARS i u plazmi i u eritrocitima ( $p < 0.001$ ) kod spontano hipertenzivnih pacova, što je posledica smanjenog oksidativnog stresa.



Slika 53. Efekti četvoronedeljnog tretmana liofilizovanim ekstraktom aronije na TBARS u (A) plazmi, (B) eritrocitima kod SHR, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt.

\*\*\* $p < 0.001$  statistički značajna razlika među grupama.

Duchnowicz i sar. 2012. su objavili slične rezultate sa eTBARS-om i pokazali da je upotreba komercijalnog ekstrakta aronije, Aronox-a smanjila lipidnu peroksidaciju za oko 40% u eritrocitima dobrovoljaca sa hiperholesterolemijom, a ovo smanjenje može biti povezano sa povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima. U studiji na ljudima, objavljenoj od strane Broncel i sar. 2010, TBARS u eritrocitima je takođe bila smanjena

posle 1 i 2 meseca primene Aronox-a kod pacijenata sa dijagnostikovanim metaboličkim sindromom.

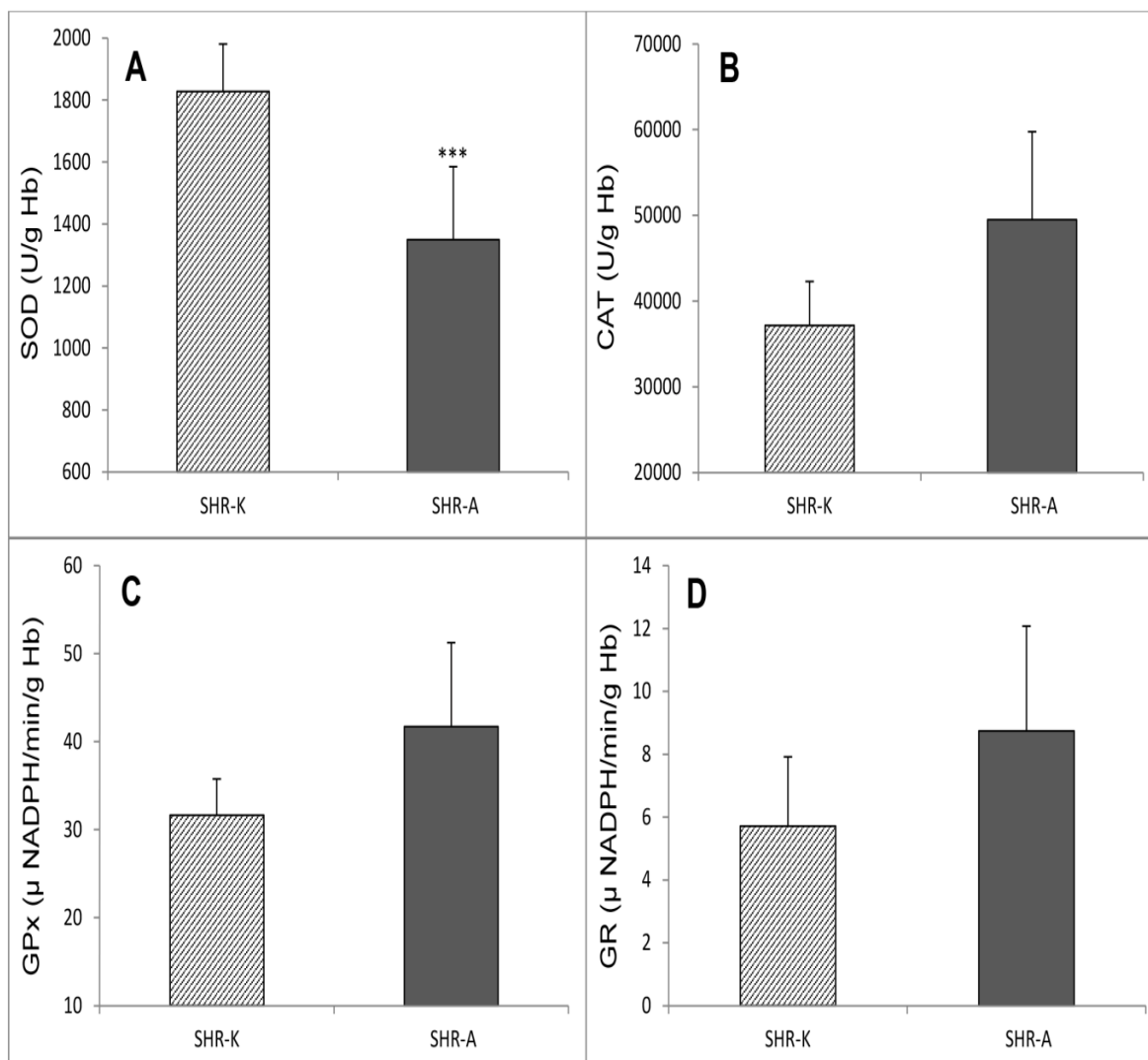
Nakon ovog istraživanja, prepostavili smo da smanjenje TBARS u plazmi i eritrocitima, kao rezultat smanjene lipidne peroksidacije nakon tretmana liofilizovanim ekstraktom aronije, takođe bi mogla biti jedna od hipoteza za mogući razlog pada krvnog pritiska kod SHR.

Ciocoiu i sar. 2013 su u svojoj studiji pokazali da etanolni ekstrakt aronije imao mogućnost da smanji endotelnu disfunkciju i poboljša antioksidativni kapacitet plazme i smanji oksidativni stres kod SHR.

### **6.9. Ispitivanje uticaja ekstrakta aronije na enzime antioksidativne zaštite**

Efekti hronične primene ekstrakta aronije na aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, SOD, CAT, GP<sub>x</sub> i GR kod spontano hipertenzivnih pacova su prikazani na Slici 54.

Ekstrakt aronije je značajno smanjio SOD aktivnost u tretiranoj grupi u poređenju sa kontrolnom ( $p < 0.01$ ), što je prikazano na Slici 54 A, bez statistički značajnih promena u GP<sub>x</sub> i GR aktivnostima (Slike 54 C i D). Iako, CAT aktivnost nije bila značajno promenjena u SHR-A grupi u odnosu na kontrolnu grupu ( $p = 0.06$ ) (Slika 54 D), primena ekstrakta aronije je ipak povećala njenu aktivnost za 33.27 %.



Slika 54. Uticaj hronične konzumacije ekstrakta aronije na aktivnost enzima antioksidativne zaštite (A) superoksid dismutaze-SOD, (B) katalaze-CAT, (C) glutation peroksidaze-GPx, (D) glutation reduktaze-GR u eksperimentalnim grupama, gde su SHR-K kontrolna grupa, a SHR-A grupa koja je primala ekstrakt.

\*\*\* $p < 0.001$  statistički značajna razlika među grupama.

Pokazano je da liofilizovani ekstrakt suvog ploda aronije ima visok sadržaj polifenolnih jedinjenja i antocijana, koji mogu poboljšati sistemski oksidativni status. U stanjima hroničnog oksidativnog stresa, aktivnost enzima antioksidativne zaštite je smanjena što može dovesti do pojave i razvoja aterogeneze i visokog krvnog pritiska.

U ovoj studiji, hronična upotreba ekstrakta aronije značajno je smanjila aktivnost SOD enzima (Slika 54 A), a blago povećala aktivnosti CAT, GP<sub>x</sub> i GR enzima, ali bez statističke značajnosti (Slike 54 B, C, D).

SOD i CAT predstavljaju dva glavna enzima antioksidativne zaštite u organizmu, koji mogu imati sinergistički efekat u zaštiti ćelije od oksidativnog stresa. Jedna od najviše opisanih i proučavanih karakteristika gotovo svakog polifenolnog jedinjenja je njihova mogućnost da deluju kao prirodni antioksidansi.

Polifenoli imaju sposobnost da smanje produkciju reaktivnih kiseoničnih jedinjenja, poput superoksidnog anjona ili drugih slobodnih radikala, doniranjem atoma vodonika ili elektrona iz mnogobrojnih polifenolih hidroksilnih grupa (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Kod SHR, kao odgovor na hiperprodukciju štetnog superoksidnog anjona, stvara se mehanizam samoodbrane i SOD aktivnost se povećava.

U ovoj studiji, pretpostavka je da su polifenoli iz ekstrakta aronije verovatno neutralisali (uklonili) superoksidni anjon i smanjili bioraspoloživost ovih kiseoničnih reaktivnih jedinjenja za dismutaciju SOD enzimom, što je posledično dovelo do smanjene SOD aktivnosti, verovatno mehanizmom negativne povratne sprege.

Pored toga, flavonoidi kao i hlorogena kiselina kojima je bogat ekstrakt aronije takođe imaju visoku efikasnost u uklanjanju slobodnih radikala (Ciocoui i sar. 2013).

S druge strane, statistični neznačajno povećanje CAT i GP<sub>x</sub> kod SHR, takođe enzima antioksidativne zaštite, može biti posledica smanjene produkcije toksičnog hidrogen peroksida kao rezultat uklonjenih i smanjenih superoksidnih anjona.

Noguer i sar. 2012. su takođe objavili da upotreba ekstrakta aronije, bogatog polifenolnim i antocijanskim jedinjenjima može da poboljša sistemski oksidativni status.

Broncel i sar. 2010. su primenom ekstrakta aronije u studiji na ljudima pokazali suprotne rezultate u poređenju sa onim u ovom istraživanju. U njihovoj studiji, CAT aktivnost je bila smanjena, a dok su SOD i GP<sub>x</sub> bile značajno povećane kod pacijenata sa metaboličkim sindromom nakon dvomesečne terapije komercijalnim ekstraktom Aronox, u dozi od 100 mg, tri puta dnevno.

U studiji objavljenoj od strane Morosanu i sar. 2011, GPx i SOD aktivnosti su bile povećane, naročito u grupi tretiranoj ekstraktom aronije u poređenju sa kontrolnom grupom (*Wistar* pacovi) i grupom koja je konzumirala ekstrakt zove.

Objedinjujući sve rezultate, krajnji cilj je bio dati uvid kako naučnoj javnosti, tako i farmaceutskom industrijskom sektoru o potencijalnoj primeni biljnog preparata za oralnu primenu čije će glavnodelujuće aktivne komponente biti jedinjenja iz ekstrakta aronije. Aktivni principi iz ploda aronije, polifenolna jedinjenja, a posebno derivati cijanidina su se pokazali kao efikasni u prevenciji kardiovaskularnih bolesti kao što su hipertenzija i ateroskleroza.

Na osnovu prethodnih rezultata, moguće je formulisati stabilan i standardizovan farmaceutski preparat u kome će biti maksimalno očuvana inače nestabilna jedinjenja ploda aronije kao što su antocijani, sa idejom šire primene ovih sistema kao suplemenata koji mogu ispoljavati pozitivne efekte na zdravlje ljudi, a posebno na kardiovaskularni sistem.

## 6. ZAKLJUČCI

Ispitivanja vezana za ovu doktorsku disertaciju obuhvatala su optimizaciju ekstrakcije polifenola iz suvog ploda biljne vrste *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, mikroinkapsulaciju ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenja raspršivanjem, kao i hemijsku i biološku karakterizaciju dobijenih ekstrakata i čestica. U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. U fazi optimizacije ekstrakcije polifenola, varirani su različiti parametri (5 stepena usitnjenosti droge, 4 različita rastvarača, 3 odnosa droga-rastvarač, 4 vremena ekstrakcije), i ispitivani su kao nezavisne promenljive uz primenu  $4 \times 3 \times 4 \times 5$  i  $2^4$  eksperimentalnih dizajnova. Među ispitivanim varijablama, vreme se nije pokazalo kao statistički značajan faktor koji utiče na ekstrakciju polifenola.
2.  $2^3$  eksperimentalnim dizajnom su se utvrdile optimalne vrednosti za svaki ispitivani faktor ali i moguće interakcije među variranim faktorima. Ekstrakt sa najvećom količinom aktivnih principa, ukupnih fenola (27.7 mg GAE/g suvog ploda) i antocijana (0.27%), dobijen je maceracijom sa 50% etanolom, 1:20 odnosom droga-rastvarač, 0.75 mm stepenom usitnjenosti droge, u trajanju od 60 minuta.
3. Dobijene količine aktivnih principa bile su u skladu sa predviđenim vrednostima, čime je pokazano da je primenjeni faktorijalni dizajn bio adekvatan model za ispitivanje optimizacije ekstrakcije.
4. Kvantitativna analiza individualnih polifenolnih jedinjenja je izvedena korišćenjem HPLC metode. Dominantni antocijani bili su cijanidin-3-*O*-galaktozid, cijanidin-3-*O*-arabinozid i cijanidin-3-*O*-glukozid, dok su među flavonoidnim jedinjenjima dominantno bili zastupljeni rutin, hiperozid i izokvercetin. HPLC analiza je potvrdila da se pod istim, odabranim ekstrakcionim uslovima postiže najveći prinos polifenolnih jedinjenja.



5. Korišćenje ultrazvučne metode za ekstrakciju suvog ploda aronije nije pokazalo veće prinose u vidu ekstrahovanih aktivnih principa. Rezultati su pokazali da je maceracija efektivna i jednostavna metoda za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije.
6. Ekstrakt sa najvećim sadržajem aktivnih principa, uspešno je inkapsuliran u odgovarajuće nosače dvema metodama mikroinkapsulacije, elektrostatičkom ekstruzijom i sušenjem raspršivanjem.
7. Čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom, korišćenjem alginata srednje viskoznosti, u koncentraciji 1.5%, uz dodatak inulina kao punioca (5%) i igle srednjeg dijametra (20) su pokazale najbolju efikasnost inkapsulacije i količinu *in vitro* oslobođenih polifenola.
8. Hidrogel čestice su bile pravilnog oblika, u rasponu veličina od 800 do 1340  $\mu\text{m}$ , u zavisnosti od tipa nosača i veličine igle. Nakon liofilizacije veličina čestica je redukovana za 18-24%.
9. Hidrogel čestice su sadržale 0.24 mg GAE/g inkapsuliranih polifenola i sa njima je postignuto produženo oslobađanje od 10 minuta, a 3.57 mg GAE/g polifenola je inkapsulirano u liofilizovane čestice sa kojima je oslobađanje produženo na čak 40 minuta.
10. SEM mikrografije su potvrdile da su čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom ujednačenih oblika, bez vidljivih oštećenja, kao i da je dodatak inulina kao punioca doprineo boljim karakteristikama čestica.
11. FTIR analiza je pokazala nekoliko relevantnih pikova u spektrima sistema u koje je inkapsuliran ekstrakt, bez vidljivih inkompatibilnosti i interakcija između nosača i ekstrakta.

12. Zbog produženog vremena oslobađanja polifenola, liofilizovane mikročestice izrađene elektrostatičkom ekstruzijom su pokazale najbolji potencijal kao sistemi za isporuku, pogodni za farmaceutsku upotrebu.
13. Iz mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem, aktivni principi su se oslobodili trenutno iz svih inkapsuliranih sistema. Najveća količina aktivnih principa, ukupnih fenola (2.168 mg GAE/g) i ukupnih antocijana (0.04%) oslobodila se iz arapske gume kao nosača.
14. Veličina mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem je bila u rasponu od 8.5 do 15.87  $\mu\text{m}$ , u zavisnosti od tipa nosača, čime je potvrđeno da je ova tehnika pogodna za proizvodnju malih i uniformih čestica, koje se mogu koristiti za oralnu primenu.
15. FTIR analiza je potvrdila da se ekstrakt može uspešno inkorporirati u mikročestice metodom sušenja raspršivanjem, da aktivni principi, a posebno antocijani ostaju očuvani, iako ova metoda zahteva relativno visoke temperature.
16. Četvoronedeljnom hroničnom primenom optimizovanog liofilizovanog ekstrakta dobijenog iz suvog ploda aronije značajno su redukovani sistolni i pulsni pritisak kod spontano hipertenzivnih pacova. Konzumacija ekstrakta nije značajno uticala na dijastolni pritisak, srednji arterijski pritisak, kao ni na regionalne hemodinamske parametre.
17. Četvoronedeljna primena ekstrakta aronije dovela je do povećanja FRAP aktivnosti plazme, dok je ABTS aktivnost ostala nepromenjena.
18. Ekstrakt aronije je značajno smanjio SOD aktivnost u eritrocitima SHR, što ukazuje na nizak nivo superoksidnih anjona u tretiranoj grupi SHR.
19. Četvoronedeljni tretman ekstraktom aronije doveo je do značajnog smanjenja lipidne peroksidacije u plazmi i eritrocitima SHR usled smanjenog oksidativnog stresa.

