



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD
HEMIJSKO INŽENJERSTVO



Dobijanje emulzionih nosača aktivnih materija
primenom homogenizera i membranskim
emulgovanjem u ćeliji sa mešanjem

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
prof. dr. Branislava G. Nikolovski

Kandidat:
Jelena D. Bajac

Novi Sad, 2018.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jelena Bajac
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Branislava G. Nikolovski, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Dobijanje emulzionih nosača aktivnih materija primenom homogenizera i membranskim emulgovanjem u ćeliji sa mešanjem
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	(5 poglavlja / 136 strana / 59 slika / 16 tabela / 207 referenci)
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo

Naučna disciplina: ND	Hemijsko inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Višestruke emulzije, membransko emulgovanje, ekstrakti belog luka, tikvino ulje, inkapsulacija aktivnih materija
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	nema
Izvod: IZ	<p>Cilj ove doktorske disertacije je dobijanje višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija kao nosača aktivnih materija u dvostepenom postupku, pri čemu se za drugi korak pripreme koristi tehnika membranskog emulgovanja (ME), na membrani od sinterovanog stakla implementiranoj u ćeliju sa mešanjem. Proces ME koristi se u svrhu unapređenja karakteristika formiranih emulzija, u smislu bolje kontrole veličine i raspodele veličina formiranih kapi, koje mogu da dovedu do razlika u stepenu inkapsulacije aktivnih materija u unutrašnjoj vodenoj fazi, u odnosu na proces u kome se za drugi korak pripreme emulzija koristi tehnika homogenizacije.</p> <p>Kompletna optimizacija sastava V_1/U emulzija, koja obuhvata određivanje koncentracije hidrofobnog emulgatora (PGPR), lipofobne materije (NaCl) i tikvinog ulja kao sekundarne aktivne komponente, rezultirala je formiranjem stabilnih nanoemulzija sa poboljšanim nutritivnim svojstvima. Nutritivno unapređeni emulzioni sistemi optimizovanog sastava korišćeni su za inkapsulaciju primarnih aktivnih komponenata (vodenog i etanolnog ekstrakata belog luka) u cilju zaštite bioaktivnih sastojaka i maskiranja neprijatnog mirisa i ukusa. Nakon definisanja sastava svih faza višestrukih emulzija, koje uključuje određivanje tipa hidrofilnog emulgatora i njegove koncentracije, kao i ispitivanja uticaja dodavanja osmotskog regulatora (glukoze) u spoljašnju vodenu fazu na stabilnost sistema i difuziju lipofoba, formirane su višestruke emulzije sa unetim aktivnim komponentama membranskim emulgovanjem u ćeliji sa mešanjem. Sistematična karakterizacija membrane od sinter stakla kao ekonomski opravdanog</p>

	<p>membranskog materijala, dala je mogućnost njegove primene u procesu. Detaljno ispitivanje uticaja procesnih parametara (transmembranskog pritiska i brzine mešanja) i višekriterijumska optimizacija procesa ME, dovela su do formiranja višestrukih emulzija sa užom raspodelom veličina kapi, koja je indirektno uticala i na poboljšanje zadržavanja inkapsuliranog materijala u unutrašnjosti emulzija tokom vremena, u odnosu na emulzije pripremljene u postupku homogenizacije.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	08.09.2016.
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: KO predsednik:</p> <p>član/mentor:</p> <p>član:</p>	<p>dr Lidija Petrović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>dr Branislava Nikolovski, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>dr Nikola Milašinić, vanredni profesor, Kriminalističko-policijska akademija, Beograd</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. thesis
Author: AU	Jelena Bajac
Mentor: MN	dr Branislava G. Nikolovski, associate professor
Title: TI	The preparation of emulsions as carriers of active components by homogenization and stirred cell membrane emulsification
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Serbia Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	(5 chapters / 136 pages / 59 figures / 16 tables / 207 references)
Scientific field SF	Technological engineering

Scientific discipline SD	Chemical engineering
Subject, Key words SKW	Multiple emulsions, membrane emulsification, garlic extracts, pumpkin seed oil, encapsulation of active ingredients
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>The aim of this doctoral thesis was to prepare multiple W/O/W emulsions with encapsulated active substances in both phases, by a two-step process, where the stirred cell membrane emulsification (ME) process, with a sintered glass filter disk as a membrane, was used as the second step, instead of conventional process (homogenization). The ME process was employed in order to improve the characteristics of the formed emulsions, in terms of better control of the size and droplet size distribution, that can change the encapsulation degree of active ingredients in the internal aqueous phase.</p> <p>The complete optimization of W/O emulsion composition, which includes determination of optimal contents of a hydrophobic emulsifier (PGPR), a lipophobic substance (NaCl) and pumpkin seed oil as an active component of the oil phase, resulted in the formation of stable nanoemulsions with improved nutritional properties. This nutritionally enhanced emulsion was used to encapsulate primary active ingredients (aqueous and ethanol garlic extract), in order to protect instable bioactive compounds of the extracts and mask the unpleasant smell and taste. After defining the composition of all phases of multiple emulsions, which includes determination of a suitable hydrophilic emulsifier and its optimal content, as well as examining the effect of addition of an osmotic regulator (glucose) in the external aqueous phase on the emulsion stability and lipophobe diffusion, multiple emulsions with encapsulated active components were formed by membrane</p>

	<p>emulsification in the stirred cell. The complete characterization of the sintered glass as an economically favourable membrane material, gave the possibility of its application in the process. Investigation of the influence of process parameters (transmembrane pressure and impeller rotation speed) and multiobjective optimization of ME, led to the formation of the multiple emulsions with a narrow droplet size distribution, which had improved retention of encapsulated material in the internal water phase over time, relative to the emulsions prepared by the homogenization process.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>08.09.2016.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB president: member/mentor: member:</p>	<p>dr Lidija Petrović, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>dr Branislava Nikolovski, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>dr Nikola Milašinović, associate professor, Academy of Criminalistic and Police Studies, Belgrade</p>

SADRŽAJ

SPISAK SLIKA	a
SPISAK TABELA	e
SPISAK OZNAKA	f
1. UVOD	1
1.1. Cilj istraživanja.....	2
2. TEORIJSKI DEO	4
2.1. Nosači aktivnih materija.....	4
2.2. Emulzioni sistemi	5
2.2.1. Višestruki emulzioni sistemi.....	7
2.3. Stabilizatori emulzija - emulgatori	8
2.3.1. Tipovi emulgatora.....	10
2.3.1.1. Poliglicerol poliricinoleat	11
2.3.1.2. Dekaglicerol monooleat	12
2.3.1.3. Lecitini	13
2.3.1.4. Polisorbati.....	14
2.3.1.5. Pluronici	15
2.3.2. Vidovi nestabilnosti emulzionih sistema	15
2.3.2.1. Nestabilnost višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija.....	17
2.4. Priprema višestrukih emulzija	19
2.4.1. Konvencionalne metode emulgovanja.....	20
2.4.2. Primena mikrostrukturiranih sistema za dobijanje emulzija - membransko emulgovanje.....	21
2.4.2.1. Tipovi membranskog emulgovanja.....	24
2.4.2.1.1. Čelija sa mešanjem	26
2.4.3. Uticaj procesnih parametara na ME.....	27
2.4.3.1. Tipovi membrana i parametri membrane	28
2.4.3.2. Procesni parametri.....	31
2.4.3.3. Bilans sila koje deluju na kap.....	34
2.5. Bioaktivne komponente.....	36

2.5.1. Ulje semena tikve.....	36
2.5.2. Beli luk (<i>Allium sativum</i> L.).....	41
2.5.2.1. Isparljive komponente belog luka	42
2.5.2.2. Neisparljive komponente belog luka.....	44
2.5.2.3. Preparati belog luka.....	46
3. EKSPERIMENTALNI DEO	49
3.1. Materijal	50
3.2. Metode rada	51
3.2.1. Priprema V_1/U emulzija.....	51
3.2.1.1. Tenziometrijska merenja	51
3.2.1.2. Viskozimetrijska merenja.....	52
3.2.1.3. Merenje veličine i raspodele veličina kapi.....	52
3.2.1.4. Merenje sedimentacione nestabilnosti emulzija.....	53
3.2.1.5. Praćenje termičke stabilnosti emulzija.....	53
3.2.2. Višekriterijumska optimizacija i statistička analiza rezultata	53
3.2.3. Priprema ekstrakta belog luka.....	56
3.2.4. Priprema V_1/U emulzija sa inkapsuliranim ekstraktom belog luka	56
3.2.5. Priprema višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija	57
3.2.5.1. Membransko emulgovanje u ćeliji sa mešanjem.....	57
3.2.5.1.1. Karakterizacija membranskog materijala	60
3.2.5.1.2. Optimizacija procesa ME u ćeliji sa mešanjem.....	60
3.2.5.2. Merenje veličine i raspodele veličina kapi višestrukih emulzija.....	61
3.2.5.3. Merenje zeta potencijala.....	61
3.2.5.4. Konduktometrijsko određivanje sadržaja oslobođene soli.....	61
3.2.5.5. Spektrofotometrijsko određivanje procenta inkapsulirane unutrašnje faze	63
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	66
4.1. Priprema jednostrukih V_1/U emulzionih sistema	66
4.1.1. Dobijanje formulacije V_1/U emulzije optimalnog sastava sa inkapsuliranim tikvinim uljem.....	66
4.1.2. Veličina i raspodela veličina kapi. Stabilnost V_1/U emulzija	75
4.1.3. Umrežavanje unutrašnje vodene faze V_1/U emulzija	78
4.1.4. Inkapsulacija ekstrakta belog luka u V_1/U emulzione sisteme	81
4.1.4.1. Inkapsulacija vodenog ekstrakta belog luka.....	81

4.1.4.2. Inkapsulacija etanolnog ekstrakta belog luka.....	84
4.2. Priprema višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzionih sistema	88
4.2.1. Izbor hidrofilnog emulgatora za $V_1/U/V_2$ emulzione sisteme	89
4.2.2. Uticaj dodavanja osmotskog regulatora u spoljašnju vodenu fazu na veličinu i stabilnost $V_1/U/V_2$ emulzija.....	92
4.2.3. Uticaj dodavanja osmotskog regulatora u V_2 na kinetiku oslobađanja soli iz unutrašnje vodene faze $V_1/U/V_2$ emulzija	96
4.2.4. Inkapsulacija ekstrakta belog luka u višestruke emulzione sisteme	99
4.2.4.1. Priprema višestrukih emulzija sa inkapsuliranim ekstraktima belog luka primenom homogenizera.....	99
4.2.4.1.1. Uticaj brzine mešanja homogenizera na veličinu formiranih kapi	100
4.2.4.2. Priprema višestrukih emulzija sa inkapsuliranim ekstraktom belog luka membranskim emulgovanjem u ćeliji sa mešanjem.....	102
4.2.4.2.1. Karakterizacija membranskog materijala	102
4.2.4.2.2. Uticaj transmembranskog pritiska na veličinu i raspodelu veličina kapi	104
4.2.4.2.3. Uticaj napona smicanja na površini membrane na veličinu i raspodelu veličina kapi.....	106
4.2.4.2.4. Optimizacija procesa membranskog emulgovanja u ćeliji sa mešanjem.	108
4.2.4.3. Poređenje homogenizacije i membranskog emulgovanja u ćeliji sa mešanjem.....	114
4.2.5. Procenat inkapsulacije unutrašnje vodene faze u višestrukim emulzijama	115
5. ZAKLJUČCI.....	119
REFERENCE.....	123

SPISAK SLIKA

Slika 2.1. Šematski prikaz razlike između nanoemulzija i mikroemulzija u pogledu njihove veličine i slobodne energije sistema u odnosu na odvojene faze sistema.....	6
Slika 2.2. Šematski prikaz strukture emulzija: a) V_1/U i U/V_2 ; b) višestrukih $V_1/U/V_2$ i $U_1/V/U_2$ emulzija	7
Slika 2.3. Orijehtacija hidrofilnog i lipofilnog emulgatora na granici faza višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija	9
Slika 2.4. Hemijska struktura poliglicerol poliricinoleata (PGPR). Crne tačke označavaju lance poliricinoleinske kiseline.....	12
Slika 2.5. Hemijska struktura T20 i T80.....	14
Slika 2.6. Hemijska struktura pluronika F68	15
Slika 2.7. Šematska ilustracija najčešćih mehanizama nestabilnosti prehrambenih emulzija: kriming, sedimentacija, flokulacija, koalescencija, Ostvaldovo sazrevanje i izdvajanje ulja	17
Slika 2.8. Šematski prikaz mehanizama transporta inkapsuliranog materijala iz višestrukih emulzija: a) „pucanje“ tečnog filma, b) formiranje lamelarnih struktura, c) formiranje inverznih micela, d) formiranje hidratiranih molekula emulgatora.....	18
Slika 2.9. Šematski prikaz različitih konvencionalnih metoda za dobijanje emulzija: a) rotor-stator (-rotor) sistemi; b) homogenizer visokog pritiska;c) mikrofluidizer i d) ultrazvučni homogenizer	21
Slika 2.10. Šematski prikaz procesa a) mikrokanalnog emulgovanja i b) membranskog emulgovanja	22
Slika 2.11. Različiti načini kontrole napona smicanja na površini membrane: a) unakrsno („cross-flow“), b) unakrsno sa vibracijom membrane, c) vibracija u kontinualnoj fazi, d) rotiranje membrane, e) ćelija sa mešanjem, ravna membrana, f) ćelija sa mešanjem, cevna membrana.....	24
Slika 2.12. Šematski prikaz a) direktnog ME i b)“premix“ ME	26
Slika 2.13. Šematski prikaz ME u ćeliji sa mešanjem sa propelerskom mešalicom	27
Slika 2.14. Profil napona smicanja na površini membrane u zavisnosti od rastojanja u odnosu na osu rotacije procesa ME u ćeliji sa mešanjem (ravna membrana).....	32
Slika 2.15. Šematski prikaz sila koji deluju na kap tokom procesa membranskog emulgovanja	35
Slika 2.16. Biosinteza organosumpornih jedinjenja iz belog luka.....	43
Slika 3.1. Šematski prikaz aparature za membransko emulgovanje u ćeliji sa mešanjem. S_1 i S_2 - salvine, V_1 - V_3 - ventili, PC - regulator pritiska gasa.....	58
Slika 3.2. Karakteristične dimenzije ćelije sa mešanjem.....	58
Slika 3.3. Lokalni napon smicanja (τ) na površini membrane u odnosu na osu rotacije.	59
Slika 3.4. Ilustracija konduktometrijske procedure praćenja procenta oslobođene soli	62

Slika 3.5. Kalibracione krive zavisnosti provodljivosti spoljašnje vodene faze (k_c) od koncentracije NaCl, za V_2 sa T20 (2% (m/v)) i različitim sadržajem glukoze.....	63
Slika 3.6. Kalibraciona kriva zavisnosti apsorbancije spoljašnje vodene faze (A) od koncentracije PTSA, za V_2 sa T20 (2% (m/v)) i različitim sadržajem glukoze	64
Slika 4.1. Uticaj variranih parametara na De Brukerov srednji prečnik kapi ($d_{4,3}$) V_1/U emulzija. E - PGPR koncentracija, TU - sadržaj tikvinog ulja u uljanoj fazi, S - koncentracija NaCl u vodenoj fazi.....	68
Slika 4.2. Uticaj variranih parametara na raspodelu veličina kapi (<i>span</i>) V_1/U emulzija.	70
Slika 4.3. Uticaj variranih parametara na indeks sedimentacije (<i>SI</i>) V_1/U emulzija, nakon 90 dana čuvanja. E - PGPR koncentracija, TU - sadržaj tikvinog ulja u uljanoj fazi, S - koncentracija NaCl u vodenoj fazi	71
Slika 4.4. Profili predviđenih vrednosti i nivoa poželjnosti funkcija prečnika kapi ($d_{4,3}$), raspodele veličina kapi (<i>span</i>) i indeksa stabilnosti nakon tri meseca čuvanja (<i>SI</i>) V_1/U emulzija	74
Slika 4.5. Raspodela veličina kapi optimalne formulacije V_1/U emulzija nakon pripreme i nakon 6 meseci čuvanja. E = 4% (m/m); TU = 50% (m/m); S = 0,15 M.....	75
Slika 4.6. Uticaj dodatka tikvinog ulja kontinualnoj fazi na raspodelu veličina kapi V_1/U emulzija tokom vremena. Kontinualna faza: a) 0% TU; b) 50% TU; c) 100% TU sa PGPR koncentracijom od 5% (m/m). Sadržaj NaCl u vodenoj fazi je 0,15 M ...	76
Slika 4.7. Uticaj dodatka NaCl u vodenu fazu na raspodelu veličina kapi V_1/U emulzija tokom vremena: a) bez dodatog NaCl; b) sa dodatkom NaCl (0,3 M). Kontinualna faza: smeša tikvinog i suncokretovog ulja (1:1, (m/m)) sa 5% (m/m) PGPR	77
Slika 4.8. Poređenje raspodele veličina kapi a) G/U i b) V_1/U emulzionih sistema stabilizovanih sa različitom koncentracijom emulgatora. Koncentracija NaCl u vodenoj fazi V_1/U emulzije je 0,15 M	79
Slika 4.9. Promena prečnika kapi ($d_{4,3}$) V_1/U i G/U emulzija sa različitim sadržajem PGPR tokom vremena. Koncentracija NaCl u vodenoj fazi V_1/U emulzije je 0,15 M	80
Slika 4.10. Uticaj termičkog tretmana na raspodelu veličina kapi: a) G/U emulzija; b) V_1/U emulzija. Koncentracija PGPR je 4% (m/m). Zagrevanje - 5 min na 100 °C; hlađenje - 24h na -20 °C	81
Slika 4.11. Uticaj koncentracije emulgatora (PGPR) na kumulativnu raspodelu veličina kapi V_E/U emulzija: a) bez dodate soli i b) sa dodatim NaCl u koncentraciji 0,15 M.....	82
Slika 4.12. Stabilnost V_E/U emulzija tokom vremena a) bez dodate soli i b) sa dodatim NaCl u koncentraciji 0,15 M. Kontinualna faza je smeša suncokretovog i tikvinog ulja (1:1) sa 4% (m/m) PGPR.....	83
Slika 4.13. Uticaj PGPR koncentracije i dodavanja NaCl u vodenu fazu na sedimentacioni indeks (<i>SI</i>) V_E/U emulzija.....	83
Slika 4.14. Sedimentaciona stabilnost različitih formulacija E_E/U i E_EV/U emulzija: a) 4h nakon pripreme i b) nakon mesec dana čuvanja. Vodena faza E_EV/U emulzija je 0,15 M rastvor NaCl. Kontinualna faza je smeša suncokretovog i tikvinog ulja (1:1).....	85

Slika 4.15. Uticaj tipa emulgatora i njegove koncentracije na kumulativnu raspodelu veličina kapi E_E/U emulzija. Kontinualna faza je smeša suncokretovog i tikvinog ulja (1:1)	86
Slika 4.16. Kumulativna raspodela veličina kapi $E_E V/U$ emulzija sa a) dodatkom NaCl u različitim koncentracijama (4% (m/m) PGPR); b) promenom PGPR koncentracije (0,075 M NaCl). Kontinualna faza je smeša suncokretovog i tikvinog ulja (1:1)	86
Slika 4.17. Stabilnost $E_E V/U$ emulzija tokom vremena sa: a) 0,075 M NaCl, b) 0,15 M NaCl. Kontinualna faza je smeša suncokretovog i tikvinog ulja (1:1) sa 4% (m/m) PGPR.....	87
Slika 4.18. Uticaj PGPR koncentracije i dodatka NaCl na sedimentacioni indeks (SI) $E_E V/U$ emulzija.....	88
Slika 4.19. Varijacija Sauterovog srednjeg prečnika kapi ($D_{3,2}$) višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija sa promenom tipa emulgatora i njegove koncentracije. Disperzna faza je V_1/U emulzija sa smešom suncokretovog i tikvinog ulja (1:1) i 4% (m/m) PGPR.....	89
Slika 4.20. Promena prečnika kapi ($D_{4,3}$) višestrukih $V_1/U/V_2$ i $G/U/V_2$ emulzija sa različitim sastavom uljane faze (sa 4% (m/m) PGPR) tokom vremena. SU - uljana faza suncokretovo ulje; SU/TU – uljana faza smeša suncokretovog i tikvinog ulja u masenom odnosu 1:1. Hidrofilni emulgator - 2% (m/v) T20.....	91
Slika 4.21. Mikrofotografije $V_1/U/V_2$ i $G/U/V_2$ višestrukih emulzija nakon pripreme i nakon termičkog tretmana: a) $V_1/U/V_2$ emulzije nakon pripreme; b) $V_1/U/V_2$ nakon zagrevanja (5 min na 100 °C); c) $V_1/U/V_2$ nakon hlađenja (24h na -20 °C); d) $G/U/V_2$ emulzije nakon pripreme; e) $G/U/V_2$ nakon zagrevanja (5 min na 100 °C); f) $G/U/V_2$ nakon hlađenja (24h na -20 °C). Hidrofilni emulgator je 2% (m/v) T20.....	92
Slika 4.22. a) Promena srednjeg prečnika kapi ($D_{4,3}$) višestrukih $V_1/U/V_2$ i $G/U/V_2$ emulzija sa dodatkom različitih koncentracija glukoze tokom vremena; b) mikrofotografije $V_1/U/V_2$ emulzije sa 0,4 M glukoze u V_2 : A - odmah nakon pripreme; B - nakon dva meseca.....	93
Slika 4.23. Promena zeta potencijala (ζ) U/V_2 emulzija, različitog sastava uljane faze, sa promenom koncentracije glukoze. Koncentracija PGPR je 4% (m/m). Koncentracija T20 je 2% (m/v). SU - uljana faza suncokretovo ulje; TU – uljana faza tikvino ulje; SU/TU – uljana faza smeša suncokretovog i tikvinog ulja u masenom odnosu 1:1.....	95
Slika 4.24. a) Krive provodljivosti višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija tokom procesa emulgovanja i b) oslobođena frakcija NaCl (FR) iz unutrašnje vodene faze $V_1/U/V_2$ emulzija, pripremljenih sa različitim koncentracijama glukoze u V_2 . Hidrofilni emulgator - 2% (m/v) T20; Hidrofobni emulgator - 4% (m/m) PGPR.....	96
Slika 4.25. Uticaj koncentracije glukoze u V_2 na kinetiku oslobađanja NaCl iz V_1 višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija. Hidrofilni emulgator - 2% (m/v) T20;	

Hidrofobni emulgator - 4% (m/m) PGPR. Crna linija predstavlja model jednačinu	97
Slika 4.26. Uticaj broja obrtaja mešalice (N) na promenu Sauterovog ($D_{3,2}$), De Brukerovog srednjeg prečnika kapi ($D_{4,3}$) i <i>span</i> vrednosti višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija pripremljenih homogenizacijom ($t = 5\text{min}$). Disperzna faza - $E_E V/U$ emulzija sa 4% (m/m) PGPR; V_2 - 2% (m/v) T20 sa 0,15 M glukoze; $\varphi = 20\%$	101
Slika 4.27. Promena fluksa vode (J_v) sa povećanjem transmembranskog pritiska (ΔP_{tm})	102
Slika 4.28. SEM mikrofografije: a) poprečnog preseka membrane; b) površinskog aktivnog sloja membrane	103
Slika 4.29. Uticaj promene transmembranskog pritiska (ΔP_{tm}) na promenu fluksa disperzne faze (J_d) kroz membranu. Disperzna faza - $E_E V/U$ emulzija.....	104
Slika 4.30. Promena De Brukerovog srednjeg prečnika kapi ($D_{4,3}$) i <i>span</i> vrednosti sa promenom transmembranskog pritiska (ΔP_{tm}) višestrukih emulzija sa različitim sadržajem disperzne faze ($\varphi = 5$ i 20%). Disperzna faza - $E_E V/U$ emulzija sa 4% (m/m) PGPR; V_2 - 2% (m/v) T20 sa 0,15 M glukoze; $N = 590$ o/min.....	105
Slika 4.31. Promena De Brukerovog srednjeg prečnika kapi ($D_{4,3}$) i <i>span</i> vrednosti sa promenom lokalnog napona smicanja (τ_{av}) na površini membrane višestrukih emulzija sa različitim sadržajem disperzne faze: a) $\varphi = 5$; b) $\varphi = 20\%$. Disperzna faza - $E_E V/U$ emulzija 4% (m/m) PGPR; V_2 - 2% (m/v) T20 sa 0,15 M glukoze	107
Slika 4.32. Konturni dijagrami međusobnog uticaja ispitivanih parametara (N i ΔP_{tm}) na <i>span</i> vrednost za: a) $\varphi = 5\%$ i b) $\varphi = 20\%$ $E_E V/U$ emulzije u višestrukoj emulziji	109
Slika 4.33. Konturni dijagram međusobnog uticaja ispitivanih parametara (N i ΔP_{tm}) na Sauterov srednji prečnik kapi, $D_{3,2}$ (μm). $\varphi = 20\%$ (v/v).....	110
Slika 4.34. Konturni dijagram međusobnog uticaja ispitivanih parametara (N i ΔP_{tm}) na fluks disperzne faze, J_d (l/m^2h). $\varphi = 20\%$ (v/v)	112
Slika 4.35. Raspodela veličina kapi višestrukih emulzija dobijenih ME u ćeliji sa mešanjem ($\Delta P_{tm} = 20$ kPa, $\tau_{av} = 12,15$ Pa) i homogenizacijom ($N = 3600$ o/min) sa inkapsuliranim: a) vodenim ekstraktom i b) etanolnim ekstraktom belog luka u unutrašnjoj vodenoj fazi. Na slici desno prikazane su mikrofotografije odgovarajućih emulzija	114
Slika 4.36. Uticaj regulacije osmotskog pritiska između vodenih faza višestruke emulzije sa inkapsuliranim: a) vodenim ekstraktom belog luka; b) etanolnim ekstraktom belog luka u V_1 na procenat inkapsulacije unutrašnje faze (Y) tokom vremena..	116
Slika 4.37. Uticaj metode pripreme na procenat inkapsulirane unutrašnje vodene faze (Y) višestrukih emulzija sa inkapsuliranim: a) vodenim ekstraktom belog luka; b) etanolnim ekstraktom belog luka. Homogenizacija ($N = 3600$ o/min, $t = 5\text{min}$); ME u ćeliji sa mešanjem ($\Delta P_{tm} = 20$ kPa, $\tau_{av} = 12,15$ Pa).....	117

SPISAK TABELA

Tabela 2.1. Prednosti i nedostaci membranskih procesa u odnosu na konvekcionalne metode	23
Tabela 2.2. Poređenje različitih tehnika kontrole napona smicanja na površini membrane....	25
Tabela 2.3. Sile koje deluju na kap tokom procesa membranskog emulgovanja i jednačine za njihov proračun.....	34
Tabela 3.1. Nivoi i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih korišćenih u eksperimentalnom planu prilikom optimizacije sadržaja V_1/U emulzije	54
Tabela 3.2. Eksperimentalni dizajn optimizacije sastava V_1/U emulzija	55
Tabela 4.1. Eksperimentalni rezultati dobijenog srednjeg prečnika kapi V_1/U emulzija ($d_{4,3}$), $span$ vrednosti i indeksa sedimentacije (SI), za posmatrani period od 90 dana čuvanja.....	67
Tabela 4.2. Vrednosti regresionih koeficijenata i koeficijenata varijacije (R^2) polinomnih funkcija za predviđanje odziva $d_{4,3}$, $span$ i $SI90$ tokom pripreme V_1/U emulzija	69
Tabela 4.3. Uticaj sastava kontinualne faze i dodatka NaCl na ravnotežni međupovršinski napon (γ) voda-u-ulju (V_1/U) emulzionog sistema na 25 °C	72
Tabela 4.4. Karakteristike $V_1/U/V_2$ emulzija stabilizovanih različitim hidrofilnim emulgatorima u V_2	90
Tabela 4.5. Uticaj dodavanja T20 (2% (m/v)) i glukoze na viskozitet (μ_c) i provodljivost (k_c) spoljašnje vodene faze (V_2), i uticaj koncentracije glukoze na viskozitet $V_1/U/V_2$ emulzije (μ_c)	94
Tabela 4.6. Vrednosti korelacionih parametara i koeficijenta determinacije (R^2) u jednačini (4.2.).....	98
Tabela 4.7. Veličina kapi i $span$ različitih formulacija višestrukih emulzija sa inkapsuliranim vodenim ($V_E/U/V_2$) ili etanolnim ekstraktom belog luka ($E_E V/U/V_2$), pripremljenih sa dodatkom različitih osmotskih regulatora u V_2 , upotrebom homogenizera ($N = 3600$ o/min; $t = 5$ min)	100
Tabela 4.8. Vrednosti regresionih koeficijenata, R^2 i p parametara, dobijenih prilikom predviđanja odziva $span$ vrednosti višestrukih emulzija sa 5% i 20% disperzne faze	110
Tabela 4.9. Vrednosti regresionih koeficijenata, R^2 i p parametara, dobijenih prilikom predviđanja odziva Sauterovog srednjeg prečnika kapi, $D_{3,2}$, višestrukih emulzija sa 5% i 20% disperzne faze.....	111
Tabela 4.10. Vrednosti regresionih koeficijenata, R^2 i p parametara, dobijenih prilikom predviđanja odziva fluksa disperzne faze, J_d , višestrukih emulzija sa 20% disperzne faze.....	112
Tabela 4.11. Optimalne vrednosti parametara (ΔP_{tm} i N) određene JOP metodom i odgovarajuće predviđene vrednosti izlaznih promenljivih ($D_{3,2}$, $span$ i J_d), za različit sadržaj disperzne faze u višestrukoj emulziji.....	113

SPISAK OZNAKA

V_1/U	voda-u-ulju emulzija
V_E/U	vodeni ekstrakt belog luka-u-ulju emulzija
E_E/U	etanolni ekstrakt belog luka-u-ulju emulzija
$E_E V/U$	50% vodeni rastvor etanolnog ekstrakta belog luka-u-ulju emulzija
$V_1/U/V_2$	voda-u-ulju-u-vodi emulzija
$V_E/U/V_2$	vodeni ekstrakt belog luka-u-ulju-u-vodi emulzija
$E_E V/U/V_2$	50% rastvor etanolnog ekstrakta belog luka-u-ulju-u-vodi emulzija
TU	tikvino ulje
SU	suncokretovo ulje
SU/TU	smeša tikvinog i suncokretovog ulja u masenom odnosu 1:1
S	koncentracija natrijum hlorida u unutrašnjoj vodenoj fazi (M)
E	koncentracija emulgatora u uljanoj fazi (%)
HLB	hidrofilno-lipofilna ravnoteža (-)
SI	sedimentacioni indeks (%)
FR	oslobođena frakcija soli u V_2 (eng. <i>fraction release</i>) (%)
Y	inkapsulirana frakcija V_1 unutar višestruke emulzije (eng. <i>entrapment yield</i>) (%)
R_y	frakcija neadsorbovane boje na granicu faza (eng. <i>recovery yield</i>) (%)
ρ_d	gustina disperzne faze (kg/m^3)
ρ_c	gustina kontinualne faze (kg/m^3)
μ_d	viskozitet disperzne faze (Pa s)
μ_c	viskozitet kontinualne faze (Pa s)
μ_e	viskozitet višestruke emulzije (Pa s)
γ	međupovršinski napon (mN/m)
φ	zapreminski udeo disperzne faze u emulziji (%)
ζ	zeta potencijal (mV)
k_e	električna provodljivost emulzije ($\mu\text{S/cm}$)
k_d	električna provodljivost disperzne faze ($\mu\text{S/cm}$)
k_c	električna provodljivost kontinualne faze ($\mu\text{S/cm}$)
D_d	srednji prečnik kapi (m)
$D_{3,2}$	Sauterov (eng. <i>Sauter</i>) srednji prečnik kapi (m)
$D_{4,3} (d_{4,3})$	De Brukerov (eng. <i>De Brouckere</i>) srednji prečnik kapi (m)
D_{10}	prečnik kapi za koji 10 vol.% ima manji prečnik (m)
D_{50}	prečnik kapi za koji 50 vol.% ima manji prečnik (m)
D_{90}	prečnik kapi za koji 90 vol.% ima manji prečnik (m)
D_p	srednji prečnik pora membrane (m)
ε	poroznost membrane (-)
J_d	fluks disperzne faze ($\text{l/m}^2\text{h}$)
M_d	maseni protok disperzne faze kroz membranu (kg/s)
A_{ef}	efektivna površina membrane (m^2)
ΔP_{tm}	transmembranski pritisak (Pa)
P_d	pritisak disperzne faze (Pa)

P_c	minimalan pritisak emulgovanja (kritični pritisak) (Pa)
P_0	pritisak na površini membrane (Pa)
θ	ugao kontakta između disperzne faze i površine membrane ($^\circ$)
L	debljina membrane (m)
K	udeo aktivnih pora (%)
K_{\max}	maksimalni udeo aktivnih pora (%)
R_m	hidraulički otpor membrane (m^{-1})
τ	lokalni napona smicanja na površini membrane (Pa)
τ_{av}	srednji napona smicanja na površini membrane (Pa)
r	radijalno rastojanje od centra membrane (m)
r_c	kritični poluprečnik u odnosu na osu rotacije (m)
D_t	unutrašnji prečnik suda u kome se odvija mešanje (m)
D_m	prečnik membrane (m)
D_i	prečnik mešalice (m)
b	visina mešalice (m)
n_b	broj propelera na mešalici (-)
a	rastojanje između mešalice i površine membrane (m)
H	visina suda u kojem se odvija mešanje (m)
H_L	visina kontinualne faze u sudu u kojem se odvija mešanje (m)
N	broj obrtaja mešalice (o/min)
Re	Rejnoldsov kriterijum (-)

1. UVOD

Način i ubrzani tempo života u XXI veku sve češće se odražava na opštu zdravstvenu osetljivost ljudi, pa postoji realna potreba za unošenjem „funktionalne“ hrane, odnosno hrane koja u sebi sadrži biološki aktivne komponente (vitamine, masne kiseline, antioksidanse, minerale i td.) koje ne pokazuju nikakve terapijske efekte. Ogroman potencijal primene ovakvih komponenti ogleda se u dopunjavanju nutritivnih svojstva hrane, doprinoseći jačanju opšteg zdravlja uz smanjenje rizika od nastajanja bolesti (Matos, 2013).

