

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, održanoj 26.01.2017. godine imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata diplomiranog farmaceuta Nade Čujić, pod naslovom:

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

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Svetlana Ibrić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr Katarina Šavikin, naučni savetnik, Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd, mentor
3. Dr Branko Bugarski, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet
4. Dr Nevena Mihailović-Stanojević, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja
5. Dr Gordana Zdunić, viši naučni saradnik, Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd

je pregledala priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

***A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije***

Doktorska disertacija diplomiranog farmaceuta Nade Čujić, pod naslovom: „***Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, *Aronia melanocarpa* (michx.) Elliott, mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem raspršivanjem***“, napisana je na

200 strana, a podeljena u 8 celina koje obuhvataju: *Uvod, Ciljeve istraživanja, Materijal i metode, Rezultate i diskusiju, Zaključke, Literaturu, Priloge i Biografiju autora*. Na početku doktorske disertacije dat je sažetak na srpskom i engleskom jeziku. Tekst disertacije pisan je jasnim, preglednim stilom i dokumentovan sa 9 tabela, 64 grafičkih prikaza (slika), kao i sa 181 literaturnim navodom koji se tiču razmatrane problematike.

***Uvodni deo*** obuhvata 3 odeljka i u njima pododeljke: Značaj bobičastog voća, Aronija (Botaničke karakteristike, Hemijski sastav ploda aronije, Biološke aktivnosti aronije, Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije), Inkapsulacija polifenolnih jedinjenja iz ekstrakata (Mikročestice, Materijali koji se koriste za izradu mikročestica, Izrada mikročestica, Kriterijumi za izbor metode inkapsulacije, Karakterizacija mikročestica, Mikroinkapsulacija polifenola iz ploda aronije).

U ovom delu opisane su karakteristike suvog ploda aronije, hemijski sastav dominantno zastupljenih jedinjenja, kao i mnogobrojne biološke aktivnosti aronije. Prikazani su polifenoli, antocijani, flavonoidi i proantocijanidini, kao dominantno zastupljena jedinjenja u plodu aronije. Objasnjen je postupak izolacije aktivnih principa iz ploda aronije, kao i primena eksperimentalnog dizajna tokom ekstrakcije sa ciljem dobijanja što većih prinosa. Predstavljeni su načini prevazilaženja nestabilnosti polifenolnih jedinjenja u ekstraktu aronije a poseban akcenat je stavljen na ispitivanje mogućnosti stabilizacije ekstrakta metodama mikroinkapsulacije. Mikročestice kao novi farmaceutski oblici, mogućnost njihove primene kao i materijali koji se mogu koristiti za njihovu izradu, sa posebnim akcentom na biodegradabilne nosače su takođe prikazani. Opisane su tehnike za proizvodnju mikročestica, elektrostatička ekstruzija i sušenje raspršivanjem, a prikazane su i njihove mnogobrojne prednosti kao i ograničavajući faktori, kao i literaturni pregledi primene ovih tehnika u farmaceutskoj industriji. Prikazane su i metode koje se najčešće koriste za karakterizaciju mikročestica sa ciljem određivanja veličine i oblika čestica, efikasnosti inkapsulacije, oslobađanja aktivnih supstanci, identifikovanja mogućih interakcija između aktivnih principa i nosača, kao i potencijalne primene mikročestica u formulaciji drugih farmaceutskih oblika.

***Ciljevi istraživanja*** su prikazali sveobuhvatno istraživanje koje se sastojalo iz tri dela koji imaju za cilj: (1) optimizaciju ekstrakcije polifenola iz suvog ploda aronije, kako bi se dobio ekstrakt sa najvećim prinosom aktivnih principa, (2) mikroinkapsulaciju dobijenog ekstrakta i razvoj oblika za kontrolisano oslobađanje polifenola. Ispitivan je uticaj procesnih parametara na elektrostatičku ekstruziju kao metodu mikroinkapsulacije kako bi se definisale mikročestice sa najvećom količinom aktivnih principa, kao i uticaj različitih nosača ali i procesnih parametara na tehniku sušenja raspršivanjem u cilju dobijanja čestica različitih karakteristika, (3) ispitivanje delovanja ekstrakta dobijenog iz suvog ploda aronije na potencijalno antihipertenzivno i antioksidativno dejstvo na modelu eksperimentalne hipertenzije.

Na osnovu postavljenih ciljeva, istraživanja su izvedena i prikazana kroz tri celine.