20. Značajna redukcija sistolnog krvnog pritiska najverovatnije je posledica smanjenog oksidativnog stresa, ali i povećane diureze koju je izazvala primena ekstrakta aronije.
  
21. Hronična primena ekstrakta nije uticala na nivo holesterola, HDL, LDL, TG i glukoze kod spontano hipertenzivnih pacova normalnog lipidnog statusa.
  
22. Na osnovu prethodno navedenih rezultata, može se zaključiti da hronična upotreba ekstrakta aronije može povoljno uticati na smanjenje rizika od kardiovaskularnih komplikacija u eksperimentalnom modelu esencijalne hipertenzije, što upućuje na potencijalnu primenu nje i njenih proizvoda kod ciljne grupe pacijenata.
  
23. Odabrani ekstrakt aronije je pogodan za izradu stabilnog i standardizovanog biljnog proizvoda, sa maksimalno očuvanom količinom aktivnih principa, koji se može koristiti kao blag antihipertenziv u početnim fazama bolesti ili kao dopuna konvencionalnoj terapiji.

## 7. LITERATURA

Abd El-Ghaffar M.A., Hashem M.S., El-Awady M.K., Rabie A.M. 2012. pH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release. *Carbohydr. Polym.* 89, 2, 667–675.

Agnihotri N., Mishra R., Goda C., Arora M. 2012. Microencapsulation—A Novel Approach in Drug Delivery: A Review, *Indo Glob. Jour. Pharmac Sci*, 2, 1, 1-20.

Aizpurua-Olaizola O., Navarro P., Vallejo A., Olivares M., Etxebarria N., Usobiaga A. 2016. Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food chem.* 190, 614-621.

Al-Awwadi N. A., Araiz C., Bornet A., Delbosc S., Cristol J. P., Linck N., Azay J., Teissedre P. L., Cros G. 2005. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *Jour. Agr. Food Chem.* 53, 1, 151-157.

Alsberg E., Kong H.J., Hirano Y., Smith M.K., Albeiruti A., Mooney D.J. 2003. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *Jour. Dent. Resear.* 82, 11, 903–908.

Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7915-7922.

Andersen O. M., Markham K. R. 2006. Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications, *CRC Press, Taylor & Francais Group*.

Bagchi D., Bagchi M., Stohs SJ., Das DK., Ray SD., Kuszynski CA., Joshi SS., Pruess HG. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148, 187–197.

Bagchi D., Bagchi M., Stohs S., Ray S.D., Sen C.K., Preuss H.G. 2000. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann NY Acad Sci*, 957, 260–270.

Bagchi D., Sen C.K., Ray S.D., Das D.K., Bagchi M., Preuss H.G., Vinson J.A. 2003. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mut Res*, 523–524, 87–97.

Balanč B., Kalušević A., Drvenica I., Coelho M.T., Djordjević V., Alves V.D., Sousa I., Moldao-Martins M., Rakić V., Nedović V., Bugarski B. 2016. Calcium-alginate-inulin microbeads as carrier for aqueous carqueja extract. *Jour. Food Sci.* 81, 1, 65–75.

Bakowska-Barczak A.M., Kolodziejczyk P.P. 2011. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Ind. Crops. Prod.* 34, 1301-1309.

Bautista Ortin A.B., Rodriguez–Rodriguez P., Gil Munoz R., Jimenez Pascual E., Busse Valverde N., Martinez Cutillas A., López Roca J.M., Gomez Plaza E. 2012. Influence of berry ripeness on concentration, qualitative composition and extractability of grape seed tannins. *Aust J Grape Wine R.* 18,123–30.

Beecher G. R.2004. Proanthocyanidins: Biological Activities Associated with Human Health. *Pharmaceutical Biology*, 42, 1,2-20.

Beirao-da-Costa S., Duarte C., Bourbon A.I., Pinheiro A.C., Janeiro M.I.N., Vicente A.A., Beirao-da-Costa M. L., Delgado I., 2013. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of *Oregano* essential oil. *Food Hydrocoll.* 33, 199-206.

Beliz H. D., Grosch W., Scheberle P. 2004. *Food Chemistry*, 3rd Edition, Springer, Verlag Berlin Heidelberg.

Belščak-Cvitanović A., Stojanović R., Manojlović V., Komes D., Cindrić-Juranović I., Nedović V., Bugarski B. 2011. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal

plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Resear. Inter.* 44, 1094-1101.

Beninger CW., Hosfield GL. 2003. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* seed coat color genotypes. *Jour. Agric Food Chem.* 51, 7879–7883.

Beutler E. 1982. Catalase In red cell metabolism, a manual of biochemical methods, 3rd Edition. Grune and Stratton, New York.

Bigović D. 2013. Karakterizacija suvih ekstrakata cvasti smilja *Helichrysum plicatum* DC. i ispitivanje njihove antioksidativne, citotoksične, spazmolitičke i antimikrobne aktivnosti. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet.

Bishayee A., Mbimbaa T., Thoppila JR., Haznagy-Radnaib E., Siposc P., Darvesha SA., Folkessond GH., Hohmann J. 2011. Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum* L.) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats. *Jour. Nutr. Biol.* 22, 1035–46.

Bors W., Foo LY., Hertkorn N., Michel C., Stettmaier K. 2001. Chemical studies of proanthocyanidins and hydrolysable tannins. *Antiox Redox Signal* 3, 995–1008.

Božin B., Mimica-Đukić N., Samojlik I., Jovin E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosmery and sage (*Rosmarius officialis* L. and *Salvia pfficinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Jour. Agric. Food. Chem.* 55, 7879-7885.

Braslasu E. D., Bradatan C., Cornila M., Savulescu I., Cojmaleata R., Braslasu M.C. 2007. Normal blood glucose in white wistar rat and its changes following anesthesia. *Lucrarai Stiintifice Medicina Veterinara*, vol. 40, 120-123.

Braunlich M., Slimestad R., Wangensteen H., Brede C., Malterud K., Barsett H. 2013. Extracts, Anthocyanins and Procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrien.5*, 663-678.

Bridle P., Timberlake C. F. 1997. Anthocyanins as natural food colours selected aspects, *Food Chem.* 58, 103-109.

Broncel M., Koziróg M., Duchnowicz P., Koter-Michalak M., Sokora J., Chojnowska Jezierska J. 2010. *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome, *Medical Science Monitor*, 16, 1, 28-34.

Burges D., Hickey A. 2007. Microsphere Technology and Applications. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 3rd edition, Swarbrick J, Ed. Informa Healthcare, New York, 2328-2338.

Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Bilić M. 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236-242.

Cacace J.E., Mazza G. 2003. Optimisation of extraction of anthocyanins from black currant with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68, 240-248.

Cerroni B., Chiessi E., Margheritelli S., Oddo L., Paradossi G. 2011. Polymer Shelled Microparticles for a Targeted Doxorubicin Delivery in Cancer Therapy. *Biomacromolecules*. 12, 593-601.

Chakraborti S., Chakraborti T., Mandal M., Mandal A., Das S., Ghosh S. 2002. Protective role of magnesium in cardiovascular diseases: a review. *Mol Cell Biochem*, 238, 1-2, 163-179.

Chang A. 2015. pH sensitive starch-g-poly(acrylic-acid)/sodium alginate hydrogels for controlled release of diclofenac sodium. *Iran. Polym. Jour.* 24, 161-169.

Chatterje D., Bhattacharjee P. 2015. Encapsulation of colour from peels of eggplant in calcium alginate matrix, characterization and food application, *Nutrafood.* 14, 87-96.

Ciocioiu M., Badescu L., Miron A., Badescu M. 2013. The involvement of a polyphenols rich extract of black chokeberry in oxidative stress on experimental arterial hypertension. *Evidence based Complementary and Alternative Medicine*, ID 912769, 8.

Cissé M., Bohuon P., Sambe F., Kane C., Sakho M. 2012. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, 109, 16-21.

Cho A.R., Chun Y.G., Kim B.K., Park D.J., 2014. Preparation of alginate–CaCl<sub>2</sub> microspheres as resveratrol carriers. *Jour. Mater. Sci.* 49, 13, 4612–4619.

Chrubasik C., Li G., Chrubasik S. 2010. The clinical effectiveness of chokeberry: a systematic review. *Phytother Res.* 24, 8, 1107-14.

Chun O.K., Chung S.J., Song W.O. 2007. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults, *Jour. Nutr.* 137, 1244–1252.

Cordoba A.L., Deladino L., Martino M. 2013. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants, *Carbohydr. Polym.* 95, 315– 323.

Croizer A., Del Rio D., Clifford M.N. 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds-Review, *Molecular Aspects of Medicine.* 31, 446-467



Ćujić N., Kundaković T., Šavikin K. 2013. Chemistry of anthocyanins, methods of isolation, identification, determination and the biological activity-A Review, *Lekovite sirovine*, 33, 19-37.

Ćujić N., Ibrić S., Bigović D., Noveski N., Šavikin K. 2015. Ispitivanje stabilnosti biljnih preparata. *Lekovite sirovine* 35, 53-60.

Ćujić N., Šavikin K., Janković T., Pljevljakušić D., Zdunić G., Ibrić S. 2016. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem.* 194, 135-142.

Ćujić N., Trifković K., Bugarski B., Ibrić S., Pljevljakušić D., Šavikin K. 2016. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. *Industrial crops and products*, 86, 120-131.

Čalija B. 2013. Funkcionalnost hitozana u formulaciji alginat-hitozan mikročestica kao nosača za nesteroidne antiinflamatorne lekove, Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

De Camargo A. C., Regitano-D'Arce M. A. B., Biasoto A. C. T., Shahidi F. 2014. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 50, 12159–12171.

Deladino L., Anbinder P.S., Navarro A.S., Martino M.N. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydr. Polym.* 71, 126-134.

Del Rio D., Borges G., Crozier A. 2010. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Br. Jour. Nutr.* 104, 67–90.

Denev P., Ciz M., Ambrozova G., Lojek A., Yanakieva I., Kratchanova M. 2010. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chem.* 123, 41055–41061.

Denev P., Kratchanov C.G., Ciz M., Lojek A M., Kratchanova M. 2012. Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: *in vitro* and *in vivo* evidences and possible mechanisms of action: a review, *Compr. Rev. Food Sci.* 11, 5, 471–489.

De Pascual T., Sanchez B.S. 2008. Anthocyanins, from plant to health, *Phytochem. Rev.* 7, 281–299.

Diebolt M., Bucher B., Andriantsitohaina R. 2001. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*, 38, 159–165.

Duchnowicz P., Nowicka A., Koter-Michalak M., Broncel M. 2012. *In vivo* influence of extract from *Aronia melanocarpa* on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia, *Medical Science Monitor*, 18, 9, 569-574.

Duthie S.J., Jenkinson AmcE, Crozier A. 2006. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur. Jour. Nutr.*, 45, 113–122.

Ebrahimi A., Schluesener H. 2012. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev.* 11, 329–45.

Erlund I., Koli R., Alfthan G., Marniemi J., Pukka P., Mustonen P., Mattila P., Jula A. 2008. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am Jour. Clin. Nutr.* 87, 323–331.

European Pharmacopoeia 6.0. 2008. Strasbourg Cedex, France: Council of Europe.

European Pharmacopoeia 9.0. 2017. Strasbourg Cedex, France: Council of Europe.

Fang Z., Bhandari B. 2010. Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends Food Tech.* 21, 510-523.

Flores F.P., Singh R.K., Kerr W.L., Pegg R.B., Kong F. 2014. Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion. *Food Chem.* 153, 272-278.

Galvan D'Alessandro L., Kriaa K., Nikov I., Dimitrov K., 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separ. Purif. Techn.* 93, 42-47.

Galvan D'Alessandro L., Dimitrov K., Vauchel P., Nikov I. 2014. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92, 1818-1826.

George P., Lyckman A., La Van D., Hegde A., Leung Y. 2005. Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics. *Biomaterials*, 26, 17, 3511–3519.

Gil M.I., Tomás-Barberán F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Jour. Agric Food Chem.* 48, 10, 4581-4589.

Glatzle D., Vuilleumier J. P., Weber F., Decker K. 1974. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia.* 30, 6, 665–667.

Gonzalez Gallego J., Garcia Mediavilla M.V., Sanchez Campos S., Tunon M.J. 2014. Antiinflammatory and immunomodulatory properties of dietary flavonoids. U: Watson R, Preedy VR, Zibadi S, Polyphenols in human health and disease Vol. 1. London: Elsevier. 435– 452.

Gonzales-Molina E., Moreno D.A., Garcia-Viguera C. 2008. Aronia-lemon juice: a new highly antioxidant beverage. *Jour. Agric Food Chem.*56, 11327-11333.

Gouin S. et al. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Technol.*15, 330–347.

Habauzit V., Milenkovic D., Morand C. 2014. Vascular protective effects of fruit polyphenols. Polyphenols in human health and disease, *London, Elsevier*, 2, 875-893.

Haminiuk C.W.I, Maciel G.M., Plata-Oviedo M.S.V, Peralta R.M. 2012. Phenolic compounds in fruits – an overview. *Int Jour. Food Sci Technol.* 47, 2023–44.

Han G.L., Li C.M., Mazza G., Yang X.G. 2005. Effect of anthocyanin rich fruit extract on PGE2 produced by endothelial cells. *Wei Sheng Yan Jiu.* 34, 5, 581-584.

Hanlin R.L., Hrmova M.M., Harbertson J.F., Downey M.O. 2010. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Aust J Grape Wine R* 16, 173–88.

Hawkins S., Wolf M., Guyard G., Greenberg S., Dayan N. 2005. Microcapsules as a delivery system. In: *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products*, Meyer RR, Ed. William Andrew, Norwich. 191-214.

Hellstrom J., Shikov A., Makarova M., Pihlanto A., Pozharitskaya O., Ryhanen E.L., Kivijarvi P., Makarov V., Mattila P. 2010. Blood pressure-lowering properties of chokeberry *Aronia mitchurinii*, var. Viking, *Journal of functional food*, 163–169.

Hider R.C., Liu Z.D., Khodr H. 2001. Metal chelating of polyphenols. In L. Packer (Eds.) *Methods in enzymology, flavonoids and other polyphenols*. San Diego: Academic Press. 335, 190-203.

Horswald A., Hertier J., Andlauer W. 2013. Characterisation of *Aronia* powders obtained by different drying process. *Food Chem.* 141, 2858-2863.

Howard L.R., Brownmiller C., Prior R.L., Mauromoustakos A. 2013. Improved Stability of Chokeberry Juice Anthocyanins by  $\beta$ -Cyclodextrin Addition and Refrigeration, *J. Agric. Food* 61, 693–699.

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

Isailović B., Đorđević V., Nedović V., Bugarski B. 2013. Liposome-in-alginate systems for encapsulation of natural antioxidants. Insid. Food Symp. 9–12 April, Leuven, Belgium.

Istenič K., Balanč B., Djordjević V., Bele M., Nedović V., Bugarski B., Poklar-Urlih N. 2015. Encapsulation of resveratrol into calcium-alginate submicron particles. *J. Food Eng.* Article in press

Jagtap U. B., Panaskar S. N., Bapat V.A. 2010. Evaluation of antioxidant capacity and phenol content in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) fruit pulp, *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 2, 99–104.