Emulzioni sistemi predstavljaju izuzetno atraktivne sisteme za primenu u prehrambenoj industriji i kao takvi se mogu naći u mnogim proizvodima koji se svakodnevno konzumiraju. Najčešće zastupljeni tipovi emulzija su ulje-u-vodi (U/V_2) emulzije, koje su zapravo kapi ulja dispergovane u kontinualnoj vodenoj fazi, koje čine sastavni deo mnogih preliva za salate. S druge strane, voda-u-ulju (V_1/U) emulzije sadrže kapi vode dispergovane u uljanoj kontinualnoj fazi, čija struktura, na primer, ulazi u sastav maslaca. Višestruke voda-u-ulju-u-vodi ($V_1/U/V_2$) emulzije predstavljaju sistem emulzije u emulziji. Sastoje se od kapi vode (V_1) koje su dispergovane u uljanoj fazi (U), pri čemu je tako formirana V_1/U emulzija konačno raspoređena u spoljašnjoj vodenoj fazi (V_2) takođe u vidu kapi. Primena višestrukih emulzija najzastupljenija je u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, dok je njihova primena u prehrambenoj industriji predmet velikog broja istraživanja poslednjih godina. Iako postoji veliki broj potencijalnih aplikacija višestrukih emulzija, prehrambene $V_1/U/V_2$ emulzije obično predstavljaju termodinamički nestabilne sisteme, što zapravo predstavlja veliki nedostatak koji treba prevazići da bi se mogle koristiti za bilo kakvu praktičnu primenu i masovnu upotrebu (Muschiolik, 2007). Njihov veliki potencijal za primenu nalazi se u činjenici da se ovakvi sistemi mogu koristiti kao nosači istovremeno hidrofилnih i lipofilnih aktivnih komponenti, i omogućiti smanjenje sadržaja masti pripremljenog proizvoda (Giroux i sar., 2013; Le Révérend i sar., 2010; McClements i sar., 2007).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ove doktorske disertacije je dobijanje višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija kao nosača aktivnih materija u dvostepenom postupku, pri čemu se za drugi korak pripreme koristi tehnika membranskog emulgovanja (ME), na membrani od sinterovanog stakla implementiranoj u ćeliju sa mešanjem, uz ispitivanje mogućnosti unapređenja karakteristika formiranih emulzija, u smislu bolje kontrole veličine i raspodele veličina formiranih kapi, koje dovode do razlika u kinetici otpuštanja unutrašnje vodene faze u odnosu na proces u kome se za drugi korak pripreme koristi tehnika homogenizacije.

Istraživanje mogućnosti primene i utvrđivanje eventualne prednosti ME, kao savremene tehnike emulgovanja, u odnosu na tradicionalni postupak homogenizacije, realizovano je kroz pripremu višestrukih emulzionih sistema sa unetom primarnom aktivnom komponentom u unutrašnju vodenu fazu, koju čini ekstrakt belog luka, i sekundarnom aktivnom komponentom, koju čini tikvino ulje u uljnoj fazi. Primarna aktivna komponenta pripremljena je u obliku vodenog i etanolnog ekstrakta belog luka, a dobijeni ekstrakti inkapsulirani su u unutrašnjosti emulzija, što prema dostupnim literaturnim podacima nije bio predmet dosadašnjih istraživanja. Ispitan je uticaj komponenti koje ulaze u sastav emulzionih sistema na njihove karakteristike i upotrebom matematičkih korelacija i statističke analize za interpretaciju rezultata, optimizovan je sastav i procesni parametri dobijanja ovih nosača aktivnih materija. Pored toga, ispitana je kinetika otpuštanja unutrašnje vodene faze iz emulzija u cilju poređenja dve ispitivane tehnike pripreme višestrukih emulzija.

Da bi se ispitala mogućnost inkapsulacije aktivnih komponenti u višestruke emulzije, prvenstveno je urađena optimizacija sastava V_1/U emulzije u koju će biti smeštene aktivne komponente. Optimizacija podrazumeva ispitivanje uticaja svih komponenti sistema na veličinu, raspodelu veličina i stabilnost V_1/U emulzija. U te svrhe korišćen je Boks-Benkenov (eng. *Box-Behnken*) eksperimentalni dizajn i višekriterijumska optimizacija za određivanje optimalnog sadržaja emulgatora i tikvinog ulja (kao sekundarne aktivne komponente) u uljanoj fazi i optimalne koncentracije soli u vodenoj fazi. Pored toga, ispitana je mogućnost umrežavanja unutrašnje vodene faze, kao metode za unapređenje stabilnosti V_1/U sistema, i izvršeno poređenje sa optimalnom formulacijom V_1/U emulzije koja je dobijena višekriterijumskom optimizacijom. Na taj način definisana je formulacija V_1/U emulzije sa inkapsuliranom sekundarnom aktivnom komponentom (tikvinim uljem).

Kao drugi korak, ispitana je primena različitih hidrofilnih emulgatora i njihove koncentracije, na formiranje višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzionija kao nosača i njihovu stabilnost. U cilju dobijanja najpogodnije formulacije višestruke emulzije u koju će biti inkapsulirane primarne aktivne komponente, ispitana je uticaj dodavanja tikvinog ulja (sekundarne aktivne komponente) i umrežavanja unutrašnje vodene faze, kao i uticaj regulacije osmotskog pritiska između dve vodene faze na veličinu kapi i stabilnost emulzionih sistema. Kinetika oslobađanja sadržaja iz unutrašnje vodene faze, u uslovima različitog osmotskog pritiska, opisana je izvođenjem matematičkog modela koji može biti upotrebljen za predviđanje procenta oslobođenog elektrolita iz unutrašnje vodene faze višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija sa izuzetnom tačnošću. Definisana formulacija višestrukih emulzionih sistema korišćena je za inkapsulaciju primarnih aktivnih komponenti.

Inkapsulacija vodenog i etanolnog ekstrakta belog luka realizovano je prvenstveno ispitivanjem njihovog uticaja, kao kompleksne smeše, na veličinu i raspodelu veličina kapi i stabilnost V_1/U nanoemulzija. S obzirom da inkapsulacija etanolnog ekstrakta belog luka podrazumeva formiranje E/U emulzija, koje nisu predmet velikog broja istraživanja, mogućnost formiranja ovakvih emulzija utvrđena je kroz izbor pogodnog emulgatora i uticaja dodavanja rastvora elektrolita unutrašnjoj vodenoj fazi na raspodelu veličina i stabilnost tokom vremena. Odabrane formulacije V_1/U emulzija sa unetom aktivnom komponentom korišćene su za pripremu višestrukih emulzija, uz dodatno praćenje uticaja dodatka osmotskog aditiva spoljašnjoj vodenoj fazi na veličinu kapi formiranih emulzija upotrebom homogenizera.

Poslednji korak podrazumeva detaljnu optimizaciju procesa ME u ćeliji sa mešanjem uz određivanje optimalnog transmembranskog pritiska i napona smicanja na površini membrane. Rezultati su potkrepljeni statističkom analizom i vešekriterijumskom optimizacijom procesnih parametara, a u cilju dobijanja monodisperznih višestrukih emulzija sa unetim aktivnim komponentama i mogućnošću kontrole veličine kapi formirane emulzije. Mogućnost korišćenja membrane od sinterovanog stakla u ćeliji sa mešanjem, podrazumeva prvenstveno potpunu karakterizaciju membranskog materijala, koji po našim saznanjima, nije ranije korišćen kao materijal za membransko emulgovanje. Izbor odgovarajuće metode za pripremu višestrukih emulzija nastao je kao rezultat poređenja karakteristika formiranih višestrukih emulzija dobijenih primenom optimalnih procesnih parametara ME i homogenizacije, kao i uticaja upotrebljene metode na kinetiku oslobađanja inkapsuliranih primarnih aktivnih komponenti.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Nosači aktivnih materija

Uloga biološki aktivnih jedinjenja u ljudskoj ishrani jedna je od najvažnijih oblasti istraživanja poslednjih godina. Istraživanja na ovu temu mogu značajno doprineti opštem zdravlju potrošača, ali i omogućiti napredak u razvoju novih sistema u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji i zdravstvu. Potencijalni efekti materija koje unosimo hranom doveli su do spoznaje da je moguće stvoriti prehrambene proizvode sa specifičnim karakteristikama, koje su u stanju da utiču na telesne funkcije iznad osnovnih koju pruža ishrana. Zapravo, na tržištu najuspešniji proizvodi su oni koji su u stanju da pruže dodatnu zdravstvenu korist, jer sve više potrošača zahteva hranu sa dodatom vrednošću. Prehrambeni proizvodi koji utiču na poboljšanje zdravlja i/ili smanjuju rizik od bolesti objedinjeni pod nazivom „funkcionalna hrana“ (Jiménez-Colmenero, 2013), zapravo predstavljaju aktivne materije inkapsulirane unutar nosača, i kao takve ulaze u sastav raznih dijetetskih suplemenata (Day i sar., 2009). Jedan od osnovnih pravaca istraživanja u prehrambenoj industriji je usmeren ka pronalazenju načina za inkapsulaciju funkcionalnih sastojaka unutar nosača bez njihovog uticaja na narušavanje funkcionalnosti konačnog proizvoda.

Funkcionalni sastojci koji mogu biti inkapsulirani u nosače obuhvataju najčešće mikronutrijente, kao što su vitamini i minerali, koji se najčešće ne proizvode u ljudskom telu i moraju biti uneti u organizam putem ishrane, ili bioaktivne molekule, odnosno fitonutrijente (poreklom iz biljaka), koji nisu neophodni za ljudsko zdravlje, ali imaju pozitivan efekat prilikom prevencije određenih bolesti (Velikov i Pelan, 2008).

Prilikom dizajniranja funkcionalne hrane mora se uzeti u obzir i funkcionalnost proizvoda u smislu strukture, teksture, stabilnosti, izgleda, ukusa i mirisa, kao i dostupnosti aktivnih sastojaka. Aktivni sastojak mora biti u odgovarajućem obliku kako bi se obezbedila njegova stabilnost, pri čemu se mora voditi računa i o ukusu finalnog proizvoda. Mikronutrijenti i bioaktivni molekuli prilikom inkapsulacije često mogu izazvati probleme zbog svojih fizičko-hemijskih karakteristika i mogućnosti interakcije sa drugim sastojcima koji su prisutni u sistemu. Postoje dva načina za uvođenje funkcionalnog sastojka u finalni

proizvod: kao rastvorena, ili kao nerastvorna komponenta u obliku disperzije. Komponente koje su rastvorene su lako dostupne za sorpciju, imaju dobru biološku raspoloživost, ali pokazuju veliku hemijsku reaktivnost sa drugim komponentama sistema. U obliku disperzije se često dodaju aktivne materije neprijatnog mirisa i ukusa, ili komponente koje lako reaguju sa drugim komponentama, ali njihovo dodavanje može dovesti do promene teksture proizvoda. Navedeni problemi se mogu prevazići inkapsulacijom aktivnih materija u koloidne nosače, čime se smanjuje njihova hemijska reaktivnost, omogućava maskiranje neprijatnog mirisa i obezbeđuje dobra biološka raspoloživost (Fraj, 2016; Velikov i Pelan, 2008). Fitonutrijenti su izuzetno atraktivna grupa za inkapsulaciju u nosače u cilju poboljšanja njihove biološke raspodele i farmakokinetike, jer se zbog njihove niske rastvorljivosti generalno slabo apsorbuju u ljudskom organizmu (Huang i sar., 2010).

U nosače aktivnih materija ubrajaju se sve strukture u koje mogu biti inkapsulirane određene aktivne komponente, kao što su: micide, lipozomi, emulzije (mikroemulzije i nanoemulzije), višestruke emulzije, mikro i nanokapsule, hidrogelovi, molekularni kompleksi i polimerne čestice. Postoji više različitih podela nosača aktivnih materija. U pogledu agregatnog stanja dele se na disperzije čvrsto-tečno, tečno-tečno i disperzije samoorganizovanih struktura molekula. Nosači aktivnih materija mogu biti jednokomponentni, kao pojedinačne aktivne komponente (koloidne čestice) ili kombinacija bioaktivnih komponenti ugrađenih u nosač. Morfološki oni mogu biti tečne (emulzije), kristalne ili amorfne čvrste supstance (koloidne čestice) i tečni kristali (mezofaze). Veličina nosača može da varira od oko 10 nm za micide do mikrometarskih veličina. Kao osnovni uslov za formiranje koloidnih sistema neophodna je stabilizacija površine koja se može postići naelektrisanjem površine (elektrostatička stabilizacija), adsorbovanjem sloja surfaktanta ili polimera na površinu (sterna stabilizacija) ili kombinacijom elektrostatičke i sterne stabilizacije (Fraj, 2016; Patel i Velikov, 2011).

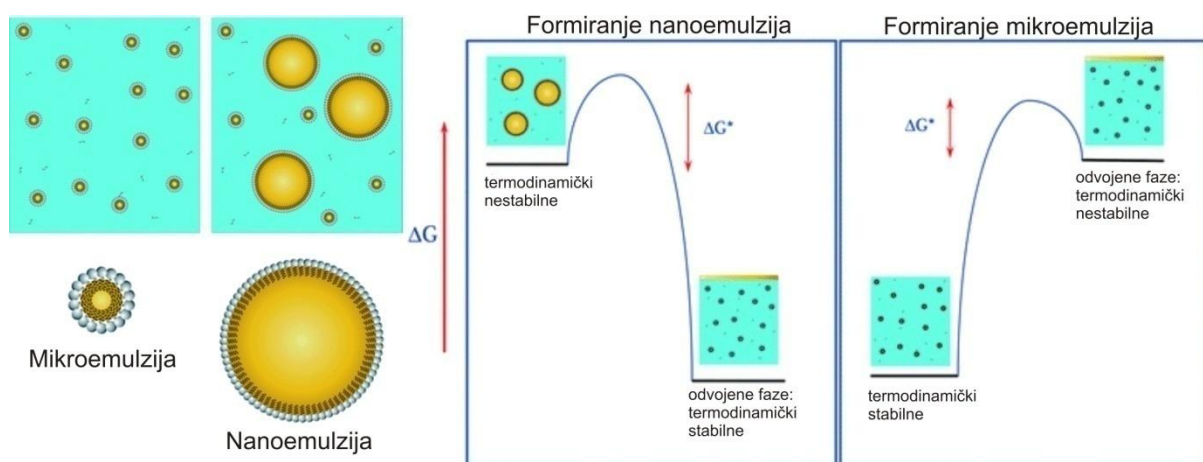
Prilikom pripreme nosača funkcionalnih sastojaka u prehrambenoj industriji od velikog je značaja prvenstveno izbor prehrambenih materijala koji se klasifikuju kao bezbedni za oralnu upotrebu. Materijali koji se mogu primenjivati pri dobijanju nosača uključuju polisaharide biljnog, životinjskog ili mikrobiološkog porekla (pektin, škrob, maltodekstrin, guma arabika, natrijum-alginat, karagenan, hidrokisporpimetil celuloza, natrijum-karboksimetil celuloza, ksantan guma, dekstran), proteine (sojin protein, kazein, želatin, zein, proteine surutke, proteine ovsa) i emulgatore (lecitin, sorbitan estri i njihovi etoksilati (tvinovi i spanovi), estri šećera, monogliceridi) (Huang i sar., 2010).

2.2. Emulzioni sistemi

Emulzioni sistem je smeša dve međusobno nemešljive tečne faze, obično ulja i vode, sa jednom fazom dispergovanom u vidu malih sfernih kapi u drugoj (McClements i sar., 2007). Sistemi gde je vodena faza dispergovana u uljanoj fazi predstavljaju voda-u-ulju (V_1/U) emulzije, dok ulje-u-vodi (U/V_2) emulzije predstavljaju sistem u kome je uljana faza dispergovana u vodi (slika 2.2a)). Faza koja je dispergovana u vidu kapi se naziva disperzna faza, dok je tečnost u kojoj je ona dispergovana kontinualna faza.

Emulzioni sistemi pokazuju izvesne razlike u stabilnosti u zavisnosti od veličine formiranih kapi i od metode koja se koristi za njihovo formiranje. Prema veličini kapi, emulzije se mogu podeliti na:

- emulzije (makroemulzije), sa prečnikom kapi 0,2-100 μm , koje su kinetički stabilne, ali termodinamički nestabilne, i zahtevaju značajnu potrošnju energije da bi se formirale;
- nanoemulzije, sa prečnikom kapi ispod 200 nm, koje pokazuju veću stabilnost od emulzija, ali se mogu smatrati i dalje termodinamički nestabilnim sistemima, iako je potrebno uložiti energiju za njihovu separaciju;
- mikroemulzije predstavljaju termodinamički stabilne sisteme, transparentne izotropne rastvora sa prečnicima kapi od 5-100 nm, koje nastaju spontanom asocijacijom hidrofilnih i hidrofobnih delova molekula surfaktanta (micelarne strukture) (Flanagan i Singh, 2006; McClements, 2012; Rao i McClements, 2012). Poseduju nižu slobodnu energiju nego kad su prisutne kao dve odvojene faze (slika 2.1).



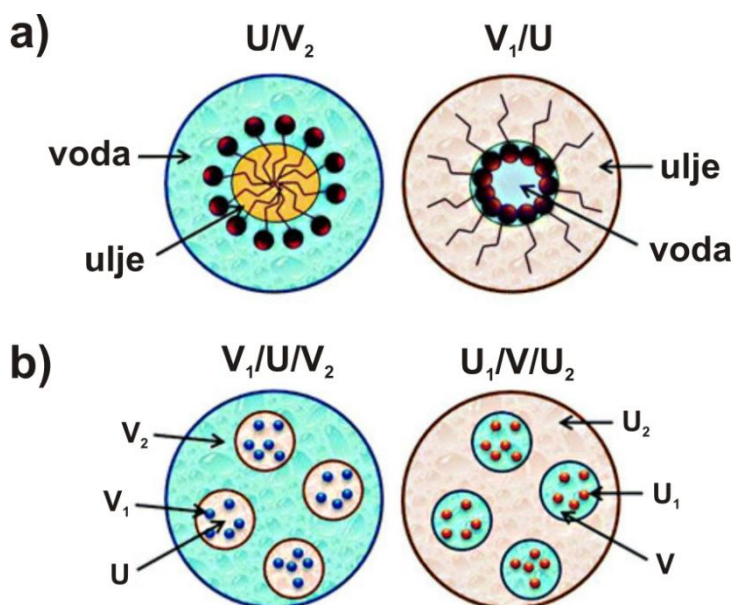
Slika 2.1. Šematski prikaz razlike između nanoemulzija i mikroemulzija u pogledu njihove veličine i slobodne energije sistema u odnosu na odvojene faze sistema (McClements, 2012)

Iako kao termodinamički nestabilni sistemi koji imaju tendenciju raslojavanja tokom vremena, emulzije su kinetički stabilne određeni vremenski period zahvaljujući supstancama (emulgatorima), koje se koriste za njihovu stabilizaciju. Kao takve one su široko rasprostranjene u različitim granama industrije, prvenstveno u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, zatim u prehrambenoj, poljoprivrednoj i petrohemijskoj industriji. Tipičan primer uspešne primene emulzija u prehrambenoj industriji je prilikom pripreme mleka, majoneza, različitih sosova i salatnih preliva (Berendsen, 2014).

2.2.1. Višestruki emulzioni sistemi

Višestruki emulzioni sistemi (duple ili višestruke emulzije) predstavljaju kompleksnu strukturu tečno/tečno disperzija, sisteme emulzije u emulziji, koje se mogu podeliti na dve kategorije: ulje-u-vodi-u-ulju ($U_1/V/U_2$) emulzije i voda-u-ulju-u-vodi ($V_1/U/V_2$) emulzije (Charcosset, 2009; Van Der Graaf i sar., 2005). $V_1/U/V_2$ emulzije predstavljaju sisteme u kojima su kapi vode (V_1) dispergovane u kapima ulja (U), koje su konačno raspoređene u spoljašnjoj vodenoj fazi (V_2), čija je struktura prikazana na slici 2.2b) (Florence i Whitehill, 1982).

Međutim, usled veće površine kontakta između faza u odnosu na obične emulzije, a kao posledica prisustva dve međupovršine, višestruke emulzije poseduju slabiju termodinamičku stabilnost. Pored njihove nestabilnosti koja je uzrokovana migracijom vode između unutrašnje i spoljašnje vodene faze, u slučaju $V_1/U/V_2$ emulzija, višestruke emulzije su izuzetno sklone razrušavanju (nastajanju običnih emulzija) tokom samog procesa pripreme, što je jedan od osnovnih razloga njihove slabe komercijalne primene. Danas se na tržištu može naći svega nekoliko proizvoda koje su na bazi višestrukih emulzija, iako je njihovo formiranje i primena označeno kao tehnologija budućnosti.



Slika 2.2. Šematski prikaz strukture emulzija: a) V_1/U i U/V_2 ; b) višestrukih $V_1/U/V_2$ i $U_1/V/U_2$ emulzija

Ogromna prednost višestrukih u odnosu na obične emulzije ogleda se u tome što sama njihova struktura može obezbediti inkapsulaciju istovremeno i hidrofilnih, i hidrofobnih aktivnih materija. Unutrašnja vodena faza $V_1/U/V_2$ emulzija može biti nosač svih hidrofilnih aktivnih materija uključujući vitamine, minerale, polifenole, aminokiseline, bioaktivne proteine, enzime, peptide, antimikrobna sredstva, konzervanse, boje i arome. Zahvaljujući višestrukim emulzijama, inkapsulacija aktivnih materija u unutrašnjosti vodene faze obezbeđuje:

- zaštitu od spoljašnjih uticaja,
- transport aktivnih materija do željene lokacije i kontrolisano otpuštanje,
- maskiranje nepoželjnih senzornih karakteristika.

U prehrambenoj industriji, višestruke emulzije imaju potencijal za primenu u postupcima dobijanja tzv. „light“ proizvoda, odnosno proizvoda sa smanjenim sadržajem masti, s obzirom da inkapsulacija unutrašnje vodene faze smanjuje ukupnu potrebnu količinu uljane faze, zadržavajući isti prečnik formiranih kapi ulja, i pri tome ne utiče značajno na senzorna svojstva proizvoda. Drugi razlog njihove potencijalne primene u prehrambenoj industriji je mogućnost maskiranja neprijatnog mirisa i ukusa komponenti unutar emulzije čime se doprinosi poboljšanju organoleptičkih svojstava hrane (Ficheux i sar., 1998).

Najmasovnija primena višestrukih emulzija registrovana je u farmaceutskoj industriji, gde se ovakve strukture koriste za imobilizaciju farmakološki aktivnih supstanci, zaštitu insulina od enzimske degradacije, u antidot terapiji kod predoziranja, u hemoterapiji pri tretmanu kanceroznih ćelija ili kao zamena za crvena krvna zrnca (Fraj, 2016).

2.3. Stabilizatori emulzija - emulgatori

Mešanjem ulja i vode, kao dve međusobno nemešljive tečne faze, dobija se sistem koji je sklon raslojavanju, kroz mnoštvo različitih mehanizama, o kojima će kasnije biti reči. Iz tog razloga, neophodno je sistemu dodati emulgatore (surfaktante) kako bi se poboljšala njegova stabilnost. Izbor pogodnog emulgatora, ili sistema emulgatora, predstavlja jedan od najvažnijih koraka pripreme emulzionih sistema. Emulgator je zapravo površinski aktivna materija (PAM) koji ima afinitet adsorpcije na površinu faza, olakšava formiranje kapi i sprečava njihovo ponovno međusobno spajanje. U odsustvu emulgatora, dispergovanjem jedne tečnosti u drugoj dolazi do povećanja slobodne površine dispergovane faze, tako da su emulzije, usled velike potencijalne energije, nestabilne. Težnja ka smanjenju potencijalne energije sistema dovodi do koalescencije kapi, što se može sprečiti dodatkom emulgatora koji smanjuje međupovršinski napon i samim tim smanjuje potencijalnu energiju sistema.

Emulgatori imaju dve glavne uloge u formiranju emulzija. Prvo, smanjuju međupovršinski napon između ulja i vode, što olakšava distribuciju kapljica, i u slučaju membranskog emulgovanja smanjuju minimalan pritisak emulgovanja. Drugo, emulgator formira zaštitni sloj na površini kapi, manje ili veće mehaničke čvrstoće, i time sprečava koalescenciju i/ili agregaciju kapi, što zavisi kako od tipa emulgatora tako i od njegove koncentracije.

Molekuli PAM sastoje se iz dva dela različite polarnosti: nepolarnog dela koji čini ugljovodonični niz (rep) i polarnog dela (glava) koga čini polarna atomska grupacija, čija veličina može da varira. Napolarni deo molekula rastvara se u organskim rastvaračima, a polarna grupa u vodi, dajući molekulu difilni (amfilni) karakter. Ako je polarni deo PAM dominantan, molekul će biti rastvoran u vodi, dok, ako je nepolarni deo dominantan, molekul će se rastvarati u organskim rastvaračima. Samim tim, izbor emulgatora zavisi od tipa emulzije koja se želi dobiti (Bastida-Rodríguez, 2013a). Jedan od osnovnih elemenata, na osnovu kojeg se najčešće vrši izbor emulgatora, je odnos hidrofилnog i hidrofobnog

(lipofilnog) dela molekula i njegova rastvorljivost po fazama. Naime, radi se o svojevrsnoj ravnoteži pomenutih delova molekula koja se naziva hidrofilno-lipofilna ravnoteža i kvantifikuje se određenom numeričkom vrednošću koja se označava kao HLB broj. Hemijski sastav molekula određuje HLB broj koji se može izračunati na sledeći način:

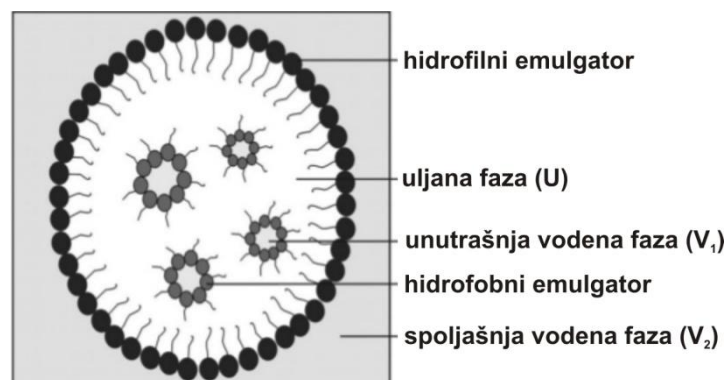
$$HLB = 20 \frac{m_h}{m_h + m_l} \quad (2.1)$$

gde je:

m_h - udeo (g/mol) hidrofilnog dela molekula,

m_l - udeo (g/mol) lipofilnog dela molekula.