***Prvi deo istraživanja*** obuhvatio je optimizaciju ekstrakcije suvog ploda aronije, ispitivanje uticaja različitih parametara na proces ekstrakcije (različiti rastvarači, stepen usitnjenosti biljnog materijala, dužina ekstrakcije, odnos droga-rastvarač), uz primenu odgovarajućeg softverskog alata, eksperimentalnog dizajna. U okviru odeljka *Materijali i metode* navedene su informacije o biljnom materijalu koji se koristio za ekstrakciju, hemijskim analizama ukupnih i pojedinačnih aktivnih principa ploda aronije, ispitivanju optimalnih uslova ekstrakcije uz primenu eksperimentalnog dizajna, kao i poređenje metoda ekstrakcije, maceracije i ultrazvučne ekstrakcije.

Optimizacija ekstrakcije suvog ploda aronije je podrazumevala:

- Ekstrakciju tradicionalnom metodom-maceracijom i definisanje optimalnih uslova ekstrakcije, ispitivanjem svakog pojedinačnog faktora na svim nivoima i u svim kombinacijama, uz upotrebu 4 x 3x 4 x 5 eksperimentalnog dizajna. U cilju odabira najboljeg ekstrakta, ekstrakcija je vršena sa četiri različita rastvarača, destilovanom vodom, 50%, 70%, 96% mešavinama etanol-voda. 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. Svrha ovog koraka je bila identifikacija promenljive koja ima statistički značajan uticaj na prinos ukupnih fenola i ukupnih antocijana.
- Određivanje sadržaja ukupnih fenola rađeno je spektrofotometrijski na osnovu reakcije sa Folin-Ciocalteu reagensom korišćenjem uređaja (Hewlett Packard, 400N). Određivanja su vršena u tri ponavljanja, a rezultati izraženi kao srednja vrednost.
- Određivanje ukupnih antocijana u ekstraktima rađeno je spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Evropska Farmakopeja 6.0 (2008) uz male modifikacije.
- Hemijska analiza pojedinačnih jedinjenja rađena je metodom visoko efikasne tečne hromatografije, na HPLC aparatu (Agilent 1200 RR, Waldbronn, Germany), uz upotrebu DAD detektora, reverzno-fazne kolone Lichrospher RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm veličina pora, Agilent). Sadržaj pojedinačnih jedinjenja je određen metodom kalibracione krive, pri čemu su za kvantifikaciju antocijana kao standardi korišćeni cijanidin-3-*O*-galaktozida, cijanidin-3-*O*-glukozida i cijanidin-3-*O*-arabinozida a za flavonoide kvercetin-3-*O*-rutinozid (rutin), kvercetin-3-*O*-galaktozid (hiperozid) i kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercetin). Sva određivanja su rađena u tri ponavljanja.
- Na osnovu rezultata dobijenih pomoću prvog faktorijalnog dizajna, urađen je novi 2<sup>3</sup> faktorijalni dizajn kako bi se odabrale optimalne vrednosti odnosa droga-rastvarač, vrste rastvarača i stepena usitnjenosti koji će dati najbolji prinos ukupnih fenola i antocijana. Svaki faktor je testiran na dva nivoa koristeći najniže i najviše vrednosti izabrane na osnovu prethodnog eksperimentalnog dizajna.
- U cilju poređenja efikasnosti tradicionalne i savremene metode ekstrakcije, plod aronije ekstrahovan je i na ultrazvučnom kupatilu-35 W, 40 kHz (Maget, Bela Palanka, Srbija), pod odabranim ekstrakcionim uslovima (50% etanol kao rastvarač, odnos droga rastvarač 1:20 i 0.75 mm stepen usitnjenosti biljne droge).

U okviru odeljka *Rezultati i diskusija* uporedo sa rezultatima prikazana je detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata, po svim fazama eksperimentalnog rada.

**Drugi deo istraživanja** obuhvatio je mikroinkapsulaciju ekstrakta aronije koji je dobijen u toku faze optimizacije ekstrakcije, dvema metodama mikroinkapsulacije, elektrostatičkom ekstruzijom i sušenjem raspršivanjem. Ispitivan je uticaj procesnih parametara na elektrostatičku ekstruziju, kao i karakterizacija čestica koje su dobijene ovom metodom. Takođe, ispitan je uticaj različitih nosača na dobijanje mikročestica odgovarajućih karakteristika korišćenjem tehnike sušenja raspršivanjem kao i mogućnost primene dobijenih čestica za oralnu primenu. U delu *Materijali i metode* opisane su tehnike kojima je

mikroinkapsuliran ekstrakt, uz primenu statističkih metoda, kao i metoda koje su korišćene za fizičko-hemijsku i biofarmaceutsku karakterizaciju izrađenih mikročestica. Ovaj deo istraživanja podeljen je u dve faze.