Jiménez-Ferrer E., Alarcón-Alonso J., Aguilar-Rojas A., Zamilpa A., Jiménez-Ferrer I., Tortoriello J., Herrera-Ruiz M. 2012. Diuretic effect of compounds from *Hibiscus sabdariffa* by modulation of the aldosterone activity, *Planta Medica*, 78, 18, 1893-1898.

Jimenez Garcia S.N., Guevara Gonzalez R.G., Miranda Lopez R., Feregrino Perez A.A., Torres Pacheco I., Vazquez Cruz M.A. 2013. Functional properties and quality

characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Res Int*, 54, 1195–207.

Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Jour. Agric Food Chem.* 47, 10, 3954-62.

Kardum N., Konić Ristić A., Savikin K., Spasić S., Stefanović A., Ivanišević J., Miljković M. 2014. Effects of Polyphenol-Rich Chokeberry Juice on Antioxidant/Pro-Oxidant Status in Healthy Subjects. *Jour. Med. Food.* 17, 8, 869-874.

Kardum N., Milovanović B., Šavikin K., Zdunić G., Mutavdzin S., Gligorijević T., Singh R.B. 2015. Beneficial effects of polyphenol-rich chokeberry juice consumption on blood pressure level and lipid status in hypertensive subjects. *Journal of Medicinal Food*, 18, 1231-1238.

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

Kay C. D. 2006. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans, *Nutr. Res. Rew*, 19, 137-146.

Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.

Kong J.M., Chia L. S., Chia T. F., Goh N. K., Brouillard R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, 64, 5, 923–933.

Kokotkiewicz A., Jaremicz Z., Luczkiewicz M. 2010. Aronia Plants: A Review of traditional use, biological activities and perspectives for modern medicine. *Journal of Medicinal Food*, 13, 255-269.

Kulling S.E., Rawel H.M. 2008. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)-A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica*, 74, 1625-1634.

Leick S., Kemper A., Rehage H. 2011. Alginate/poly-L-lysine capsules: mechanical properties and drug release characteristics. *Soft Matter*, 7, 6684-6694.

Leong S.Y., Oey I. 2012. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chem.* 133, 1577–1587.

Lewis G., Mathieu D., Phan-Tan-Lu R. *Pharmaceutical Experimental Design*. Marcel Dekker, New York; 1999.

Li Y.G., Tanner G., Larkin P. 1996. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *Jour. Sci Food Agr.* 70, 1, 89-101.

Liu M., Li X., Liu Y., Cao B. 2013. Regulation of flavanone 3-hydroxylase gene involved in the flavonoid biosynthesis pathway in response to UV-B radiation and drought stress in the desert plant, *Reaumuria soongorica*. *Plant Physiol Biochem.* 73, 161–7.

Lotito S.B., Actis-Goretta L., Renart M.L., Caligiuri M., Rein D., Schmitz H.H., Steinberg F.M., Keen C.L., Fraga C.G. 2000. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem. Biophys. Res. Common.* 276, 945–951.

Malafaya P., Silva G., Reis R. 2007. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications, *Adv. Drug Delivery Rev.* 59, 207–233.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. Jour. Clin. Nutr.* 79, 727–47.

Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. Jour. Clin. Nutr.* 81, 1, 230-242.

Manojlović V., Djonlagić J., Obradović B., Nedović V., Bugarski B. 2006. Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine, *Int. J. Nanomed*, 1, 163–171.

Manojlović V., Rajić N., Djonlagić J., Obradović B., Nedović V., Bugarski B. 2008. Application of Electrostatic Extrusion–Flavour Encapsulation and Controlled Release. *Sens.* 8, 1488-1496.

Martinsen A., Skjak-Braek G., Smidsrod O., 1989. Alginate as immobilization material; I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 79–89.

Mattila P., Hellström J., Törrönen R. 2006. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Jour. Agric Food Chem.* 54, 19, 7193-9.

Mihailović-Stanojević N., Belščak-Cvitanović A., Grujić-Milanović J, Ivanov M., Jovović Đ., Bugarski B., Miloradović Z. 2013. Antioxidant and antihypertensive activity of extract from *Thymus serpyllum* L. in experimental hypertension. *Plant Foods Hum. Nutr.* 68, 235-240.

Mihailović-Stanojević N., Miloradović Z., Ivanov M., Bugarski B., Jovović Đ., Karanović D., Vajić U.J., Komes D., Grujić-Milanović J. 2016. Upregulation of Heme oxygenase-1 in response to wild Thyme treatment protects against hypertension and oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, ID 1458793, 11.



Mihailović-Stanojević N., Šavikin K., Živković J., Zdunić G., Miloradović Z., Ivanov M., Grujić-Milanović J. 2016. Moderate consumption of alcohol-free red wine provide more beneficial effects on systemic haemodynamics, lipid profile and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats than red wine. *Journal of Functional Foods*, 26, 719–730.

Milić J, Petrović S. 2003. Karakteristike savremenih farmaceutskih oblika. *Hem. Ind.* 57, 424-436.

Mink P.J., Scrafford C.G., Barraj L.M., Harnack L., Hong C.P., Nettleton J.A., Jacobs D.R. Jr. 2007. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am Jour. Clin. Nutr.* 85, 895–909.

Morch Y., Donati I., Strand B., Skjak-Brak G. 2006. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $\text{Sr}^{2+}$  on alginate microbeads. *Biomacromolecules*.7, 1471-1480.

Moroşanu A. I., Ciocoiu M., Bădescu L., Bădescu M. 2011. Antioxidant effect of aronia versus sambucus on murine model with or without arterial hypertension. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 16, 1, 222–227.

Mubarak A., Bondonno C., Liu A., Considine M., Rich L., Mas E., Croft K., Hodgson J. 2012. Acute Effects of Chlorogenic Acid on Nitric Oxide Status, Endothelial Function, and Blood Pressure in Healthy Volunteers: A Randomized Trial, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 36, 9130-9136.

Mulvihill E.E., Huff M.W. 2010. Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Can. Jour. Cardiol.* 26, 17-21.

Nadavala S.K, Swayampakula K., Boddu V.M., Abburi K. 2009. Biosorption of phenol and *o*-chlorophenol from aqueous solution on to chitosan–calcium alginate blended beads. *J. Hazard Mater.* 162, 482–489.

- Nelson G. 2002. Application of microencapsulation in textiles. *Int. J. Pharm.* 242, 55- 62.
- Noguer M. A., Cerezo A. B., Navarro E. D., Garcia-Parrilla M. C. 2012. Intake of alcohol-free red wine modulates antioxidant enzyme activities in a human intervention study. *Pharmacological Research*, 65, 6, 609–614.
- Obradović M., Radišić M., Vunjak-Novaković G., Nedović V., Willaert R. 2005. Applications in Cell Immobilisation Biotechnology, Springer, Dordrecht, 99–129.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction Analytical Biochemistry, 95, 2, 351–358.
- Olas B., Wachowicz B., Tomczak A., Erler J., Stochmal A., Oleszek W. 2008. Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of *Aronia melanocarpa*, seeds of grape and bark of *Yucca schidigera* in vitro. *Platelets*. 19, 1, 70-77.
- Ostertag M.L., O’Kennedy N., Kroon A.P., Duthie G.G., de Roos B. 2009. Impact of dietary polyphenols on human platelet function—a critical review of controlled dietary intervention studies. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 60–81.
- Oszmiański J., Wojdyło A. 2005. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* 221, 809–13.
- Ovando A.C., Hernandez L.P., Hernandez E.P., Rodriguez J.A., Galan-Vidal C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins- A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Paglia D.E., Valentine W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Jour. Lab. Clin. Med.* 70,158–169.

Park Y., Park J. 2011. The preventive and therapeutic effects of Aronox extract on metabolic abnormality and hypertension, *Journal The Korean Society of Hypertension*, 17, 3, 95-102.

Paques J.P., van der Linden E., van Rijn C.J.M., Sagis L.M.C. 2013. Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with CaCl<sub>2</sub> nanoparticles. *Food Hydrocoll.* 31, 2, 428–434.

Paques J.P., van der Linden E., van Rijn C.J.M., Sagis L.M.C., 2014. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv. Colloid. Interf. Sci.* 209, 163–171.

Park K., Yeo Y. 2007. Microencapsulation Technology. In: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd edition , Swarbrick J, Ed. Informa Healthcare, New York, 2315-2327.

Poncelet D., Babak V., Neufeld R.J., Goosen M., Bugarski B. 1999. Theory of electrostatic dispersion of polymer solution in the production of microgel beds containing biocatalyst. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 79, 213–228.

Porter L.J. 1994. Flavans and proanthocyanidins. In: Harborne JB, ed., The Flavonoids: Advances in Research since 1986. London, Chapman & Hall, pp. 23–55.

Prüsse U., Bilancetti L., Bucko M., Bugarski B., Bukowski J., Gemeiner P. 2008. Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chem. Pap.* 62, 4, 364-374.

Pržić D., Ružić N., Petrović S. 2004. Lyophilization-the process and industrial use, *Chem. Ind.* 58, 12, 552-562.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 9–10, 1231–1237.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.

Rice-Evans C., Miller M., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.* 2, 4, 152-159.

Ramić M., Vidović S., Zeković Z., Vladić J., Cvejic A., Pavlić B. 2015. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpaby*-products from filter-tea factory. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 360-368.

Rassis D.K., Saguy I.S., Nussinovitch A. 2002. Collapse, shrinkage and structural changes in dried alginate gels containing fillers. *Food Hydrocoll.* 16, 139-151.

Robert P., Gorena T., Romero N., Sepulveda E., Chavez J., Saenz C. 2010. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegrante (*Punica granatum*) by spray drying. *Food Science Techn.* 45, 1386-1394.

Rodrigues A.D., Scheffel T.B., Scola G., Santos M.T., Fank B., de Freitas S.C., Dani C., Vanderlinde R., Henriques J.A., Coitinho A.S., Salvador M. 2012. Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylenetetrazole. *Neurochem. Int.* 60, 799–805.

Rousseau I., Le Cerf D., Picton L., Argiller J.F., Muller G. 2004. Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate beads. *Eur. Polym. Jour.*40, 2709–2715.

Rowe R., Sheskey P., Quinn M. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed. Pharmaceutical Press, London, 20-21,622-623.

Rugina D., Sconta Z., Leopold L., Pintea A., Bunea A., Socaciu C. 2012. Antioxidant activities of chokeberry extracts and the cytotoxic action of their anthocyanin fraction on HeLa human cervical tumor cells. *Jour. Medic. Food*, 15, 700-706.

Sainova I., Pavlova I., Alexieva B., Vavrek I., Nikolova E., Valcheva-Kuzmanova S., Markova T., Krachanova M., Denev P. 2012. Chemoprotective, antioxidant and immunomodulatory *in vitro* effects of *Aronia melanocarpa* total extract on laboratory-cultivated normal and malignant cells. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 35-43.

Sanna V., Lubinu G., Madau P., Pala N., Nurra S., Mariani A., Sechi M. 2015. Polymeric nanoparticles encapsulating white tea extract for nutraceutical application. *Jour. Agric. Food. Chem.*, 63, 2026-2032.

Santos-Buelga C., Scalbert A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds—Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Jour. Sci. Food Agric.* 80, 1094–1117.

Scalbert A., Johnson I.T., Saltmar M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. Jour. Clin. Nutr.*, 81, 215–217.

Seeram N.P., Aviram M., Zhang Y., Henning S.M., Feng L., Dreher M., Heber D. 2008. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Jour. Agric Food Chem.* 56, 4, 1415-22.

Shahidi F., Ambigaipalan P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects –A review, *Jour. Funct Food*, 18, 820-897.

Shatoor A. S. 2013. In vivo hemodynamic and electrocardiographic changes following *Crataegus aronia* syn. *Azarolus* (L) administration to normotensive Wistar rats. *Saudi Med. Jour.* 34, 2, 123-134.

Shindo M., Kasai T., Abe A., Kondo Y. 2007. Effects of dietary administration of plant-derived anthocyanin-rich colors to spontaneously hypertensive rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 53, 1, 90-93.

Siepmann J., Siepmann F. 2006. Microparticles Used as Drug Delivery Systems. *Progr. Colloid Polym. Science*, 133, 15-21.

Sikora J., Broncel M., Mikiciuk-Olasik E. 2014. *Aronia melanocarpa* Elliot Reduces the Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme-In Vitro and Ex Vivo Studies, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, ID 739721, 7.

Silva D. G., Cooper P. D., Petrovsky N. 2004. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses. *Immunol. Cell Biol.* 82, 611-616.

Simeonov S.B., Botushanov N.P., Karahanian E.B., Pavlova M.B., Husianitis H.K., Troev D.M. 2002. Effects of *Aronia melanocarpa* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv)*. 44, 3, 20-23.

Simić V., Rajković K, Stojičević S., Veličković D., Nikolić N., Lazić M., Karabegović I. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network, *Separation and purification technology*, 160, 89-97.

Smith S., Klotman P., Svetkey L. 1992. Potassium chloride lowers blood pressure and causes natriuresis in older patients with hypertension. *Journal of American Society Nephrology*, 2, 1302-1309.

Stalikas 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268-3295.

Stanisavljević N., Samardžić J., Janković T., Šavikin K., Mojsin M., Topalović V., Stevanović M. 2015. Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix, *Food chem.* 175, 516-522.

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

Sueiro L., Yousef G.G., Seigler D., De Mejia E.G., Grace M.H., Lila M.A. 2006. Chemopreventive potential of flavonoids extracts from plantation-bred and wild *Aronia melanocarpa* (Black Chokeberry) fruits. *Jour. Food Sci.* 71, 480-488.

Suri S., Ruan G., Winter J., Schmidt C. 2013. Microparticles and nanoparticles, Classes of Materials Used in Medicine, Biomaterials Science, 3<sup>rd</sup> Edition, Elsevier, 360-388.

Szajdek A., Borowska E.J. 2008. Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 4, 147–156.

Tabart J., Franck T., Kevers C., Pincemail J., Serteyn D., Defraigne J.O., Dommesa J. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts. *Food Chem.* 131, 1116–1122.

Thies C. 1996. A Survey of Microencapsulation Processes. In *Microencapsulation*, Benita S, Ed. Marcel Dekker, New York, 1-19.

Thies C. 2005. Microencapsulation. In: Seidel A. (Ed.), *Kirk–Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th ed, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 317-327.

Tolun A., Altintas Z., Artik N. 2016. Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *Journal of Biotechnology* 239, 23–33.

Tonessen H., Karlsen J. 2002. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28, 621-630.

Touyz R. M., Milne F. J. 1999. Magnesium supplementation attenuates, but does not prevent, development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension*, 12, 8, 757-765.

Trifković K., Milašinović N., Djordjević V., Kalagasidis-Krušić M., Knežević-Jugović Z., Nedović V., Bugarski B. 2014, Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols. *Carbohydr. Polym.* 111, 901-907.

Valcheva-Kuzmanova S.V., Belcheva A. 2006. Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Med (Plovdiv)*. 48, 2, 11-17.

Valcheva-Kuzmanova S., Kuzmanov K., Mihova V., Krasnaliev I., Borisova P., Belcheva A. 2007. Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods Hum. Nutr.* 62, 1, 19-24

Vauchel P., D'Alessandro L., Dhulster P., Nikov I., Dimitrov K. 2015. Pilot scale demonstration of integrated extraction–adsorption eco-process for selective recovery of antioxidants from berries wastes. *Journal of Food Engineering*, 158, 1–7.

Vidlar A., Vostalova J., Ulrichova J., Student V., Stejskal D., Reichenbach R., Vrbkova J., Ruzicka F., Simanek V. 2010. The effectiveness of dried cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) in men with lower urinary tract symptoms, *British Journal of Nutrition*, 104, 1181–1189.

Vlaseva R., Ivanova M., Denev P., Petkova N. 2014. Preparation of dairy dessert with addition of encapsulated biologically active substances. Proceedings of the International Conference, Agri-food sciences, processes and technologies, Sibiu, Romania.

Vuleta G., Primorac M., Milić J., Savić S. 2012. Farmaceutska tehnologija I, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd.