Emulgatori sa niskom HLB vrednošću, rastvorljivi u ulju, koriste se za dobijanje emulzija V_1/U , dok su emulgatori sa visokom HLB vrednošću, rastvorljivi u vodi, koriste se za dobijanje emulzija U/V_2 . Dakle, višestruke emulzije sadrže (najmanje) dva emulgatora od kojih je jedan lipofilni (niske HLB vrednosti), a drugi hidrofilni (visoke HLB vrednosti). Lipofilni molekul PAM će se adsorbovati na V_1/U međupovršinu i stabilizovati unutrašnje kapi vode, dok će adsorpcija hidrofilnog emulgatora na U/V_2 međupovršinu stabilizovati kapi ulja. Njihova orijentacija na granici faza je prikazana na slici 2.3. Interakcija između ova dva emulgatora određuje stabilnost dvostrukih emulzija (Van Der Graaf i sar., 2005).



Slika 2.3. Orijehtacija hidrofilnog i lipofilnog emulgatora na granici faza višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija

Koncentracija odabranog emulgatora uopšteno utiče na srednju veličinu i raspodelu veličina kapi, kao i na stabilnost emulzije. Povećanjem koncentracije emulgatora veličina kapi se smanjuje, kao i vreme formiranja kapi, zbog povećanja dodirne površine faza i smanjenja međupovršinskog napona između dve faze. Uticaj koncentracije emulgatora na smanjenje veličine kapljica se zapaža samo do kritične micelarne koncentracije (KMK), nakon koje veličina ostaje približno konstantna. Međutim, daljim povećanjem koncentracije iznad vrednosti KMK smanjuje se agregacija kapljica tokom stajanja, pa su emulzije sa povišenom koncentracijom emulgatora stabilnije. Ovaj efekat zavisi kako od tipa emulgatora, tako i od koncentracije disperzne faze, i može se pojačati kombinacijom dva različita emulgatora (Márquez i sar., 2010; Mun i sar., 2010).

2.3.1. Tipovi emulgatora

Emulgatori kao površinski aktivne materije mogu se podeliti u četiri grupe u zavisnosti od prirode polarnog dela molekula:

- anjonski,
- katjonski,
- amfoterni,
- nejonski.

Jonski emulgatori (katjonski i anjonski) imaju ograničenu primenu u prehrambenoj industriji, jer većina njih nije dozvoljena za primenu u hrani usled potencijalne toksičnosti i neželjenog dejstva za ljudsko zdravlje. Emulgatori koji su dozvoljeni za oralnu upotrebu su uglavnom negativno naelektrisani (kao što su mono- i diglicerid estri limunske kiseline (CITREM), monoglicerid estri diacetil vinske kiseline (DATEM) i natrijum lauril sulfat (SLS)), dok se od katjonskih emulgatora često koristi lauril-arginat (LAE). Međutim, njihova upotreba može biti ograničena koncentracijom, jer u slučaju da je potrebna visoka koncentracija emulgatora za neku primenu, može doći do pojave neželjenih efekata poput iritacija (Friberg i sar., 2004; McClements i Rao, 2011).

Nejonski emulgatori su najčešće korišćeni emulgatori u prehrambenoj industriji usled njihove niske toksičnosti, odsustva bilo kakvog neželjenog efekta i visoke sposobnosti formiranja emulzije nezavisno od metode emulgovanja. Primeri emulgatora koji se najčešće koriste su estri različitih šećera (sorbitanmonooleat, saharoza monopalmilat), polioksietilen etri (POE ili brijovi) i etoksilovani sorbitan estri (tvinovi i spanovi) (Henry i sar., 2009; McClements i Rao, 2011).

Cviterjonski emulgatori (eng. *Zwitterionic*) poseduju dve ili više suprotno naelektrisanih grupa u istom molekulu. Samim tim, oni mogu biti negativno, pozitivno ili neutralno naelektrisani u zavisnosti od pH rastvora u kome se nalaze. Najčešće primenjivani cviterjonski emulgatori koji se mogu primenjivati u hrani su fosfolipidi, pri čemu se lecitin ubraja u najčešće korišćene. Međutim, pored njega postoji veliki broj prirodnih fosfolipida, koji nisu tako dobri emulgatori u svojoj izolovanoj formi, kako za formiranje, tako i za stabilizaciju emulzionih sistema. Međutim, oni mogu biti prilično efikasni ukoliko se koriste u kombinaciji sa ko-emulgatorima (McClements i Rao, 2011).

Uopšteno, u prehrambenoj industriji, najčešće korišćeni tipovi emulgatora su mali molekuli, fosfolipidi, proteini i polisaharidi. Odabrani tip emulgatora pokazuje veliki uticaj na veličinu formiranih kapi. Mali molekuli emulgatora (monomeri) ispoljavaju visoku efikasnost pri formiranju nanoemulzija, bilo da se za pripremu primenjuju metode koje zahtevaju unošenje energije od strane mehaničkog uređaja (homogenizacija, homogenizacija pod visokim pritiskom, ultrazvučno emulgovanje, mikrofluidizacija) ili metode koje koriste hemijsku energiju komponenti za formiranje emulzija (spontano emulgovanje, inverzija faza) (Karthik i sar., 2017; McClements i Rao, 2011; Ohtani i Rasert, 2014). S druge strane, proteini i polisaharidi nisu pogodni za primenu pri formiranju emulzija bez dodatnog unošenja energije u sistem, i skloni su formiranju kapi većeg prosečnog prečnika čak i uz upotrebu mehaničkih uređaja za njihovo formiranje, tako da se njihovim korišćenjem retko formiraju nanoemulzije. S druge strane, njihova ogromna prednost u odnosu na primenu

drugih emulgatora ogleda se u tome što su prirodne komponente (označeni kao „*label-friendly*“ sastojci u hrani), pa postoji veliki interes za njihovu potencijalnu primenu i unapređenje njihovog delovanja (McClements i Rao, 2011).

Često se za poboljšanje karakteristika formiranih emulzija i njihove stabilnosti koriste kombinacije više različitih emulgatora i/ili se emulzionim sistemima dodaju ko-emulgatori (jednostavni i viši alkoholi) ili ko-rastvarači (polioli kao što su polipropilen glikol, glicerol i sorbitol). Ko-emulgatorima se smatraju amfifilni molekuli koji imaju površinsku aktivnost, ali nemaju dovoljno dobra stabilizaciona svojstva da deluju samostalno usled male veličine polarne glave. Mehanizam njihovog delovanja se može pripisati fluidizaciji na granicu faza, podešavanju odnosa viskoziteta disperzna/kontinualna faza ili smanjenju elektrostatičkog odbijanja između naelektrisanih delova jonskog surfaktanta na međupovršini delujući kao prostorna smetnja. Ko-rastvarači su izrazito polarni molekuli koji nisu naročito površinski aktivni, ali mogu uticati na fizičko-hemijske karakteristike molekula emulgatora, kao što su površinska aktivnost, koeficijent raspodele između faza (voda/ulje) i sposobnost formiranja koloidnih struktura, putem promene strukture i interakcije molekula u vodenoj fazi (McClements i Rao, 2011).

2.3.1.1. Poliglicerol poliricinoleat

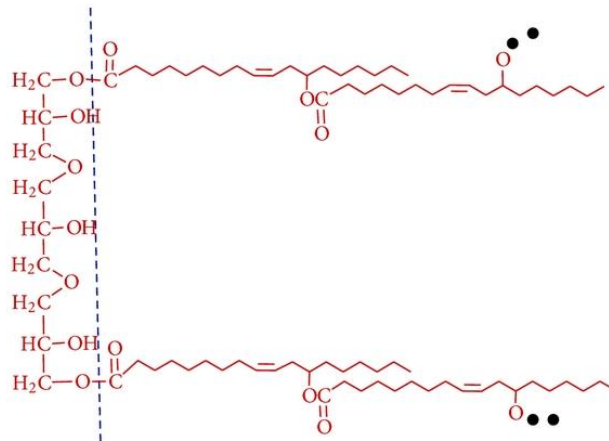
Za pripremu višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija neophodno je prvenstveno pripremiti stabilnu V_1/U emulziju. Stabilnost V_1/U emulzije zavisi od izbora i koncentracije lipofilnog emulgatora, prirode uljane faze, kao i prirode inkapsulirane aktivne materije ili markera, naročito ako su u pitanju elektroliti (Fraj, 2016).

Poliglicerol estri masnih kiselina su nejonski emulgatori koji se koriste za stabilizaciju emulzija, pena, disperzija, i kao sredstva za gaziranje, modifikatori viskoziteta, sredstva za jačanje testa, sredstva protiv pucanja, ovlaživači, rastvarači i supstituenti za masti. Uopšteno, poliglicerol estri masnih kiselina koji su dozvoljeni za korišćenje u prehrambene svrhe su poliglicerol estri jestivih masnih kiselina (PGFA, E475) i poliglicerol poliricinoleat (PGPR, E476). HLB broj ovih agenasa za emulgovanje zapravo zavisi od dužine poliglicerol lanca (broja prisutnih hidrofilnih grupa) i stepena esterifikacije (Bastida-Rodríguez, 2013a).

PGPR je sintetski nejonski emulgator dobijen od polimerizovanog glicerola i interesterifikovane ricinoleinske kiseline, čija je hemijska struktura prikazana na slici 2.4. Hemijski predstavlja kompleksnu strukturu estara, koji variraju u zavisnosti od stepena polimerizacije, poliglicerol izomera, stepena esterifikacije, pozicije gde se vrši esterifikacija, prisutnih masnih kiselina, jer ricinusovo ulje sadrži pored ricinoleinske kiseline i druge masne kiseline (3-8% oleinske, 3-7% linolne i 0-2% stearinske kiseline) (Gülseren i Corredig, 2012; Orfanakis i sar., 2013; Wilson i sar., 1998).

PGPR, zbog svoje izrazito lipofilne prirode, ubraja se u grupu jednog od najsnažnijih emulgatora za pripremu V_1/U emulzija, koji može da formira izuzetno stabilne emulzije čak i pri visokom sadržaju vodene faze (do 80%). Literaturni podaci ukazuju da PGPR već pri koncentracijama od 2% daje izuzetno stabilne emulzije, što je preduslov za formiranje stabilnih višestrukih emulzija (Gülseren i Corredig, 2012; Su i sar., 2006). Najveća primena PGPR je u industriji čokolade, gde se koristi kao sredstvo koje sprečava zgrušavanje

čokolade, zbog svoje izuzetne sposobnosti da veže prisutnu vodu (Gülseren i Corredig, 2014). Njegova osnovna uloga je, što kao aditiv, poboljšava karakteristike rastopljene čokolade, odnosno ima ulogu modifikatora viskoziteta, čime doprinosi oblikovanju istopljene čokolade. Zajedno sa lecitinom sa kojim ima komplementarna reološka svojstva, doprinosi kontrolisanju reoloških svojstava čokolade. Još jedna značajna primena PGPR je u postupku dobijanju niskokaloričnih namaza (Bastida-Rodríguez, 2013; Wilson i Smith, 1998).



Slika 2.4. Hemijska struktura poliglicerol poliricinoleata (PGPR). Crne tačke označavaju lance poliricinoleinske kiseline (Bastida-Rodríguez, 2013a)

Ispitivanja njegove potencijalne toksičnosti iz 1969. godine pokazala su da je dozvoljen dnevni unos PGPR 3,75 mg/kg telesne težine. Ova granica je kasnijim istraživanjima podignuta na 7,5 mg/kg telesne težine, 1975. godine, koja je kasnije potvrđena i 1979. godine od strane Evropske zajednice naučnog komiteta za hranu (SCF). Dozvoljena količina važi i danas, i priznat je kao bezbedan (eng. *Generally Recognized as Safe*) od strane FDA (eng. *Food and Drug Administration*) i Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO) za primenu u hrani (Bastida-Rodríguez, 2013; Friberg i sar., 2004; Gülseren i Corredig, 2014; Wilson i sar., 1998).

2.3.1.2. Dekaglicerol monooleat

Dekaglicerol monooleat (MO-7S ili MO-750) je nejonski emulgator koji se ubraja u grupu poliglicerol estara masnih kiselina. HLB vrednost dekglicerol monooleata je 12,9. Pored mogućnosti njegove primene za formiranje U/V₂ emulzionih sistema, selekcijom u odnosu na druge agense za emulgovanje, poliglicerol estri masnih kiselina izabrani su kao najbolji za pripremu etanol-u-ulju (E/U) emulzionih sistema. Prilikom upotrebe ove grupe emulgatora stepen polimerizacije utiče na formiranje i stabilnost dobijenih emulzija, gde je predhodnim istraživanjima MO-7S izabran kao emulgator sa najboljim svojstvima (Xu i sar., 2001a). MO-7S je potpuno rastvorljiv u 95% etanolu i pokazuje veoma slabu rastvorljivost u ulju. Prema Bankroftovom pravilu (eng. *Bankcroft rule*), faza u kojoj je emulgator više rastvorljiv je kontinualna faza. S obzirom da MO-7S ima visoku HLB vrednost, očekivano je

da usled njegove polaranosti i veće rastvorljivosti u etanolnoj fazi, etanol bude kontinualna faza i omogući formiranje ulje-u-etanolu emulzija (De Los Reyes i Charcosset, 2010). Međutim, predhodna istraživanja su pokazala da MO-7S u smeši etanol/ulje ne podleže ovom zakonu, i da je primenom ovog emulgatora jedino moguće formirati stabilne E/U emulzije (Xu i sar., 2001b).

Ograničavajući faktor primene ovog emulgatora je njegova slaba površinska aktivnost, odnosno slabo izražen uticaj na međupovršinski napon, pa E/U emulzije dobijene epotrebom MO-7S ne podležu mehanizmu površinske stabilizacije (eng. *Gibbs-Marangoni effect*¹), kao obične V₁/U emulzije. Predložen mehanizam stabilizacije emulzija bazira se na rastvorljivosti monomera i njegovoj raspodeli između uljane i etanolne faze, koji uključuje difuziju MO-7S iz etanolne faze prema ulju, povećanje koncentracije emulgatora na granici faza i formiranje agregata na međupovršinskom filmu, koji dalje doprinose stabilnosti emulzionog sistema i sprečavaju koalescenciju kapi (Xu i sar., 2001a; Xu i sar., 2001b).

Upotreba MO-7S pri formiranju emulzionih sistema još uvek je u fazi istraživanja, pa postoji ograničen broj publikacija sa njegovom upotrebom. Kao emulgator primenjuje se za pripremu prehrambenih U/V₂ emulzija najčešće na azijskom kontinentu (Khalid i sar., 2017; Shu i sar., 2016), dok se još uvek ne može naći u bazama podataka dozvoljenih prehrambenih aditiva na evropskom kontinentu. S druge strane, većina publikacija koja se odnosi na upotrebu MO-7S za stabilizaciju E/U emulzija odnosi se na primenu ovih sistema pri proizvodnji biodizela (De Los Reyes i Charcosset, 2010), sa osvrtom na mogućnost korišćenja E/U emulzija kao nosača aktivnih materija u farmaceutskoj industriji (Xu i sar., 2001b).

2.3.1.3. Lecitini

Lecitini, kao grupa jedinjenja, jedinstveni su prirodni emulgatori koji poseduju amfifilna svojstva. Najčešće su sastavljeni od fosfolipida, koje čini fosforna kiselina sa holinom, glicerolom ili drugim masnim kiselinama, obično glikolipidima ili trigliceridima. Prirodni izvor lecitina su biljna i životinjska tkiva, i najčešće se dobija ekstrakcijom i prečišćavanjem fosfolipida iz soje, jaja, mleka, uljane repice ili suncokreta (ALC, 2009). Usled niske rastvorljivosti u vodi, u vodenoj sredini fosfolipidi se tako orijentišu da formiraju strukture kao što su lipozomi, dvoslojne strukture, micle ili lamelarne strukture, zavisno od stepena hidratacije i temperature. S obzirom da lecitin predstavlja mešavinu raznih fosfolipida, njegov sastav zavisi od sirovine iz koje je dobijen. Kao glavni izvor lecitina koristi se sojino ulje, iako se lecitin dobijen iz suncokretovog ulja navodi kao sve češća alternativa sojinom lecitinu. Glavni fosfolipidi lecitina dobijenog iz soje su fosfatidil holin (14-16%), fosfatidil inozitol (10-15%), fosfatidil etanolamin (10-15%), fosfatidna kiselina (5-12%), steroli i ugljeni hidrati. Ostale nefosfolipidne komponente prisutne su u manjim količinama, a detektovane u sojinom lecitinu su tokoferol, biotin, folna kiselina, tiamin,

¹ *Gibbs-Marangoni effect* - prenos molekula emulgatora duž međupovršinskog sloja usled gradijenta površinskog napona, koji se javlja kao posledica neravnomerne raspodele emulgatora na međupovršini, u cilju sprečavanja spajanja dve susedne kapi i njihove koalescencije (Tadros, 1994).

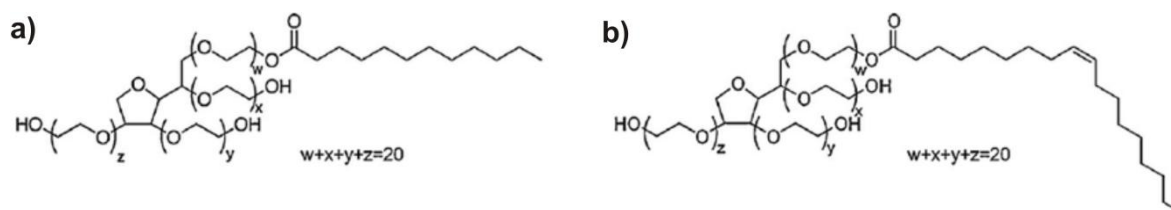
riboflavin, pantotenska kiselina, piridoksin i niacin (Rydhag i Wilton, 1981; Scholfield, 1981).

Komercijalno dostupan sojin lecitin može biti u tečnom stanju, kao viskozna tečnost, ili može biti u obliku praha, koji većinom čine koncentrisani trigliceridi, koji je potpuno oslobođen uljane faze i slobodnih masnih kiselina. Tečni lecitin se lakše disperguje u uljanoj fazi, dok se praškasti lakše disperguju u vodenoj fazi. Samim tim, u procesu pripreme emulzija se mogu dodavati i jednoj i drugoj fazi u zavisnosti od forme emulgatora. Emulgujuća svojstva lecitina i njegova primena za formiranje emulzija zavise od njegove HLB vrednosti, koji može da varira u intervalu od 2 do 12 (ALC, 2009; Van Nieuwenhuyzen, 1976).

Primena lecitina široko je rasprostranjena u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji i industriji boja. U prehrambenoj industriji netoksičnost lecitina dovela je do njegove široke upotrebe kao aditiva prilikom pripreme različitih vrsta hrane. Njegova upotreba redukuje viskozitet, zamenjuje skuplje sastojke, kontroliše kristalizaciju šećera i reološke karakteristike čokolade, pomaže pri mešanju sastojaka, poboljšava vek trajanja proizvoda i može se koristiti kao sredstvo za premazivanje. Kao sredstvo za emulgovanje stabilizuje emulziju, poboljšava teksturu namaza i oslobađanje arome (ALC, 2009; Nieuwenhuyzen, 1976).

2.3.1.4. Polisorbati

Polisorbati se ubrajaju u grupu nejonskih emulgatora koji su bezbedni za upotrebu. Njihova najveća primena je u kozmetičkim formulacijama, a koriste se za pospešivanje penetracije leka kroz kožu (Cappel i Kreuter, 1991). Polisorbati su estri masnih kiselina polioksietilen sorbitana. Najčešće korišćeni emulgatori iz ove grupe su polioksietilen sorbitan monolaurat (T20 (eng. *Tween 20*)) i polioksietilen sorbitan monooleat (T80 (eng. *Tween 80*)), čije su hemijske strukture prikazane na slici 2.5. Osnovni deo molekula polisorbata je isti, dok se struktura pojedinih molekula razlikuje usled različitih bočnih lanaca masnih kiselina. Bočni ugljovodonični lanci predstavljaju hidrofobnu strukturu polisorbata, dok je hidrofилna priroda posledica prisustva etilen-oksид grupacija. Zahvaljujući svojoj hidrofилno/lipofilnoj strukturi imaju sposobnost akumulacije na granici faza, orijentišući hidrofилne delove ka vodi, a hidrofobne ka ulju (Kerwin, 2008). T20 i T80 su izrazito hidrofилne prirode, rastvorljivi u vodi, sa izrazito velikim vrednostima HLB broja (16,7 za T20 i 15 za T80) (Badolato i sar., 2008; Friberg i sar., 2004; McClements, 2004).

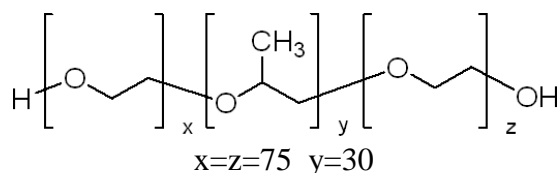


Slika 2.5. Hemijska struktura T20 i T80 (Ruiz-Peña i sar., 2010)

KMK polisorbata je niska i iznosi oko 0,014 mmol/l za T80 i 0,061 mmol/l za T20. Njihov uticaj na snižavanje površinskog napona, a samim tim i emulgujuća svojstva, više su izražena prilikom upotrebe T20, koji snižava površinski napon na oko 30 mN/m, za razliku od T80, koji snižava na 42 mN/m, pri istoj koncentraciji (Kerwin, 2008; Ruiz-Peña i sar., 2010).

2.3.1.5. Pluronic

Poloksameri (pluronic (eng. *Pluronic*)) su nejonski triblok kopolimeri, koji se sastoje od centralnog hidrofobnog dela, koji čini polioksipropilen, i dva hidrofilna kraja, koji se sastoje od polioksietilena. Postoji veliki broj različitih poloksamera čija se svojstva razlikuju. Etilen oksid/propilen oksid/etilen oksid (EO/PO/EO) blok kopolimeri predstavljaju grupu emulgatora koji se zbog njihove karakteristike slabog penušanja koriste u mašinskim deterdžentima za pranje sudova, kao i u raznim primenama koje zahtevaju surfaktante koji malo pene ili ne pene uopšte. Nalaze primenu kao pomoćna sredstva za ispiranje, kao rastvarači za mirise, i kao ugušćivači i agensi za želiranje. Blagi su deterdženti, netoksični, ali relativno skupi. Između ostalog, mogu se koristiti za povećanje rastvorljivosti hidrofobnih supstanci. Takođe, koriste se za različite procene primene lekova, i smatraju se postojanim u lekovima koji se koriste prilikom hemoterapije. Povećanjem udela EO lanaca povećava se rastvorljivost u vodi, kao i sposobnost ugušćivanja i formiranja gela, a smanjuje vlaženje (Kabanov i sar., 1995; Sastry i Hoffmann, 2004).



Slika 2.6. Hemijska struktura pluronika F68

Hemijska struktura pluronika F68 (PF68), koji je najčešće primenjivan poloksamer prikazana je na slici 2.6. PF68 je u vodi rastvoran dvofunkcionalni blok kopolimer, koga određuje primarna hidroksilna grupa. Netoksičan je, nalazi se u obliku čvrstih pastila i ima HLB vrednost veću od 24.

2.3.2. Vidovi nestabilnosti emulzionih sistema

Emulzije kao metastabilni sistemi podložni su destabilizaciji tokom vremena koja se odigrava različitim fizičko-hemijskim mehanizmima, uključujući gravitacionu separaciju, flokulaciju, koalescenciju, Ostvaldovo sazrevanje (eng. *Ostwald ripening*) i hemijsku degradaciju (slika 2.7) (McClements i Rao, 2011).

Gravitaciona separacija je jedna od najčešćih vidova nestabilnosti emulzija, i može se ispoljiti kroz pojavu sedimenta na dnu ili pojavu dispergovane faze na površini emulzije

označenog kao kriming emulzije (eng. *creaming*), a u zavisnosti od gustine disperzne i kontinualne faze. Kriming predstavlja kretanje kapi ka vrhu i javlja se kao posledica njihove manje gustine od kontinualne faze, dok sedimentacija predstavlja kretanje kapi ka dnu usled njihove veće gustine od kontinualne faze. Pojava kriminga je češća pojava kod U/V_2 i $V_1/U/V_2$ emulzija, dok se sedimentacija češće javlja kod V_1/U emulzija.

Brzina kojom se kapi kreću usled gravitacione separacije definisana je Stokesovim zakonom (eng. *Stoke's law*):

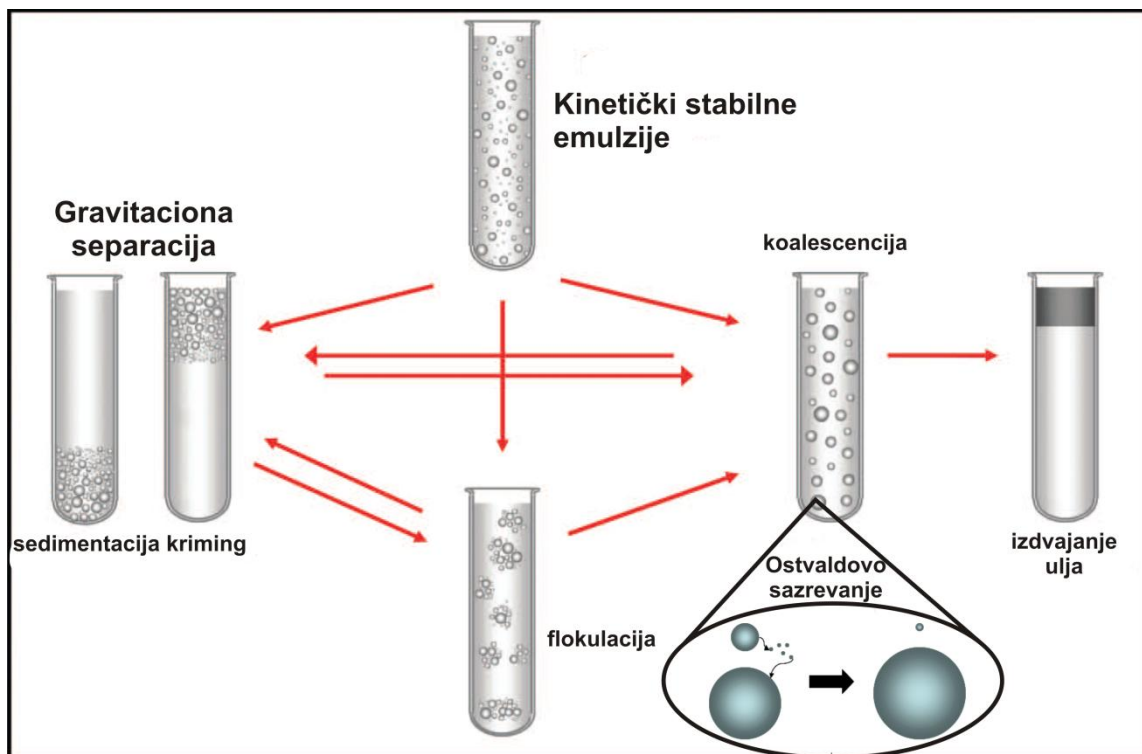
$$v = - \frac{2gr_k^2(\rho_k - \rho_c)}{9\mu_c} \quad (2.2)$$

gde je v brzina izdvajanja kapi (brzina kriminga), r_k poluprečnik kapi, ρ_k gustina kapi, ρ_c gustina kontinualne faze, μ_c viskozitet kontinualne faze, g je gravitaciona konstanta. Praktično, pored ova dva vida sedimentacione separacije, kapi se u masi emulzije kreću jedna u odnosu na drugu usled Braunovog kretanja (eng. *Brownian motion*), koji je povezan sa toplotnom energijom sistema. Kretanje kapi usled gravitacionih sila se intenzivira sa porastom prečnika kapi, dok se Braunovo kretanje intenzivira sa smanjenjem prečnika kapi. Na taj način, kod kapi koje su u opsegu nanoemulzija (veličina čestica ~ 70 nm) ne treba očekivati da dođe do kriminga, usled izraženog efekta Braunovog kretanja (Friberg i sar., 2004; McClements i Rao, 2011).

Gravitaciona separacija može se kvantifikovati uvođenjem veličine koja se naziva sedimentacioni indeks (SI) ili kriming indeks (CI), u zavisnosti od tipa emulzija koje se analiziraju.

Agregacija kapi podrazumeva međusobno spajanje više kapi u jednu (koalescenciju) ili asocijaciju kapi u aglomerate, bez njihovog međusobnog srašćivanja. Pojava koalescencije direktno zavisi od primenjenog emulgatora ili sistema emulgatora (Landfester, 2003). Drugi najčešći uzrok ovih pojava je priroda koloidnih interakcija, koja može zavisi od: fizičko-hemijskih karakteristika pojedinih faza (dielektrične konstante i indeksa refrakcije), prečnika kapi, karakteristika međupovršinskog sloja (debljine, naelektrisanja, pakovanja, reoloških karakteristika i hidrofobnosti) i karakteristika fluida-kontinualne faze (pH, osmotskog pritiska, jonske jačine i temperature). Interakcija između kapi predstavlja sumu Van der Valsovih (eng. *Van der Waals*), elektrostatičkih, sternih i hidrofobnih interakcija (McClements, 2004). Van der Valsove i hidrofobne interakcije predstavljaju privlačne interakcije, dok su sterne i elektrostatičke interakcije obično odbojnog karaktera. Uopšteno, intenzitet privlačnih i odbojnih interakcija povećeva se sa povećanjem prečnika kapi (McClements i Rao, 2011).

Ostvaldovo sazrevanje je proces povećanja prečnika kapi u emulziji tokom vremena, usled difuzije materije sadržane unutar kapi malih prečnika ka kapima većeg prečnika kroz kontinualnu fazu (McClements, 2004). Javlja se usled razlike u kapilarnom pritisku između pojedinih kapi, odnosno razlike u Laplasovom pritisku (eng. *Laplace pressure*) za kapi različitih veličina, koji se povećava sa smanjenjem prečnika kapi. Intenzitet ovog efekta zavisi od veličine kapi i njihove polidisperznosti, kao i rastvorljivosti disperzne faze u kontinualnoj (Landfester, 2006). Usled većeg kapilarnog pritiska u manjim kapima, materijal iz njih ima težnju da difunduje ka većim kapima, kako bi se pritisci izjednačili.