## 2a) Faza istraživanja:

- Čestice sa inkapsuliranim ekstraktom aronije su izrađene elektrostatičkom ekstruzijom, variranjem različitih nosača (alginati niskog i srednjeg viskoziteta, sa ili bez dodatka inulina) kao i tri različite veličine igle (18, 230, 22) na elektrostatičkom ekstruderu uz upotrebu infuzione pumpe (Razel, Scientific Instruments, Stamford, USA), stalnim zapreminskim protokom od 39.3 ml/h.
- U cilju dobijanja suvih čestica, koristila se metoda sušenja zamrzavanjem (Beta 1-8 Freeze Dryer, Martin Christ, GmbH, Osterode am Harz, Germany).
- Veličina hidrogel i liofilizovanih čestica je određena korišćenjem optičkog mikroskopa (Carl Zeiss model AxioImager A1). Srednja vrednost dijametra čestica i standardna devijacija su izračunate iz izmerenih vrednosti. Uvid u sferičnost hidrogel čestica dobijena je takođe pomoću optičkog mikroskopa, a osušenih čestica (lioofilizacijom) pomoću lupe (Nikon SMZ 18, kamera Nikon DS-Fi1C, objektiv SHR Plan Apo).
- Efikasnost inkapsulacije polifenola određivana je nakon rastvaranja mikročestica u rastvoru natrijum-citrata uz energično mešanje, koristeći Vortex (Tehnica, Železniki, Slovenija). Nakon rastvaranja i dezintegriranja čestica, u tako dobijenim polifenolno-citratnim rastvorima određivan je sadržaj ukupnih polifenola spektrofotometrijski prema Folin-Ciocalteu metodi.
- Oslobođanje polifenola u *in vitro* uslovima su određivano je u odgovarajućim medijumima (voda i zakišeljani medijum) u određenim vremenskim intervalima, a takođe je ispitivano i poređeno oslobođanje polifenola iz hidrogel i liofilizovanih čestica. Sadržaj oslobođenih polifenola određivan je spektrofotometrijski prema Folin-Ciocalteu metodi.
- Potencijalne interakcije između inkapsuliranog ekstrakta i nosača određene su metodom Furijerove Transmisionne Infracrvene Spektroskopije, a spektri su snimljeni na FTIR spektrofotometru (BOMEM, Hartmann & Braun, Frankfurt, Nemačka), korišćenjem KBr diska. 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  $\text{cm}^{-1}$ .
- Morfologija površine čestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom ispitivana je korišćenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa (Tescan Mira 3 XMU, Cranberry Township, USA). Upotrebljena su različita uveličanja što je naglašeno na mikrografijama.

## 2b) Faza istraživanja:

- Metoda sušenja raspršivanjem je primenjena za mikroinkapsulaciju 50% etanolnog ekstrakta aronije koji je dobijen tokom faze optimizacije ekstrakcije upotrebom 3 različita nosača, arapskom gumom (5%), maltodekstrinom (20%) i mlekom u prahu (20%). Za mikroinkapsulaciju se koristio uređaj za sušenje raspršivanjem (Büchi mini B-290, Büchi Labortechnik AG, Switzerland), korišćenjem dijametra igle od 0.7 mm, temperaturom ulaznog ( $130\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) i izlaznog ( $56\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) vazduha, protokom vazduha (536 L/h), protokom tečnosti (8 mL/min), pritiskom atomizacije (6 psi).
- Određivana je količina oslobođenih polifenola (spektrofotometrijski prema Folin-Ciocalteau metodi) i antocijana (spektrofotometrijski prema propisu Evropske Farmakopeje 6.0.) iz mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem u *in vitro* uslovima.
- Transmisioni spektri dobijenih čestica su snimljeni na FTIR spektrofotometru (BOMEM, Hartmann & Braun, Frankfurt, Nemačka) korišćenjem metode pomoću KBr diska. Uzorci su snimani na talasnoj dužini od 4000 do  $450\text{ cm}^{-1}$ , sa rezolucijom od  $4\text{ cm}^{-1}$ .
- 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, poznate kao DeBroukere-ova vrednost.

U okviru odeljka *Rezultati i diskusija* uporedo sa rezultatima prikazana je detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata, po svim fazama eksperimentalnog rada.