Wang X., Zhao J. 2013. Encapsulation of the herbicide picloram by using polyelectrolyte biopolymers as layer-by-layer materials. *Jour. Agric. Food. Chem.*, 61, 3789- 3796.

Waterman P.G., Mole S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites, Blackwell Scientific Publication, Oxford.

Wrolstad R.E. 2004. Anthocyanin Pigments- Bioactivity and Coloring Properties, *Journal of Food Science*, 69, 419-425.

Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y.J., Li H.B. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. Jour. Mol. Sci* 11, 622–46.

Xia M., Ling W., Zhu H., Wang Q., Ma J., Hou M., Tang Z, Li L., Ye Q. 2007. Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 27, 519–524.

Xiaoling L., Jasti B. 2006. Design of controlled release drug delivery systems. McGraw Hill, New York.

Young K.N., Yong L.H., 2015. Skin anti-inflammatory activity of nano-encapsulated *Aronia melanocarpa* extracts. *Res. Jour. Biotech.* 10, 62-74.

Yugoslavian Pharmacopeia (Pharmacopoea Jugoslavica), 2000. 5th Edition, National Institute for Health Protection, Contemporaneous administration, Belgrade, Serbia.

Zhang Z.S., Li D., Wang L.J., Ozkan N., Chen X.D., Mao Z.H., Yang H.Z. 2007. Optimisation of ethanol-water extraction of lignins from flaxseed. *Separ. Purif. Technology*, 57, 17-24.

Zhao Y., Wang J., Balleve O., Luo H., Zhang W. 2012. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids, *Hypertension Research*, 35, 370–374.

Zhu X. Y, Daghini E., Chade A. R. 2006. Role of oxidative stress in remodeling of the myocardial microcirculation in hypertension, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26, 8, 1746–1752.

## 8. PRILOG I

### Količine ukupnih fenola i ukupnih antocijana dobijenih tokom faze optimizacije ekstrakcije primenom 4 x 3 x 4 x 5 eksperimentalnog dizajna

Odnos droga rastv.	Rastv.	Stepen usitnj.	Vrem.	Broj ponavlj.	Ukupni fenoli		Ukupni antocijani	
					Srednja vred.	St. Dev.	Srednja vred.	St. Dev.
1:10	50%	sito_6	15 min	3	13.12	0.367	0.162	0.008
1:10	50%	sito_6	30 min	3	13.48	0.309	0.161	0.011
1:10	50%	sito_6	60 min	3	14.63	1.195	0.204	0.015
1:10	50%	sito_6	90 min	3	17.40	1.244	0.224	0.016
1:10	50%	sito_3	15 min	3	11.60	0.621	0.166	0.008
1:10	50%	sito_3	30 min	3	14.32	0.173	0.194	0.007
1:10	50%	sito_3	60 min	3	13.75	1.121	0.199	0.005
1:10	50%	sito_3	90 min	3	15.83	0.208	0.199	0.007
1:10	50%	sito_2	15 min	3	15.95	1.500	0.164	0.004
1:10	50%	sito_2	30 min	3	17.13	1.057	0.175	0.009
1:10	50%	sito_2	60 min	3	20.43	0.491	0.187	0.021
1:10	50%	sito_2	90 min	3	18.87	2.572	0.220	0.012
1:10	50%	sito_1	15 min	3	20.52	0.252	0.219	0.009
1:10	50%	sito_1	30 min	3	19.92	1.338	0.191	0.010
1:10	50%	sito_1	60 min	3	19.74	1.335	0.194	0.018
1:10	50%	sito_1	90 min	3	20.11	0.566	0.194	0.017
1:10	50%	sito_0.75	15 min	3	19.84	0.953	0.297	0.012
1:10	50%	sito_0.75	30 min	3	21.15	1.865	0.261	0.013
1:10	50%	sito_0.75	60 min	3	19.63	1.377	0.273	0.020
1:10	50%	sito_0.75	90 min	3	18.54	0.436	0.262	0.036

Odnos droga rastv.	Rastv.	Stepen usitnj.	Vrem.	Broj ponavlj.	Ukupni fenoli		Ukupni antocijani	
					Srednja vred.	St. Dev.	Srednja vred.	St. Dev.
1:10	70%	sito_6	15 min	3	11.61	0.655	0.134	0.004
1:10	70%	sito_6	30 min	3	13.23	1.317	0.153	0.005
1:10	70%	sito_6	60 min	3	14.47	1.175	0.173	0.006
1:10	70%	sito_6	90 min	3	15.71	1.087	0.163	0.009
1:10	50%	sito_6	15 min	3	13.12	0.367	0.162	0.008
1:10	50%	sito_6	30 min	3	13.48	0.309	0.161	0.011
1:10	50%	sito_6	60 min	3	14.63	1.195	0.204	0.015
1:10	50%	sito_6	90 min	3	17.40	1.244	0.224	0.016
1:10	50%	sito_3	15 min	3	11.60	0.621	0.166	0.008
1:10	50%	sito_3	30 min	3	14.32	0.173	0.194	0.007
1:10	50%	sito_3	60 min	3	13.75	1.121	0.199	0.005
1:10	50%	sito_3	90 min	3	15.83	0.208	0.199	0.007
1:10	50%	sito_2	15 min	3	15.95	1.500	0.164	0.004
1:10	50%	sito_2	30 min	3	17.13	1.057	0.175	0.009
1:10	50%	sito_2	60 min	3	20.43	0.491	0.187	0.021
1:10	50%	sito_2	90 min	3	18.87	2.572	0.220	0.012
1:10	50%	sito_1	15 min	3	20.52	0.252	0.219	0.009
1:10	50%	sito_1	30 min	3	19.92	1.338	0.191	0.010
1:10	50%	sito_1	60 min	3	19.74	1.335	0.194	0.018
1:10	50%	sito_1	90 min	3	20.11	0.566	0.194	0.017
1:10	50%	sito_0.75	15 min	3	19.84	0.953	0.297	0.012
1:10	50%	sito_0.75	30 min	3	21.15	1.865	0.261	0.013
1:10	50%	sito_0.75	60 min	3	19.63	1.377	0.273	0.020
1:10	50%	sito_0.75	90 min	3	18.54	0.436	0.262	0.036
1:10	70%	sito_6	15 min	3	11.61	0.655	0.134	0.004
1:10	70%	sito_6	30 min	3	13.23	1.317	0.153	0.005
1:10	70%	sito_6	60 min	3	14.47	1.175	0.173	0.006
1:10	70%	sito_6	90 min	3	15.71	1.087	0.163	0.009
1:10	70%	sito_3	15 min	3	11.09	3.297	0.185	0.022
1:10	70%	sito_3	30 min	3	13.22	0.776	0.193	0.009
1:10	70%	sito_3	60 min	3	15.08	0.341	0.214	0.015
1:10	70%	sito_3	90 min	3	14.72	0.387	0.218	0.010
1:10	70%	sito_2	15 min	3	15.39	0.812	0.173	0.016
1:10	70%	sito_2	30 min	3	18.11	1.290	0.206	0.012

				Ukupni fenoli			Ukupni antoc.	
Odnos droga rastv.	Rastv.	Stepen usitnj.	Vrem.	Broj ponavlj.	Srednja vred.	St. Dev.	Srednja vred.	St. Dev.
1:10	70%	sito_2	60 min	3	14.58	1.759	0.201	0.011
1:10	70%	sito_2	90 min	3	17.97	1.965	0.204	0.020
1:10	70%	sito_1	15 min	3	17.85	0.469	0.189	0.004
1:10	70%	sito_1	30 min	3	18.15	0.219	0.200	0.012
1:10	70%	sito_1	60 min	3	17.86	0.884	0.200	0.004
1:10	70%	sito_1	90 min	3	17.51	2.574	0.210	0.006
1:10	70%	sito_0.75	15 min	3	21.88	0.811	0.233	0.009
1:10	70%	sito_0.75	30 min	3	19.91	0.796	0.234	0.005
1:10	70%	sito_0.75	60 min	3	21.66	1.608	0.233	0.009
1:10	70%	sito_0.75	90 min	3	21.32	0.622	0.238	0.007
1:10	96%	sito_6	15 min	3	2.75	0.397	0.043	0.003
1:10	96%	sito_6	30 min	3	3.41	0.278	0.057	0.001
1:10	96%	sito_6	60 min	3	3.44	0.145	0.058	0.003
1:10	96%	sito_6	90 min	3	4.25	0.139	0.075	0.007
1:10	96%	sito_3	15 min	3	3.98	0.167	0.067	0.001
1:10	96%	sito_3	30 min	3	4.28	0.292	0.077	0.001
1:10	96%	sito_3	60 min	3	4.61	0.090	0.086	0.004
1:10	96%	sito_3	90 min	3	4.73	0.402	0.076	0.002
1:10	96%	sito_2	15 min	3	4.69	0.758	0.068	0.006
1:10	96%	sito_2	90 min	3	5.42	0.888	0.083	0.005
1:10	96%	sito_1	15 min	3	4.52	0.290	0.042	0.004
1:10	96%	sito_1	30 min	3	4.81	0.701	0.052	0.001
1:10	96%	sito_1	60 min	3	5.48	0.567	0.064	0.002
1:10	96%	sito_1	90 min	3	6.39	0.238	0.075	0.003
1:10	96%	sito_0.75	15 min	3	7.96	0.622	0.079	0.004
1:10	96%	sito_0.75	30 min	3	7.42	0.189	0.069	0.003
1:10	96%	sito_0.75	60 min	3	7.79	0.219	0.084	0.005
1:10	96%	sito_0.75	90 min	3	8.21	0.352	0.087	0.006
1:10	voda	sito_6	15 min	3	7.79	0.180	0.074	0.006
1:10	voda	sito_6	30 min	3	8.49	0.676	0.082	0.008
1:10	voda	sito_6	60 min	3	8.43	0.698	0.080	0.008
1:10	voda	sito_6	90 min	3	8.49	1.430	0.084	0.004
1:10	voda	sito_3	15 min	3	10.70	1.129	0.097	0.011

					Ukupni fenoli		Ukupni antoc.	
Odnos droga rastv.	Rastv.	Stepen usitnj.	Vrem.	Broj ponavlj.	Srednja vred.	St. Dev.	Srednja vred.	St. Dev.
1:10	voda	sito_3	30 min	3	10.54	0.266	0.095	0.002
1:10	voda	sito_3	60 min	3	11.27	0.643	0.103	0.007
1:10	voda	sito_3	90 min	3	10.14	0.251	0.094	0.004
1:10	voda	sito_2	15 min	3	7.07	0.654	0.061	0.007
1:10	voda	sito_2	30 min	3	6.08	0.428	0.058	0.009
1:10	voda	sito_2	60 min	3	6.31	0.339	0.061	0.005
1:10	voda	sito_2	90 min	3	5.70	0.706	0.066	0.005
1:10	voda	sito_1	15 min	3	8.26	0.636	0.084	0.005
1:10	voda	sito_1	90 min	3	8.74	0.391	0.085	0.002
1:10	voda	sito_0.75	15 min	3	7.37	0.283	0.078	0.004
1:10	voda	sito_0.75	30 min	3	8.09	0.557	0.084	0.002
1:10	voda	sito_0.75	60 min	3	7.85	0.731	0.086	0.003
1:10	voda	sito_0.75	90 min	3	5.80	1.588	0.063	0.005
1:20	50%	sito_6	15 min	3	12.91	1.735	0.170	0.015
1:20	50%	sito_6	30 min	3	15.28	1.749	0.208	0.004
1:20	50%	sito_6	60 min	3	12.76	0.344	0.183	0.012
1:20	50%	sito_6	90 min	3	16.75	0.736	0.225	0.017
1:20	50%	sito_3	15 min	3	12.90	0.490	0.165	0.003
1:20	50%	sito_3	30 min	3	14.62	0.772	0.202	0.026
1:20	50%	sito_3	60 min	3	16.06	0.832	0.205	0.004
1:20	50%	sito_3	90 min	3	17.95	1.067	0.228	0.019
1:20	50%	sito_2	15 min	3	16.04	1.371	0.185	0.012
1:20	50%	sito_2	30 min	3	17.13	1.057	0.196	0.008
1:20	50%	sito_2	60 min	3	20.43	0.491	0.216	0.039
1:20	50%	sito_2	90 min	3	18.87	2.572	0.233	0.006
1:20	50%	sito_1	15 min	3	20.44	1.247	0.213	0.002
1:20	50%	sito_1	30 min	3	20.97	1.219	0.198	0.011
1:20	50%	sito_1	60 min	3	22.29	2.271	0.197	0.008
1:20	50%	sito_1	90 min	3	20.32	2.081	0.218	0.005
1:20	50%	sito_0.75	15 min	3	26.25	0.250	0.276	0.022
1:20	50%	sito_0.75	30 min	3	28.40	2.143	0.272	0.010
1:20	50%	sito_0.75	60 min	3	28.03	1.430	0.276	0.009
1:20	50%	sito_0.75	90 min	3	27.61	3.434	0.270	0.016

					Ukupni fenoli		Ukupni antoc.	
Odnos droga rastv.	Rastv.	Stepen usitnj.	Vrem.	Broj ponavlj.	Srednja vred.	St. Dev.	Srednja vred.	St. Dev.
1:20	70%	sito_6	15 min	3	10.68	0.617	0.151	0.026
1:20	70%	sito_6	30 min	3	12.21	1.274	0.168	0.017
1:20	70%	sito_6	60 min	3	15.08	1.941	0.182	0.006
1:20	70%	sito_6	90 min	3	13.49	1.622	0.178	0.025
1:20	70%	sito_3	15 min	3	11.84	1.048	0.185	0.004
1:20	70%	sito_3	30 min	3	13.61	0.470	0.206	0.013
1:20	70%	sito_3	60 min	3	16.86	0.552	0.230	0.011
1:20	70%	sito_3	90 min	3	15.59	1.867	0.224	0.008
1:20	70%	sito_2	15 min	3	12.66	0.585	0.174	0.009
1:20	70%	sito_2	30 min	3	13.11	0.374	0.203	0.014
1:20	70%	sito_2	60 min	3	15.80	1.494	0.219	0.010
1:20	70%	sito_2	90 min	3	17.37	1.142	0.250	0.015
1:20	70%	sito_1	15 min	3	20.46	1.073	0.216	0.017
1:20	70%	sito_1	30 min	3	21.77	0.531	0.222	0.009
1:20	70%	sito_1	60 min	3	21.62	0.566	0.210	0.003
1:20	70%	sito_1	90 min	3	22.08	1.934	0.211	0.006
1:20	70%	sito_0.75	15 min	3	11.78	0.385	0.253	0.007
1:20	70%	sito_0.75	30 min	3	11.86	0.480	0.248	0.018
1:20	70%	sito_0.75	60 min	3	11.38	1.134	0.256	0.011
1:20	70%	sito_0.75	90 min	3	12.18	0.210	0.260	0.006
1:20	96%	sito_6	15 min	3	3.33	0.170	0.048	0.005
1:20	96%	sito_6	90 min	3	4.83	0.458	0.077	0.011
1:20	96%	sito_3	60 min	3	5.40	0.216	0.091	0.001
1:20	96%	sito_3	90 min	3	5.57	0.287	0.084	0.003
1:20	96%	sito_2	15 min	3	2.35	1.508	0.061	0.007
1:20	96%	sito_2	30 min	3	5.00	0.620	0.074	0.006
1:20	96%	sito_2	60 min	3	6.05	0.217	0.092	0.004
1:20	96%	sito_2	90 min	3	5.72	0.100	0.103	0.014
1:20	96%	sito_1	15 min	3	6.00	0.909	0.046	0.002
1:20	96%	sito_1	30 min	3	6.31	0.609	0.058	0.002
1:20	96%	sito_1	60 min	3	7.22	0.360	0.071	0.002
1:20	96%	sito_1	90 min	3	7.86	0.097	0.082	0.003
1:20	96%	sito_0.75	15 min	3	8.65	0.668	0.096	0.007