Slika 2.7. Šematska ilustracija najčešćih mehanizama nestabilnosti prehrambenih emulzija: kriming, sedimentacija, flokulacija, koalescencija, Ostvaldovo sazrevanje i izdvajanje ulja (McClements i Rao, 2011)

Ostvaldovo sazrevanje može se sprečiti dodatkom inhibitora koje sprečavaju ovaj efekat, a ove komponente prevashodno moraju biti dodate disperznoj fazi. U slučaju V_1/U emulzija, dodatak u vodi rastvornih supstanci (naročito molekula male molekulske mase kao što su soli ili šećeri) dovodi do povećanja osmotskog pritiska u manjim kapima. Manje kapi vode će difundovati ka većim sve dok koncentracija dodate materije ne dovede do uspostavljanja ravnoteže ($\Delta p_{\text{kap}} = \Delta p_{\text{osm}}$), nakon čega ne dolazi do pojave Ostvaldovog sazrevanja (Badolato i sar., 2008; Landfester i sar., 2000).

2.3.2.1. Nestabilnost višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija

Stabilnost višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzionih sistema u fokusu je istraživanja poslednjih decenija, zbog njihove kompleksne prirode i potencijalne nestabilnosti tokom pripreme i skladištenja. Uopšteno, ubrajaju se u termodinamički i kinetički nestabilne sisteme koji su skloni koagulaciji, flokulaciji i raslojavanju. Njihovoj nestabilnosti doprinosi i činjenica da je za njihovu pripremu neophodno koristiti dva emulgatora suprotne rastvorljivosti, jednog male HLB vrednosti i drugog visoke HLB vrednosti, čije prisustvo može biti uzrok potencijalne nestabilnosti sistema, usled difuzije emulgatora između dve prisutne međupovršine.

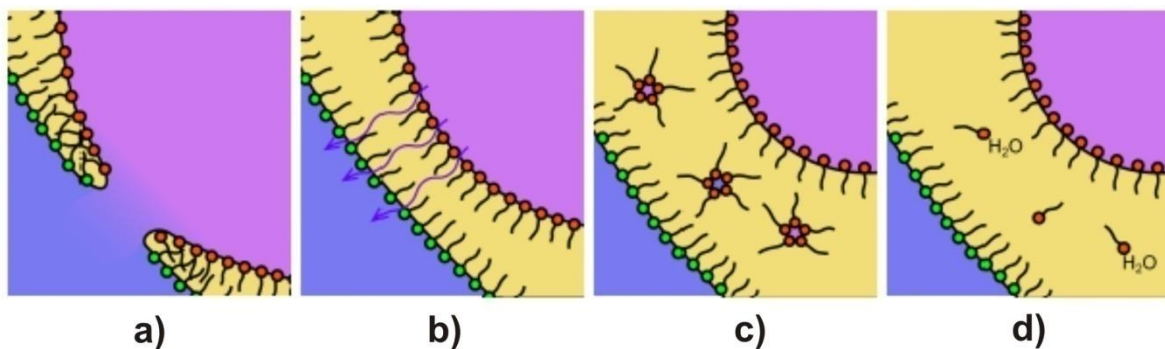
Na nestabilnost i oslobađanje sadržaja iz višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzionih sistema može uticati veliki broj parametara: priroda upotrebljenog emulgatora i njegova koncentracija (Matos i sar., 2014; Sapei i sar., 2012; Ushikubo i Cunha, 2014), razlika osmotskih pritisaka između unutrašnje i spoljašnje vodene faze (Frasch-Melnik i sar., 2010), veličina kapi i

sadržaj disperzne faze (udeo unutrašnje vodene faze u V_1/U emulziji, kao i udeo V_1/U emulzije u višestrukoj emulziji) (Herzi i sar., 2014), hemijska priroda uljane faze (Bonnet i sar., 2009; Herzi i sar., 2012), temperatura skladištenja (Bonnet i sar., 2010a), kao i veliki broj drugih komponenti koji se mogu dodavati sistemu.

Stabilnost višestrukih emulzija može se poboljšati na različite načine, uključujući dodavanje elektrolita (NaCl) ili glukoze u unutrašnju vodenu fazu, ili želiranjem unutrašnje vodene faze, čime se zapravo pospešuje stabilnost V_1/U emulzije, a samim tim i višestruke emulzije. Pozitivan efekat na stabilnost može se postići dodavanjem punioca (ksantan gume, hidroksietil celuloze ili glukoze) u spoljašnju vodenu fazu, ili korišćenjem koloidnih čestica ili kompleksa protein-polisaharid, kao stabilizatora uljanih kapi (Benichou i sar., 2007; Dickinson, 2011; O'Regan i Mulvihill, 2010; Pawlik i sar., 2010; Sapei i sar., 2012).

Promene koje se najčešće javljaju u sistemima višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija nakon njihove pripreme, i dovode do njihove nestabilnosti tokom vremena, uključuju koalescenciju spoljašnjih kapi višestruke emulzije i/ili koalescenciju unutrašnjih kapi vode, pri čemu koalescencija unutrašnjih kapi može i ne mora uticati na veličinu kapi višestruke emulzije (Dickinson, 2011). Starenjem emulzija dolazi do oslobađanja inkapsuliranog materijala u višestrukim emulzijama. Najčešći načini oslobađanja inkapsuliranog sadržaja iz unutrašnje vodene faze $V_1/U/V_2$ emulzionih sistema uključuju:

- permeaciju vode, i u vodi rastvorenih komponenti, uz „pucanje“ tečnog filma između unutrašnjih kapi vode i granične površine spoljašnje kapi (slika 2.8a));
- molekulska difuziju ili permeaciju inkapsuliranog materijala kroz uljanu fazu bez narušavanja strukture međupovršinskog filma (Pays i sar., 2002; Vasiljevic i sar., 2006).



Slika 2.8. Šematski prikaz mehanizama transporta inkapsuliranog materijala iz višestrukih emulzija: a) „pucanje“ tečnog filma, b) formiranje lamelarnih struktura, c) formiranje inverznih micela, d) formiranje hidratiranih molekula emulgatora (Berendsen, 2014)

U cilju sprečavanja narušavanja strukture međupovršinskog filma, i koalescencije kapi kao posledice ovog mehanizma, sistemu se dodaju komponente za izjednačavanje osmotskog pritiska ($\Delta\Pi$) između dve vodene faze. Kod višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzije sa pozitivnim osmotskim pritiskom (veći osmotski pritisak u V_1) tokom vremena dolazi do transporta vode u unutrašnjost V_1 kapi, što izaziva njihovo „oticanje“. Kao posledica „oticanja“ kapi V_1 , postepeno dolazi do povećanja njihove zapremine, sve do postizanja kritične vrednosti prečnika kapi. Nakon postizanja kritične veličine dolazi do pucanja unutrašnjih kapi i pretvaranja višestruke emulzije u U/V_2 emulziju. S druge strane, kod

emulzija sa negativnim $\Delta\Pi$ (veći osmotski pritisak u V_2) dolazi do transporta vode iz unutrašnjih kapi ka spoljašnjoj vodenoj fazi, što tokom vremena izaziva „isušivanje“ unutrašnjih kapi. Skupljanje kapi V_1 , kao posledica smanjenja njihove zapremine, postepeno dovodi do njihovog nestajanja i pražnjenja kapi ulja (Frasch-Melnik i sar., 2010; Jiao i sar., 2002; Matsumoto i Sherman, 1969; Tedajo i sar., 2005).

Drugi mehanizam transporta inkapsuliranog materijala podrazumeva migraciju materijala kroz uljanu fazu bez raskidanja filma, koji se može odvijati prema jednom od četiri predložena mehanizma:

- direktna solubilizacija i difuzija kroz sloj ulja – može se odvijati ukoliko je inkapsulirani materijal neutralne prirode (nenaelektrisani molekuli);
- permeacija materijala kroz lamele emulgatora koje se formiraju na U/V_2 međupovršinskom sloju na mestima gde je sloj ulja veoma tanak, usled fluktuacije (nepravilnog povećanja i smanjenja) njegove debljine (slika 2.8b));
- integracija inkapsuliranog materijala unutar obrnutih (inverznih) micela emulgatora i difuzija micela kroz uljanu fazu (slika 2.8c));
- transport pomoću hidrofilnih polarnih glava emulgatora kroz sloj ulja – može se transportovati voda i hidrofilne inkapsulirane materije (slika 2.8d)) (Bonnet i sar., 2010b; Cheng i sar., 2007; Garti, 1997).

Koji od mehanizama transporta inkapsuliranog materijala će biti dominantan zavisi, pre svega, od stabilnosti emulzionog sistema, kao i od prirode inkapsulirane materije, tipa i koncentracije emulgatora. U suštini, nestabilnost višestrukih emulzionih sistema je najčešće posledica simultane pojave više pomenutih mehanizama.

2.4. Priprema višestrukih emulzija

Najčešći način pripreme višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzije podrazumeva dva koraka. Prvi korak podrazumeva formiranje V_1/U emulzije uz korišćenje lipofilnog emulgatora, dispergovanjem unutrašnje vodene faze u kontinualnu uljanu fazu. U ovoj fazi pripreme emulzionih sistema se najčešće primenjuju konvencionalne metode dobijanja emulzija koje podrazumevaju upotrebu sudova sa mešalicama različite konstrukcije, koloidne mlinove, homogenizere i mikrofluidizere. Drugi korak podrazumeva dispergovanje formirane V_1/U emulzije u spoljašnju vodenu fazu, u kojoj se nalazi hidrofilni emulgator. Opšta preporuka je da se u ovoj fazi ne koristi visok napon smicanja, jer on može dovesti do razaranja unutrašnje emulzije i koalescencije sa spoljašnjom fazom. (Charcosset, 2009).

S obzirom da se sam proces formiranja emulzija zasniva na dispergovanju nemešljivih tečnosti, pri čemu zapravo dolazi do formiranja nove međupovršine, potrebna energija za njihovo formiranje uglavnom zavisi od međupovršinskog napona između dve faze i veličine formiranih kapi. Osnovna svojstva formiranih emulzija, kao što su stabilnost, reološka svojstva i njihova praktična primena, u velikoj meri zavise ne samo od temperature i sastava, već i od raspodele veličina kapi (Leal-Calderon i sar., 2007). U cilju poboljšanja karakteristika formiranih emulzija razvijen je veliki broj metoda koji se mogu koristiti za

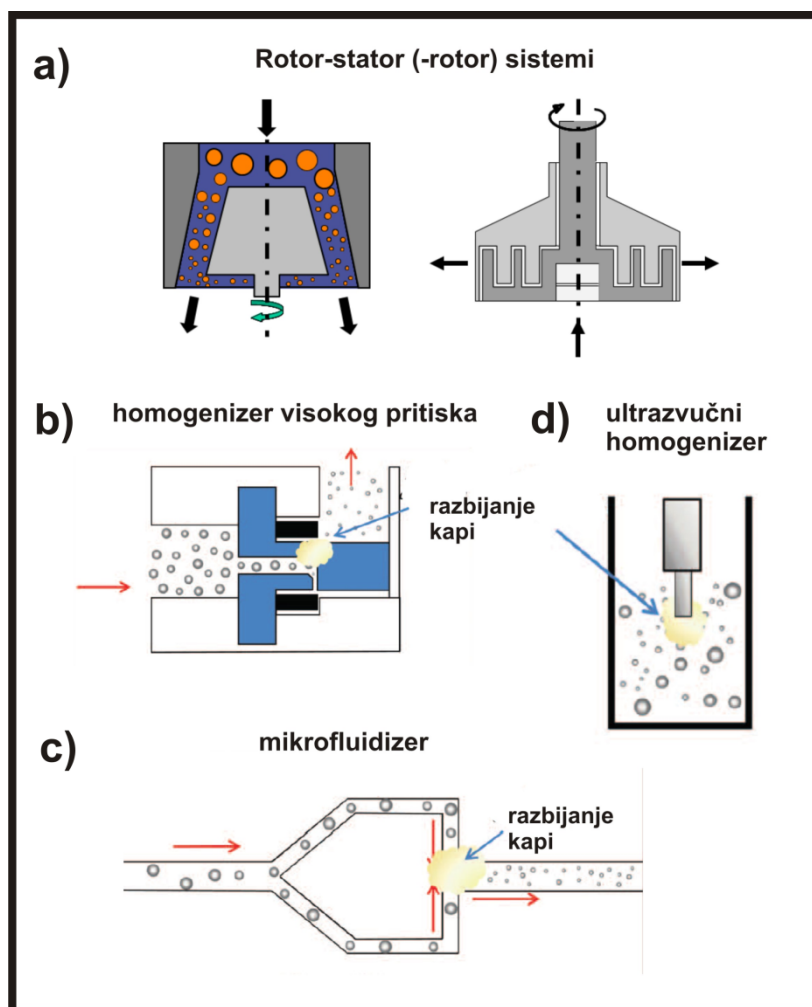
dobijanje emulzija. Njihova osnovna razlika se ogleda u načinu iskorišćenja energije, mehanizmu otkidanja kapi i energetskej efikasnosti procesa prilikom dobijanja željene veličine kapi.

2.4.1. Konvencionalne metode emulgovanja

Konvencionalne metode pripreme emulzija obuhvataju intenzivne procese mešanja, koji koriste veliku količinu energije za razbijanje krupnih kapi na sitnije. Jedna od najčešće primenjivanih metoda je homogenizacija. Primeri sistema koji se koriste za homogenizaciju su:

- Rotor-stator (-rotor) sistemi - baziraju se na propuštanju emulzije kroz procep između kupastog ili cilindričnog statora i rotora, ili sistema od dva rotora, pri čemu usled obrtanja (spinovanja) dolazi do razbijanja kapi na manje dimenzije (slika 2.9a));
- Homogenizeri visokog pritiska - baziraju se na propuštanju emulzije kroz izuzetno mali otvor pod visokim pritiskom, u kome nastale kapi emulzije formiraju manje kapi (slika 2.9b));
- Mikrofluidizeri - princip rada je sličan kao kod homogenizera visokog pritiska, samo je dizajn kanala kroz koji prolazi emulzija nešto drugačiji. Emulzija pod visokim pritiskom prolazi kroz dva odvojena kanala, koji se sjedinjuju u komoru, u kojoj dolazi do veoma efikasnog razbijanja kapi usled sudara dve struje (slika 2.9c));
- Ultrazvučni sistemi - njihova primena se zasniva na propuštanju ultrazvučnih talasa kroz emulziju u koju je uronjena ultrazvučna sonda, gde usled intenzivne turbulencije dolazi do razbijanja kapi na manje veličine (slika 2.9d)).

Rasprostranjena upotreba ovakvih sistema za emulgovanje bazira se na njihovoj visokoj efikasnosti. Međutim, primena ovih uređaja podrazumeva korišćenje velikog napona smicanja, koji najčešće dovodi do intenzivne koalescencije formiranih kapi disperzne faze, onemogućavajući pouzdanu kontrolu veličine i raspodele veličina kapi. Primena visokog napona smicanja može dovesti do gubitka funkcionalnih karakteristika komponenti koje su osetljive na zagrevanje ili smicanje, dok polidisperznost emulzija može direktno uticati na fizičko-hemijske karakteristike proizvoda. Osim toga, potrošnja energije kod ovakvih načina dobijanja emulzija je obično velika (Charcosset, 2009; Van Der Graaf i sar., 2005). Navedeni problemi doveli su do razvoja alternativnih metoda emulgovanja, koje se zasnivaju na primeni mikrostrukturiranih sistema za formiranje emulzija (Charcosset, 2009; Nazir i sar., 2010).



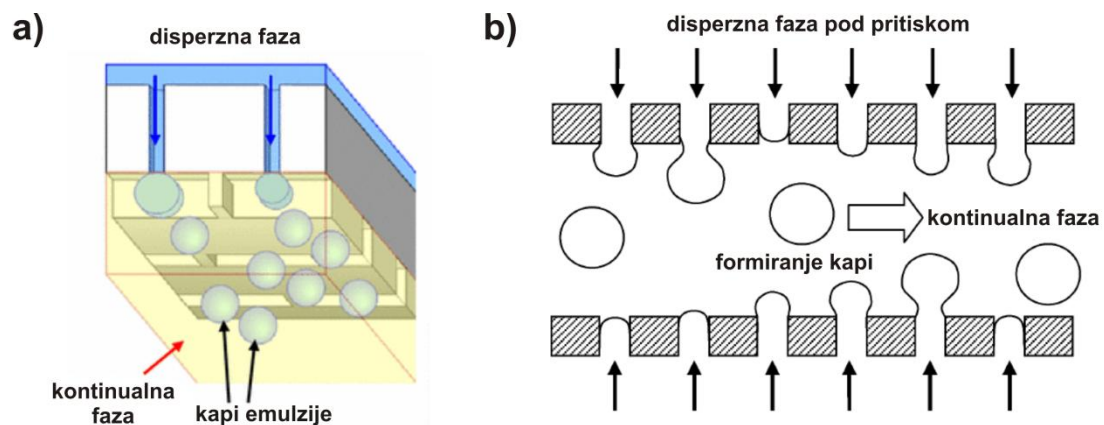
Slika 2.9. Šematski prikaz različitih konvencionalnih metoda za dobijanje emulzija: a) rotor-stator (-rotor) sistemi; b) homogenizer visokog pritiska; c) mikrofluidizer i d) ultrazvučni homogenizer (McClements i Rao, 2011)

2.4.2. Primena mikrostrukturiranih sistema za dobijanje emulzija - membransko emulgovanje

Intenzivna istraživanja na razvoju novih tehnika za dobijanje emulzija sa kontrolom veličine i raspodele veličina kapi dovela su do razvoja i primene mikrostrukturiranih sistema u ove svrhe. Osnovna prednost primene mikrostrukturiranih sistema u odnosu na konvencionalne metode emulgovanja zasniva se na niskoj potrošnji energije (Nazir i sar., 2010; Sugiura i sar., 2002). Razvijen je veliki broj tehnika emulgovanja na mikrostrukturiranim sistemima koje se mogu koristiti za dobijanje monodisperznih emulzija, pri čemu veličina kapi emulzija zavisi isključivo od geometrije uređaja (Berendsen, 2014). Podela ovih tehnika izvršena je na osnovu načina formiranja kapi na dve osnovne kategorije: mikrokanalno i membransko emulgovanje.

- **Mikrokanalno emulgovanje** - tehnike koja se zasnivaju na spontanom formiranju kapi

Mikrokanalno emulgovanje zasniva se na potiskivanju disperzne faze kroz mikrokanale i naglom propadanju disperzne faze pri nailasku na „stepenicu“, što joj omogućava da zauzme termodinamički najstabilniji (sferni) oblik (slika 2.10a). Formiranje kapi bazirano je isključivo na međupovršinskom naponu. Kapi se formiraju bez uticaja napona smicanja izazvanog protokom kontinualne faze, pri čemu je protok disperzne faze jedini kontrolisan parametar, što čini ovu metodu interesantnom za proizvodnju višestrukih emulzija. Međutim, kao prvi korak pripreme višestruke $V_1/U/V_2$ emulzije, odnosno priprema V_1/U emulzije, preporučuje se upotreba neke od konvekcionálnih metoda emulgovanja, jer je osnovni nedostatak mikrokanalnog emulgovanja relativno nizak prinos koji se može postići, koji nije preporučljiv pri pripremi V_1/U emulzije. Pored toga, kvašenje i prljanje ovakvih uređaja je prilično zanemareno, iako može biti značajan problem koji može da skрати životni vek uređaja. Zbog svega navedenog, prilikom pripreme emulzija na mikrokanalima, povećanje dimenzija uređaja sa laboratorijskog na industrijski nivo praktično je neizvodljiv (Berendsen, 2014). Međutim, osnovna prednost upotrebe ovakvog sistema emulgovanja podrazumeva mogućnost pouzdane kontrole veličine kapi direktnim posmatranjem pomoću mikroskopa, što može biti izuzetno značajno za formiranje monodisperznih emulzionih sistema (Okushima i sar., 2004; Sugiura i sar., 2004, 2002; Van Der Graaf i sar., 2005).



Slika 2.10. Šematski prikaz procesa a) mikrokanalnog emulgovanja i b) membranskog emulgovanja (Kobayashi i sar., 2009; Rayner i sar., 2004)

- **Membransko emulgovanje** - tehnike sa kontrolom napona smicanja

Membransko emulgovanje (ME) kao metoda za dobijanje emulzija dobila je posebnu pažnju u poslednjih 15 godina. Primena ME kao metode emulgovanja zasniva se na kontroli protoka i kontinualne i disperzne faze istovremeno. Veliki interes koji vlada za primenu ME bazira se na prednostima koje ova tehnika ima u odnosu na druge metode. Poređenjem sa konvencionálnim metodama, čija upotreba često ima za posledicu formiranje polidisperznih emulzija, usled formiranja emulzije razbijanjem velikih kapi na manje u zoni velike gustine

energije (Vladislavljević i Mitrović, 2000), ME je tehnika pripreme emulzija koja omogućava pouzdanu i preciznu kontrolu veličine kapi i formiranje monodisperznih emulzija, uz nisku potrošnju energije, što dovodi do njene masovne upotrebe poslednjih godina (Matos i sar., 2015; Vladislavljević i Schubert, 2002). Potrebna gustina energije za formiranje kapi sličnih dimenzija je za membransko emulgovanje 100 puta manja nego što zahteva homogenizacija pod visokim pritiskom, i 10 puta manja u odnosu na rotor-stator sisteme, dok se u isto vreme manje energije gubi u vidu toplote (Joscelyne i Trägårdh, 1999). Korišćenje ME daje mogućnost smanjenja količine upotrebljenog emulgatora i izvođenja procesa pri relativno blagim uslovima (sobnoj temperaturi, neutralnom pH), omogućavajući time upotrebu komponenti koje su termički nestabilne. Još jedna prednost primene ME ogleda se u tome što je napon smicanja na površini membrane značajno manji nego kod konvencionalnih metoda, što daje mogućnost korišćenja supstanci koje su osetljive na smicanje (Charcosset, 2009). ME je pogodna tehnika kako za dobijanje emulzija V_1/U , emulzija U/V_2 , tako i višetrukkih $V_1/U/V_2$ emulzija. Pored toga, membranskim emulgovanjem mogu se dobiti emulzije etanol/ulje/voda ($E/U/V_2$) i disperzije čvrsto/ulje/voda ($\check{C}/U/V$). Osnovne prednosti i nedostaci ME u odnosu na konvekcionalne metode emulgovanja sumirane su u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Prednosti i nedostaci membranskih procesa u odnosu na konvekcionalne metode (Charcosset, 2009)

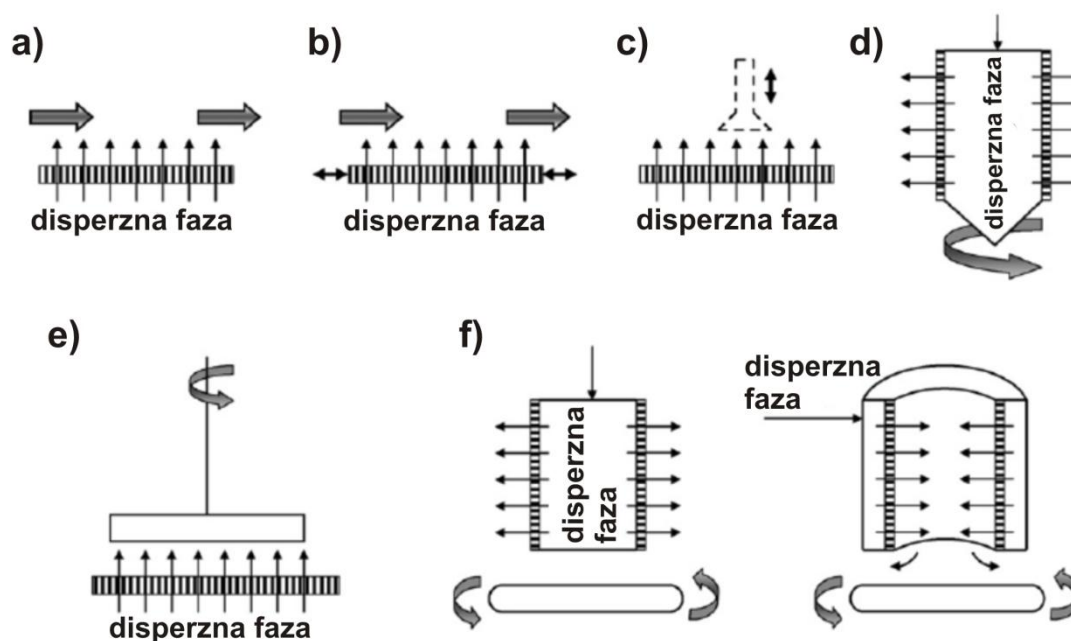
Prednosti	Nedostaci
<ul style="list-style-type: none"> • velika i konstantna površina kontakta • međusobna nezavisnost faza koje se dovode u kontakt • odsustvo pokretnih delova • lako se povećava proizvodni kapacitet • laka kontrola procesa • manji energetske zahtevi u odnosu na konvencionalne metode • redukcija fenomena koalescencije • odsustvo penušanja • uska raspodela veličina kapi • razvoj sve većeg broja tipova ME 	<ul style="list-style-type: none"> • dodatni otpor prenosu mase od strane membranske površine • relativno kratak životni vek membrane • visoki troškovi zamene membrane • mala brzina permeacije, redukovana produktivnost • prisustvo fenomena prljanja površine membrane i unutrašnjosti pora

Šematski prikaz osnovnog principa na kome se zasniva membransko emulgovanje prikazan je na slici 2.10b). U ovakvom postupku emulgovanja, korišćenjem sile pritiska disperzna faza se potiskuje kroz pore mikroporozne membrane, dok kontinualna faza prolazi duž površine membrane. Kapi nastaju na izlazima iz pora i kad dostignu određenu veličinu, odvajaju se od pora pod uticajem napona smicanja na površini membrane. Mehanizam formiranja kapi uključuje dve faze: rast na izlazu iz pora membrane i otkidanje kapi sa otvora pora. Njihovo odvajanje određeno je bilansom sila koje u tom trenutku deluju na kap, o čemu će kasnije biti reči. Kapi na porama teže da formiraju oblik sfere pod uticajem međupovršinskog napona, ali može doći do nepravilnosti u zavisnosti od protoka kontinualne faze i kontaktnog ugla između kapi i površine membrane. Konačna veličina i raspodela veličina kapi nisu samo određene veličinom i raspodelom veličina pora na membrani, već i

intenzitetom koalescencije, kako na površini membrane, tako i u masi emulzije (Charcosset, 2009; Rayner i sar., 2004; Van Der Graaf i sar., 2005; Vladislavljević i Williams, 2005).

2.4.2.1. Tipovi membranskog emulgovanja

Osnovna podela tehnika sa kontrolom napona smicanja (slika 2.11), a koji se primenjuje u cilju što boljeg odvajanja kapi sa površine membrane i kontrole raspodele veličina kapi, izvršena je na osnovu načina realizacije kontrole napona smicanja, koje se može postići: a) recirkulacijom kontinualne faze, pri čemu je orijentacija toka kontinualne faze u odnosu na tok disperzne faze unakrsna („*cross-flow*“ sistem za ME) (Joscelyne i Trägårdh, 1999; Vladislavljević i sar., 2004), b) vibracijom membrane uz unakrsni tok faza (Kelder i sar., 2007), c) vibracijom elemenata u kontinualnoj fazi u neposrednoj blizini membrane (Hatate i sar., 1997), d) rotacijom celokupne membrane (Vladislavljević i Williams, 2006), e) i f) mešanjem kontinualne faze mešalicom uz korišćenje ravne (slika 2.11e)) ili cevne membrane (slika 2.11f)) (Dragosavac i sar., 2012; Dragosavac i sar., 2008; Piacentini i sar., 2013; Suárez i sar., 2013). Tehničko izvođenje ME u ćeliji sa mešanjem, uz upotrebu cevne membrane, može biti realizovano na dva načina: potiskivanjem disperzne faze sa unutrašnje strane i sa spoljašnje strane membrane (slika 2.11f)) (Dragosavac i sar., 2008).



Slika 2.11. Različiti načini kontrole napona smicanja na površini membrane: a) unakrsno („*cross-flow*“), b) unakrsno sa vibracijom membrane, c) vibracija u kontinualnoj fazi, d) rotiranje membrane, e) ćelija sa mešanjem, ravna membrana, f) ćelija sa mešanjem, cevna membrana (Dragosavac i sar., 2008)

Ukoliko se primenjuje direktno membransko emulgovanje, unakrsno emulgovanje je u literaturi najčešće korišćena metoda za kontrolu napona smicanja, ali se uspešno može primeniti samo ukoliko molekul PAM ima dovoljno vremena da stabilizuje graničnu površinu. Svaka od pomenutih metoda poseduje određene prednosti i nedostatke u odnosu na ostale, čije karakteristike su sumirane u tabeli 2.2.