**Treći deo istraživanja** je obuhvatio ispitivanje hipotenzivnog delovanja ekstrakta suvog ploda aronije na modelu esencijalne hipertenzije kod spontano hipertenzivnih pacova-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, a zatim je ostatak liofilizovan u cilju lakšeg aplikovanja kod eksperimentalnih životinja. Liofilizovan ekstrakt je okarakterisan na sadržaj ukupnih fenola, antocijana i proantocijanidina, a takođe određena je i antioksidativna aktivnost ekstrakta aronije pomoću FRAP i ABTS metoda, a kao pozitivane kontrolne vrednosti, korišćeni su konvencionalni antioksidansi kao što su vitamin C i butilhidroksitoluen. Sva određivanja su vršena u tri ponavljanja. Životinje su bile raspoređene u dve eksperimentalne grupe, kontrolnu SHR-K (n=9), koja je svakodnevno gastričnom sondom primala 1 ml vode u trajanju od četiri nedelje i tretiranu grupu, SHR-A (n=10) koja je primala 50 mg/kg/dan liofilizovanog ekstrakta aronije rastvorenog u 1 ml vode. U odeljku *Materijali i metode* opisani su parametri koji su određivani kod eksperimentalnih životinja.

- Primenom hiruške intervencije na femoralnoj arteriji je izvršena ugradnja katetera za potrebe registrovanja sistolnog, dijastolnog i srednjeg arterijskog pritiska i frekvence rada srca na uređaju Cardiomax III (9800TCR Cardiomax III-TCR, Columbus Instruments', USA). Za potrebe određivanja minutnog volumena srca na uređaju Cardiomax III, hiruški je obrađena jugularna vena i u nju ubačen kateter, a u unutrašnjost leve karotidne arterije je postavljen termosenzor za registraciju telesne temperature životinje. Na osnovu telesne mase životinja preračunavan je indeks

minutnog volumena, dok je pulsni pritisak izračunat iz razlike sistolnog i dijastolnog pritiska. Ukupni periferni otpor je izračunat na osnovu izmerenih vrednosti za minutni volumen i srednji arterijski pritisak.

- Merenje regionalnih hemodinamskih parametara vršeno je određivanjem protoka krvi kroz karotidnu i renalnu arteriju, kao i aortu direktnom metodom pomoću uređaja Transonic T106 Small Animal Flowmeter (Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA). 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.
- Radi određivanja biohemijskih parametara uzorkovana je krv punkcijom iz račve abdominalne aorte, i čuvana u tubama koje su sadržale antikoagulans litijum-heparin (Sigma, USA). 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. Uticaj ekstrakta aronije na bubrežnu funkciju je procenjena na osnovu određivanja klirensa endogenog kreatinina 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. 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 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).
- Step en lipidne peroksidacije u plazmi i eritrocitima je procenjen na osnovu određivanja reaktivnih jedinjenja tiobarbiturne kiseline (TBARS).
- Ukupni antioksidativni kapacitet plazme i sposobnost redukovanja gvožđa u plazmi određivani su ABTS metodom i FRAP testom.
- Radi određivanja enzima antioksidativne zaštite uzimala se kompletna krv i centrifugirala, posle čega se plazma odvajala od eritrocita. Istaloženi eritrociti su resuspendovani i tri puta isprani fiziološkim rastvorom uz centrifugiranje 15 min na 3.000 rpm, 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 SOD, CAT, GSH-Px, GR. Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima izražena je u jedinicama po g hemoglobina. Za određivanje koncentracije hemoglobina u lizatu krvi primenjena je kolorimetrijska cijanomethemoglobinska metoda po Drabkinu i Austinu. Za određivanje je korišćen komercijalno dostupan *Drabkinov reagens*. Aktivnost enzima super oksid dismutaze (SOD) određena je indirektnom metodom koja se zasniva na smanjenju brzine redukcije citohroma C. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u lizatu krvi određivana je spektrofotometrijskom metodom koja je pratila brzinu razgradnje vodonik peroksida u prisustvu katalaze na 230 nm. Određivanje aktivnosti glutathion-

peroksidaze (GPx) vršeno je metodom koja se zasnivala na aktivnosti GPx, koja katalizuje oksidaciju glutationa (GSH) u glutation-disulfid (GSSG) uz redukciju organskih hidroperoksida i glutation reduktaze (GR), koja katalizuje redukciju GSSG u GSH uz oksidaciju NADPH kao koenzima. Ovom metodom se prati potrošnja NADPH, odnosno oksidacija NADPH uz glutation reduktazu na 340 nm. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR) rađeno je metodom koja se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovanog u redukovani glutation.

U odeljku *Rezultati i diskusija* uporedo sa rezultatima prikazana je detaljna analiza i tumačenje dobijenih rezultata, po svim fazama eksperimentalnog rada.

### **B. Opis postignutih rezultata**

U **Prvom delu istraživanja**, tokom faze 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 x 3 x 4 x 5 eksperimentalnog dizajna. Među ispitivanim varijablama, vreme se nije pokazalo kao statistički značajan faktor koji utiče na ekstrakciju polifenola.

2<sup>3</sup> 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. 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.

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 (maceracijom sa 50% etanolom, 1:20 odnosom droga-rastvarač, 0.75 mm stepenom usitnjenosti droge, u trajanju od 60 minuta) postiže najveći prinos polifenolnih jedinjenja.