					Ukupni fenoli		Ukupni antoc.	
Odnos droga rastv.	Rastv.	Stepen usitnj.	Vrem.	Broj ponavlj.	Srednja vred.	St. Dev.	Srednja vred.	St. Dev.
1:20	96%	sito_0.75	30 min	3	8.26	0.476	0.095	0.003
1:20	96%	sito_0.75	60 min	3	8.95	0.600	0.102	0.004
1:20	96%	sito_0.75	90 min	3	9.07	0.161	0.111	0.008
1:20	voda	sito_6	15 min	3	7.91	0.476	0.086	0.015
1:20	voda	sito_6	30 min	3	9.53	0.527	0.096	0.007
1:20	voda	sito_6	60 min	3	10.16	1.717	0.112	0.008
1:20	voda	sito_6	90 min	3	10.03	1.029	0.109	0.013
1:20	voda	sito_3	15 min	3	10.48	0.303	0.109	0.007
1:20	voda	sito_3	30 min	3	10.83	0.577	0.108	0.005
1:20	voda	sito_3	60 min	3	10.86	0.273	0.121	0.014
1:20	voda	sito_3	90 min	3	11.45	1.061	0.116	0.010
1:20	voda	sito_2	15 min	3	8.72	0.203	0.115	0.004
1:20	voda	sito_2	30 min	3	9.68	0.451	0.123	0.005
1:20	voda	sito_2	60 min	3	10.32	0.781	0.120	0.005
1:20	voda	sito_2	90 min	3	11.78	0.611	0.120	0.007
1:20	voda	sito_1	15 min	3	9.39	0.704	0.091	0.005
1:20	voda	sito_1	30 min	3	10.53	0.282	0.105	0.009
1:20	voda	sito_1	60 min	3	10.85	0.204	0.115	0.002
1:20	voda	sito_1	90 min	3	10.54	1.415	0.105	0.017
1:20	voda	sito_0.75	15 min	3	10.74	0.567	0.103	0.002
1:20	voda	sito_0.75	30 min	3	11.18	0.616	0.120	0.005
1:20	voda	sito_0.75	60 min	3	11.71	0.136	0.118	0.006
1:20	voda	sito_0.75	90 min	3	11.67	0.644	0.122	0.004
1:30	50%	sito_6	15 min	3	15.91	4.425	0.172	0.025
1:30	50%	sito_6	30 min	3	15.19	0.984	0.149	0.007
1:30	50%	sito_6	60 min	3	16.14	1.797	0.178	0.022
1:30	50%	sito_6	90 min	3	17.54	0.552	0.180	0.004
1:30	50%	sito_3	15 min	3	13.03	0.248	0.163	0.003
1:30	50%	sito_3	30 min	3	16.10	1.059	0.193	0.022
1:30	50%	sito_3	60 min	3	16.29	1.346	0.202	0.014
1:30	50%	sito_3	90 min	3	17.62	0.620	0.218	0.019
1:30	50%	sito_2	15 min	3	14.94	0.406	0.199	0.020
1:30	50%	sito_2	90 min	3	16.32	1.397	0.210	0.014



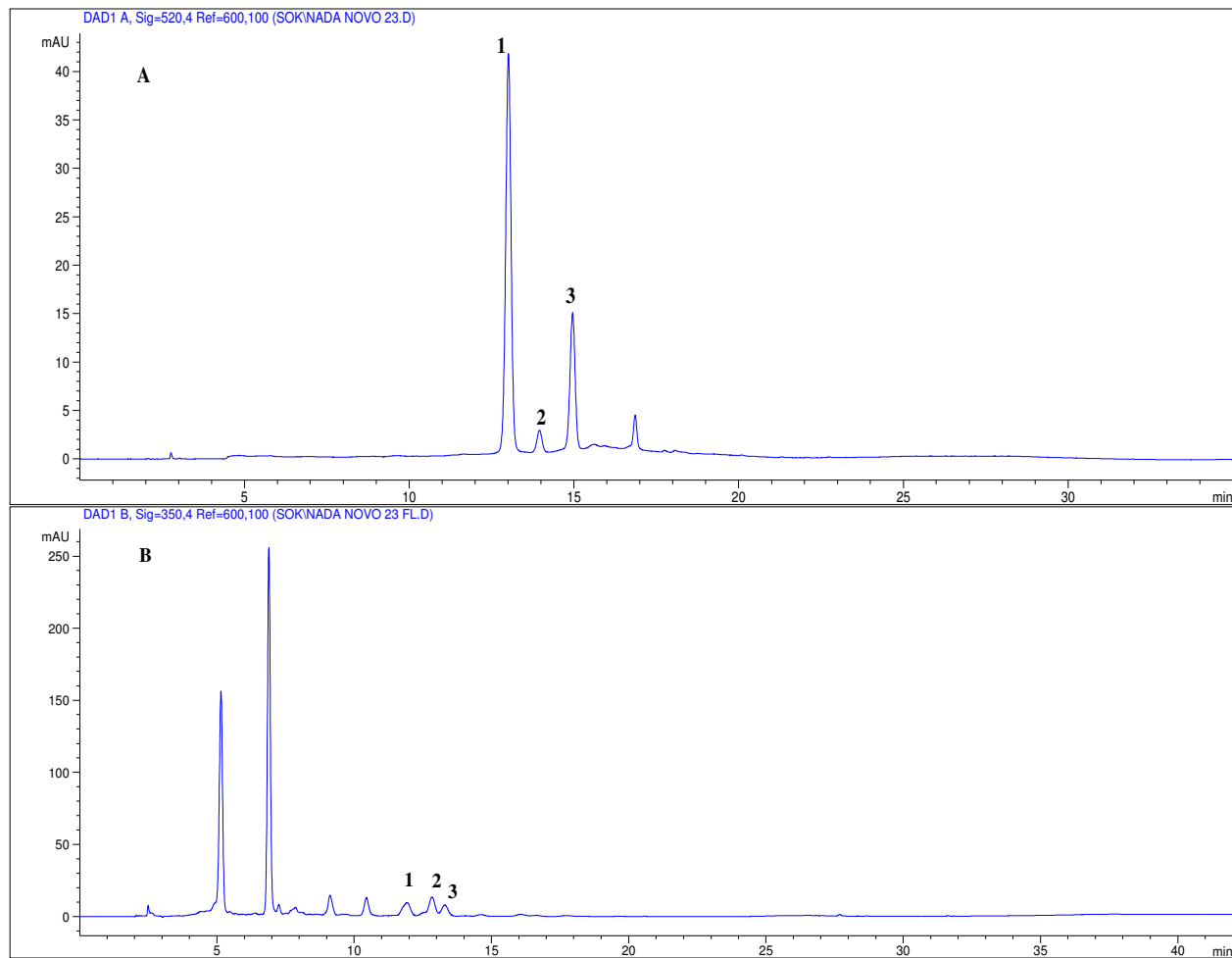
					Ukupni fenoli		Ukupni antoc.	
Odnos droga rastv.	Rastv.	Stepen usitnj.	Vrem.	Broj ponavlj.	Srednja vred.	St. Dev.	Srednja vred.	St. Dev.
1:30	50%	sito_1	15 min	3	19.43	0.551	0.191	0.005
1:30	50%	sito_1	30 min	3	20.67	0.910	0.201	0.013
1:30	50%	sito_1	60 min	3	20.34	0.296	0.204	0.013
1:30	50%	sito_1	90 min	3	20.40	0.425	0.202	0.009
1:30	50%	sito_0.75	15 min	3	20.81	2.046	0.228	0.009
1:30	50%	sito_0.75	30 min	3	22.29	0.940	0.258	0.021
1:30	50%	sito_0.75	60 min	3	23.77	2.323	0.244	0.013
1:30	50%	sito_0.75	90 min	3	25.80	0.871	0.244	0.014
1:30	70%	sito_6	15 min	3	11.46	0.705	0.142	0.021
1:30	70%	sito_6	30 min	3	14.24	0.993	0.168	0.024
1:30	70%	sito_6	60 min	3	14.58	1.230	0.156	0.008
1:30	70%	sito_6	90 min	3	15.00	0.527	0.182	0.005
1:30	70%	sito_3	15 min	3	14.47	0.818	0.198	0.009
1:30	70%	sito_3	30 min	3	16.37	1.925	0.213	0.018
1:30	70%	sito_3	60 min	3	17.18	1.112	0.232	0.036
1:30	70%	sito_3	90 min	3	16.37	0.341	0.233	0.009
1:30	70%	sito_2	15 min	3	15.86	1.291	0.202	0.011
1:30	70%	sito_2	30 min	3	14.24	0.775	0.198	0.004
1:30	70%	sito_2	60 min	3	17.16	0.454	0.242	0.005
1:30	70%	sito_2	90 min	3	18.48	1.649	0.238	0.024
1:30	70%	sito_1	15 min	3	20.24	1.603	0.204	0.008
1:30	70%	sito_1	90 min	3	19.72	0.825	0.208	0.005
1:30	70%	sito_0.75	15 min	3	23.68	3.819	0.256	0.011
1:30	70%	sito_0.75	30 min	3	22.91	0.545	0.260	0.003
1:30	70%	sito_0.75	60 min	3	23.19	0.247	0.241	0.014
1:30	70%	sito_0.75	90 min	3	22.48	0.783	0.230	0.015
1:30	96%	sito_6	15 min	3	4.04	0.692	0.044	0.005
1:30	96%	sito_6	30 min	3	4.24	0.550	0.064	0.010
1:30	96%	sito_6	60 min	3	4.59	0.280	0.071	0.018
1:30	96%	sito_6	90 min	3	5.07	0.561	0.074	0.001
1:30	96%	sito_3	15 min	3	4.68	0.193	0.075	0.002
1:30	96%	sito_3	30 min	3	5.50	0.212	0.091	0.003
1:30	96%	sito_3	60 min	3	5.49	0.217	0.093	0.005

					Ukupni fenoli		Ukupni antoc.	
Odnos droga rastv.	Rastv.	Stepen usitnj.	Vrem.	Broj ponavlj.	Srednja vred.	St. Dev.	Srednja vred.	St. Dev.
1:30	96%	sito_3	90 min	3	5.52	0.314	0.085	0.002
1:30	96%	sito_2	15 min	3	3.42	0.460	0.038	0.001
1:30	96%	sito_2	30 min	3	5.18	0.579	0.054	0.004
1:30	96%	sito_2	60 min	3	6.74	0.359	0.085	0.006
1:30	96%	sito_2	90 min	3	7.12	0.406	0.083	0.002
1:30	96%	sito_1	15 min	3	4.81	0.175	0.049	0.003
1:30	96%	sito_1	30 min	3	6.49	0.380	0.063	0.002
1:30	96%	sito_1	60 min	3	7.29	0.417	0.080	0.014
1:30	96%	sito_1	90 min	3	7.00	0.061	0.086	0.014
1:30	96%	sito_0.75	15 min	3	10.69	0.548	0.106	0.003
1:30	96%	sito_0.75	30 min	3	10.93	0.091	0.122	0.014
1:30	96%	sito_0.75	60 min	3	10.45	0.319	0.124	0.013
1:30	96%	sito_0.75	90 min	3	8.85	1.180	0.090	0.020
1:30	voda	sito_6	15 min	3	8.84	0.468	0.085	0.012
1:30	voda	sito_6	30 min	3	10.51	1.214	0.095	0.006
1:30	voda	sito_6	60 min	3	12.14	1.619	0.114	0.012
1:30	voda	sito_6	90 min	3	9.91	0.751	0.099	0.016
1:30	voda	sito_3	15 min	3	11.05	0.333	0.096	0.005
1:30	voda	sito_3	30 min	3	11.78	0.173	0.120	0.006
1:30	voda	sito_3	60 min	3	12.24	0.431	0.125	0.013
1:30	voda	sito_3	90 min	3	11.98	0.583	0.118	0.006
1:30	voda	sito_2	15 min	3	9.92	0.313	0.073	0.001
1:30	voda	sito_2	30 min	3	10.95	0.345	0.084	0.011
1:30	voda	sito_2	60 min	3	10.42	0.309	0.092	0.012
1:30	voda	sito_2	90 min	3	10.04	0.543	0.085	0.006
1:30	voda	sito_1	15 min	3	9.50	0.383	0.080	0.006
1:30	voda	sito_1	30 min	3	11.63	0.576	0.102	0.004
1:30	voda	sito_1	60 min	3	12.04	0.447	0.115	0.000
1:30	voda	sito_1	90 min	3	10.32	0.178	0.100	0.004
1:30	voda	sito_0.75	15 min	3	12.57	0.569	0.118	0.012
1:30	voda	sito_0.75	30 min	3	10.61	1.634	0.120	0.006
1:30	voda	sito_0.75	60 min	3	11.72	0.124	0.117	0.012
1:30	voda	sito_0.75	90 min	3	14.78	4.828	0.128	0.007

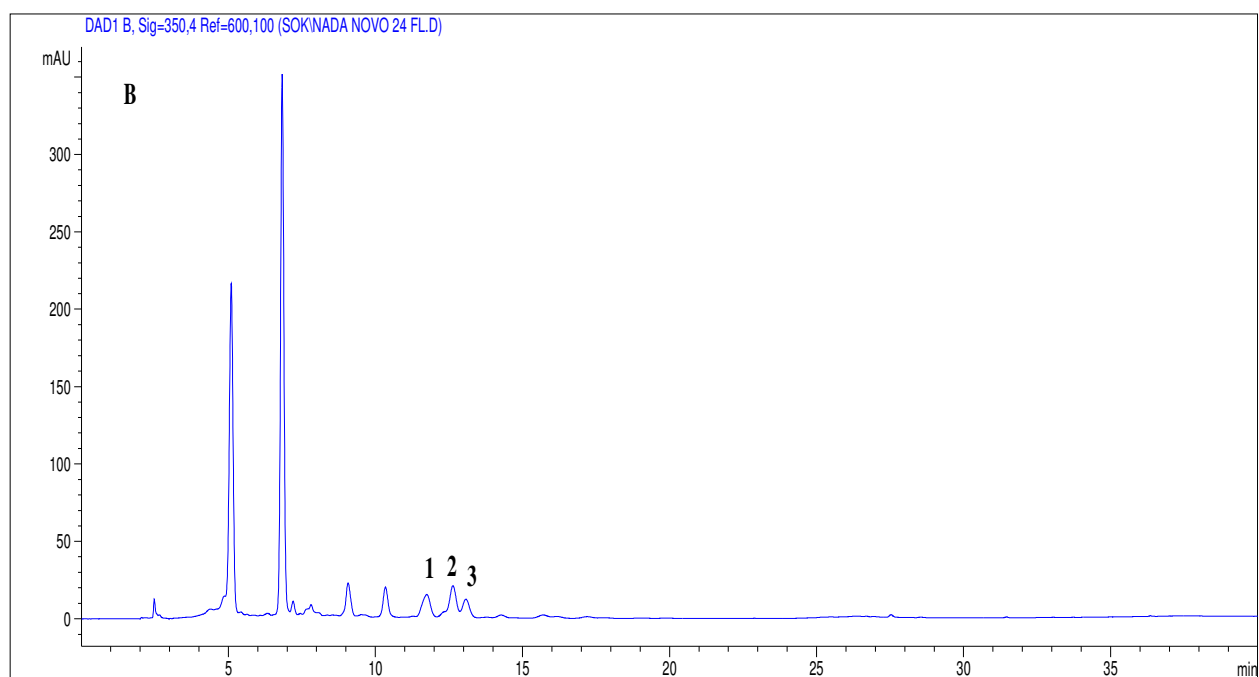
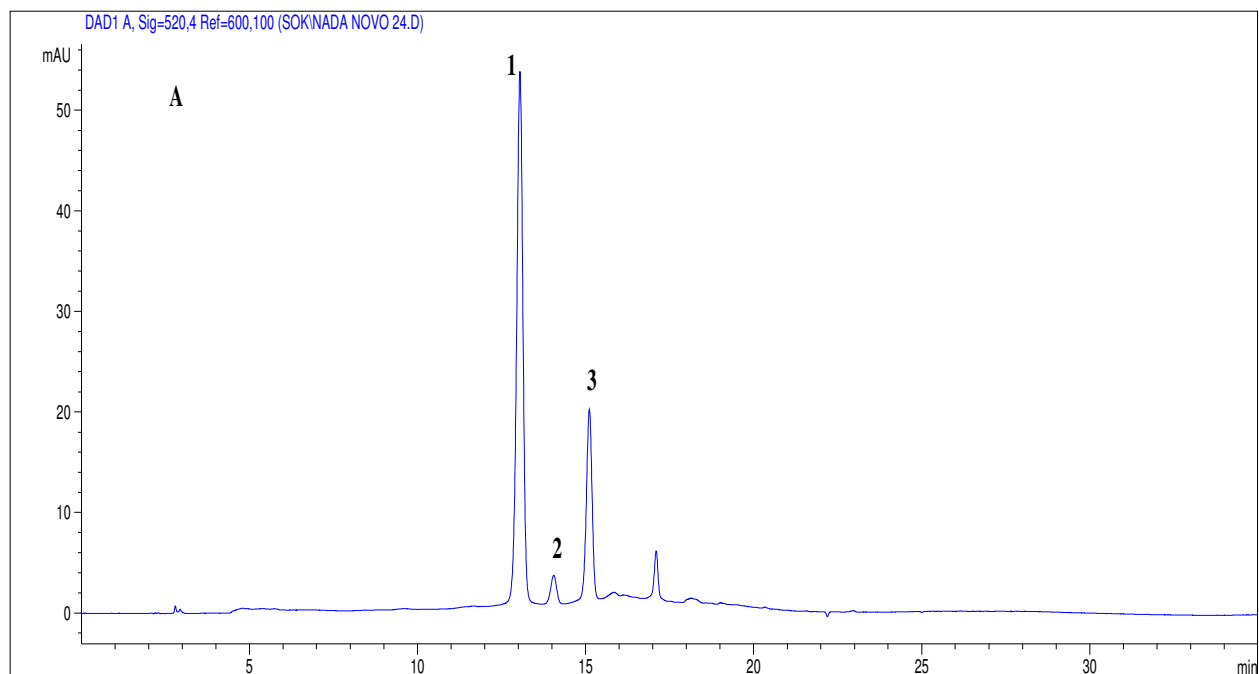
## 9. PRILOG II