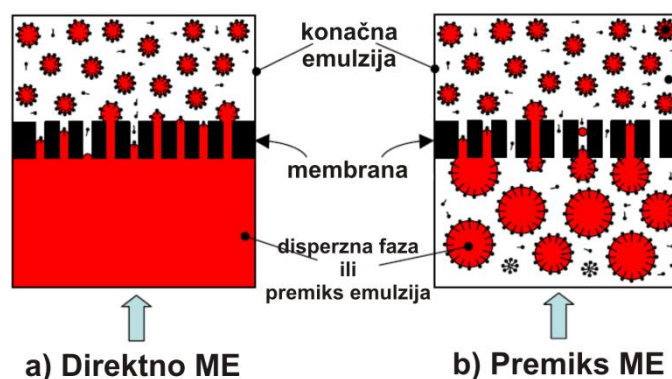
Tabela 2.2. Poređenje različitih tehnika kontrole napona smicanja na površini membrane (Dragosavac i sar., 2008)

	Prednosti	Nedostaci
Unakrsno („cross-flow“)	<ul style="list-style-type: none"> • konstantan napon smicanja na površini membrane; • lako se povećava kapacitet proizvodnje; • široko rasprostranjeni moduli. 	<ul style="list-style-type: none"> • mogućnost deformacije kapi prolaskom kroz pumpu i kroz cevovode; • zahteva veliku količinu materijala za rad, što je ekonomski neisplativo kada se koriste skupe komponente (Thompson i sar., 2011)
Unakrsno sa vibracijom membrane	<ul style="list-style-type: none"> • dodatna kontrola napona smicanja; • smanjenje veličine kapi. 	<ul style="list-style-type: none"> • komplikovana izrada; • ne postiže se poboljšanje uniformnosti kapi.
Rotirajuće membrane	<ul style="list-style-type: none"> • pogodne za viskozne emulzije i osetljive materije; • male količine uzorka dovoljne za rad (Thompson i sar., 2011). 	<ul style="list-style-type: none"> • velika potrošnja energije; • komplikovan i skup dizajn.
Vibracije u kontinualnoj fazi	<ul style="list-style-type: none"> • jednostavne za izvođenje 	<ul style="list-style-type: none"> • loša kontrola napona smicanja; • primenljivo samo u slučaju malog broja aplikacija.
Ćelija sa mešanjem (cevna membrana)	<ul style="list-style-type: none"> • mala zapremina kontinualne faze 	<ul style="list-style-type: none"> • ograničen maksimalni transmembranski pritisak; • neuniforman napon smicanja na površini membrane.
Ćelija sa mešanjem (ravna membrana)	<ul style="list-style-type: none"> • veliki fluks disperzne faze kroz membranu; • rad sa malim količinama uzorka 	<ul style="list-style-type: none"> • diskontinualan proces; • veliki prečnik dobijenih emulzija.

Pored navedene podele ME na osnovu načina kontrole napona smicanja, napravljena je i podela tehnika membranskog emulgovanja prema načinu izvođenja procesa na dve osnovne kategorije, čiji je osnovni princip prikazan na slici 2.12:

- **Direktno membransko emulgovanje** (slika 2.12a)) - disperzna faza se pod pritiskom potiskuje kroz pore membrane. U ovu kategoriju spadaju sve gore navedene tehnike membranskog emulgovanja.

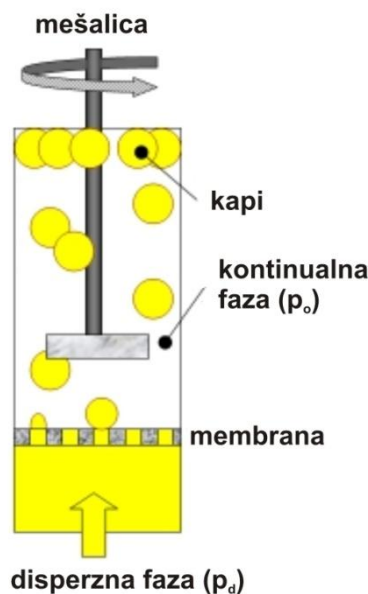
- **Premiks (eng. *Premix*) membransko emulgovanje** (slika 2.12b)) - zasniva se na tome da se predhodno pripremljena gruba emulzija (premiks), dobijena najčešće konvencionalnim metodama emulgovanja, propušta kroz membranu, u cilju smanjenja prečnika i poboljšanja uniformnosti kapi (Liu i sar., 2011; Piacentini i sar., 2014; Vladisavljević i sar., 2004).



Slika 2.12. Šematski prikaz a) direktnog ME i b) "premix" ME (Vladisavljević i Williams, 2005)

2.4.2.1.1. Čelija sa mešanjem

Čelija sa mešanjem predstavlja sistem za emulgovanje u kome je ravna (kružna) membrana postavljena ispod propellerske mešalice, koja svojim obrtanjem izaziva smicanje na površini membrane (slika 2.13). Postupak izvođenja je isti kao za sve metode ME, a zasniva se na potiskivanju disperzne faze kroz pore membrane, upotrebom komprimovanog gasa ili upotrebom peristaltičke pumpe sa konstantnim protokom. Za razliku od „*cross-flow*“ ME, napon smicanja na površini membrane u slučaju ćelije sa mešanjem nije uniforman, jer mešalica stvara radijalni model toka kontinualne faze na membranskoj površini. Bez obzira na tu činjenicu, ME u ćeliji sa mešanjem moguće je dobiti kapi emulzije sa uniformnom raspodelom veličina, jer se najveći broj kapi generiše oko kritičnog radijusa na mestu gde je napon smicanja najveći, o čemu će kasnije biti reči. Kao što je prikazano u tabeli 2.2, pored rada sa malim količinama, prednost upotrebe ovakvog sistema je što on omogućava postizanje velikog fluksa disperzne faze kroz membranu, čime se doprinosi efikasnosti procesa (Dragosavac i sar., 2012, 2008; Suárez i sar., 2013).



Slika 2.13. Šematski prikaz ME u ćeliji sa mešanjem sa propellerskom mešalicom (Buonomenna, 2013)

2.4.3. Uticaj procesnih parametara na ME

Na karakteristike formiranih emulzija membranskim emulgovanjem utiče veliki broj parametara, koji se mogu podeliti u tri osnovne grupe:

- parametri membrane,
- karakteristike faza,
- procesni (radni) parametri.

U parametre membrane ubrajaju se:

- srednji prečnik pora, raspodela veličina pora, oblik pora,
- broj aktivnih pora,
- poroznost,
- kvašenje,
- permeabilnost, K ,
- debljina membrane, L .

U karakteristike faza spadaju:

- međupovršinski napon, γ ,
- tip i koncentracija emulgatora,
- viskozitet kontinualne i disperzne faze, μ_c i μ_d ,
- gustina kontinualne i disperzne faze, ρ_c i ρ_d .

Procesnim parametrima smatraju se:

- napon smicanja, τ ,
- transmembranski pritisak, ΔP_{tm} ,
- temperatura,

- konfiguracija membranskog modula (Charcosset, 2009).

2.4.3.1. Tipovi membrana i parametri membrane

Membrane koje se koriste za procese ME mogu biti izrađene od različitih materijala, pri čemu tip materijala definiše ostale parametre, kao što su mikrostruktura, poroznost i kvašljivost. U literaturi se navode različiti tipovi membranskog materijala koji se koriste pri dobijanju emulzionih sistema, kao što su:

- silikon nitrid membrane (Geerken i sar., 2007; Zhu i Barrow, 2005),
- polikarbonatne membrane (Kobayashi i sar., 2002),
- aluminijum oksidne keramičke membrane (α -Al₂O₃) (Schröder i sar., 1998),
- cirkonijumom obložene keramičke membrane (Joscelyne i Trägårdh, 1999),
- membrane od politetrafluoretilena (Suzuki i sar., 1998),
- membrane od polipropilena (Vladisavljević i sar., 2002),
- silicijum staklo membrane (Fuchigami i sar., 2000),
- poliamidne membrane (Giorno i sar., 2003),
- „*Shiarisu porus glass*“ membrane (SPG) (Charcosset, 2009; Katoh i sar., 1996),
- metalne membrane (nikl membrane) (Dragosavac i sar., 2008; Matos i sar., 2014; Suárez i sar., 2014).

U zavisnosti od materijala i tehnike njihove proizvodnje, mogu se dobiti membrane sa različitim performansama u pogledu veličine pora, oblika pora (kružne ili kvadratne), izuvijanosti pora, otvora pora na površini membrane ili kvašljivosti površine (hidrofilne ili hidrofobne). Membrane koje su pokazale najbolja svojstva za formiranje emulzionih sistema su SPG membrane, odnosno staklene membrane sintentisane od CaO-Al₂O₃-B₂O₃-SiO₂ tipa stakla, koji je dobijen iz „*Shiarisu*“ - japanskog vulkanskog pepela. SPG membrane najčešće su cevnog oblika sa širokim opsegom veličina pora (0,05-30 μ m) i visoke poroznosti (50-60%). One poseduju uniformne cilindrične mikropore, međusobno nepovezane, koje karakteriše uska raspodela veličina. Kvašljivost površine im se može menjati reakcijom sa organskim silanima, kao na primer sa oktadeciltrihlorsilanom. Osnovni nedostatak ogleda se u tome što i pored visoke poroznosti ovih membrana, udeo aktivnih pora je često nizak (ispod 10% za unakrsno ME), što ima za posledicu nizak fluks kroz membranu. Pored SPG membrana, za dobijanje emulzija često se koriste i keramičke aluminijum oksidne (α -Al₂O₃) membrane, α -aluminijum i cirkonijum obložene membrane (SCT) i politetrafluoroetilen membrane. Njih uopšteno karakteriše velika aktivna površina i relativno visok fluks kroz pore (Charcosset, 2009). Metalne membrane koje se koriste za formiranje emulzionih sistema, odlikuju se tačno definisanim rastojanjem između susednih pora, što daje mogućnost precizne kontrole veličine i raspodele veličina kapi (Dragosavac i sar., 2008).

Veličina pora (D_p) membrane u linearnoj je vezi sa veličinom kapi emulzije koje se formiraju na membrani (D_d):

$$D_d = c \cdot D_p \quad (2.3)$$

gde je c konstanta koja može da varira između 3 i 50, u zavisnosti od operativnih uslova i vrste korišćene membrane. Za SPG membrane vrednost date konstante, prema literaturnim podacima, nalazi se u opsegu od 2 i 10.

Raspodela veličina formiranih kapi direktno zavisi od raspodele veličina pora na membrani. Monodisperzne emulzije mogu se dobiti ukoliko je raspodela veličina pora membrane dovoljno uska, dok prisustvo malog broja krupnih pora može dovesti do pojave bimodalne krive raspodele formiranih kapi (Charcosset, 2009; Liu i sar., 2011).

Poroznost membrane definiše udaljenost između susednih pora, pri čemu se sa smanjenjem poroznosti povećava rastojanje između pora. Što su pore bliže jedna drugoj (pri velikoj poroznosti), veća je verovatnoća koalescencije kapi na površini membrane, pre samog njihovog odvajanja. Da bi se sprečila koalescencija kapi na samoj površini membrane, rastojanje između susednih pora treba da bude veće od prečnika kapi koje se formiraju. S druge strane, ako je poroznost suviše niska fluks disperzne faze može biti isuviše mali i nedovoljan za izvođenje procesa emulgovanja (Liu i sar., 2011).

Geometrija pora je parametar koji takođe može uticati na raspodelu veličina formiranih kapi. Najčešći oblici pora su kružne, kvadratne i pravougaone, koje su nasumično raspoređene unutar same membrane. U slučaju korišćenja kružnih nasumično raspoređenih pora za formiranje emulzionih sistema, potrebno je primeniti značajnu silu smicanja u procesu, kako bi se omogućila precizna kontrola veličine i raspodele veličina formiranih kapi (Liu i sar., 2011).

Kvašljivost membrane je jedna od najvažnijih karakteristika koja definiše veličinu i raspodelu veličina formiranih kapi. Kako bi se omogućilo pravilno formiranje kapi na površini membrane i njihovo odvajanje, membrana mora biti kvašljiva sa kontinualnom fazom i ne sme biti kvašljiva sa disperznom fazom. Ugao kontakta između površine membrane i kapi disperzne faze (θ) koja se izdvaja na samoj površini (meren u kontinualnoj fazi) mora biti manji od 90° , sa težnjom da ima što manju vrednost. To praktično znači da se za dobijanje V_1/U emulzija primenjuju hidrofobne membrane (kvašljive uljanom fazom), dok se za dobijanje U/V_2 emulzija primenjuju hidrofilne membrane (kvašljive vodenom fazom). Pored toga, kontaktni ugao između faza na površini membrane zavisi i od brzine adsorpcije emulgatora na granicu faza i napona smicanja na površini membrane, odnosno bilansa sila koje deluju na kap. Ukoliko je θ suviše veliki (blizak 90°), kap može da se suviše dugo zadržava na površini membrane, što ima za posledicu veće kapi i veći indeks polidisperznosti. S druge strane, ukoliko je ugao kontakta suviše mali ili disperzna faza kvazi površinu membrane, neće doći do pravilnog formiranja kapi na otvoru pore, već „curenja“ disperzne faze po površini membrane. Kvašljivost membrane se delimično može modifikovati potapanjem membrane u kontinualnu fazu. Na taj način, neutralne površine mogu postati hidrofilne ili hidrofobne. Međutim, nepoznato je koliki vremenski period će takva membrana zadržati dobijena hidrofilna/hidrofobna svojstva. Zbog toga se preporučuje upotreba kovalentno modifikovane površine membrane (Gijsbertsen-Abrahamse i sar., 2004; Liu i sar., 2011; Peng i Williams, 1998).

Debljina membrane (dužina pora) takođe igra važnu ulogu u kontroli raspodele veličina kapi i produktivnosti procesa ME. Prema Darsijevom zakonu (eng. *Darcy's law*),

fluks disperzne faze (J_d) povezan je sa transmembranskim pritiskom (ΔP_{tm}) i debljinom membrane (L) preko jednačine:

$$J_d = \frac{K \Delta P_{tm}}{\mu_d L} \quad (2.4)$$

gde je K permeabilnost membrane i μ_d viskozitet disperzne faze. Na datom transmembranskom pritisku, debljina membrane jedan je od faktora koji definiše fluks disperzne faze. Kada se uzme u obzir pretpostavka da membrana ima n cilindričnih uniformnih pora poluprečnika r , permeabilnost membrane je data Hagen-Poiseujevom jednačinom (eng. *Hagen-Poiseuille equation*) (Charcosset i sar., 2004):

$$K = \frac{nr^2}{8\pi} \quad (2.5)$$

Udeo aktivnih pora (K) na membrani definiše procenat pora koji učestvuje u procesu membranskog emulgovanja, odnosno procenat pora kroz koje protiče disperzna faza. Udeo aktivnih pora predstavlja parametar koji određuje brzinu (fluks) disperzne faze kroz membranu. Za procenu udela aktivnih pora razvijeni su različiti matematički modeli, gde se većina bazira na povezivanju ovog parametra sa definisanim fluksom disperzne faze. Međutim, za definisanje K kao procentualne vrednosti pora koje su aktivne u procesu ME, za razliku od gore navedene permeabilnosti membrane, potrebno je ovaj parametar povezati ne samo sa debljinom membrane i brojem pora na membrani, već i drugim parametrima koji definišu karakteristike samih pora, kao što su vijugavost i međusobna povezanost pora u samoj masi membranskog materijala. Jedan od uspešnih modela razvili su Vladislavljević i Šubert (2002), gde je udeo aktivnih pora zapravo funkcija hidrauličkog otpora membrane (R_m) i fluksa disperzne faze (J_d), povezanih preko sledeće jednačine (Matos i sar., 2013; Vladislavljevic i Schubert, 2002):

$$K = \frac{J_d \mu_d R_m}{\Delta P_{tm}} \quad (2.6)$$

S obzirom da je koalescencija kapi na samoj površini membrane nepoželjna u procesu ME, udeo aktivnih pora mora biti ispod odgovarajuće maksimalne vrednosti (K_{max}), da bi se ova pojava sprečila. Naime, ukoliko su dve kapi prilikom odvajanja sa površine suviše blizu jedna drugoj, može doći do njihovog spajanja u jednu kap, čime se doprinosi polidisperznosti. Jednačina za procenu maksimalnog udela aktivnih pora (K_{max}), može se definisati na sledeći način:

$$K_{max} = \left(\frac{\pi}{4\varepsilon} \right) \left(\frac{D_d}{D_p} \right)^{-2} \quad (2.7)$$

gde je D_d prečnik kapi, D_p prečnik pora, ε poroznost membrane (Vladislavljevic i Schubert, 2002; Vladislavljević i sar., 2004).

Definisana vrednost udela aktivnih pora na površini membrane može dati mogućnost procene vremena potrebnog za formiranje kapi (t_f). S obzirom da t_f predstavlja odnos zapremine kapi (V_d) i zapreminskog protoka disperzne faze kroz pojedinačnu poru (Q_{dp}), sređivanjem jednačine dobija se sledeći izraz:

$$t_f = \frac{V_d}{Q_{dp}} = \frac{\frac{\pi}{6} D_d^3}{\frac{\pi}{4} D_p^2 \frac{J_d}{\varepsilon K}} = \frac{2\varepsilon K D_d^3}{3D_p^2 J_d} \quad (2.8)$$

Vreme formiranja kapi, pored navedenih parametara, zavisi i od tipa emulgatora i međupovršinskog napona (Kukizaki, 2009; Matos i sar., 2013).

2.4.3.2. Procesni parametri

U procesne parametre ubrajaju se, kao što je već rečeno ranije, transmembranski pritisak (ΔP_{tm}), od koga zavisi fluks disperzne faze (J_d), napon smicanja na površini membrane (τ) i temperatura. Minimalan pritisak koji se mora primeniti, kako bi disperzna faza otpočela kretanje kroz pore membrane, naziva se kritičan pritisak (P_c) ili minimalni pritisak emulgovanja. Postoji mogućnost izračunavanja približne vrednosti P_c , uz pretpostavku da su pore idealno cilindrične, korišćenjem Laplasove jednačine (eng. *Laplace's equation*):

$$P_c = \frac{4\gamma \cos\theta}{D_p} \quad (2.9)$$

gde je D_p srednji prečnik pora, γ međupovršinski napon i θ ugao kontakta između disperzne faze i površine membrane. Precizna vrednost P_c određuje se eksperimentalnim putem.

Transmembranski pritisak, ΔP_{tm} , kao pogonska sila za protok kontinualne faze definisan je kao razlika između pritiska disperzne faze, P_d , i prosečnog pritiska kontinualne faze (P_0):

$$\Delta P_{tm} = P_d - P_0 \quad (2.10)$$

U slučaju kada je membrana ravna, odnosno u procesu ME u ćeliji sa mešanjem, pritisak P_0 je pritisak na površini membrane. Stvarna vrednost transmembranskog pritiska može biti znatno iznad kritičnog, usled odstupanja oblika pora od modela koji ih predstavlja idealno cilindričnim (za koje važi Laplasova jednačina), odnosno pojave vijugavosti pora, nepravilnosti otvora pora na površini membrane i značajnog uticaja kvašljivosti površine membrane na proticanje kroz pore membrane (Charcosset, 2009; Matos i sar., 2013).

Fluks disperzne faze, J_d , može se povezati sa transmembranskim pritiskom preko već definisanog Darsijevog zakona (jednačina (2.4)). Pored navedene jednačine, još jedan oblik Darsijevog zakona daje mogućnost preciznijeg izračunavanja J_d , i povezuje ove dve veličine preko hidrauličkog otpora membrane, R_m , umesto debljine membrane:

$$J_d = \frac{\Delta P_{tm}}{\mu_d R_m} \quad (2.11)$$

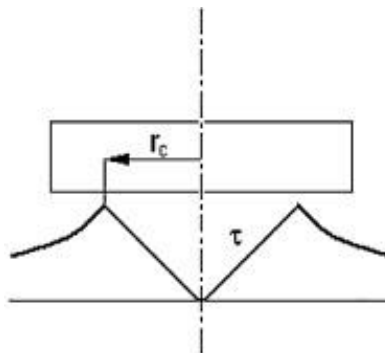
R_m se određuje eksperimentalno merenjem fluksa vode za različite vrednosti transmembranskog pritiska, i zavisi od karakteristika same membrane. Definisanje fluksa disperzne faze kroz membranu, moguće je i preko masenog protoka disperzne faze kroz membranu, M_d , na sledeći način:

$$J_d = \frac{M_d}{\rho_d A_{ef}} \quad (2.12)$$

gde je A_{ef} efektivna površina membrane i ρ_d gustina disperzne faze.

Sa porastom transmembranskog pritiska raste i fluks disperzne faze, pri čemu oba ova parametra treba održavati na optimalnoj vrednosti, u cilju što efikasnijeg procesa emulgovanja. Suviše visok fluks može dovesti do izdvajanja disperzne faze sa membrane u vidu mlaza ili do formiranja velikih kapi, odnosno širenja raspodele veličina kapi. Suviše nizak J_d ima za posledicu dugotrajno izvođenje samog procesa. Optimalna vrednost transmembranskog pritiska trebalo bi da bude 2 do 10 puta veća od P_c (Charcosset i sar., 2004; Charcosset, 2009).

Napon smicanja (τ) na površini membrane ključni je parametar za formiranje kapi na membrani i njihovo odvajanje, jer dovodi do pojave sile smicanja koja deluje na kap. Pored toga, napon smicanja zavisi od performansi samog modula u koji je smeštena membrana, odnosno konstrukcije same membrane.



Slika 2.14. Profil napona smicanja na površini membrane u zavisnosti od rastojanja u odnosu na osu rotacije procesa ME u ćeliji sa mešanjem (ravna membrana)

Formiranje emulzija ME u ćeliji sa mešanjem sa ravnom membranom direktna je posledica napona smicanja na površini membrane. Kao što je već rečeno, napon smicanja nije konstantan duž površine membrane. Obrtanjem mešalice u sudu dolazi do obrazovanja dve oblasti kretanja tečnosti, za koje se naponi smicanja drastično razlikuju: vrtložno kretanje tečnosti (eng. *vortex regime*), koje se formira oko ose mešanja, i mirujućii sloj tečnosti u neposrednoj blizini zidova suda (eng. *free vortex regime*), u kome vrednost napon smicanja opada sa približavanjem slojeva tečnosti zidovima suda, kao što je to prikazano na slici 2.14. Rastojanje između ose mešanja i granice ove dve zone naziva se kritični prečnik (r_c), pa se i izrazi za računanje napona smicanja za pomenute dve oblasti razlikuju. U oblasti vrtložnog

režima, izvedena jednačina za proračun napona smicanja, definisana je kao linearna zavisnost radijalnog rastojanja od centra membrane (r):

$$\tau = \frac{0,825(2\pi N)\mu_c r}{\delta} \quad (2.13)$$

gde je δ debljina graničnog sloja na površini membrane definisana sledećim izrazom:

$$\delta = \sqrt{\frac{\mu_c}{2\pi\rho_c N}} \quad (2.14)$$

Ukoliko je prečnik kapi manji od debljine graničnog sloja, jednačina (2.13) se svodi na oblik:

$$\tau = 0,825(2\pi)^{1,5}\rho_c^{0,5}\mu_c^{0,5}N^{1,5}r \quad (2.15)$$

Izraz za računanje napona smicanja u neposrednoj blizini zidova suda, delimično je korigovan u odnosu na jednačinu (2.15), uzimajući u obzir i kritičan prečnik:

$$\tau = 0,825(2\pi)^{1,5}\rho_c^{0,5}\mu_c^{0,5}N^{1,5}r_c^{1,6}r^{0,6} \quad (2.16)$$

gde su ρ_c gustina kontinualne faze, μ_c viskozitet kontinualne faze, N broj obrtaja impelera, r radijalno rastojanje od ose rotacije. 0,825 predstavlja brojnu vrednost korekcionog faktora, koji je dobijen eksperimentalno za odnos $D_i / D_t = 0,8$ (Matos i sar., 2013; Suárez i sar., 2013).

Kritičan prečnik može biti procenjen pomoću empirijske jednačine koja je izvedena za sudove sa mešanjem sa mešalicom sa lopaticama, koju je definisao Jamamoto (eng. *Yamamoto*) 1975. godine:

$$r_c = \frac{D_i}{2} 1,23 \left(0,57 + 0,35 \frac{D_i}{D_t}\right) \left(\frac{b}{D_t}\right)^{0,036} n_b^{0,116} \frac{Re}{1000 + 1,43Re} \quad (2.17)$$

gde su D_i , b i n_b prečnik, visina mešalice i broj sečiva (propelera) na mešalici, redom, a D_t prečnik suda u kome se odvija mešanje. Rejnoldsov broj, Re , (eng. *Reynolds number*) definisan je jednačinom koja se koristi u slučaju primene sudova sa mešanjem u sledećem obliku:

$$Re = \frac{\rho_c N D_i^2}{\mu_c} \quad (2.18)$$

gde je N broj obrtaja mešalice, ρ_c gustina i μ_c viskozitet kontinualne faze. Data korelacija za proračun r_c može se primenjivati u slučaju kada je odnos prečnika mešalice i suda u kome se odvija mešanje u intervalu od 0,3 do 0,7 (Suárez i sar., 2013).

2.4.3.3. Bilans sila koje deluju na kap

Najvažniji mehanizmi otkidanja kapi sa površine membrane zasnivaju se na primenjenom naponu smicanja u procesu, i zavise od nekoliko sila koje deluju na kap. U cilju što boljeg razumevanja svih sila koje deluju na kap u toku procesa ME, tip i način izračunavanja pojedinačnih sila prikazan je u tabeli 2.3, dok je smer njihovog delovanja na kap prikazan na slici 2.15.

Sila smicanja, F_D , nastaje kao posledica protoka kontinualne faze preko površine membrane, a smer delovanja sile je paralelan sa njenom površinom. Uz pretpostavku da se formiranje kapi odvija u laminarnom podsloju, ova sila može se definisati pomoću Stokesove jednačine, uz uvođenje korekcionog faktora, kako bi se uzeo u obzir efekat zida pore pri kretanju kapi. Međutim, u zavisnosti od modela, ova sila se može predstaviti ili kao funkcija brzine ili napona smicanja (jednačina (2.19)), pri čemu definisani napon smicanja zavisi u velikoj meri od konfiguracije modula membrane (ravna ili cevna membrana). U oba slučaja, korekcioni faktor k_x ključni je parametar za definisanje sile smicanja, i ima različite vrednosti za različite tipove membrana.

Tabela 2.3. Sile koje deluju na kap tokom procesa membranskog emulgovanja i jednačine za njihov proračun

Sila	Jednačina
Sila smicanja	$F_D = \frac{3}{2} \pi k_x D_d^2 \tau \left(\frac{3\mu^* + 2}{3\mu^* + 3} \right) \quad (2.19)$
Sila međufaznog napona	$F_\gamma = \gamma D_p \pi \quad (2.20)$
Sila razlike statičkog pritiska	$F_{SP} = \gamma \pi \frac{D_p^2}{D_d} \quad (2.21)$
Dinamička sila podizanja kapi	$F_{DL} = 0,761 \frac{\tau^{1,5} D_d^3 \rho_c^{0,5}}{\mu_c} \quad (2.22)$
Sila potiska	$F_B = \frac{\pi}{6} \Delta \rho g D_d^3 \quad (2.23)$
Sila inercije	$F_I = \frac{\pi}{6} \rho_d v_d^2 D_p^2 \quad (2.24)$

μ^* je odnos dinamičkog viskoziteta disperzne i kontinualne faze

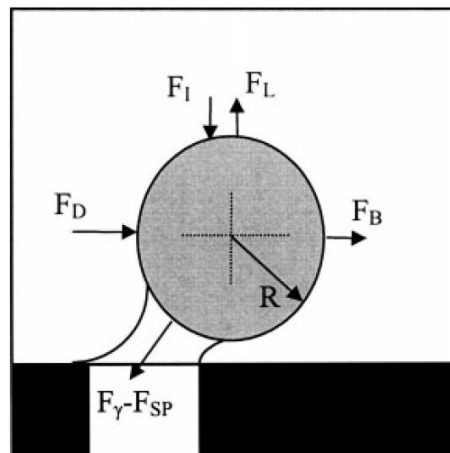
v_d je brzina disperzne faze

Sila međufaznog napona, F_γ , je adheziona sila koja drži kap vezanu za ivicu otvora pore, odnosno osnovna je sila zadržavanja kapi tokom emulgovanja, i deluje suprotno od smera otkidanja kapi. Ova sila zavisi od međupovršinskog napona (γ) i prečnika pora (D_p), shodno jednačini (2.20).

Sila koja potiče od razlike statičkog pritiska, F_{SP} , podrazumeva silu koja potiče od razlike između pritiska kapi i pritiska okolne kontinualne faze na samoj površini membrane.

Definisana je preko međupovršinskog napona, prečnika pora, kao i odnosa prečnika vrata kapi (koji povezuje kap i poru membrane) i prečnika same kapi. Često se uzima aproksimacija da je ovaj odnos 1, odnosno da je vrat kapljice jednak njenom prečniku, kao što je slučaj i u jednačini (2.21).

Dinamička sila podizanja kapi, F_{DL} (F_L), posledica je asimetričnog profila brzina kontinualne faze u neposrednoj blizini kapi. Kao što je prikazano u jednačini (2.22), ova sila zavisi od napona smicanja i veličine kapi.



Slika 2.15. Šematski prikaz sila koje deluju na kap tokom procesa membranskog emulgovanja (Charcosset i sar., 2004)

Sila potiska, F_B , je rezultat razlike u gustini između dve faze, i zavisi od zapremine kapi (jednačina (2.23)). Značajna je samo u slučaju kada ne dolazi do kretanja kontinualne faze i pri velikim razlikama gustina dve faze. U slučaju unakrsnog emulgovanja i emulgovanja u ćeliji sa mešanjem, brojna vrednost ove sile je izuzetno mala u odnosu na F_D i $F_γ$.

Sila inercije, F_I , je u direktnoj vezi sa masom fluida koja izlazi iz otvora pora (jednačina (2.24)). Javlja se usled kretanja disperzne faze kroz pore membrane, koja izaziva postepeno formiranje i punjenje kapi disperznom fazom, na obodu otvora pore. Pravac delovanja sile je normalan na površinu membrane, dok je smer suprotan rastu i odvajanju kapi od pore.

Tokom procesa formiranja kapi na porama membrane, sa porastom veličine kapi, dolazi i do promene intenziteta delovanja pojedinih sila koje deluju na nju. Veličina kapi se povećava, sve dok zbir sila koje su zaslužne za odvajanje kapi (F_{SP} , F_{DL} , F_B i F_D) ne postane veći od zbira sila zaslužnog za zadržavanje kapi na otvoru pore. Pri sumiranju bilansa sila koje deluju na kap dokazan je, pored uticaja primenjene metode emulgovanja, i značajan uticaj veličine pora membrane, odnosno veličine formiranih kapi. Na primer, u slučaju kada je veličina formiranih kapi oko 200 μm , ne bi trebalo zanemariti silu potiska, jer može imati značajnu vrednost. S druge strane, kada su kapi manje, inerciona sila i sila potiska značajno su manje od sile smicanja i sile međufaznog napona, pa se one pri izvođenju modela koje predstavljaju ravnotežne jednačine, mogu zanemariti (Matos i sar., 2013; Peng i Williams, 1998; Suárez i sar., 2013).