Korišćenje ultrazvučne metode za ekstrakciju suvog ploda aronije nije dovelo do povećanja prinosa aktivnih principa. Rezultati su pokazali da je maceracija efektivna i jednostavna metoda za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije, kojom se ne degradiraju inače osetljivi aktivni principi.

U **Drugom delu istraživanja** ekstrakt sa najvećim sadržajem aktivnih principa dobijen tokom faze optimizacije ekstrakcije, uspešno je inkapsuliran u odgovarajuće nosače dvema metodama mikroinkapsulacije, elektrostatičkom ekstruzijom i sušenjem raspršivanjem.

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 su bile pravilnog oblika, u rasponu veličina od 800 do 1340 µm, u zavisnosti od tipa nosača i veličine igle. 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 3.57 mg GAE/g polifenola je inkapsulirano u liofilizovane čestice sa kojima je oslobađanje produženo na čak 40 minuta.

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.

FTIR analiza je pokazala nekoliko relevantnih pikova u spektrima sistema u koje je inkapsuliran ekstrakt, bez vidljivih inkompatibilnosti i interakcija između nosača i ekstrakta.

Zbog produženog vremena oslobađanja polifenola, liofilizovane mikročestice izrađene elektrostatičkom ekstruzijom su pokazale najbolji potencijal kao sistemi za isporuku polifenolnih jedinjenja, a koji su pogodni za farmaceutsku upotrebu.

Iz mikročestica dobijenih tehnikom 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 mikročestica gde je arapska guma korišćena kao nosač. Veličina mikročestica dobijenih sušenjem raspršivanjem je bila u 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.

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 primenu relativno visokih temperatura.

**U Trećem delu istraživanja ispitivan je** uticaj četvoronedeljne hronične primene optimizovanog liofilizovanog ekstrakta dobijenog iz suvog ploda aronije na sistemske i regionalne hemodinamske parametre. Nakon četiri nedelje, 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. Četvoronedeljna primena ekstrakta aronije dovela je do povećanja FRAP aktivnosti plazme, dok je ABTS aktivnost ostala nepromenjena. Ekstrakt aronije je značajno smanjio SOD aktivnost u eritrocitima SHR, što ukazuje na nizak nivo superoksidnih anjona u tretiranoj grupi SHR. Četvoronedeljni tretman ekstraktom aronije doveo je do značajnog smanjenja lipidne peroksidacije u plazmi i eritrocitima SHR usled smanjenog oksidativnog stresa.

Hronična primena ekstrakta nije uticala na nivo holesterola, HDL, LDL, TG i glukoze kod spontano hipertenzivnih pacova normalnog lipidnog statusa.

Značajna redukcija sistolnog krvnog pritiska najverovatnije je posledica smanjenog oksidativnog stresa, ali i povećane diureze koju je izazvala primena ekstrakta aronije.

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 njegovu potencijalnu primenu kod kardiovaskularnih oboljenja.

Odabrani ekstrakt aronije je pogodan za izradu stabilnog i standardizovanog biljnog proizvoda, sa maksimalno očuvanom količinom aktivnih principa.



### ***C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature***

Budući da se savremeni način života povezuje sa neadekvatnom ishranom i sve učestalijom pojavom različitih hroničnih oboljenja, pojavljuje se potreba za primenom alternativnih prirodnih supstanci, i antioksidanasa kojima bi se postiglo ciljano zaštitno dejstvo na organizam. Zbog toga su izolovanje i identifikacija biološki aktivnih jedinjenja iz biljaka, njihova dalja primena u smislu obogaćivanja različitih proizvoda ovim jedinjenjima, mogućnost njihove primene kao dodatka ishrani, trenutno jedna od najaktuelnijih naučno-istraživačkih tema. Poslednjih godina posebno su atraktivna ispitivanja polifenolnih jedinjenja, sekundarnih biljnih metabolita, kojima se pripisuju pozitivni efekti na ljudsko zdravlje zahvaljujući potentnoj biološkoj aktivnosti (Stojanović i sar. 2012; Shahidi i sar. 2015). Pored toga, ova klasa jedinjenja je interesantna i za prehrambenu industriju jer se smatraju dobrom alternativom veštačkim antioksidansima, dok su sa medicinskog aspekta zanimljivi zbog niza dokazanih pozitivnih efekata na zdravlje ljudi. Studije sa preporukama za konzumiranje polifenola su danas veoma česte (Bräunlich i sar. 2013; Denev i sar. 2010).