### Karakterizacija i kvantifikacija pojedinačnih antocijanskih i flavonoidnih jedinjenja urađena HPLC-DAD metodom

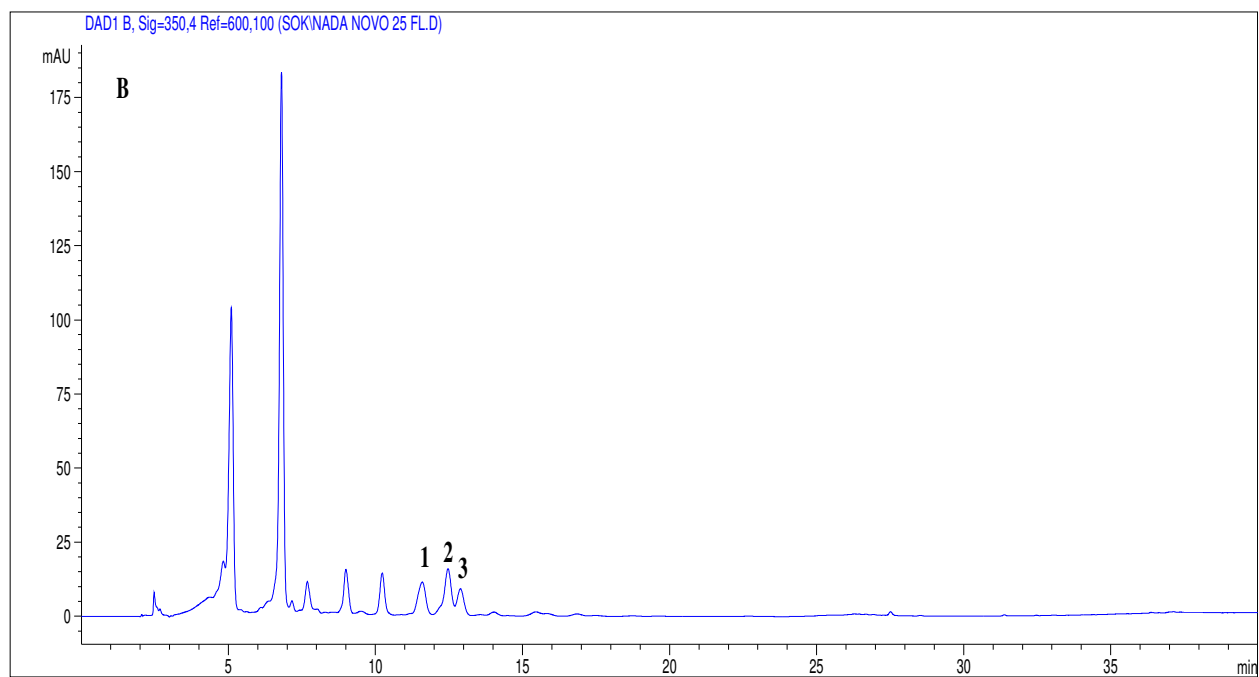
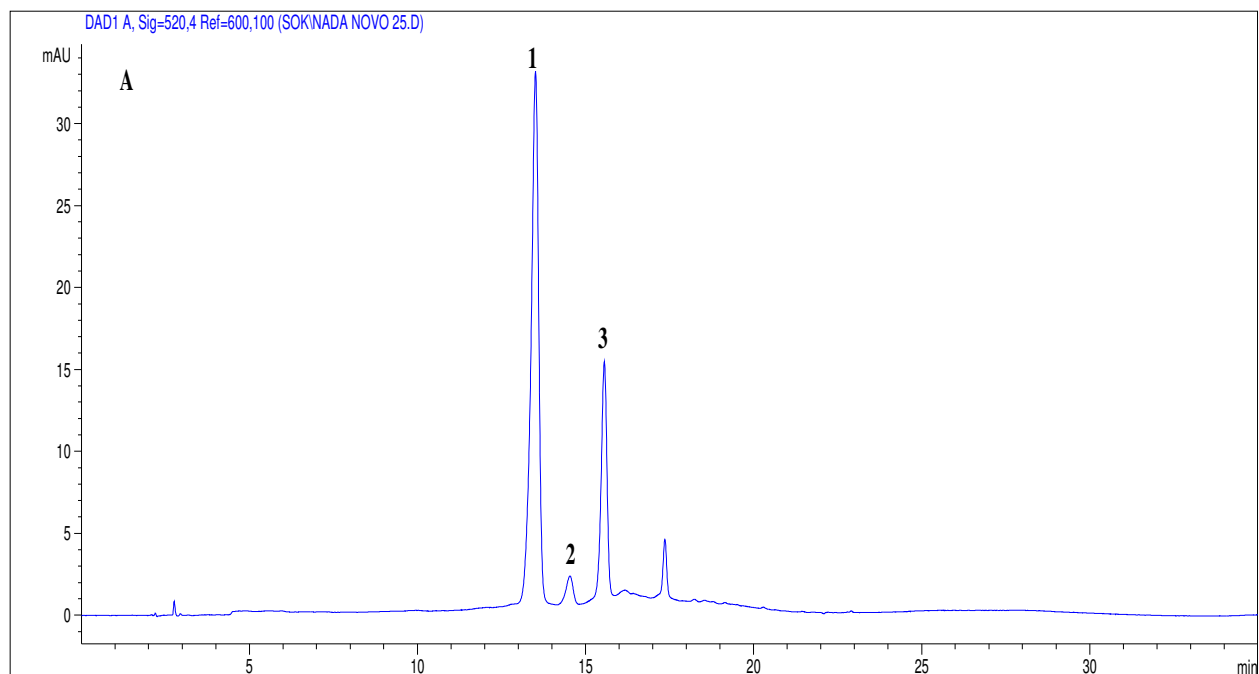
Identifikacija pojedinačnih antocijana (A) i flavonoida (B) u različitim ekstraktima ploda aronije HPLC-DAD metodom (A) (1) Cijanidin-3-*O*-galaktozid (2) Cijanidin-3-*O*-glukozid (3) Cijanidin-3-*O*-arabinozid, (B) (1) Kvercetin-3-*O*-rutinozid (rutin) (2) Kvercetin-3-*O*-galaktozid (hiperozid) (3) Kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercetin)



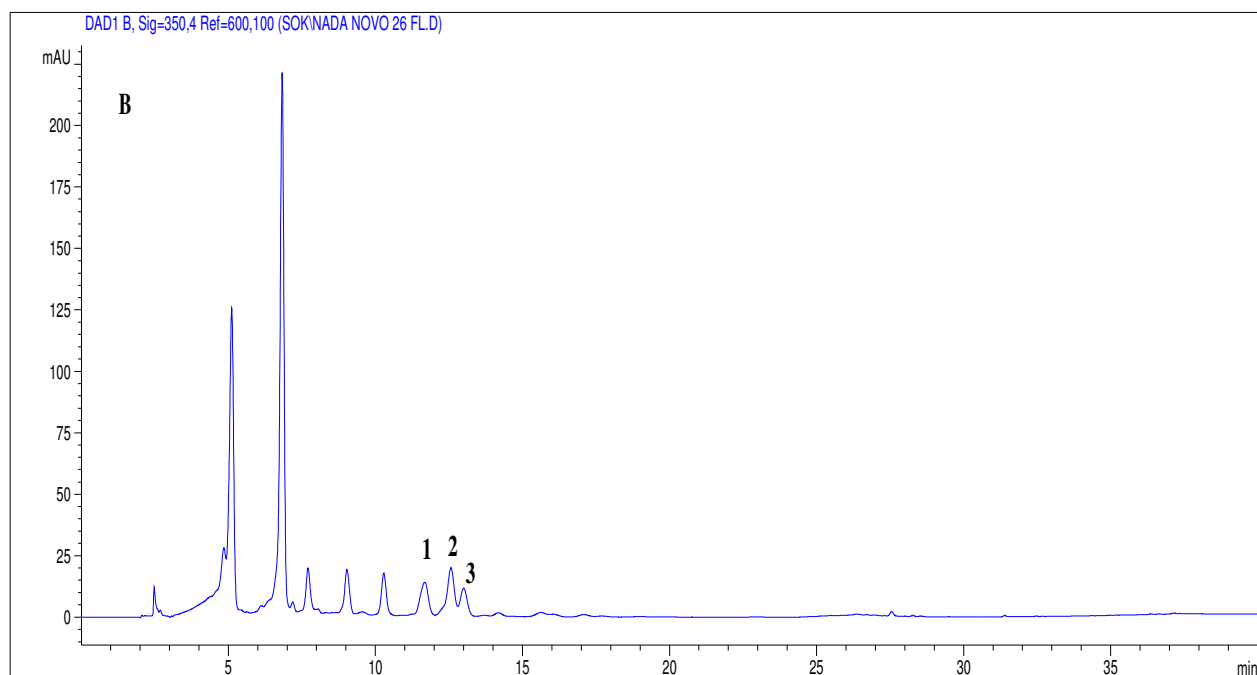
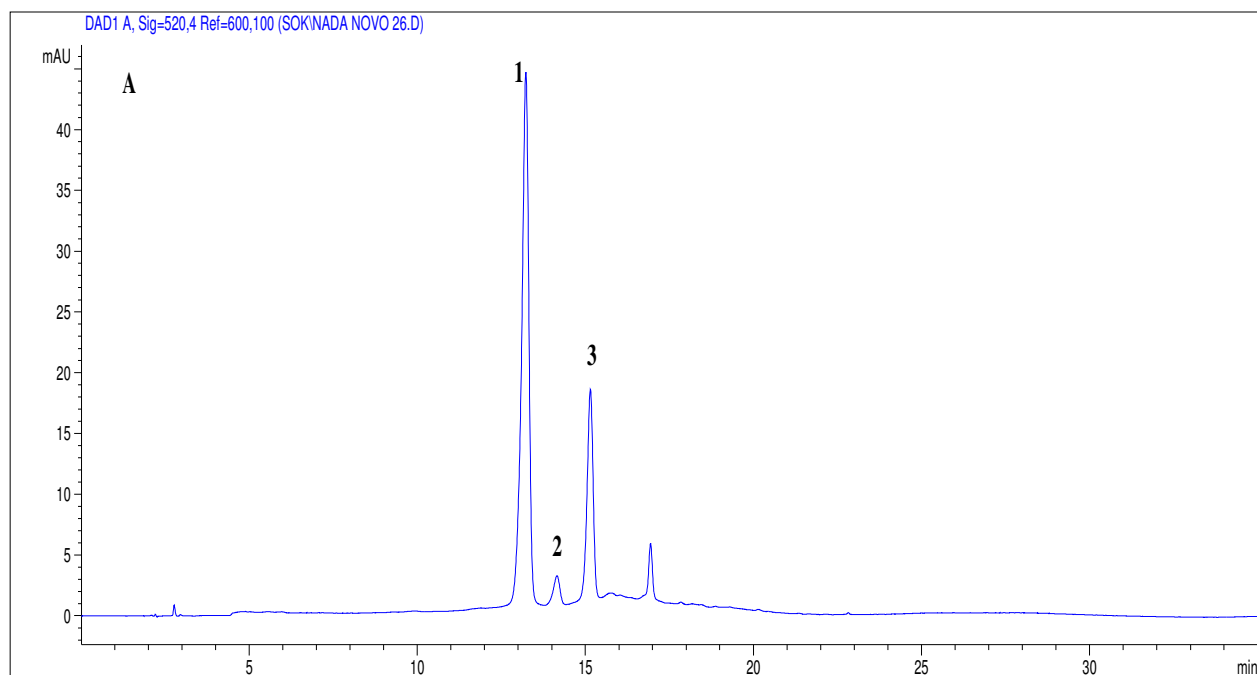
**Slika 55.** Hromatogrami ekstrakta (50% etanol, 1:30 odnos droga-rastvarač, 1 mm veličina čestica)