2.5. Bioaktivne komponente

Mnoštvo aktivnih komponenti može biti inkapsulirano unutar nosača dobijenih jednom od emulzionih tehnika. U okviru ove doktorske disertacije, kao bioaktivne komponente korišćeni su ulje semena tikve, kao lipofilna aktivna komponenta, i beli luk koji je pripreman u formi vodenog i etanolnog ekstrakta, i korišćen kao hidrofilna primarna aktivna komponenta.

2.5.1. Ulje semena tikve

Biljna ulja uopšteno predstavljaju robu široke potrošnje, i koriste se, kako pri pripremi različitih oblika hrane, tako i u različitim granama industrije. I pored širokog spektra izvora za njihovu proizvodnju, svetska potrošnja uglavnom je ograničena na sojino, palmino, suncokretovo ulje i ulje uljane repice. Preostala biljna ulja, koja se značajno manje koriste na globalnom nivou, poseduju različita svojstva u smislu masno-kiselinskog sastava i antioksidativnih svojstava. Međutim, njihova ogromna nutritivna prednost u odnosu na često korišćena ulja, ogleda se u tome što njihovo korišćenje može poboljšati svojstva hrane i industrijski pripremljenih proizvoda. Jedno od takvih ulja je i ulje semena tikve, čija upotreba nije niti popularizovana, niti široko rasprostranjena, iako poseduje karakteristike koje su pogodne za njegovu masovnu primenu u dijetetskim suplementima (Stevenson i sar., 2007).

Veliki broj istraživanja posvećen je ispitivanju sastava ulja semena tikve, biološkim i fiziološkim svojstvima, iz čega proizilazi njegova farmakološka primena. Za dobijanje ovog ulja koristi se najčešće tikva bogata uljem tzv. uljana tikva, pri čemu se gaji u dve osnovne forme: uljana tikva sa ljuskom i uljana tikva-golica, kod koje seme nije obloženo ljuskom. Proizvedeno ulje se može naći u maloprodaji, kao čisto hladno ceđeno ulje ili u smeši sa drugim uljima, i odlikuje ga izuzetno visoka cena, koja je posledica skupog postupka dobijanja (Nikolovski, 2009).

Organoleptička svojstva ulja semena tikve odlikuju se izuzetno karakterističnim ukusom i mirisom, arome prženih koštunjavih plodova, zbog pirazina koji nastaje prilikom prženja semena neposredno pre presovanja, ukoliko se ulje dobija takvim tehnološkim postupkom. Boja ulja varira od tamno zelene do braon, sa nijansama crvene, koje mogu da se kreću od crvenkasto-oker do tamnocrvene, i poseduje crvenu fluorescenciju. Zbog svojih prijatnih organoleptičkih svojstava, tikvino ulje se veoma često koristi kao salatno ulje. Međutim, zbog boje i jake arome, kao i izuzetnog penušanja ima ograničenu primenu u kulinarstvu (Nikolovski, 2009).

Izuzetna nutritivna svojstva ulja semena tikve opravdavaju njegovu visoku cenu. Konzumacija ovog ulja može se povezati sa mnogim pozitivnim zdravstvenim uticajima. Najznačajnija farmakološka svojstva ulja semena tikve povezana su sa njegovim pozitivnim uticajem u lečenju benigne hiperplazije prostate, odnosno uticaju na smanjenje veličine i rasta prostate, čime se indirektno može uticati na ublažavanje smetnji pri mokrenju (Procida i sar., 2013; Xanthopoulou i sar., 2009). Efektivnost uticaja tikvinog ulja na benignu hiperplaziju prostate može biti delimično funkcija njegove sposobnosti da poboljša funkciju rada bešike i

uretre. Poboljšanje usklađenosti rada bešike i smanjenje pritiska u bešici i uretri povezuju se sa pozitivnim uticajem lipidnih komponenti tikvinog ulja. Takođe, postoje dokazi da ulje semena tikve može pozitivno da utiče i uspori napredovanje hipertenzije, jer pospešuje snižavanje sadržaja masti u krvi, čime utiče i na smanjenje povišenog holesterola u krvi. Ublažavanje simptoma artritisa samo je jedna u nizu pozitivnih aspekata njegove upotrebe. Pored toga, pozitivan uticaj na ublažavanje simptoma dijabetesa vezuje se za promovisanje hipoglikemijske aktivnosti. Ulje semena tikve značajan je izvor vitamina E (tokoferola), pri čemu njegova antioksidativna svojstva mogu imati značajne terapijske efekte. Ispitivanja farmakološke aktivnosti dijetetskih suplementa sa ovim uljem pokazala su isvestan uticaj na smanjenje rizika od razvoja raka, naročito raka želudca, dojke i pluća, dok se uticaj na prevenciju raka prostate pripisuje prisustvu različitih karotenoida. Primena ulja semena tikve pokazala je i značajnu antimikrobnu aktivnost na različite vrste bakterija (Caili i sar., 2006; Stevenson i sar., 2007). Postoje verovanja da konzumiranje semena tikve ima antiparazitno delovanje zbog prisustva aminokiseline kukurbitina, kao i da sprečava nastajanje kamena u bubregu (Nikolovski, 2009).

Tikvino ulje ubraja se u izuzetno nezasićena biljna ulja, sa velikim varijacijama u masno-kiselinskom sastavu u zavisnosti od varijeteta tikve od koje je dobijeno, stepena zrelosti biljke, kvaliteta zemljišta i klimatskih uslova na kom je uzgajana. Sastoji se od kompleksne smeše masnih kiselina, estara masnih kiselina (monoglicerida (1,44%), diglicerida (0,39%), triglicerida (94,5%)), i drugih komponenti prisutnih u manjim količinama tzv. mikronutrijenata: vitamina (tokoferoli i tokotrienoli (0,03-0,09%)), sterola (0,2-0,4%), ugljovodonika (0,62%), fosfolipida (1%) i pigmenta (Nikolovski, 2009). Od masnih kiselina uglavnom dominira oleinska i linolna kiselina. Sadržaj masnih kiselina obično varira u zavisnosti od vrste tikve, za zasićene masne kiseline: miristinska, C14 (0,18-0,25%), palmitinska, C16 (12,6-18,4%), stearinska, C18 (5,1-9%), arahidinska, C20 (0,26-1,12%), beheninska, C22 (0,12-0,54%) kiselina i nezasićene masne kiseline: palmitoleinska, C16:1 (0,12-0,52%), oleinska, C18:1 (17-39,5%), linolna, C18:2 (36,2-62,8%) i linoleinska, C18:3 (0,53-0,82%) kiselina (Stevenson i sar., 2007).

Vitamin E u biljnim uljima je prisutan u formi različitih izomera: α -, β -, γ -, δ -tokoferol i četiri odgovarajuća tokotrienola. Sadržaj vitamina E u tikvinom semenu je na izuzetno visokom nivou, pri čemu su najzastupljeniji α -tokoferol i γ -tokoferol i njima odgovarajući izomeri (tokotrienoli) u koncentracijama do 91 mg/kg i 41-620 mg/kg, redom. Ostala dva tokoferola (β - i δ -tokoferol), kao i njihovi izomeri se u tikvinom semenu nalaze u značajno nižim koncentracijama. Vitamin E se ubraja u značajne prirodne antioksidanse, koji štiti ćelijske membrane i lipoproteine od oksidativnog stresa i oštećenja. Zahvaljujući njihovoj ulozi u sprečavanju oksidacije nezasićenih masnih kiselina u biljnom materijalu, njihovo očuvanje u biljnim uljima je od izuzetnog značaja (Nikolovski, 2009). Murković i sar. kvantikovali su sadržaj α -tokoferola (37,5 μ g/g) i γ -tokoferola (383 μ g/g), kao i odgovarajućih izomera α -tokotrienola (15,9 μ g/g) i γ -tokotrienola (128 μ g/g) u semenu tikve. Međutim, tokom procesa pripreme ulja sadržaj vitamina E se menja, usled primene povišene temperature u procesu pečenja. Tom prilikom koncentracija γ -izomera ostaje približno konstantna, dok se sadržaj α -izomera, odnosno količina α -tokotrienola značajno smanjuje, usled njegove nestabilnosti na povišenoj temperaturi (Murkovic i sar., 2004). Za razliku od

ulja dobijenog iz *C. pepo* L. vrste tikve, nađeni sadržaj tokoferola u *C. maxima* var. *Béjaoui* ukazuje na dominaciju δ -tokoferola (42,27% od ukupnog sadržaja tokoferola), praćeno sa α -tokoferolom i zatim γ -tokoferolom, pri čemu je ukupni sadržaj tokoferola u ulju dobijenog iz ove vrste tikve (418 mg/100 g ulja) značajno veći u odnosu na ulje dobijeno iz *C. pepo* L. (80,65 mg/100 g ulja). Međutim, α -tokoferol se preporučuje za upotrebu jer ima najveću biološku aktivnost od svih tokoferola, dok γ -tokoferol ima najizraženiju antioksidativnu aktivnost (Rezig i sar., 2012; Saloua i sar., 2009). S obzirom da se sadržaj tokoferola sa najvećom biološkom aktivnošću može menjati u procesu pripreme ulja, prednost sa ovog aspekta se može dati upotrebi hladno ceđenog tikvinog ulja.

Ulje semena tikve značajan je prirodan izvor **sterola**, pri čemu mogu biti prisutni u ulju kao slobodne komponente i esterifikovane sa masnim kiselinama (Hrabovski i sar., 2012; Murkovic i sar., 2004). Prema duploj vezi u prstenu, fitosteroli se najčešće klasifikuju kao $\Delta 5$ i $\Delta 7$ -steroli. Većina biljaka najčešće sadrži $\Delta 5$ -sterole, dok su $\Delta 7$ -steroli specifični za nekoliko familija, pre svega familije biljaka *Cucurbitaceae* i *Theaceae*, u koje se ubraja i tikva (Nakić i sar., 2006). Upravo ovi steroli su odgovorni za biološku aktivnost ovog ulja, i smatra se da upravo oni iskazuju efekat u profilaksi i lečenju bolesti prostate i poremećaja rada bešike. Pored $\Delta 7$ -sterola, u ulju su nađene i male količine sitosterola, kampesterola, stigmasterola i 2,4-dimetil cikloartanola (Procida i sar., 2013). Hrabovski i sar., 2012 detektovali su prisustvo i odredili sadržaj sledećih sterola u uzorcima ulja tikve golice, *Cucurbita pepo* convar. *citrullina*: desmosterola, kampesterola, stigmasterola, β -sitosterola, spinasterola, $\Delta 7,22,25$ -stigmastatrienola, $\Delta 7$ -stigmastenola, $\Delta 7,25$ -stigmastadienola i $\Delta 7$ -avenasterola. U uzorcima ulja tikve golice utvrđeno je da su najzastupljeniji steroli $\Delta 7$ tipa, i to: $\Delta 7,25$ -stigmastadienol, $\Delta 7$ -stigmastenol, $\Delta 7,22,25$ -stigmastatrienol, $\Delta 7$ -avenasterol i spinasterol. U proseku, sadržaj $\Delta 7$ -sterola u uzorcima ulja dobijenim različitim postupcima je oko 16,5 puta veći od sadržaja $\Delta 5$ -sterola (Nikolovski, 2009). Međusobni odnos $\Delta 7$ -sterola i $\Delta 5$ -sterola u tikvinom ulju zavisi od starosti semena tikve i primenjenog rastvarača za ekstrakciju (Rezig i sar., 2012). Sadržaj različitih sterola se ne menja tokom tehnološkog postupka dobijanja ulja i primene visokih temperatura, ukazujući na stabilnost ovih komponenti tokom prerade u prehrambenoj industriji. Ukupan sadržaj sterola u ulju semena tikve varira u zavisnosti od primenjenog postupka dobijanja ulja i varijeteta semena tikve. Ekstrakcija natkritičnim fluidima pokazala se kao veoma uspešna tehnika za njihovo izolovanje i koncentrisanje (Murkovic i sar., 2004; Procida i sar., 2013). Sadržaj sterola značajno je veći ukoliko se kao polazna sirovina primenjuje seme tikve sa ljuskom, i ukoliko se kao tehnološki postupak pripreme ulja koristi ekstrakcija, a ne presovanje semena, koje se zapravo primenjuje na industrijskom nivou (Nikolovski, 2009).

Skvalen je alifatični triterpenoid koji nastaje kao međuproizvod u sintezi holesterola. Najveći izvor skvalena je ulje ajkuline jetre, mada se u umerenim količinama može naći i u biljnim uljima (maslinovom, palminom ulju, ulju pšeničnih klica i ulju mekinja pirinča). Skvalen je jedna od osnovnih komponenti nezasićenih lipida kože, zbog čega ima pozitivna svojstva kada se primeni u kozmetičkim preparatima kao emolijent i antioksidans, pokazujući izuzetna svojstva za hidrataciju kože i određene antitumorne aktivnosti. Pored toga, skvalen se može primeniti kao nosač lipofilnih aktivnih materija u emulzionim sistemima, pri čemu doprinosi smanjenju veličine kapi, stabilnosti i vremenu zadržavanja aktivnih komponenti

unutar nosača (Chung i sar., 2001; Huang i sar., 2009). Značajna je i primena skvalena u nosačima u obliku lipidnih nanočestica. Lipidne nanočestice mogu se koristiti kao zamena za U/V₂ emulzije, jer zahvaljujući strukturnim karakteristikama čvrstog matriksa, imaju veću fizičku i hemijsku stabilnost, veći kapacitet inkapsulirane materije i bolju kontrolu oslobađanja (Huang i sar., 2009). Postoje literaturni podaci o izraženom delovanju skvalena u inhibiranju hemijski indukovano raka debelog creva, pluća i kože. Stoga, sve veći interes vlada za izolovanje skvalena iz prirodnih izvora („biljni“ skvalen) i nalaženje biljnih izvora koji su bogati ovom komponentom. Nakić i sar. su pokazali da ulje semena tikve poseduje visok nivo skvalena, bez obzira na varijetet sadnice iz koga se ulje dobija. S druge strane, ono što utiče na količinu prisutnog skvalena u ulju je postupak njegovog dobijanja, pri čemu je uočen značajno veći sadržaj skvalena kod ulja dobijenog ekstrakcijom u odnosu na industrijski ceđeno ulje (Nakić i sar., 2006). Visok nivo skvalena detektovan je u ulju tikve golice dobijenom natkritičnom ekstrakcijom, a dobijeni ukupni prinos skvalena ovim postupkom, pri ispitivanim uslovima iznosio je 2 g/kg semena tikve (suva materija) (Nikolovski, 2009).

U ulju semena tikve otkriven je značajan broj **karotenoida** i **vitamina A**. Najznačajniji karotenoidi koji su identifikovani u ulju su lutein (10,6 mg/kg), β -karoten (1,8 mg/kg) i β -kriptoksantin (0,8 mg/kg). Iako je tikva kao biljka značajan izvor vitamina B, njihova koncentracija u semenu i u uljima semena tikve, nalazi se na niskom nivou (Fruhworth i Hermetter, 2008). Karotenoidi se često koriste u prehrambenoj industriji kao sredstva koja se dodaju hrani za poboljšanje boje, pored toga što je dokazano da imaju izraženo antioksidativno dejstvo. Sa biološkog aspekta, unos proizvoda koji su bogati karotenoidima vezuje se za smanjenje rizika od nastajanja raka, usporavanje degeneracije makule (žute mrlje u oku), katarakte, oštećenja kože usled opekotina od sunca i kardiovaskularnih bolesti (Aust i sar., 2001, Nikolovski, 2009).

Pored navedenih pigmenata i nutrijenata koji su prisutni u ulju, u semenu tikve nalazi se dosta **lignana**, pri čemu je najznačajniji sekoizolaricirezinol koji poseduje izvesnu estrogenu aktivnost (Nikolovski, 2009).

Različiti tipovi minerala (Na, K, Mg, Ca i P) takođe su izolovani iz ulja semena tikve, pri čemu njihove koncentracije zavise od uslova gajenja i varijeteta sorte. Selen, koji je od izuzetnog fiziološkog značaja, identifikovan je u semenu tikve. Međutim, s obzirom da se u najvećoj meri javlja u obliku *L*-selenometionina, ne može se naći u ulju. Nasuprot njemu, jod kao element nakon postupka presovanja i ceđenja ulja, može se naći u manjoj količini i u ulju (oko 2-3 mg/kg ulja).

Fosfolipidi prisutni u semenu tikve su najčešće u obliku fosfatidilholina, fosfatidilserina i fosfatidiletanolamina. Fosfolipidi se smatraju potpuno prirodnim jedinjenjima, čija je upotreba široko rasprostranjena u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, prvenstveno kao nosača aktivne komponente i emulgujućih sredstava. Značaj fosfolipida i njihova biološka aktivnost se ogleda u njihovoj sposobnosti da se ugrade u oštećenu ćelijsku membranu, koji može imati značajnu primenu prilikom prekomerne upotrebe lekova u lečenju različitih bolesti, kao i različitih infektivnih stanja kao što je hepatitis. Jedan oblik formiranja nosača aktivnih materija su i strukture fosfolipida organizovane u liposome, koji se koriste kao nosači lekova slabo rastvorljivih u vodi, i smanjuju ispoljavanje štetnih efekata

leka. U prehrambenoj industriji, fosfolipidi se prvenstveno koriste kao emulgatori, odnosno kao stabilizatori mešavine čokolade i margarina u slatkišima (Raharjo i sar., 2011). Najveći izvor fosfolipida su zapravo određena biljna ulja, u koje se može ubrojati i ulje semena tikve, u kojima sadržaj fosfolipida može značajno da varira (0,5-1,04%) u zavisnosti od varijeteta tikve (Fruhvirth i Hermetter, 2007, 2008).

Održivost ulja je veoma bitna karakteristika, jer je na taj način moguće definisati njegov rok upotrebe. Održivost ulja se najčešće sagledava preko oksidativne stabilnosti ulja. Ulje semena tikve ima veoma dobru održivost, i može se svrstati u jedno od najstabilnijih ulja na našem tržištu (Nikolovski, 2009). Oksidativna stabilnost tikvinog ulja prvenstveno uslovljeno odnosom linolne i oleinske kiseline. Ukoliko je sadržaj linolne kiseline manji, a oleinske veći, stabilnost ulja je veća, što je posledica različite brzine oksidacije ove dve kiseline. Vitamin E kao prirodno antioksidativno sredstvo prisutno u ulju, nema uticaja na oksidativnu stabilnost ulja semena tikve. Pored toga, u ulju tikve su prisutne i druge pro-oksidativne (protohlorofil i protofeoptin) i antioksidativne (polifenoli) komponente, kao i komponente koje mogu da ispolje i pro-oksidativna i antioksidativna svojstva (α -tokoferol), čiji uticaj na stabilnost još uvek nije u potpunosti razjašnjen (Murkovic i Pfannhauser, 2000).

Tradicionalna tehnologija pripreme tikvinog ulja podrazumeva prvenstveno termičku obradu (prženje) ogoljenih semena tikve, nakon čega sledi postupak ceđenja na hidrauličkim presama. Neposredno pre prženja osušenom semenu se dodaje voda i so, kako bi se formirala meka pulpa, koja se nakon toga prži na 100-130 °C do 60 minuta, što dovodi do koagulacije proteina i omogućava odvajanje ulja pod pritiskom. Pored toga, prženjem se obezbeđuje i specifična aroma dobijenog ulja. Ceđenje ulja se odvija na pritisku od 300 do 600 bar. Tehnološki postupak pripreme hladno ceđenog ulja semena tikve podrazumeva pranje i sušenje semena do sadržaja vode od 7%. Pre obrade, seme prolazi magnetno čišćenje i potpuno uklanjanje organskih nečistoća. Direktnim pritiskom na osušeno seme u kontinualnim presama, dolazi do cepanja biljnog materijala i izdvajanja ulja, koje se zatim filtrira i skladišti u tamnim bocama. Postupkom hladnog ceđenja ne dolazi do zagrevanja sirovine i nastalih proizvoda, pri čemu izlazna temperatura ulja ne prelazi 50 °C, ulje zadržava prirodni ukus i sastav svih komponenti prisutnih u semenu (Vujasinovic i sar., 2010). U laboratorijskom naučno-istraživačkom radu sve češća je primena ekstrakcionih tehnika primenom različitih rastvarača, u postupcima dobijanja biljnih ulja. Jedna od perspektivnih tehnika za dobijanje ulja jeste i ekstrakcija natkritičnim fluidima, koja se intenzivno razvija poslednjih godina. Ova metoda predstavlja odličnu alternativu klasičnim ekstrakcionim tehnikama, jer mnoge komponente semena uljarica (tokoferoli i karotenoidi) su osetljive na toplotu i prisustvo kiseonika. Takođe, ostatak nakon ekstrakcije natkritičnim fluidima bogat je proteinima i nutrijentima, koji nisu uništeni u procesu, jer nisu bili izloženi visokoj temperaturi, i nisu onečišćeni organskim rastvaračem, što je još jedna potencijalna prednost primene ove tehnike (Nikolovski, 2009).

2.5.2. Beli luk (*Allium sativum* L.)

Još od drevnih vremena poznato je korišćenje belog (*Allium sativum* L.) i crnog luka (*Allium cepa* L.) kao uobičajenih dodataka hrani, kako radi poboljšanja njenog ukusa, tako i zbog njihovog pozitivnog dejstva u lečenju mnogih bolesti. Prvi crteži i naznake o njihovoj primeni datiraju još iz 3700. godine pre nove ere, koji su pronađeni u grobnicama faraona i egipatskim svetim hramovima. Prvi zapisi o njihovoj upotrebi kao leka datiraju iz 1550. godine pre nove ere, gde su na egipatskom medicinskom papirusu pronađene terapijske formulacije koje ih navode kao lekove za različite vrste bolesti, kao što su srčani problemi, glavobolja, ujedi i tumori (Borek, 2001). Naime, postojalo je verovanje da ova namirnica može da potpomogne astmatičarima i ljudima sa plućnim smetnjama. Kasnije su ove biljke korišćene u velikoj meri od strane grka i rimljana usled verovanja da poseduju isceljujuća svojstva, kao što se i dan danas koriste u mnogim mediteranskim zemljama (Amagase i sar., 2001).

Allium vrste su bogat izvor fitonutrijenata, materija koje mogu biti od koristi u lečenju ili prevenciji mnogih bolesti, uključujući rak, koronarne bolesti srca, gojaznost, hiperholesterolemiju, dijabetes tipa 2, povišen krvni pritisak, kataraktu i poremećaj rada gastrointestinalnog trakta (nadutost, kolike i dispepsija). *Allium* je najveći i najznačajniji predstavnik familije *Alliaceae* i obuhvata 450 vrsta. Pored belog i crnog luka, još nekoliko vrsta ove familije se uzgaja s ciljem njihove upotrebe u kulinarstvu, kao što su praziluk (*Allium porrum* L.), vlašac (*Allium ascalonicum* Hort.), divlji beli luk (*Allium ursinum* L.), vlasac (*Allium schoenoprasum* L.), kao i mnoge druge na našim prostorima manje poznate vrste (Lanzotti, 2006).

Rastući interes naučne zajednice za komponentama koje nemaju direktan terapijski efekat, ali koje doprinose opštem stanju zdravlja ljudi, usmerio je fokus istraživanja na organske komponente dobijene iz prirodnih biljnih izvora. Takve komponente su nazvane „nutraceutici“ ili „fitohemikalije“, i ubrajaju se u neesencijalne mikronutrijente, koji imaju značajnu ulogu u očuvanju zdravlja. Jedna od biljaka koja sadrži takve komponente je i beli luk, što je usmerilo veliki broj istraživanja na ponovno izučavanje ove biljke.

Naučno-istraživački rad na ovim vrstama počeo je još u drugoj polovini XIX veka radom Luja Pastera koji je prvi 1858. zabeležio antibakterijska svojstva belog luka. Kasnije je Albert Švajcer koristio beli luk za lečenje amebne dizenterije koja se pojavila u Africi, kao i za lečenje nekoliko vrsta epidemija koje su se pojavile (tifusa, kolere, difterije i tuberkuloze). U poslednje vreme, istraživanja su usmerena na antikancerogena svojstva belog luka, gde su istraživanja u Kini pokazala da postoji povezanost između smanjenja rizika nastajanja raka i povećanog unosa belog luka u organizam. Ovi dokazi su povezani sa sposobnošću belog luka da redukuje koncentraciju nitrata u želudačnom traktu (Lanzotti, 2006).

Biološki efekti belog luka i preparata belog luka privukli su posebnu pažnju u modernoj medicini, usled sveobuhvatnog verovanja da potpomažu održavanju opšteg zdravlja, suzbijanju bolesti i doprinose povećanju energije. Povoljni klinički i biološki efekti preparata belog luka se povezuju sa smanjenjem faktora rizika za nastajanje kardiovaskularnih bolesti (smanjenje agregacije trombocita, visokog krvnog pritiska i prevencija ateroskleroze) i raka (digestivnog trakta i prostate), stimulacijom imunih funkcija,

poboljšanoj detoksikacijom, prevencijom hepatitisa (oštećenja jetre), antioksidativnim svojstvima, kao i antimikrobnim, antiparazitnim i antivirusnim delovanjem (Banerjee i Maulik, 2002; Hussein i sar., 2017).

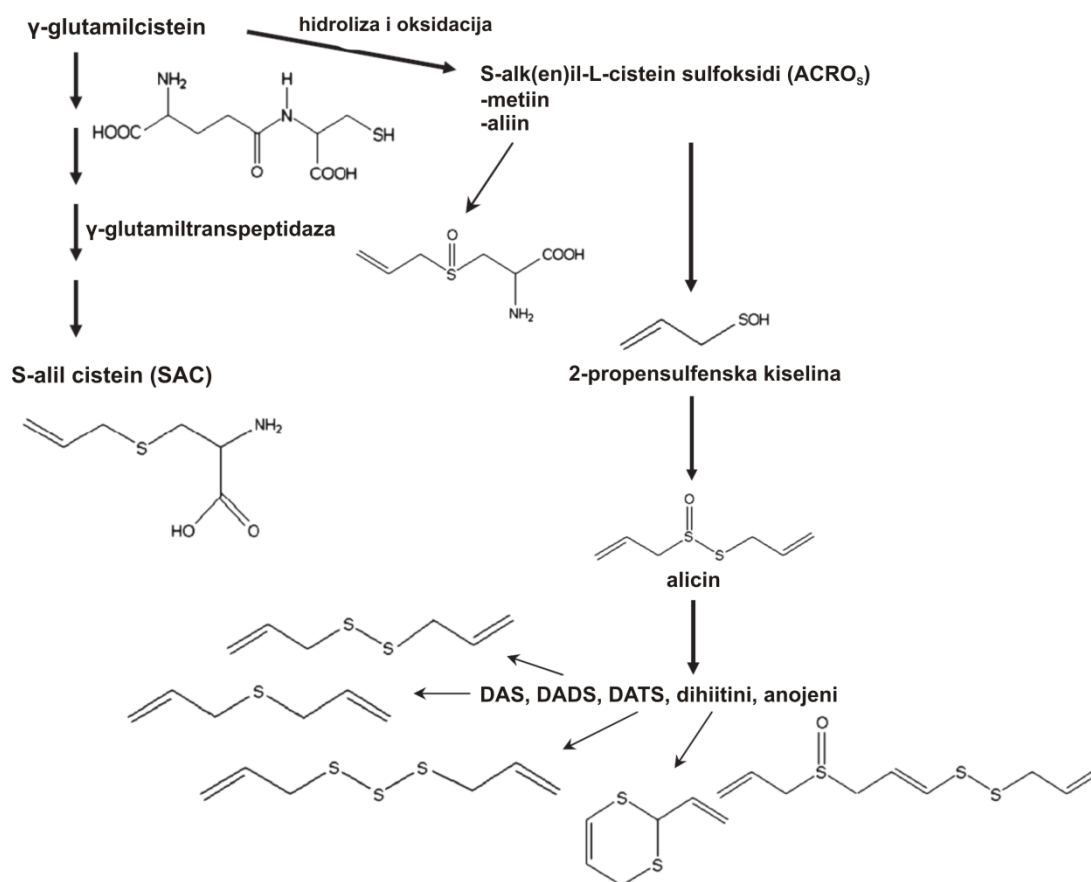
2.5.2.1. Isparljive komponente belog luka

Mnogi biološki efekti belog luka su povezani sa tiosulfonatima, isparljivim jedinjenjima sumpora (Ramirez i sar., 2017) koji su karakteristični za *Allium* vrste, koji su zapravo odgovorni za karakterističan oštar miris i ukus belog luka. Tiosulfonati se ubrajaju u grupu izuzetno reaktivnih i termički nestabilnih jedinjenja, koji se uključuju u spontane hemijske reakcije koje je praktično nemoguće kontrolisati, i mogu dovesti i do transformacije proizvoda (Lanzotti, 2006). Ukupna koncentracija tiosulfonata u belom luku tokom vremena je približno konstantna, ali individualna sumporna jedinjenja su sklona konverziji iz jednog oblika u drugi, što izuzetno komplikuje njihovo kvantitativno određivanje (Block i sar., 1992).

Cistein je početni metabolit za sintezu sumpornih jedinjenja u lukovima. Iz njega se metaboličkim reakcijama sintetišu metionin, proteini, glutation, ali i neproteinogeni derivati, kao što su γ -glutamil peptidi, *S*-supstituisani cisteini i *S*-alk(en)il-*L*-cistein sulfoksidi (ACSOs). Pored γ -glutamil-peptida i ACSOs, ćelije belog luka i drugih srodnih vrsta, sadrže i druga u vodi rastvorna neisparljiva sumporna jedinjenja na koje ne deluje enzim aliinaza, kao što su *S*-substituisani cisteini i cikloaliin (Amagase, 2006; Simin, 2014).