Aronija (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, Rosacea) je jedan od najbogatijih izvora polifenolnih jedinjenja među biljkama, gde dominiraju antocijani, proantocijanidini, fenolne kiseline, flavanoli (Rugina i sar. 2012; Sueiro i sar. 2006; Bräunlich i sar. 2013; Kulling i Rawel, 2008). Plod aronije vodi poreklo iz Severne Amerike, a početkom 20-og veka počela je da se uzgaja i u Istočnoj Evropi, Skandinaviji i Rusiji (Kokotkiewicz, Jaremicz i Luczkiewicz, 2010). Aktivni principi iz ploda aronije pokazuju niz pozitivnih delovanja na zdravlje, a koriste se i u profilaksi a 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).

Kardiovaskularne bolesti u humanoju populaciji predstavljaju jedan od vodećih uzroka mortaliteta. Pored hipertenzije i ateroskleroze, oksidativni stres i povišena lipidna peroksidacija takođe su prisutni u patološkim stanjima kardiovaskularnih oboljenja. 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 antihipertenzivne, hipolipemičke i kardioprotektivne efekte, kako pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, tako i sinergizma u delovanju ovih komponenti (Hellstrom i sar. 2010; Broncel i sar. 2010; Ciocoiu i sar. 2013; Young i Jeong, 2011; Duchnowicz i sar. 2012), što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. Budući da je predmet istraživanja veoma aktuelna biljna vrsta, po prvi put su se ispitali *in vivo* efekti ekstrakta ploda aronije na krvni pritisak.

Aronija je na tržištu dostupna u vidu svežih i suvih plodova, soka, džemova, ali i različitih dijetetskih suplemenata i ekstrakata (Kokotkiewicz i sar. 2010; Kulling i sar. 2008; Gonzales-Molina, Moreno i Garcia-Viguera, 2008). 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. 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, gde se posebno misli na antocijane koji su izuzetno nestabilna jedinjenja. Brojni su faktori koji utiču na efikasnost ekstrakcije, a najznačajnji među njima su rastvarač, metoda ekstrakcije, temperatura, dužina trajanja ekstrakcije, stepen usitnjenosti biljnog materijala, i pH vrednost ekstragensa. Optimizacija ekstrakcionog procesa ploda aronije variranjem različitih faktora je danas veoma interesantna, jer su literaturni podaci do sada veoma oskudni. Da bi se maksimizovao prinos polifenolnih jedinjenja, potrebno je ispitati optimalne vrednosti pomenutih faktora. 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. On takođe određuje i potencijalne interakcije između pojedinačnih faktora a sve u cilju što bolje optimizacije metode ekstrakcije (Ramić i sar, 2015). U skladu sa svim prethodno navedenim, ovo istraživanje je takođe imalo za interes dobijanje ekstrakta sa maksimalnom količinom aktivnih principa.

Primena ekstrakata bogatih polifenolima ima i niz ograničenja, a to su 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). Jedna od metoda kojom se mogu očuvati biološki aktivna jedinjenja ekstrakta ploda aronije i prevazići njihova nestabilnost je metoda mikroinkapsulacije. Mikroinkapsulacija se može definisati kao proces koji uključuje potpuno obuhvatanje ćelija, enzima i biološki aktivnih supstanci unutar definisanih poroznih, polupropusnih materijala korišćenjem različitih tehnika, tako da nastaju čestice veličine 1–1000  $\mu\text{m}$  (Burges i Hickey, 2007; Park i Yeo, 2007). Glavni cilj ove metode je očuvanje stabilnosti aktivnih principa, produženje roka trajanja, kontrolisano oslobađanje iz mikročestica, pokrivanje gorkog ukusa polifenola, i sprečavanje negativnog dejstva gastrointestinalnog trakta (Fang i Bhandari, 2010). Mikroinkapsulacija je obećavajuća metoda kojom se može poboljšati bioraspoloživost polifenola (Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk, 2011; Belščak-Cvitanović i sar. 2011). Među mnogobrojnim metodama mikroinkapsulacije, elektrostatička ekstruzija se izdvojila 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). 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, što se pokazalo kao rezultata i u ovom istraživanju.

Ispitivanje uticaja različitih procesnih parametara na elektrostatičku ekstruziju tokom mikroinkapsulacije ekstrakta aronije je veoma interesantno jer do sada nisu postojali literaturni podaci, a sve u cilju definisanja mikročestica sa najvećom količinom aktivnih principa, tj. polifenola.