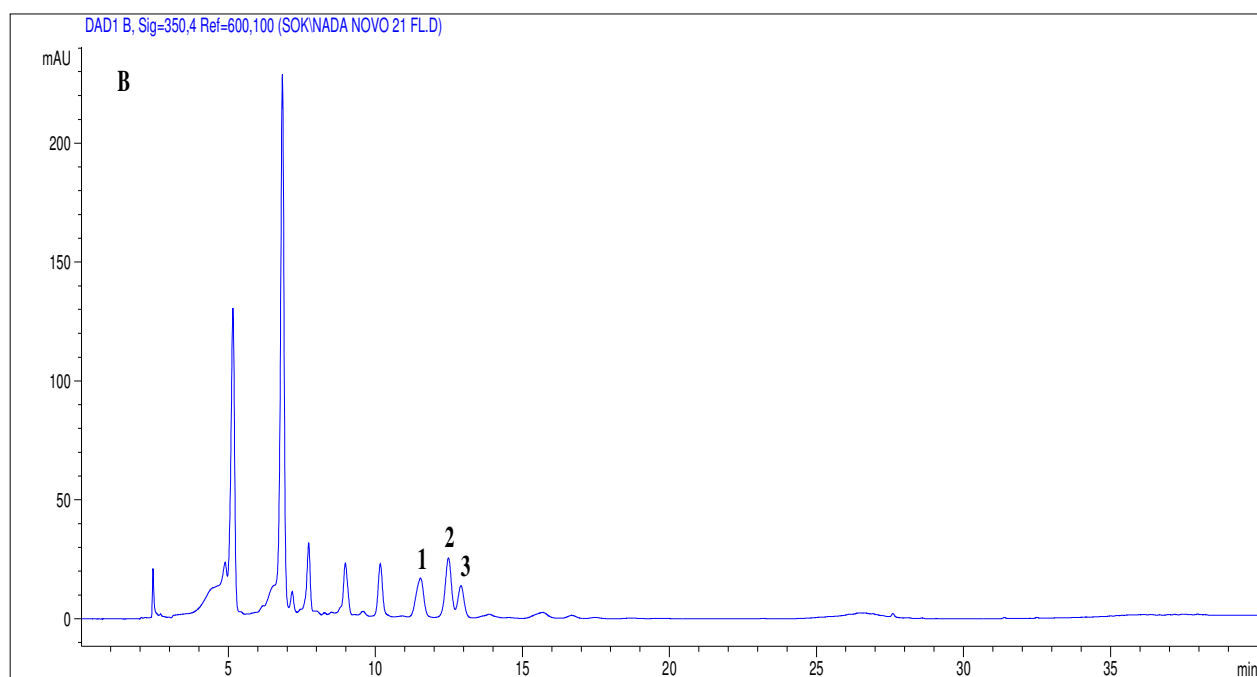
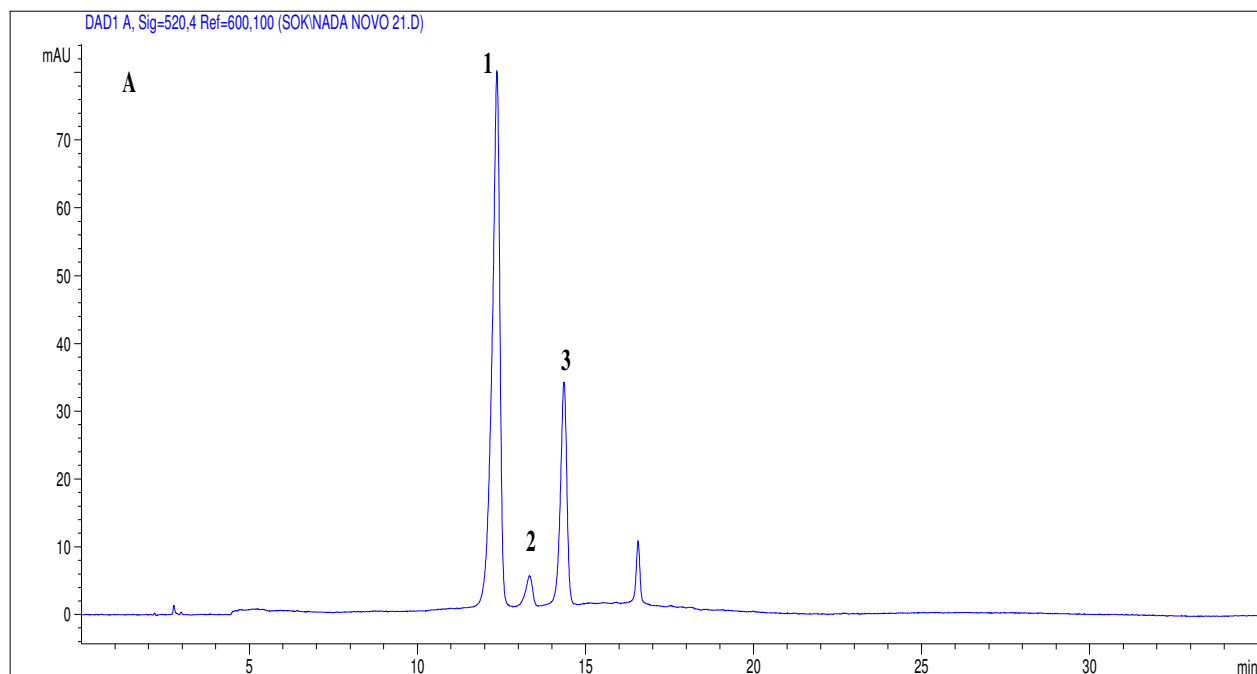
**Slika 56.** Hromatogrami ekstrakta (50% etanol, 1:20 odnos droga-rastvarač, 1 mm veličina čestica)



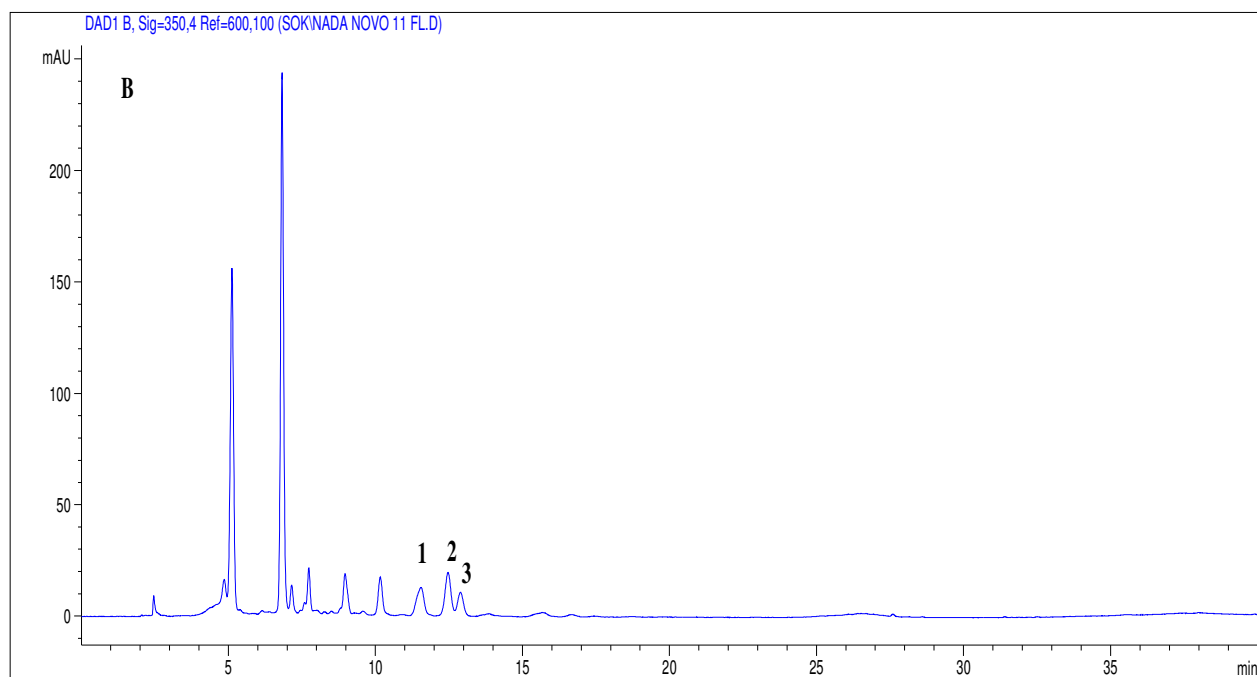
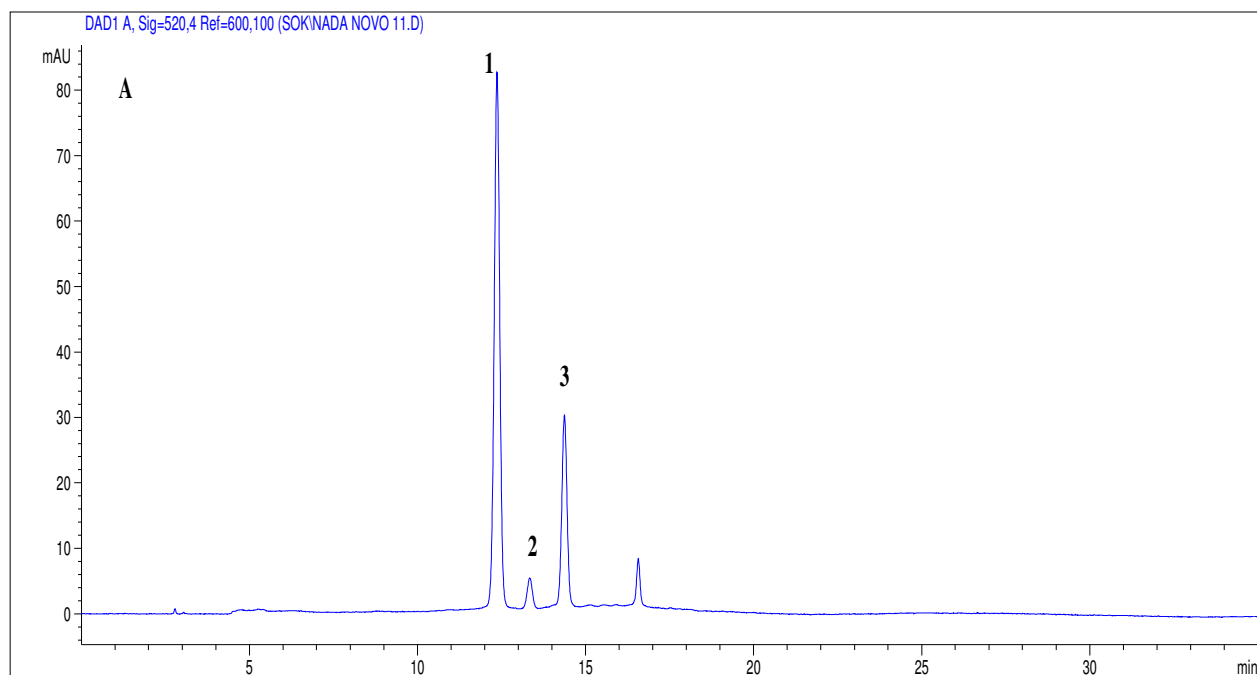
**Slika 57.** Hromatogrami ekstrakta (70% etanol, 1:30 odnos droga-rastvarač, 1 mm veličina čestica)



**Slika 58.** Hromatogrami ekstrakta (70% etanol, 1:20 odnos droga-rastvarač, 1 mm veličina čestica)

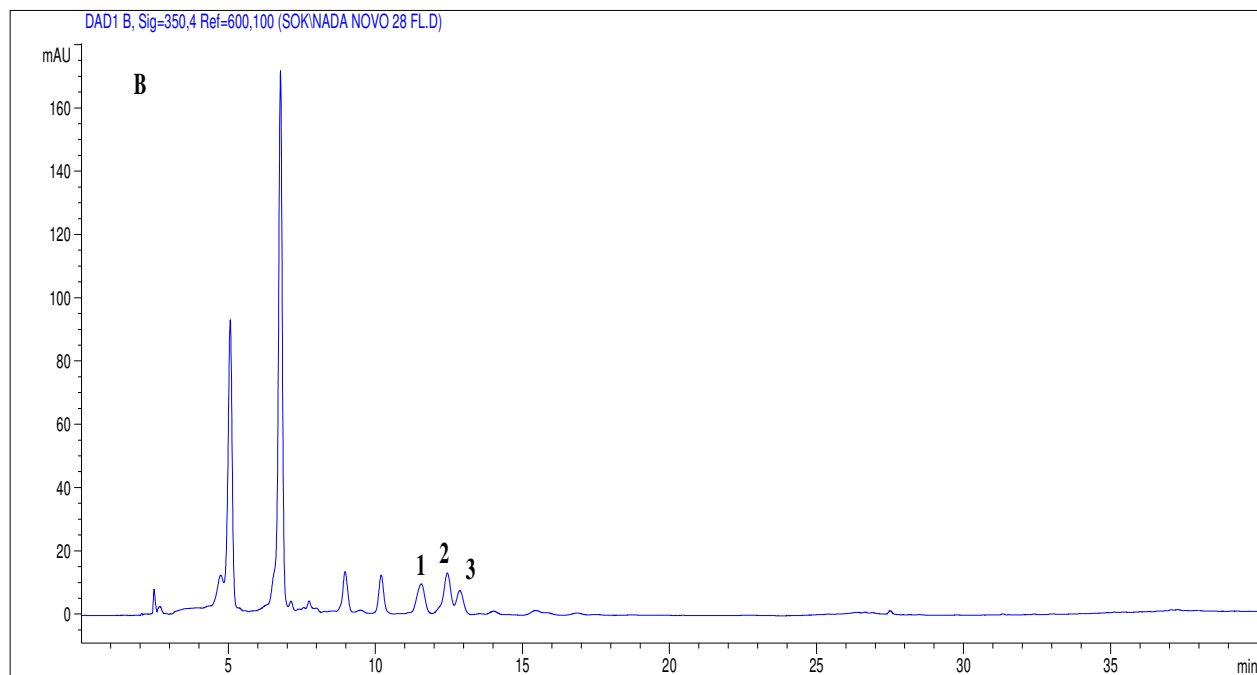
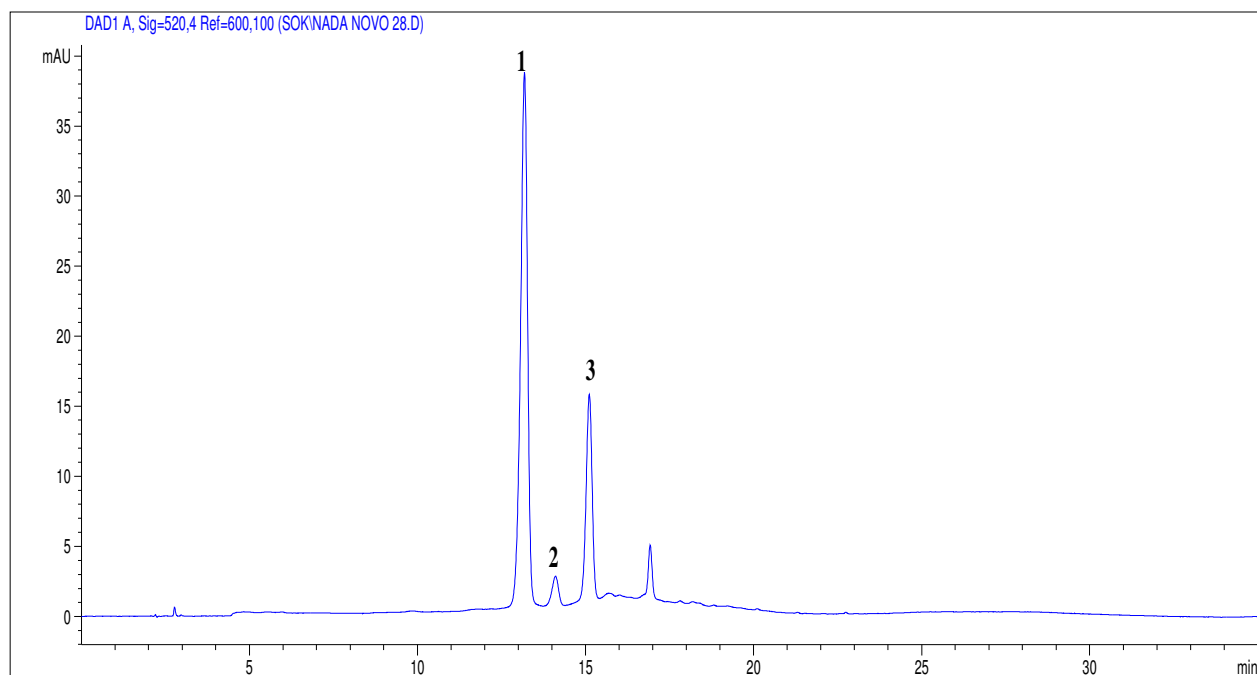