Primarni perkursori tiosulfonata u belom luku su *S*-alk(en)il-*L*-cistein sulfoksidi i γ -glutamilcistein čija je glavna uloga, pored toga što predstavlja važan izvor peptida, biosinteza intermedijernih jedinjenja za odgovarajuće isparljive komponente (ACSOs), odnosno liposolubilne sumporne komponente, kao što su dialil sulfid (DAS) i dialil disulfid (DADS). S druge strane, enzimskom transformacijom γ -glutamilcisteina ekstrakcijom u vodenom rastvoru nastaje *S*-alil cistein (SAC), koji se smatra jednom od aktivnih komponenti belog luka odgovornom za veliki deo pozitivnih uticaja na zdravlje. Kao što je šematski prikazano na slici 2.16, *S*-alk(en)il-*L*-cistein sulfoksidi se javljaju u dva oblika, i to kao: metiin (*S*-metil-*L*-cistein sulfoksid) i aliin (*S*-alil-*L*-cistein sulfoksid). Pored navedena dva, u vrstama roda *Allium* do sada su identifikovana još dva dominantna ACSOs: propiin i izoaliin, i dva ACSOs koja se ređe javljaju: etiin i butiin. Aliin se nalazi prisutan u najvećoj meri i odgovoran je za većinu mirisnih jedinjenja koja se oslobađaju iz belog luka. Narušavanjem ćelijske strukture belog luka (sečenje, gnječenje, žvakanje ili dehidratacija), iz vakuola se oslobađa enzim aliinaza, koja enzimski katalizovanim reakcijama veoma brzo dovodi do liziranja cistein sulfoksida (SCs), proizvodeći sulfensku kiselinu (Corzo-Martínez i sar., 2007). S obzirom da je sulfenska kiselina izuzetno reaktivan intermedijer, skoro trenutno prelazi u tiosulfonate reakcijom kondenzacije (Lanzotti, 2006). Naime, iz sulfenske kiseline prvo nastaje 2-propensulfenska kiselina, koja auto-kondenzacijom daje tiosulfonate, od kojih je najzastupljenije jedinjenje alicin. Alicin je veoma isparljivo i veoma nestabilno jedinjenje, koje često nestaje tokom prerade i veoma brzo i lako se transformiše u druge organosumporne komponente. U zavisnosti od vrste luka i eksperimentalnih uslova (pH, temperatura, način pripreme uzorka, vreme skladištenja) iz alicina mogu nastati različita, uglavnom isparljiva, sumporna jedinjenja kao što su DAS, DADS, dialil trisulfid (DATS),

metilalil disulfid, metilalil trisulfid, 2-vinil-4H-1,3-ditiin, 3-vinil-4H-1,2-ditiin i (E,Z)-ajoeni (Amagase, 2006; Ramirez i sar., 2017; Simin, 2014).



Slika 2.16. Biosinteza organosumpornih jedinjenja iz belog luka (Corzo-Martínez i sar., 2007)

Dokaz veoma velike nestabilnosti alicina je i činjenica da nakon 20h na temperaturi od 20 °C on se potpuno prevodi u DADS (66%), DAS (14%), DATS (9%) i sumpor-dioksid. Alicin veoma lako reaguje sa aminokiselinama i proteinima, formirajući sulfhidrilne grupe. Zahvaljujući toj činjenici tokom konzumacije on se vezuje za proteine i aminokiseline u ćelijskim membranama, čime biva zarobljen onemogućavajući njegovu absorpciju i prelazak u krvotok. Iz tog razloga, istraživanja su dokazala da nakon konzumacije belog luka, pa čak i čistog alicina, nivo alicina u krvotoku jednak je nuli.

Optimum za delovanje aliinaze kao ključnog enzima koji olakšava transformaciju cistein sulfoksida u tiosulfonate je pH = 6,5 i temperatura 36-48 °C. Aktivnost aliinaze zavisi od pH vrednosti, dok tiosulfonati se neće formirati ispod vrednosti pH od 3,6. S obzirom da je pH vrednost u stomaku najčešće ispod ove vrednosti, delovanje aliinaze je najčešće kompletno i nepovratno inhibirano u kiselim uslovima, tako da ne postoji mogućnost nastajanja alicina u želudačnom traktu. S druge strane, bez obzira na mogućnost oslobađanja alicina u vodenom rastvoru, ne postoje preparati belog luka kod kojih je identifikovan alicin kao komponenta, jer on zapravo predstavlja intermedijer za dobijanje drugih jedinjenja koje mogu ispoljiti aktivnost. Iz svega navedenog, sledi da se alicin sam po sebi ne može smatrati

aktivnom komponentom, jer nije odgovoran za bilo kakav pozitivan biloški efekat u ljudskom telu (Amagase, 2006).

Jedna od glavnih aktivnih komponenti belog luka i preparata belog luka je SAC, sa izuzetno izraženim farmakološkim efektima, koji pokazuje 30 puta manju toksičnost u odnosu na alicin i DADS. Kao u vodi rastvorna komponenta, čija se koncentracija u preparatima povećava sa vremenom ekstrakcije, predstavlja aktivnu komponentu belog luka koja pokazuje izuzetnu bioraspoloživost nakon konzumacije i može ispoljiti svoju aktivnost (Amagase i sar., 2001).

2.5.2.2. Neisparljive komponente belog luka

Pored isparljivih jedinjenja, neisparljive komponente belog luka koje mogu da imaju potencijalnu biološku aktivnost i predmet su istraživanja poslednjih decenija uključuju dokazivanje prisustva i aktivnosti makronutrijenata, kao što su lektin (najzastupljeniji protein u belom i crnom luku), prostaglandin, fruktan, pektin, adenzin, vitamin B₁, B₂, B₆, C i E, biotin, masne kiseline, nikotinska kiselina, glikolipidi, fosfolipidi i esencijalne aminokiseline. Pored makronutrijenata, pozitivni biološki efekti se mogu pripisati i prisustvu polarnih jedinjenja koja se mogu naći u belom luku (sapogenini, saponini i flavonoidi), koji su značajno stabilniji prilikom obrade (kuvanja) i čuvanja od tiosulfonata (Lanzotti, 2006).

Steroidni saponini i sapogenini su grupa jedinjenja koja poseduje antifungalnu, antibakterijsku, antiinflamatornu i antikoagulantnu aktivnost, kao i uticaj na smanjenje holesterola (Amagase i Milner, 1993; Corzo-Martínez i sar., 2007). Saponini su velika grupa sekundarnih biomolekula, široko rasprostranjenjih u belom luku i drugim zelenim biljkama. Ubrajaju se u površinski aktivne materije, i u vodenim rastvorima obilno pene (Simin, 2014). Poseduju hemolitičku aktivnost, i odgovorni su za gorak ukus koji se može javiti usled njihovog prisustva. U nekoliko studija dokazano je da saponini izolovani iz belog luka mogu, pored antifungalne, antikoagulantne aktivnosti i uticaja na snižavanje holesterola, da ispolje i antikancerogeno, citotoksično delovanje, kao i da deluju antispazmolitički (sprečavanje nastajanja grčeva) (Amagase, 2006).

Saponini se uglavnom nalaze u obliku glikozida, a mogu se podeliti u dve grupe prema prirodni aglikonskog skeleta (sapogenina): steroidne i triterpenske saponine (Amagase i Milner, 1993; Simin, 2014). Prvi izolovani sapogenini iz belog i crnog luka i praziluka su sitosterol (Smoczkiwicz i sar., 1982), gitogenin, oleanolna kiselina i amirin, neposredno nakon čega je utvrđeno i prisustvo sapogenina diosgenina i β -hlorogenina. β -hlorogenin, pored organosumpornih jedinjenja, može biti razmatran kao jedan od aktivnih komponenti belog luka, jer je dokazano da inhibira agregaciju trombocita u krvi (Amagase i Milner, 1993). Kada se posmatra samo beli luk, prvi furostanol saponin koji je izolovan iz lukovice bio je proto-erubozid B i njegov spirostanolni analog erubozid B, a nešto kasnije i njihovi epimeri proto-izo-erubozid B i izo-erubozid B. Erubosid B pokazuje antifungalnu aktivnost za *Candida albicans*, citotoksične i antitumorne efekte. Nasuprot njemu, proto-erubosid B nije pokazao nikakvu biološku aktivnost. Kasnija istraživanja dovela su do izolovanja još tri tipa furostanol saponina, nazvanih sativozid B₁, R₁ i R₂, iz belog luka. Uticaj na efekat snižavanja ukupnog nivoa holesterola i LDL holesterola u krvi, bez uticaja na nivo HDL

holesterola, verovatno je posledica sinergističkog delovanja svih saponina, i to verovatno spirostanol saponina koji nastaju konverzijom furostanol saponina pomoću β -glukozidaze (Amagase i Milner, 1993; Lanzotti, 2006).

Pored saponina i sapogenina, od velikog značaja je prisustvo aliksina i **organoselenovih jedinjenja**, za koje je dokazano da ispoljavaju razne biološke efekte, kao što je redukcija holesterola, prevencija nastajanja raka i verovatno su ovi efekti posledica zajedničkog delovanja sa organosumpornim jedinjenjima. Beli luk poseduje izrazitu sposobnost da apsorbuje i akumulira selen iz zemljišta u obliku selenita (Se(IV) ili Se(VI) jedinjenja) u koncentraciji većoj od 1000 ppm, zahvaljujući činjenjici da u metabolizmu biljke Se može lako da zameni sumpor, i tako ugradi u različita jedinjenja umesto sumpora. U lukovici belog i crnog luka identifikovani su mnogi analozi *S*-alk(en)il-cisteina i γ -glutamil-alk(en)il-cistein peptida, od kojih su najzastupljeniji γ -glutamil-*Se*-metil selenocistein, selenometionin i *Se*-metil selenocistein, kao dominantno jedinjenje sa najvećom aktivnošću. Istraživanja na ovu temu imaju rastući interes usled dokazanog izrazitog antikancerogenog svojstva ovih jedinjenja (Block i sar., 2001; Simin, 2014; Whanger, 2004). Selen je esencijalni mikroelement za čoveka jer je neophodan za funkcionisanje nekih enzima (prvenstveno enzima antioksidativne zaštite) i ulazi u sastav aminokiselina, te njegov nedostatak u ishrani dovodi do pojave bolesti povezanih sa slabošću mišića i srčanih smetnji. Prisustvo organoselenovih jedinjenja u lukovima značajno doprinosi njihovoj nutritivnoj vrednosti, jer organski vezan Se ima daleko veću biološku raspoloživost i veoma često manju toksičnost od neorganskih formi selena. Pored izražene aktivnosti u lečenju i prevenciji nastanka tumora, dokazana je i antiinfektivna, antivirusna, antibakterijska, antimikotična, antiinflamatorna i antioksidativna aktivnost jedinjenja selena. Međutim, njeno identifikacija u obliku organoselenovih jedinjenja u biološkim uzorcima nije jednostavna, prvenstveno zbog nedostatka komercijalnih standarda (Block i sar., 2001; Nurajii i sar., 2007; Simin, 2014; Whanger, 2004).

Fenolna jedinjenja predstavljaju drugu značajnu klasu sekundarnih biomolekula crnog i belog luka, koje karakteriše prisustvo jednog ili više aromatičnih prstenova, sa jednom ili više hidroksilnih grupa. U vrstama roda *Allium* od biljnih fenola najzastupljeniji su favonoidi, pri čemu najzastupljenija grupa su flavonoli, zatim antocijani, a u nekim vrstama prisutni su i flavoni (Simin, 2014). Iako beli luk kao biljna sirovina predstavlja veoma siromašan izvor flavonoida u odnosu na ukupan sadržaj flavonoida u crnom luku, dominiraju slobodni flavonski aglikoni: miricetin (639 mg/kg) i apigenin (217 mg/kg), a detektovana je i manja količina kvercetin (47 mg/kg) (Miean i Mohamed, 2001), rutina (kvercetin 3-rutinozida) i diosmetina (luteolin 4'-metiletara) (Simin, 2014) i veoma mala količina kemferola. Ukupni sadržaj fenolnih kiselina pronađen u belom luku je 2,20 mg/100g materijala (Gorinstein i sar., 2008).

Flavonoidi prisutni u biljkama poseduju širok spektar aktivnosti, pri čemu su mnoga istraživanja pokazala da ishrana bogata fenolima smanjuje rizik od određenih bolesti. Uloga biljnih fenola u prevenciji bolesti prvobitno je pripisivana njihovoj izraženoj antioksidativnoj aktivnosti (Heim i sar., 2002). Prevencija bolesti u čijoj patofiziologiji se nalazi oksidativni stres, uključuje: kardiovaskularne bolesti, reumatoidni artritis, aterosklerozu, multiplu sklerozu, neurodegenerativne bolesti (Alchajmerova i Parkinsonova bolest), prerano starenje i

kancerogene bolesti (Ren i sar., 2003; Simin, 2014). Pored antioksidativne aktivnosti, dokazano je da određena fenolna jedinjenja ispoljavaju antimikrobnu (Cushnie i Lamb, 2005), antivirusnu, antiinflamatornu, antimutagenu, antialergijsku aktivnost i sposobnost inhibiranja nekih enzima (Cook i Samman, 1996). Iako se fenoli smatraju netoksičnim, neki flavonoidi mogu imati mutageno delovanje, ali samo pri izuzetno visokim koncentracijama (Karakaya, 2004; Simin, 2014).

Aliksin (3-hidroksi-5-metioksi-6-metil-2-pentil-4H-piran-4-on), tzv. *phytoalexins* (eng. *phyto*-biljka, *alexins*-za odbranu) je fenolno jedinjenje izolovano iz belog luka sa strukturom γ -pirona. Nastaje kao autoimuni odgovor biljke na izloženi stres, jer je njihova sinteza izazvana izlaganjem biljke određenim vrstama stresa, kao što je kontakt sa bakterijama, virusima, gljivicama, UV zracima ili solima teških metala (Moriguchi i sar., 1997; Yamasaki i sar., 1991). Kao rezultat tokom vremena aliksin može formirati vidljive kristale na površini belog luka, naročito na mestima gde je tkivo nekrotično. Nakon 2 godine, količina akumuliranog aliksina na tkivu belog luka dostiže vrednost i do 1% (Kodera i sar., 2002a), ali mu je rastvorljivost u vodi veoma niska. Aliksin poseduje jedinstvene biološke karakteristike kao što su antioksidativna, antimikrobna i antitumorna svojstva, pokazuje neurotrofične efekte (indukuju opstanak, razvoj i funkciju neurona) i poseduje sposobnost vezivanja slobodnih radikala (Arimoto i sar., 1997; Kodera i sar., 2002b), ali pri većim koncentracijama može biti i citotoksičan.

2.5.2.3. Preparati belog luka

Dijetetski suplementi na bazi belog luka, ubrajaju se u kategoriju dodataka hrani koji imaju daleko najkomercijalniju primenu u odnosu na ostale suplemente koji se mogu naći na tržištu. Iako su preparati na bazi belog luka komercijalno dostupni, hemijski sastav belog luka je izuzetno kompleksan, čija kompleksnost značajno utiče na konačni sastav proizvoda, koji u mnogome zavisi i od metoda pripreme preparata. Komercijalni preparati belog luka se mogu svrstati u četiri osnovne kategorije: etarsko ulje belog luka, macerat belog luka, beli luk u prahu i ekstrakt belog luka.

Etarsko ulje belog luka dobija se destilacijom vodenom parom, pri čemu u hemijskom sastavu dominiraju različiti sulfidi, najčešće DADS kao glavna komponenta (Harris i sar., 2001) i dialil trisulfid. S obzirom da je glavni proizvod uljana frakcija belog luka, komponente belog luka koje su rastvorne u vodi potpuno su eliminisane iz proizvoda ovim procesom pripreme. Samim tim, u etarskom ulju belog luka ne nalazi se alicin. Komercijalno dostupni preparati na bazi etarskog ulja belog luka, podrazumevaju kapsule koje sadrže 99% odgovarajućeg biljnog ulja i samo 1% etarskog ulja belog luka, usled njegovog izuzetno ljutog ukusa (Amagase i sar., 2001). Etarsko ulje belog luka poseduje širok spektar antimikrobnih aktivnosti i da se kao takav može primenjivati kao prirodni antimikrobni začin u raznim prehrambenim proizvodima (Benkeblia, 2004; El-Sayed i sar., 2017).

Uljni macerat belog luka primarno se koristi kao začin, i priprema se u cilju zaštite i inkapsulacije komponenti belog luka koje se oslobađaju razaranjem njegove ćelijske strukture unutar biljnog ulja. Međutim, usled izuzetno velike nestabilnosti oslobođenog alicina u toku

pripreme macerata, finalni macerat sadrži komponente nastale degradacijom alicina kao što su dihiitin, ajoen, sulfide i zaostale količine aliina (Amagase i sar., 2001).

Beli luk u prahu nastaje mlevenjem, sušenjem i raspršivanjem belog luka do sitnih čestica. Masovno se proizvodi kao sredstvo za poboljšanje ukusa u prehrambenoj industriji. U pogledu hemijskog sastava smatra se da prah sadrži identične komponente kao i sirov beli luk, samo se količine prisutnih sastojaka značajno razlikuju. Na primer, u procesu dehidratacije tokom pripreme praha, izgubi se više od polovine aliina kao osnovne organosumporne komponente u sirovom belom luku. Kao što je već ranije naglašeno, sečenjem i gnječenjem sirovog belog luka može se osloboditi relativno velika količina alicina. Međutim, iako je često na preparatima na bazi praha belog luka u komercijalne svrhe istaknuto postojanje alicina, analizom ovih proizvoda nije utvrđeno njegovo prisustvo kao sastojka samog preparata. Čak i u slučaju pretpostavke da u prahu postoje određene merljive količine alicina ili komponenti iz kojih može pod određenim uslovima nastati alicin, on ne može ispoljiti svoju aktivnost usled inaktivacije enzima aliinaze u želudačnom traktu. Postoje literaturni podaci koji ukazuju da beli luk u praškastom obliku, ne ispoljava nikakav uticaj na smanjenje nivoa holesterola u krvi, za razliku od sirovog belog luka (Amagase i sar., 2001).

Ekstrakti belog luka su dobijeni potapanjem celih čenova ili isečenog belog luka u odgovarajući ekstrakcioni medijum određeni vremenski period, nakon čeka se vrši separacija (centrifugiranje i filtracija) dobijenog ekstrakta, po potrebi njegovo koncentrisanje i upotreba. Koncentrisanje se može vršiti do dobijanja praškastog oblika (Amagase i sar., 2001).

Opšte je poznata činjenica da proces ekstrakcije doprinosi jačini i bioraspoloživosti aktivnih komponenti iz biljaka, i eliminiše neželjene i toksične efekte biljnog materijala koji se podvrgava procesu. Iritirajuća, kisela i nestabilna oksidaciona jedinjenja u sirovom belom luku (alicin) mogu biti eliminisani i modifikovani ekstrakcijom sa alkoholom, vinom, mlekom ili sirćetom, pre njegove upotrebe kao terapijskog sredstva (Amagase, 2006). Iako se beli luk koristi kao popularan dodatak jelima za poboljšanje njihovog mirisa i ukusa, kao i tradicionalno u medicinske svrhe, prekomerna potrošnja belog luka može dovesti do određenih zdravstvenih tegoba. Pored neprijatnog mirisa belog luka, koji može zaostati u dahu dugo nakon konzumacije i koži nakon manipulacije, može doći i do alergijskih reakcija izazvanih ovom biljkom. Štetni efekti koji su povezani sa konzumiranjem belog luka (sirovog ili u prahu) uključuju poremećaje rada creva i dijareju, smanjenje ukupnih proteina u krvi i kalcijuma, anemiju, bronhijalnu astmu, kontaktni dermatitis i inhibiciju spermatogeneze (Hussein i sar., 2017). Pored toga, u ulju rastvorna organosumporna jedinjenja poznata su po svom iritirajućem i alergijskom efektu, sa izraženijim toksičnim efektom u odnosu na jedinjenja belog luka rastvorna u vodi, čija se toksičnost smanjuje sa povećanjem vremena ekstrakcije. DAS i alicin su komponente belog luka koje najčešće dovode do iritacija i alergijskih reakcija (Amagase i sar., 2001).

Varijacije sastava dobijenog ekstrakta belog luka, u velikoj meri zavise od primenjenog medijuma za ekstrakciju, u čije svrhe se mogu primenjivati prečišćena voda, etil alkohol (Papageorgiou i sar., 1983) ili aceton (Irkin i Korukluoglu, 2007), kao i od vremena trajanja ekstrakcije. Prirodni biljni ekstrakti mogu da budu odlična alternativa za veštačke konzervanse, jer pokazuju snažnu antifungalnu i antibakterijsku aktivnost, pored izraženih

antioksidativnih svojstava, što može biti od velikog značaja za očuvanje životnog veka namirnica (Irkin i Korukluoglu, 2007).

Etanolni ekstrakt belog luka pokazuje najizraženija antimikrobna svojstva u odnosu na druge oblike ekstrakata (Harris i sar., 2001). Pored toga, etanolni ekstrakt belog luka se u nekim kulturama tradicionalno koristi kao prirodni lek za grip i prehladu, kao i za podizanje imuniteta pacijenata. Eidi i sar. (2006) su ustanovili izražen uticaj etanolnog ekstrakta belog luka na lečenje dijabetesa. Naime, oralna primena ekstrakta dovela je do smanjenja glukoze u krvi, ukupnog holesterola, triglicerida, uree, mokraćne kiseline, kreatinina i do porasta serumskog insulina kod pacova sa dijabetesom, ali ne i kod zdravih pacova. Terapijski efekat etanolnog ekstrakta belog luka na bolesne pacove bio je izraženiji od odgovarajućeg leka koji se koristi u terapiji dijabetesa (Eidi i sar., 2006).

Međutim, najzastupljeniji oblik ekstrakta belog luka koji se može naći na tržištu je ekstrakt dobijen dugotrajnom ekstrakcijom sa vodom u trajanju i do 20 meseci, tzv. AGE (eng. „*Aged garlic extract*“). Tokom procesa „starenja“ ekstrakta, komponente koje imaju oštar i iritantan miris se prevode u stabilna jedinjenja sumpora. Ovako dobijen ekstrakt u svom sastavu sadrži antioksidativne fitohemikalije, kao što su u vodi rastvorna organosumporna jedinjenja, mnoštvo liposolubilnih organosumpornih komponenti (u manjim količinama) i flavonoide, naročito aliksin i selen. Dugoročnom ekstrakcijom belog luka dolazi do stvaranja komponenti konverzijom nestabilnih molekula, kao što su alicin, u stabilna i bioraspoloživa u vodi rastvorna organosumporna jedinjenja, kao što je (SAC) i S-alil merkaptocisteine (SAMC) (Borek, 2001). Za razliku od ostalih preparata belog luka, bezbednost AGE vodenog ekstrakta je potvrđena mnogim toksikološkim analizama (Amagase i sar., 2001).

Biološki i farmakološki značaj AGE ekstrakta predmet je mnogih istraživanja, jer je dokazano da kao suplement ima niz pozitivnih svojstava. Najznačajnija je svakako njegova antioksidativna aktivnost, koja ukazuje na delotvornost AGE u zaštiti oštećenja ćelija usled starenja, zračenja i hemijskog izlaganja, kao i dugoročnog toksičnog oštećenja ćelija. AGE ispoljava svoje delovanje tako što štiti endotelijalne ćelije od oštećenja od strane oksidisanih molekula (što može doprineti aterosklerozi), štiti DNK od oštećenja slobodnim radikalima, mutacije, jonizujućeg zračenja i oštećenja uzrokovanih UV zracima, štiti od gubitka funkcije mozga tokom starenja čoveka, preko njegove sposobnosti da poboljša kognitivne funkcije i pamćenje i pokazuje umerenu aktivnost u procesu snižavanja holesterola u krvi i krvnog pritiska (Rahman i Billington, 2000; Steiner i Li, 2001). Njegova konzumacija smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti, moždanog udara i raka, uključujući oksidativno indukovana oštećenja moždanih ćelija, koja su uzročnici nastajanja Alchajmerove bolesti (Borek, 2001).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo u okviru ove doktorske disertacije podeljen je u pet delova. Istraživanja u prvom delu su bila usmerena ka definisanju najpovoljnijeg sastava primarne V_1/U emulzije, i mogućnosti inkapsulacije tikvinog ulja kao aktivne komponente unutar emulzionog sistema, uz primenu višekriterijumske optimizacije za definisanje optimalne formulacije. Tikvino ulje je izabrano kao komponenta uljane faze u cilju poboljšanja nutritivnih svojstava emulzija kao nosača aktivnih materija. Drugi deo podrazumeva pripremu ekstrakata belog luka i ispitivanje mogućnosti njihove inkapsulacije kao primarne aktivne komponente u V_1/U emulzije. Na osnovu jasnih navoda pozitivnog uticaja primene belog luka u svakodnevnoj ishrani, definisanih u teorijskom delu, u okviru ove doktorske disertacije beli luk je izabran kao materijal čijom se ekstrakcijom doprinosi jačini i bioraspoloživosti aktivnih komponenti, a inkapsulacija u emulzione sisteme daje mogućnost zaštite aktivnih komponenti i maskiranja neprijatnog mirisa i ukusa. Pored inkapsulacije vodenog ekstrakta belog luka u višestruke emulzione sisteme, inkapsulacija etanolnog ekstrakta predstavljala je veliki izazov, usled relativno malog broja radova koji se bave proučavanjem formiranja $E/U/V_2$ emulzionih sistema. S druge strane, etanolni ekstrakt belog luka usled svoje jačine ne preporučuje se za direktnu oralnu konzumaciju, što se može prevazići njegovim inkapsuliranjem u emulzione sisteme.

Optimalna formulacija V_1/U emulzije korišćena je za pripremu višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija, u okviru trećeg dela, koji podrazumeva definisanje najpovoljnijeg sastava višestruke emulzije. Četvrti deo podrazumeva primenu membranskog emulgovanja u ćeliji sa mešanjem, kao metode za formiranje $V_1/U/V_2$ emulzija sa unetim aktivnim komponentama, definisanje optimalnih procesnih parametara i optimizaciju procesa, kao i poređenje sa konvencionalnom metodom emulgovanja. Priprema višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzionih sistema sa inkapsuliranim ekstraktom belog luka predstavlja neistraženu oblast, kako sa aspekta njegove inkapsulacije, tako i sa aspekta primene membranskog emulgovanja u ćeliji sa mešanjem uz upotrebu sinterovanog stakla kao membranskog materijala. Razlog primene ME emulgovanja za njihovo formiranje je mogućnost unapređenja karakteristika formiranih emulzija u odnosu na proces homogenizacije, dok razlog integracije membrane od

sinterovanog stakla u proces ME je značajno manja cena materijala u odnosu na druge membranske materijale. Konačno, poslednji deo podrazumeva ispitivanje uticaja sastava i metode emulgovanja na mogućnost inkapsulacije primarne aktivne komponente unutar $V_1/U/V_2$ emulzija.

3.1. Materijal

Korišćene hemikalije za izradu sistema nosač-aktivna materija:

- Suncokretovo ulje - proizvod kompanije "Vital" (Vrbas, Srbija)
- Devičansko ulje semena tikve - proizvod kompanije "Suncokret" (Hajdukovo, Srbija). Sastav masnih kiselina tikvinog ulja, čija je gustina na 25 °C $\rho = 916,9 \text{ kg/m}^3$ je: 18,09% čine zasićene masne kiseline (11,72% palmitinska, 5,58% stearinska, 0,42% arahidinska, 0,14% beheninska, 0,12% miristinska, 0,08% heptadekanonska i 0,03% lignocerinska kiselina); 37,73% čine mononezasićene masne kiseline (37,43% oleinska, 0,16% *cis*-11-eikozenoinjska i 0,14% palmitoleinska kiselina), dok 43,98% čine polinezasićene masne kiseline (43,75% linolna i 0,23% linoleinska kiselina).
- Lipofilni emulgatori - rastvorni u ulju:
 - ✓ Poliglicerol poliricinoleat (PGPR 90) - HLB vrednosti 3,0, doniran od strane "Jaffa" a.d. (Crvenka, Srbija)
 - ✓ Sojin lecitin - doniran od strane "Jaffa" a.d. (Crvenka, Srbija)
- Emulgator rastvorljiv u etanolu:
 - ✓ Dekaglicerol monooleat (MO-7S ili MO-750) - HLB vrednosti 12,9, doniran od strane kompanije Yakuhin Kogyo Co (Osaka, Japan)
- Hidrofilni emulgatori - rastvorni u vodi:
 - ✓ Polioksietilen(20) sorbitan monolaurat (T20) - HLB vrednosti 16,7, proizvod kompanija Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Nemačka) i Acros organics (Geel, Belgija)
 - ✓ Polioksietilen(80) sorbitan monooleat (T80) - HLB vrednosti 15,0, proizvod kompanije Comcen (Zemun, Srbija)
 - ✓ Pluronik F68 (PF68) - triblok kopolimer $[\text{EO}_{75}\text{PO}_{30}\text{EO}_{75}]$, HLB vrednosti veće od 24, proizvod kompanije Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Nemačka)
- Natrijum-hlorid (NaCl) - Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Nemačka)
- D-(+)-glukoza - Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Nemačka)
- Natrijum-alginat - Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Nemačka)
- Kalcijum-hlorid (CaCl_2) – Centrohem (Beograd, Srbija)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) - 96%, kompanije Zorka Pharma (Šabac, Srbija)
- Natrijumova so 1,3,6,8 pirentetrasulfonske kiseline (PTSA) - marker boja za spektrofotometrijsku analizu, proizvod kompanije Acros organics (Geel, Belgija)
- Demineralizovana (DEMI) voda - provodljivosti 4 $\mu\text{S/cm}$, dobijena na uređaju za reversnu osmozu Aquafilter Ltd. (Lodz, Poljska).

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema V_1/U emulzija

Prvi korak u pripremi višestrukih emulzija je dobijanje stabilnih V_1/U emulzija, sa minimalnim prečnikom kapi i uniformnom raspodelom veličina. Odabir najbolje formulacije bazira se na određivanju pogodnog emulgatora, njegove koncentracije i formulisanju sastava unutrašnje vodene faze.

Za pripremu primarnih V_1/U emulzija korišćen je homogenizer, *Ultra Turrax T-25* (IKA, Nemačka). Emulzije su pripremane dodavanjem disperzne faze kap po kap u kontinualnu fazu uz mešanje na 24000 o/min trajanju od 10 minuta. Kao disperzna faza (V_1) korišćena je demineralizovana voda, 0,15 ili 0,3 M rastvor NaCl. Rastvori NaCl pripremljeni su rastvaranjem određene mase NaCl u demineralizovanoj vodi, pri čemu je koncentracija izražena u mol/l. Uljane faze (U) pripremljene su rastvaranjem hidrofobnog emulgatora (PGPR) u suncokretovom, tikvinom ulju ili smeši suncokretovog i tikvinog ulja u masenom odnosu 1:1, mešanjem na magnetnoj mešalici uz zagrevanje na 50 °C u trajanju od 30 minuta. PGPR koncentracija varirana je od 1 do 5% (m/m). Prilikom pripreme emulzija, kontinualna uljana faza smeštena je u posudu sa duplim zidovima kroz koje cirkuliše rashladna voda, kako bi se obezbedilo hlađenje emulzije tokom procesa emulgovanja, na oko 20 °C, korišćenjem termostata (MLW, Češka Republika). Postupak pripreme emulzija trajao je dok se ne postigne 20% (v/v) disperzne faze u emulziji.