Tehnika sušenja raspršivanjem je još jedna metoda mikroinkapsulacije veoma aktuelna poslednjih par godina. Sušenje raspršivanjem je postupak kojim se medijum u vidu sitnih kapljica uvodi u struju zagrejanog gasa koji dovodi do brzog formiranja čvrstih čestica. Sušenje raspršivanjem je brza, efikasna tehnika za mikroinkapsuliranje sa različitim nosačima. Ovom tehnikom se generalno dobijaju mikročestice veličine 1-100  $\mu\text{m}$  i postiže se ekifasnost inkapsulacije čak do 99%. Osnovne prednosti sušenja raspršivanjem su jednostavnost metode, veliki kapacitet proizvodnje i mogućnost komercijalne primene, međutim metoda ima i nedostatke i ograničenja. Ova ograničenja uglavnom se odnose na

osetljivost supstanci na povišenu temperaturu, pogotovo termolabilnih polifenolnih jedinjenja. Rezultati ovog istraživanja u poređenju sa prethodno objavljenim u literaturi su pokazali da je sušenje raspršivanjem pogodna metoda za očuvanje osetljivih aktivnih principa iz ploda aronije (Burges i Hickey, 2007; Park i Yeo, 2007; Fang i Bhandari 2010; Flores i sar, 2014; Horswald, Hertier, Andlauer, 2013).

Na osnovu opsežnog pregleda literature, može se zaključiti da istraživanja u okviru ove disertacije ukazuju na značaj i aktuelnost ispitivane tematike. U okviru doktorske disertacije, citirano je 181 literaturni navod koji su omogućili da se prikaže stanje u ispitivanoj oblasti, kao i aktuelnost problematike. Savremena istraživanja objavljena u navedenim naučnim radovima su opisana, analizirana i izvedeni su zaključci koji su omogućili dobar uvid u potencijal primene inkapsuliranog ekstrakta aronije. Na osnovu pažljive analize rezultata prikazanih u naučnoj literaturi izložene su osnovne smernice za istraživanja koja su izvršena u ovoj doktorskoj disertaciji.

Nakon poređenja rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije sa do sada objavljenim rezultatima drugih istraživačkih grupa, zaključili smo da je ostvaren značajan doprinos u razvoju novih sistema za inkapsulaciju polifenola iz ekstrakata aronije, koji omogućavaju čuvanje stabilnosti kao i produženo oslobađanje aktivnih komponenti. Do sada kroz literaturne podatke nisu bili ispitivani uticaji veličine igle, kao ni uticaj različitih viskoziteta alginata na mikroinkapsulaciju polifenola aronije. Maltodekstrin, arapska guma i mleko u prahu nisu ispitivani kao sistemi za isporuku i očuvanje stabilnosti polifenola aronije u cilju oralne primene. Ekstrakt suvog ploda aronije je prvi put primenjen u *in vivo* studiji na modelu esencijalne hipertenzije, sa ciljem ispitivanja uticaja ekstrakta na smanjenje rizika od kardiovaskularnih komplikacija.

Na osnovu rezultata teze elektrostatička ekstruzija i sušenje raspršivanjem se mogu predložiti kao efikasne metode za mikroinkapsulaciju i očuvanje stabilnosti polifenolnih jedinjenja koja pokazuju niz pozitivnih efekata na kardiovaskularno zdravlje.

## Literatura

1. 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.
2. 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. *J. Sci. Food Agricul.* 92, 685–696.
3. 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.
4. 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.
5. 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. *J. Medic. Food*, 15, 700-706.

6. 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. *J. Food Sci.* 71, 480-488.
7. Kulling, S.E., Rawel, H.M., 2008. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)-A review on the characteristic components and potential health effects. *Pl. Med.* 74, 1625-1634.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Gonzales-Molina, E., Moreno, D.A., & Garcia-Viguera, C. 2008. Aronia-lemon juice: a new highly antioxidant beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11327-11333.
15. Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejin, A., & Pavlić, B. 2015. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 360-368.
16. Bakowska-Barczak, A.M., Kolodziejczyk, P.P., 2011. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Ind. Crops. Prod.* 34, 1301-1309.
17. Fang, Z., Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends Food Tech.* 21, 510-523.
18. 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.
19. 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.

20. 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
21. Burges, D., Hickey, A. 2007. Microsphere Technology and Applications. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 3rd edition, Swarbrick J, Ed. Informa Healthcare, New York, 2328-38.
22. Park., K, Yeo., Y. 2007. Microencapsulation Technology. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 3rd edition , Swarbrick J, Ed. Informa Healthcare, New York, 2315-27.
23. 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.
24. Horswald, A., Hertier, J., Andlauer, W., 2013. Characterisation of Aronia powders obtained by different drying process. *Food Chem.* 141, 2858-2863.

#### ***D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije***

##### **Radovi u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (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.