**Slika 59.** Hromatogrami ekstrakta (70% etanol, 1:20 odnos droga-rastvarač, 0.75 mm veličina čestica)



**Slika 60.** Hromatogrami ekstrakta (50% etanol, 1:30 odnos droga-rastvarač, 0.75 mm veličina čestica)





**Slika 61.** Hromatogrami ekstrakta (70% etanol, 1:30 odnos droga-rastvarač, 0.75 mm veličina čestica)

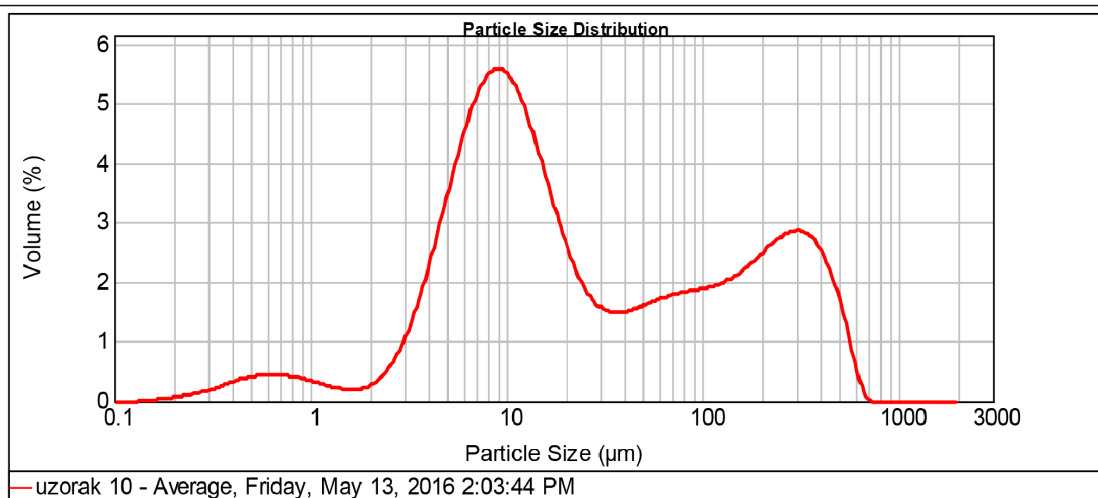
## 10. PRILOG III

### Veličina i distribucija mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem (Mastersizer 2000)

d(0.1): 4.272 um

d(0.5): 15.869 um

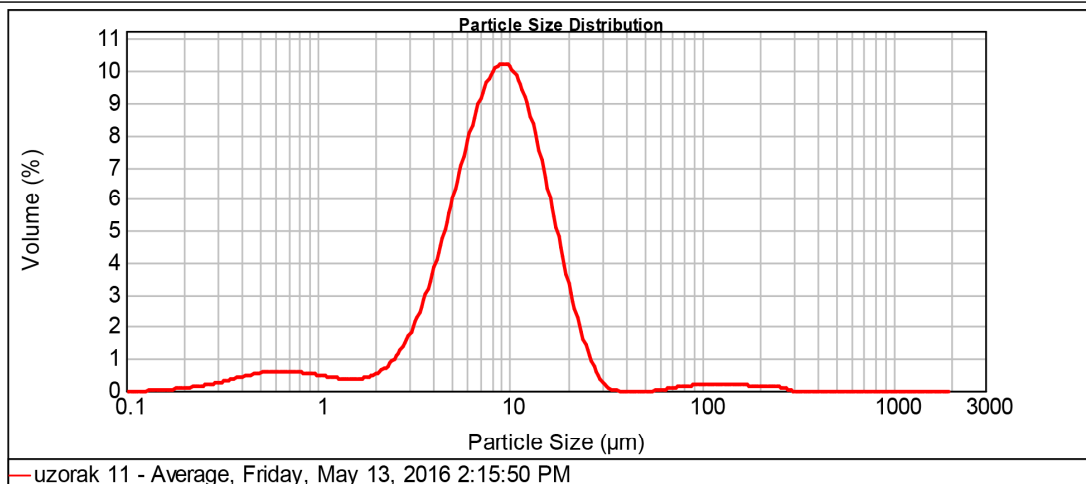
d(0.9): 300.505 um



Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.26	11.482	4.46	120.226	1.81	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.21	13.183	3.90	138.038	1.91	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.02	1.445	0.18	15.136	3.29	158.489	2.04	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.03	1.660	0.19	17.378	2.68	181.970	2.20	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.05	1.905	0.25	19.953	2.16	208.930	2.37	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.08	2.188	0.40	22.909	1.76	239.883	2.51	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.12	2.512	0.65	26.303	1.50	275.423	2.58	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.16	2.884	1.02	30.200	1.37	316.228	2.54	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.22	3.311	1.52	34.674	1.34	363.078	2.35	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.28	3.802	2.13	39.811	1.37	416.869	1.97	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.34	4.365	2.82	45.709	1.44	478.630	1.43	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.38	5.012	3.52	52.481	1.52	549.541	0.67	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.41	5.754	4.17	60.256	1.58	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.41	6.607	4.67	69.183	1.63	724.436	0.07	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.39	7.586	4.98	79.433	1.67	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.36	8.710	5.04	91.201	1.70	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.31	10.000	4.86	104.713	1.74	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	0.31	11.482	4.86	120.226	1.74	1258.925	0.00		

**Slika 62.** Veličina i distribucija čestica dobijenih inkapsulacijom ekstrakta aronije u maltodekstrin

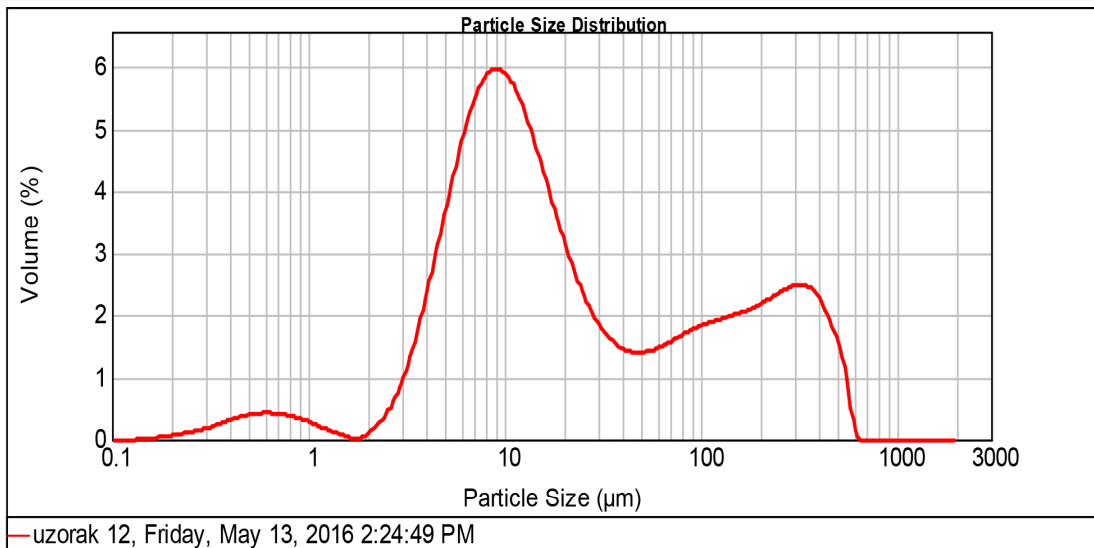
d(0.1): 3.248 um                      d(0.5): 8.500 um                      d(0.9): 17.310 um



Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.38	11.482	8.10	120.226	0.17	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.34	13.183	6.86	138.038	0.16	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.33	15.136	5.40	158.489	0.16	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.02	1.660	0.37	17.378	3.87	181.970	0.15	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.04	1.905	0.49	19.953	2.49	208.930	0.14	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.07	2.188	0.74	22.909	1.36	239.883	0.11	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.11	2.512	1.14	26.303	0.54	275.423	0.01	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.16	2.884	1.72	30.200	0.08	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.21	3.311	2.52	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.29	3.802	3.54	39.811	0.00	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.37	4.365	4.73	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.45	5.012	6.00	52.481	0.00	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.51	5.754	7.25	60.256	0.04	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.54	6.607	8.29	69.183	0.10	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.53	7.586	9.00	79.433	0.15	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.49	8.710	9.23	91.201	0.17	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.44	10.000	8.92	104.713	0.18	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096		11.482		120.226		1258.925	0.00		

**Slika 63.** Veličina i distribucija čestica dobijenih inkapsulacijom ekstrakta aronije u mleko u prahu

d(0.1): 4.550 um                      d(0.5): 14.929 um                      d(0.9): 275.164 um



Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.17	11.482	4.86	120.226	1.76	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.11	13.183	4.35	138.038	1.81	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.02	1.445	0.05	15.136	3.77	158.489	1.87	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.03	1.660	0.00	17.378	3.17	181.970	1.95	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.05	1.905	0.11	19.953	2.64	208.930	2.04	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.08	2.188	0.26	22.909	2.18	239.883	2.15	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.11	2.512	0.53	26.303	1.81	275.423	2.22	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.15	2.884	0.95	30.200	1.55	316.228	2.23	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.21	3.311	1.51	34.674	1.37	363.078	2.11	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.27	3.802	2.20	39.811	1.28	416.869	1.76	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.33	4.365	2.97	45.709	1.26	478.630	1.33	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.37	5.012	3.73	52.481	1.30	549.541	0.34	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.39	5.754	4.43	60.256	1.46	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.38	6.607	4.97	69.183	1.55	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.36	7.586	5.30	79.433	1.64	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.31	8.710	5.38	91.201	1.70	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.25	10.000	5.22	104.713	1.70	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096		11.482		120.226		1258.925	0.00		

Slika 64. Veličina i distribucija čestica dobijenih inkapsulacijom ekstrakta aronije u arapsku gumu

## 11. PRILOG IV

## **Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

### **5.1. Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja (M20)**

#### **5.1.1. Radovi u međunarodnim časopisima izuzetnog značaja (M21a)**

Ćujić N., Šavikin K., Janković T., Pljevljakušić D., Zdunić G., Ibrić S. (2016): Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, 194: 135-142.

Ćujić N., Trifković K., Bugarski B, Ibrić S., Pljevljakušić D., Šavikin K. (2016): Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. *Industrial crops and products*, 86: 120-131.

### **5.2. Radovi objavljeni u zbornicima međunarodnih skupova (M30)**

#### **5.2.1. Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)**

Ćujić N, Šavikin K, Trifković K, Bugarski B, Ibrić S, Pljevljakušić D (2014): „Encapsulation of chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract in alginate and alginate/inulin system by electrostatic extrusion“ *10<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology CESPT 2014*, Portorož, Slovenija, 18-20.09.2014, Book of abstracts, 89-90.

Ćujić N, Šavikin K, Pljevljakušić D, Zdunić G, Ibrić S, Jovanovic A (2014): Optimization of polyphenols extraction from dry chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.), *International Symposium of Natural Products and Drug Discovery-Future Perspectives*, Vienna, Austria, 13-14.11.2014., Book of abstracts, 11.

**Ćujić N**, Grujić-Milanović J, Šavikin K, Miloradović Z, Jovović Dj, Ivanov M, Vajić UJ, Karanović D, Mihailović-Stanojević N (2015): Antihypertensive effect of polyphenol rich chokeberry extract in spontaneously hypertensive rats, 2<sup>nd</sup> European Section meeting of International Academy of Cardiovascular Science, Belgrade, Serbia, 8-10.10.2015. Book of abstracts, 107.

**Ćujić N**, Grujić-Milanović J, Šavikin K, Miloradović Z, Jovović Dj, Ivanov M, Vajić UJ, Karanović D, Mihailović-Stanojević N (2015): Antioxidative effect of polyphenol rich chokeberry extract on lipid peroxidation of in spontaneously hypertensive rats, 2<sup>nd</sup> European Section meeting of International Academy of Cardiovascular Science, Belgrade, Serbia, 8-10.10.2015. Book of abstracts, 108.

**Ćujić N**, Trifković K, Bugarski B, Ibrić S, Pljevljakušić D, Janković T, Šavikin K (2016): Drying influence on actual load of chokeberry polyphenols in microencapsulated alginate or alginate/inulin particles, State of the art technologies: challenge for the research in Agricultural and Food Sciences, Belgrade, 18-20.04.2016. Book of abstracts, 63.

**Ćujić N**, Trifković K, Bugarski B, Ibrić S, Pljevljakušić D, Janković T, Šavikin K (2016): Encapsulation of chokeberry extract by electrostatic extrusion, 8<sup>th</sup> Training School on Microencapsulation, Cork, Ireland, 30.05-02.06.2016.

**Ćujić N**, Šavikin K, Janković T, Kalušević A, Nedović V, Ibrić S (2016): Microencapsulation of chokeberry polyphenols and anthocyanins with different carrier by spray drying method, The 6<sup>th</sup> International Biscience Conference, Novi Sad, 19-21. 09.2016. Book of abstracts, 122.

**Ćujić N**, Šavikin K, Janković T, Kalušević A, Nedović V, Ibrić S (2016): Spray drying influence on encapsulation of chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract, 11<sup>th</sup> Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Belgrade, Serbia, 22-24 September 2016, Book of abstract, 124. Arhiv of Pharmacy, Spec Issue 2016, 66.

### **5.3. Radovi u časopisu nacionalnog značaja (M52)**

Ćujić N, Kundaković T, Šavikin K (2013): Chemistry of anthocyanins, methods of isolation, identification, determination and the biological activity- A Review, *Lekovite sirovine* 33, 19-37.

Ćujić N, Ibrić S, Bigović D, Noveski N, Šavikin K (2015) Ispitivanje stabilnosti biljnih preparata. *Lekovite sirovine* 35, str. 53-60.

### **5.4. Tehnička i razvojna rešenja (M80)**

#### **5.4.1. Industrijski prototip (M82)**

Šavikin K, Ćujić N, Zdunić G, Žugić A. „Anti-age kolekcija za negu kože sa ekstraktom aronije“

Rezultat projekta 46013: „Tradicionalni i novi proizvodi od plodova gajenih i samoniklih vrsta voćaka i vinove loze i nus-produkata u preradi, sa posebnim osvrtom na autohtone sorte: hemijska karakterizacija i biološki profil“

Projektni period: 2011-2015

Rukovodilac projekta: dr Katarina Šavikin

---

## 12. BIOGRAFIJA AUTORA

Nada Ćujić rođena je 29.01.1986. godine u Zemunu. Medicinsku školu u Beogradu, smer farmaceutski tehničar završila je 2005. godine sa odličnim uspehom. Školske 2005/2006 je upisala Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu i diplomirala 04.02.2011 sa ocenom diplomskog rada 10. Nakon završenog obaveznog staža za diplomirane farmaceute, stručni ispit je položila 2012. Doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala u novembru 2012. godine na Katedri za farmaceutsku tehnologiju.

Od 2010-2011. godine je radila kao profesor farmakologije i kozmetologije u Medicinskoj školi u Zemunu, a od marta do decembra 2011. godine stažirala u Apotekarskoj ustanovi Beograd. Od jula do septembra 2011. godine usavršavala se u Ege University Hospital, Odsek za farmaciju, u Izmiru u Turskoj. Od aprila 2012. godine zaposlena je u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, u Odseku za farmaceutska istraživanja i razvoj, a od 2013. godine u zvanju Istraživač saradnik. Učestvovala u internim projektima Instituta, razvoju novih proizvoda kao i na projektu Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja, br. 46013 (Tradicionalni i novi proizvodi od plodova gajenih i samoniklih vrsta voćaka i vinove loze i nus-produkata u preradi, sa posebnim osvrtom na autohtone sorte: hemijska karakterizacija i biološki profil). Autor je i koautor većeg broja publikacija objavljenih u stranim i domaćim časopisima: prvi autor 2 rada i koautor 1 rada kategorije M21a, od kojih 2 rada čine deo disertacije, 14 saopštenja sa međunarodnih skupova iz kategorije M30, 1 štampano u celini (M33) i 13 štampanih u izvodu (M34), od kojih su 7 vezani za disertaciju, 5 radova u časopisima nacionalnog značaja kategorije M52, 2 saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64), kao i jednog tehničkog rešenja (M82).



---

## Izjava o autorstvu

Potpisana: Nada Čujić

Broj indeksa: 22/12

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

“Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem raspršivanjem”

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

U Beogradu, 27.02.2017.

Potpis doktoranda

-----

---

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: Nada Čujić

Broj indeksa: 22/12

Studijski program: Doktorske akademske studije iz Farmaceutске tehnologije

Naslov rada: "Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, *Aronia melanocarpa* (michx.) Elliott, mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem raspršivanjem"

Mentor: Prof. dr. Svetlana Ibrić

Potpisana: Nada Čujić

Izjavljujem da je štampana verzija mog dokorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

U Beogradu, 27.02.2017.

Potpis doktoranda

-----

---

## Izjava o korišćenju

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

“Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem raspršivanjem”, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima sam predala u elektronskon formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

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

U Beogradu, 27.02.2017.

Potpis doktoranda

-----

---

---

---

---