##### **Saopštenja na konferencijama međunarodnog značaja**

**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.

#### **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-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“

#### ***E. Zaključak - obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije***

Doktorska disertacija diplomiranog farmaceuta Nade Ćujić ima za predmet savremenu temu istraživanja koja se odnosi na optimizaciju ekstrakcije polifenola suvog ploda aronije, kao i mikroinkapsulaciju dobijenog ekstrakta u novije farmaceutske sisteme za očuvanje stabilnosti i kontrolisano oslobađanje polifenolnih jedinjenja. Polifenoli su prirodni antioksidansi za koje postoji veliko interesovanje zbog niza pozitivnih dejstava na zdravlje ljudi. Ipak, ovi prirodni

antioksidansi su izuzetno osetljivi na delovanje faktora spoljašnje sredine, izuzetno podložni uticajima oksidacije, imaju malu bioraspoloživost i slabo se apsorbuju nakon oralne primene. Dodatak polifenola prehrambenim i farmaceutskim proizvodima je upravo problematičan zbog ovih karakteristika. Zato se intenzivno ispituju nosači koji bi omogućili produženo i kontrolisano oslobađanje polifenola i štitili ih od faktora spoljašnje sredine. Inkapsulacija predstavlja jedan od načina da se ovi nedostaci prevaziđu, da se polifenoli aronije kao aktivne komponente zaštite i da se postigne kontrolisano oslobađanje i omogući njihova šira upotreba. Za mikroinkapsulaciju polifenola mogu se primeniti različite tehnike, ali među njima se ističu elektrostatička ekstruzija i sušenje raspršivanjem. Kao nosači za inkapsulaciju mogu se koristiti prirodni i biodegradabilni nosači, stoga je njihova primena moguća kako u kozmetičkim, tako i u farmaceutskim i prehrambenim proizvodima. Iz navedenih razloga u ovoj disertaciji su ispitani alginati kao pogodni nosači za inkapsulaciju metodom elektrostatičke ekstruzije, sa ili bez dodatka inulina. Složeni sistemi alginat-inulin kombinuju prednosti koje imaju alginati kao zasebni sistemi za inkapsulaciju, a prevazilaze njihove nedostatke. Takođe i sušenje raspršivanjem je opisana kao tehnika za proizvodnju mikročestica željenih karakteristika.

Rezultati ove doktorske disertacije daju pre svega saznanja o optimizaciji ekstrakcije suvog ploda aronije sa ciljem dobijanja maksimalne količine aktivnih principa, a dopunjuju i saznanja o hemijskom profilu i biološkim svojstvima ekstrakta aronije. Zaključeno je da hronična upotreba ekstrakta aronije ima povoljan uticaj na krvni pritisak, oksidativni status i da može uticati na smanjenje rizika od kardiovaskularnih oboljenja. Takođe, daju uvid kako naučnoj javnosti tako i industrijskom sektoru o potencijalnoj primeni mikročestica sa inkapsuliranim ekstraktom aronije, sa idejom šire primene ovih sistema kao suplemenata koji mogu da doprinesu kvalitetu i nutritivnoj vrednosti već postojećih proizvoda, ili se mogu koristiti kao zasebni proizvodi. Na osnovu rezultata predložene doktorske disertacije i objavljenih radova u prijavi koju je kandidat podneo, kao i iz navedene literature koja je korišćena u istraživanju, uočava se veliko poznavanje predmetne oblasti istraživanja, kao i poznavanje aktuelnog stanja u ovoj oblasti u svetu. Svi rezultati u okviru ove disertacije su dokazani odgovarajućim eksperimentima, kao i savremenim analitičkim metodama prema originalnim ili modifikovanim metodama iz literature. Karakterizacija dobijenih mikročestica sa inkapsuliranim polifenolima iz ekstrakta aronije izvedena je savremenim metodama.

Na osnovu svega što je izloženo u doktorskoj disertaciji smatramo da ovaj rad predstavlja značajan naučni doprinos u proučavanju efekata konzumacije ekstrakta suvog ploda aronije, bogatog polifenolima, na pokazatelje oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite kao i antihipertenzivnog dejstva.

Doktorska disertacija pod nazivom “Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, *Aronia melanocarpa* (michx.) Elliott, mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem raspršivanjem” po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima i jasno osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima ispunjava sve kriterijume adekvatno napisanog naučnog dela. Komisija smatra da je kandidat uspešno realizovao postavljene ciljeve istraživanja što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u međunarodnim časopisima sa SCI liste.

Komisija, stoga, sa predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu da prihvati pozitivan Izveštaj o izrađenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom “Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, *Aronia melanocarpa* (michx.) Elliott, mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem raspršivanjem”, i kandidatu diplomiranom

farmaceutu, Nadi Ćujić odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Beograd, 24.02. 2017. god

Članovi Komisije za odbranu i ocenu doktorske disertacije:

---

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

---

**Dr Katarina Šavikin**, naučni savetnik (mentor)

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