V_1/U emulzije sa umreženom unutrašnjom vodenom fazom formirane su zahvaljujući sposobnosti natrijum-alginata da formira umreženu stukturu u prisustvu jona kalcijuma. Postupak pripreme gel-u-ulju (G/U) emulzija podrazumeva identičnu proceduru kao priprema V_1/U emulzija, pri čemu se umesto V_1 faze, uljanoj fazi dodaje 1% (m/v) rastvor Na-alginata (22 cm³). Nakon pauze od 1 minut, nastavlja se mešanje pri istom broju obrtaja uz dodavanje 0,2 M rastvora CaCl₂ (4,6 cm³). U cilju efikasnog formiranja umrežene strukture unutar kapi, odnos zapremine rastvora CaCl₂ i Na-alginata podešen je na 1:4,8 (Perez-Moral i sar., 2014).

3.2.1.1. Tenziometrijska merenja

Merenje međupovršinskog napona, odnosno napona na granici faza ulje/voda rađeno je korišćenjem tenziometra Sigma 703D (KSV Instruments, Finska), metodom otkidanja prstena (eng. *Du Noüy method*). Merenja su rađena u laboratorijskim čašama od 50 cm³, tako što je u čašu sipano 10 cm³ vodene faze (teža faza), nako čega je ona postavljena u oblogu za termostatanje i u nju uronjen prsten (temperatura 25 °C), nekoliko milimetara ispod površine. Zatim je, pažljivo, uz zid čase dodato 10 cm³ uljne faze i ostavljeno 10 minuta radi stabilizacije adsorpcionog sloja (sloja na granici faza). Postupak merenja se sastoji u izvlačenju prstena iz teže, vodene u lakšu, uljnu fazu. Međupovršinski napon vodena faza/ulje meren je sa rastvorom PGPR u suncokretovom i tikvinom ulju kao uljanom fazom, kao i njihovoj smeši u masenom odnosu 1:1. Kao vodena faza korišćena je destilovana voda

ili 0,15 M rastvor NaCl. Za svaki ispitivani sistem ulje/voda merenje je ponovljeno najmanje tri puta, a rezultat predstavlja srednju vrednost svih merenja.

3.2.1.2. Viskozimetrijska merenja

Merenje viskoziteta kako uljanih, tako i spoljašnjih vodenih faza rađeno je korišćenjem rotacionog viskozimetra RS600 (Thermo Haake GmbH, Nemačka) sa mernim priborom konus-ploča ($d = 60$ mm, $\alpha = 1^\circ$) na 25 °C. Postupak merenja se nakon postavljanja između mernih elemenata i temperiranja u trajanju od 500 s, zasniva na merenju napona smicanja τ (Pa) pri kontinualnom povećanju brzine smicanja $\dot{\gamma}$ (s^{-1}) od $\dot{\gamma} = 0$ do maksimalne vrednosti ($\dot{\gamma}_{max} = 500$ s^{-1}), zatim zadržavanjem na $\dot{\gamma}_{max}$ u trajanju od 5 minuta, i smanjenju brzine smicanja od $\dot{\gamma}_{max}$ do $\dot{\gamma} = 0$. Kod njutnovskih fluida ne dolazi do promene napona smicanja sa promenom brzine smicanja, tako da se prividni viskozitet ispitivanog sistema može definisati jednačinom (3.1):

$$\mu_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (3.1)$$

3.2.1.3. Merenje veličine i raspodele veličina kapi

Merenje veličine i raspodele veličina kapi bazira se na optičkim metodama merenja, kao najčešće primenjivanim metodama poslednjih godina, koje se zasnivaju na sposobnosti emulzija da rasipaju svetlost. Podrazumeva upotrebu uređaja za merenje intenziteta rasejane svetlosti, koji uz primenu softverske transformacije daje informacije o raspodeli veličina kapi.

Srednji prečnik kapi nanoemulzija, odnosno V_1/U emulzija, određen je korišćenjem uređaja *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments, UK), mernog opsega od $0,6$ nm do 6 μ m, pri čemu su za sama merenja korišćene polistirenske kivete za jednokratnu upotrebu. Merenje je rađeno neposredno nakon formiranja emulzija, uz razblaživanje emulzije suncokretovim uljem 80 puta. Svaki uzorak je meren minimum tri puta, a konačni rezultat predstavlja srednju vrednost svih merenja. Dobijeni prečnik izražen je kao De Brukerov (eng. *De Brouckere*) srednji prečnik kapi ($d_{4,3}$), definisan pomoću jednačine (3.2):

$$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (3.2)$$

gde je d_i srednji prečnik kapi, dok je n_i broj kapi prečnika d_i (Bouyer i sar., 2012; Sapei i sar., 2012). Za praćenje stabilnosti veličine kapi tokom vremena, merenja veličine kapi rađena su u određenim vremenskim intervalima od momenta formiranja emulzije.

Uniformnost kapi izražena je preko veličine koja je obeležena kao *span*, koja predstavlja meru polidisperznosti sistema, definisanog preko sledeće jednačine:

$$span = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}} \quad (3.3)$$

gde je D_{50} je prečnik kapi emulzije pri kojem 50 vol.% uzorka ima manju veličinu, a 50 vol.% veću veličinu kapi, dok su D_{90} i D_{10} prečnici kapi čija zapremina zauzima manje od 90 vol.% i 10 vol.% od ukupne zapremine na kumulativnoj krivoj raspodele veličina, redom (Ushikubo i Cunha, 2014). Grubo govoreći, što je $span$ vrednost manja, kapi su uniformnije, dok je zadovoljavajuća $span$ vrednost $\approx 0,5$ i može se smatrati monodisperznom emulzijom (Matos i sar., 2014).

3.2.1.4. Merenje sedimentacione nestabilnosti emulzija

Za praćenje sedimentacione nestabilnosti emulzija, sveže pripremljene emulzije su prebačene u graduisane staklene cilindre od 10 cm³ i ostavljene na sobnoj temperaturi određeni vremenski period (do tri meseca u zavisnosti od uzorka). Kao kvantitativna mera gravitacione separacije, koristi se veličina koja se naziva sedimentacioni indeks (SI), i podrazumeva merenje odnosa visine izdvojene neprozirne emulzije (H_t) i ukupne visine emulzije (H_0) tokom vremena. Time se definiše SI (%) kao procentni sadržaj izdvojenog taloga na dnu ili kontinualne faze (seruma) na vrhu cilindra prema jednačini (3.4):

$$SI = \frac{H_0 - H_t}{H_0} \cdot 100 \quad (3.4)$$

Što je veća vrednost indeksa sedimentacije, stabilnost emulzija je manja (Nikolovski i sar., 2016; Sapei i sar., 2012; Surh i sar., 2007).

3.2.1.5. Praćenje termičke stabilnosti emulzija

Uticaj termičkog tretmana na promenu veličina i raspodele veličina kapi ispitan je zamrzavanjem uzoraka (V_1/U emulzija i G/U emulzija) 24 h na -20 °C, odnosno zagrevanjem 5 minuta na 100 °C (Perez-Moral i sar., 2014). Nakon termičkog tretmana merena je veličina kapi emulzija i poređena sa svežim uzorcima, pri čemu su merenja rađena minimum tri puta.

3.2.2. Višekriterijumska optimizacija i statistička analiza rezultata

Za ispitivanje uticaja pojedinih parametara koji ulaze u sastav V_1/U emulzionih sistema na veličinu i raspodelu veličina kapi i sedimentacionu stabilnost emulzije upotrebljena je metoda odzivne površine, pri čemu je primenjen Boks-Benkenov eksperimentalni dizajn. U okviru eksperimentalnog plana varirane su tri promenljive: PGPR koncentracija u uljanoj fazi (1-5% (m/m), X_1), sadržaj tikvinog ulja u kontinualnoj fazi

(0-100% (m/m), X_2) i koncentracija NaCl u vodenoj fazi (0-0,3 M, X_3), pri čemu su parametri varirani u tri nivoa (-1, 0, +1) kao što je prikazano u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Nivoi i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih korišćenih u eksperimentalnom planu prilikom optimizacije sadržaja V_1/U emulzije

Nezavisno promenljiva	Simbol		Nivo	
	Nekodirani	Kodirani	Nekodirani	Kodirani ^b
PGPR koncentracija, % (m/m)	E	X_1	1 3 5	-1 0 +1
Sadržaj tikvinog ulja u uljanoj fazi, % (m/m)	TU	X_2	0 50 100	-1 0 +1
Koncentracija NaCl u vodenoj fazi, M	S	X_3	0 0,15 0,30	-1 0 +1

Boks-Benkenov eksperimentalni dizajn korišćen je kako bi se utvrdio uticaj variranih parametara na srednji prečnik kapi ($d_{4,3}$) i *span* vrednost pripremljene emulzije, kao i na sedimentacionu stabilnost (*SI*), izraženu za period nakon tri meseca čuvanja. Sadržaj disperzne faze je održavan na konstantnoj vrednosti i iznosio je $\varphi = 20\%$ (v/v). Eksperimentalni dizajn sastojao se od 15 eksperimenata, prikazanih u tabeli 3.2, dok su eksperimentalno dobijene vrednosti izražene kao srednja vrednost tri pojedinačna merenja i njihove standardne devijacije. Celokupna statistička analiza urađena je primenom softverskog paketa STATISTICA 12 (Nikolovski i sar., 2016).

Metoda odzivne površine korišćena za dobijanje veze između izlaznih parametara ($d_{4,3}$, *span*, *SI*) i variranih parametara (X_1 , X_2 , X_3) podrazumeva upotrebu model jednačina za procenu uticaja i određivanje regresionih koeficijenata. Najčešće korišćena jednačina u okviru Boks-Benkenovog modela je kvadratna jednačina sa tri promenljive. Pogodnost modela, za date eksperimentalne uslove, tumači se na osnovu koeficijenta determinacije (R^2), kao mere odstupanja odzivne funkcije od eksperimentalno dobijenih rezultata. S obzirom da nisu svi parametri u jednačinama statistički značajni, jednačine su redukovane na taj način da se dobiju regresione funkcije u kojima su sadržane samo statistički značajni regresioni koeficijenti. Na taj način dobijene su jednačine za procenu vrednosti $d_{4,3}$, *span* i *SI90* na osnovu kodiranih nezavisno promenljivih (X_1 , X_2 , X_3):

$$d_{4,3} = a_0 + a_1X_1 + a_3X_2 + a_5X_3 + a_6X_3^2 + a_7X_1X_2 + a_8X_1X_3 \quad (3.5)$$

$$span = b_0 + b_1X_1 + b_3X_2 + b_5X_3 + b_6X_3^2 + b_7X_1X_2 + b_8X_1X_3 \quad (3.6)$$

$$SI = c_0 + c_1X_1 + c_2X_1^2 + c_3X_2 + c_5X_3 + c_6X_3^2 \quad (3.7)$$

^b $X_1 = (E-3)/2$; $X_2 = (TU-50)/50$; $X_3 = (S-0,15)/0,15$.

gde su a_0 , b_0 i c_0 odsečci, a_i , b_i i c_i ($i = 1, 3, 5$) linearni koeficijenti, a_i , b_i i c_i ($i = 2, 4, 6$) kvadratni koeficijenti, a_i , b_i i c_i ($i = 7, 8, 9$) koeficijenti interakcije .

Tabela 3.2. Eksperimentalni dizajn optimizacije sastava V₁/U emulzija

Red. br.	E, % (m/m)	TU, % (m/m)	S, M
	X ₁	X ₂	X ₃
1	1 (-1)	0 (-1)	0,15 (0)
2	5 (+1)	0 (-1)	0,15 (0)
3	1 (-1)	100 (+1)	0,15 (0)
4	5 (+1)	100 (+1)	0,15 (0)
5	1 (-1)	50 (0)	0 (-1)
6	5 (+1)	50 (0)	0 (-1)
7	1 (-1)	50 (0)	0,3 (+1)
8	5 (+1)	50 (0)	0,3 (+1)
9	3 (0)	0 (-1)	0 (-1)
10	3 (0)	100 (+1)	0 (-1)
11	3 (0)	0 (-1)	0,3 (+1)
12	3 (0)	100 (+1)	0,3 (+1)
13	3 (0)	50 (0)	0,15 (0)
14	3 (0)	50 (0)	0,15 (0)
15	3 (0)	50 (0)	0,15 (0)

Konačne minimalne vrednosti zavisnih promenljivih ($d_{4,3}$, $span$ i $SI90$) dobijene su višekriterijumskom optimizacijom, baziranoj na već korišćenom Boks-Benkenovom eksperimentalnom dizajnu. Višekriterijumska optimizacija se sastoji od tri koraka. Prvi korak podrazumeva matematičko definisanje pojedinačnih funkcija $f_i = (X_1, X_2, X_3)$ ($i = 1, 2$ i 3), koji zavise od pomenutih nezavisnih promenljivih (jednačine (3.5); (3.6); (3.7)). U drugom koraku, minimum funkcije cilja formiran je uz primenu težinskih faktora, definišući težinu uticaja svake pojedinačne funkcije (w_i). Treći korak podrazumeva primenu višekriterijumske optimizacije za pronalaženje minimuma funkcije cilja, uz definisanu težinu uticaja svake pojedinačne funkcije na formiranje minimuma (Osyczka, 1984, Gergely i sar., 2003):

$$L = \sum_{i=1}^m w_i \left[\frac{f_i(X_1, X_2, X_3) - f_i^*}{f_i^*} \right]^2 \rightarrow \min ! \quad (3.8)$$

gde L je funkcija cilja, i f_i^* pojedinačna optimalna vrednost funkcije i .

Minimiziranje funkcije cilja (L) urađeno je primenom softverskog paketa Pajton (eng. *Python*) (ScyPy 0.14.0.). Algoritmi koji su dali dobre rezultate su: L-BFGS-B (Limited-memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-ShannoBound-constrained) algoritam, COBYLA (the Constrained Optimization BY Linear Approximation method) i TNC (Truncated Newton Conjugate-gradient) algoritam (Nikolovski i sar., 2016).

3.2.3. Priprema ekstrakta belog luka

Priprema vodenog ekstrakta belog luka: sveži čenovi belog luka (*A. sativum L.*) (90 g) su prvo isečeni na komade, pomešani sa demineralizovanom vodom (200 g), nakon čega su mleveni u blenderu u trajanju od 15 min. Čvrsti delovi belog luka su uklonjeni filtracijom kroz sterilnu gazu, nakon čega je rastvor dobijen nakon filtracije centrifugiran korišćenjem ultracentrifuge (Univerzal 320R, Hettich, Nemačka) na 2400 o/min u trajanju od 30 minuta na temperaturi 20 °C, kako bi se izbeglo zagrevanje uzorka i time razaranje aktivnih komponenti belog luka. Supernatant je zatim filtriran kroz filter papir uz upotrebu vakuum pumpe (Heidolph Instruments GmbH, Nemačka). Konačno, prikupljen ekstrakt je čuvan u frižideru na 4 °C.

Priprema etanolnog ekstrakta belog luka: sveži čenovi belog luka (*A. sativum L.*) (300 g) isečeni su na veoma sitne komade, pomešani sa 96% etanolom (700 g) i ostavljeni 7 dana u tamnoj staklenoj boci, zaštićenoj od direktne sunčeve svetlosti, na sobnoj temperaturi. U toku ekstrakcije sadržaj je povremeno mešan. Nakon završetka postupka ekstrakcije, čvrsti delovi belog luka uklonjeni su filtracijom kroz sterilnu gazu. Tečni etanolni ekstrakt belog luka je dodatno profiltriran kroz filter papir korišćenjem vakuum pumpe (Heidolph Instruments GmbH, Nemačka). Ekstrakt je čuvan na sobnoj temperaturi u tamnim bocama do njegove upotrebe.

3.2.4. Priprema V_1/U emulzija sa inkapsuliranim ekstraktom belog luka

Emulzija sa inkapsuliranim ekstraktom belog luka (V_E/U i E_EV/U emulzija) pripremljena je istim postupkom kao i V_1/U emulzija bez primarne aktivne komponente, korišćenjem homogenizera *Ultra Turrax T-25* (IKA, Nemačka), prema već opisanoj proceduri u poglavlju 3.2.1.

Za pripremu V_E/U emulzije sa inkapsuliranim vodenim ekstraktom belog luka kao aktivnom materijom, kao disperzna faza korišćen je zapravo vodeni ekstrakt belog luka ili 0,15 M rastvor NaCl u vodenom ekstraktu. Uljana faza je rastvor hidrofobnog emulgatora (PGPR) u smeši tikvinog i suncokretovog ulja, koncentracije 2-4% (m/m).

Inkapsulacija etanolnog ekstrakta belog luka podrazumeva dva načina formiranja emulzionog sistema:

1. pripremu etanolni ekstrakt belog luka-u-ulju (E_E/U) emulzije uz upotrebu rastvora lipofilnog emulgatora (PGPR ili sojin lecitin) u smeši tikvinog i suncokretovog ulja (1:1), koncentracije 2-4% (m/m) ili upotrebu 2% (m/v) rastvora MO-7S u etanolnom ekstraktu luka, kao emulgatora za E/U emulzije, i smeše uljanih komponenti kao kontinualne faze;
2. pripremu E_EV/U emulzije u kojima je unutrašnja vodena faza 50% (v/v) etanolni rastvor belog luka, bez i sa dodatim NaCl u koncentraciji 0,075 ili 0,15 M. Uljana faza je rastvor lipofilnog emulgatora (PGPR) u smeši tikvinog i suncokretovog ulja, u koncentraciji 2-5% (m/m).

3.2.5. Priprema višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija

Priprema višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija podrazumeva dodavanje primarne V_1/U emulzije, pripremljene na već opisan način, u spoljašnju vodenu fazu na dva načina: homogenizacijom ili membranskim emulgovanjem (ME) u ćeliji sa mešanjem.

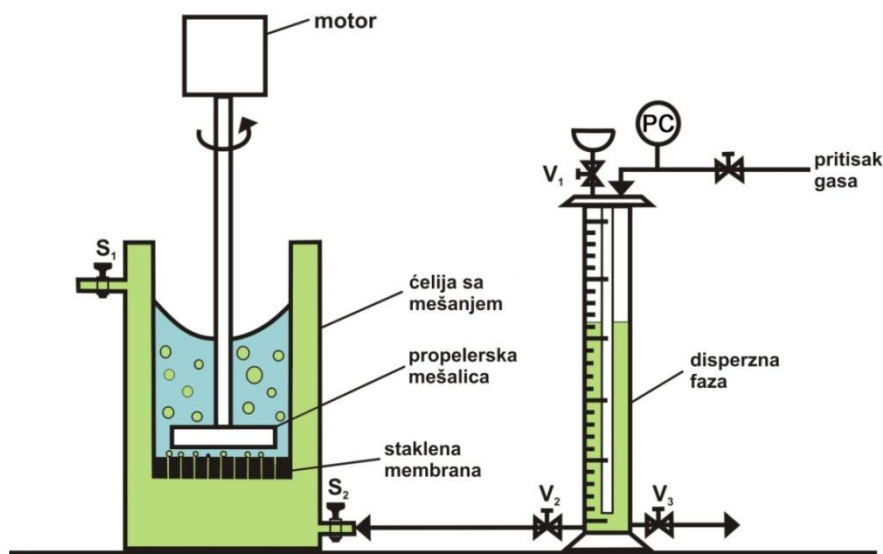
Priprema osnovnih višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija upotrebom homogenizera *Ultra Turrax T-25*, podrazumeva dodavanje primarne emulzije u spoljašnju vodenu fazu (V_2), pri 3600 o/min u trajanju od 8 minuta. Dodavanje V_1/U emulzije kao disperzne faze se izvodi dok sadržaj u emulziji ne dostigne 20% (v/v). Spoljašnje vodene faze pripremljene su rastvaranjem određene količine hidrofilnog emulgatora u demineralizovanoj vodi. Osnovni rastvori hidrofilnog emulgatora su T20, T80 ili PF68 u koncentracijama 1-5% (m/v). Rastvor PF68 priprema se tako što se potrebna masa PF68 odmeri, prelije destilovanom vodom, i pažljivo zagreva uz mešanje, vodeći računa da ne dođe do želiranja. Nakon potpunog rastvaranja rastvor se prenosi u odgovarajući normalan sud i dopuni destilovanom vodom, ostavi 24h na sobnoj temperaturi i nakon toga koristi za rad. Pri pripremi rastvora T20 i T80 nije potrebno zagrevanje. Prilikom dodavanja osmotskih aditiva spoljašnjoj vodenoj fazi, osnovnom rastvoru se dodaje određena masa *D-(+)-glukoze* ili NaCl uz zagrevanje i kvantitativno prenošenje. Koncentracije glukoze u spoljašnjoj vodenoj fazi su bile 0,075; 0,15; 0,3 i 0,4 M. Koncentracije NaCl u spoljašnjoj vodenoj fazi su bile 0,075; 0,15 i 0,3 M.

Priprema višestrukih emulzija sa inkapsuliranim ekstraktima belog luka podrazumeva emulgovanje V_E/U ili E_EV/U primarne emulzije u spoljašnju vodenu fazu, upotrebom homogenizera na već opisan način ili membranskim emulgovanjem u ćeliji sa mešanjem. Višestruke $V_E/U/V_2$ emulzije su pripremljene bez ili sa dodatkom osmotskog aditiva (0,3 M glukoze ili 0,15 M NaCl) u V_2 . Na isti način, višestruke $E_EV/U/V_2$ emulzije pripremljene su sa i bez dodavanja istih osmotskih aditiva (0,15 M glukoze ili 0,075 M NaCl) u V_2 .

3.2.5.1. Membransko emulgovanje u ćeliji sa mešanjem

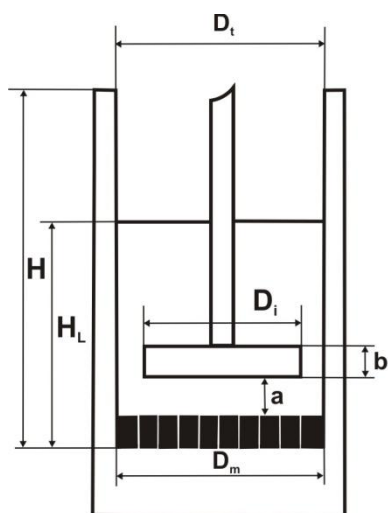
Priprema višestrukih emulzija upotrebom membranskog emulgovanja u ćeliji sa mešanjem podrazumeva propuštanje disperzne faze (V_E/U ili E_EV/U primarne emulzije) kroz pore mikroporozne membrane od sinterovanog stakla u obliku diska (Duran, Pula, Hrvatska), implementirane u ćeliju sa mešanjem. Ova aparatura je napravljena za potrebe istraživanja i izradu ove doktorske disertacije, a njen izgled je prikazan na slici 3.1. Postupak podrazumeva utiskivanje disperzne faze kroz pore membrane upotrebom komprimovanog gasa (N_2) u spoljašnju vodenu fazu, koja je smeštena u posudu sa mešanjem. Mešanje se izvodi jednostavnom lopatastom mešalicom koja je postavljena neposredno iznad membrane koju pokreće laboratorijski motor (Tehtnica type UM405, Železniki, Slovenija) sa kontrolom broja obrtaja (N), koji proizvodi napon smicanja odgovoran za otkidanje kapi sa površine membrane. Promenom brzine mešanja dolazi do promene napona smicanja na površini membrane (τ), dok promenom pritiska gasa menja se vrednost transmembranskog pritiska (ΔP_{tm}). Za određivanje optimalnih uslova za pripremu emulzija broj obrtaja variran je u intervalu od 140 do 1400 o/min, dok je pritisak disperzne vaze (P_d) variran u intervalu od 20 do 100 kPa. Eksperimenti su izvođeni dok sadržaj disperzne faze (ϕ) u emulziji nije dostigao

vrednost od 20% (v/v), dok je uzimanje uzorka za praćenje veličine kapi rađeno pri sadržajima disperzne faze od $\varphi = 5, 10, 15$ i 20% (v/v).



Slika 3.1. Šematski prikaz aparature za membransko emulgovanje u ćeliji sa mešanjem. S_1 i S_2 - salvine, V_1 - V_3 - ventili, PC - regulator pritiska gasa

Karakteristične dimenzije ćelije sa mešanjem prikazane su na slici 3.2, a njihove vrednosti date tabelarno. S obzirom da se u procesu emulgovanja koristi celokupna površina membrane, za membranu prečnika 5,5 cm i debljine 4 mm, izračunata efektivna površina membrane iznosi $A_{ef} = 23,75 \text{ cm}^2$ (Ilić i sar., 2017). Prečnik pora membrane se nalazi u intervalu 10-16 μm , definisan od strane proizvođača.

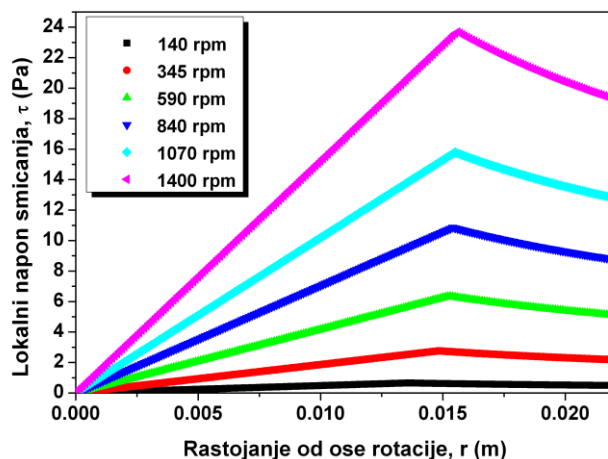


Parametar	Dimenzija (m)
Visina lopatice, b	0,009
Prečnik impelera (lopatice), D_i	0,044
Prečnik membrane, D_m	0,055
Unutrašnji prečnik tanka (suda) sa mešanjem, D_t	0,060
Visina ćelije, H	0,155
Visina kontinualne faze u ćeliji bez mešanja, H_L	0,055
Rastojanje između mešalice i površine membrane, a	0,004

Slika 3.2. Karakteristične dimenzije ćelije sa mešanjem

Napon smicanja (τ) na površini membrane nema konstantnu vrednost, već se menja u odnosu na osu rotacije mešalice, na način na koji je to prikazano na slici 3.3. Na slici je data promena lokalnog napona smicanja (τ) u funkciji radijalnog rastojanja od ose rotacije, pri

čemu je τ izračunat na osnovu ranije definisanih jednačina (2.15) i (2.16), pod pretpostavkom da duž debljine graničnog sloja τ ima konstantnu vrednost. Izračunate vrednosti se odnose na V_2 sa 2% (m/v) T20 i 0,15 M glukoze. Što je brzina mešanja veća, lokalni napon smicanja ima veću vrednost za posmatrano rastojanje od ose rotacije r , a shodno tome i maksimalna vrednost napona smicanja (τ_{\max}), koji se postiže kada je $r = r_c$, raste sa porastom broja obrtaja mešalice.



Slika 3.3. Lokalni napon smicanja (τ) na površini membrane u odnosu na osu rotacije. Kontinualna faza - 2% (m/v) T20 sa 0,15 M glukoze

Pored toga što nema konstantnu vrednost na površini membrane, u slučaju kada se u procesu membranskog emulgovanja za formiranje kapi koristi celokupna površina membrane, prosečna vrednost napona smicanja (τ_{av}) na površini membrane uzima se kao reprezentativna (Dragosavac i sar., 2012; Suárez i sar., 2013), i računa pomoću jednačine (3.9):

$$\tau_{av} = \frac{\int_0^{r_c} \left(0.825\eta_c 2\pi n r \left(\frac{1}{\delta}\right)\right) (2\pi r) dr + \int_{r_c}^{D_m/2} \left(0.825\eta_c 2\pi n r_c \left(\frac{r_c}{r}\right)^{0.6} \left(\frac{1}{\delta}\right)\right) (2\pi r) dr}{d_m^2 \pi / 4} \quad (3.9)$$

Nakon svakog eksperimenta membrana je čišćena komercijalnim rastvorom deterdženta (Farry) i/ili 2% (v/v) Ultrasilom 110 na temperaturi od 80 °C, zatim ispirana ključalom demineralizovanim vodom, do postizanja početne vrednosti fluksa. Povremeno, ukoliko je postojala potreba, membrana je dodatno ispirana 96% etanolom ili metanolom. Nakon toga je membrana sušena vazduhom pod pritiskom, i potapana u kontinualnu fazu 2h pre narednog eksperimenta, kako bi površina membrane postala hidrofилна (Ilić i sar., 2017).

3.2.5.1.1. Karakterizacija membranskog materijala

Detaljnije informacije o membranskom materijalu dobijene su snimanjem morfologije površine i poprečnog preseka membrane pomoću elektronskog mikroskopa (SEM, JOEL JSM 6460 LV, Japan), gde je membrana postavljena na nosač i nakon naparavanja zlatom snimana pod različitim uvećanjima. S obzirom da je prečnik pora dat od strane proizvođača definisan kao opseg prečnika, preciznije određivanje srednjeg prečnika pora (D_p) i raspodele veličina pora, kao i poroznosti membrane (ε) rađeno je metodom živine porozimetrije (AutoPore IV 9500, SAD).

Hidraulički otpor membrane (R_m) definisan je merenjem fluksa demineralizovane vode kroz membranu, pri različitim vrednostima transmembranskog pritiska. Na osnovu nagiba prave zavisnosti J_v od ΔP_{tm} i korišćenjem jednačine $R_m = (1/\eta_v)(\partial J_v/\partial \Delta P_{tm})^{-1}$, procenjena je vrednost otpora membrane (Vladisavljević i sar., 2005).

3.2.5.1.2. Optimizacija procesa ME u ćeliji sa mešanjem

Za analizu, obradu podataka i optimizaciju procesa ME u ćeliji sa mešanjem, korišćena je metoda odzivne površine, kao i program R v.3.2.5. Direktna veza između variranih parametara (N i ΔP_{tm}) i odziva izlaznih parametara (J_d , $D_{3,2}$ i $span$), definisana je pomoću polinoma drugog reda, kao što je to i ranije rađeno, a opisano u poglavlju 3.2.2 pri optimizaciji sastava V_1/U emulzionih nosača, uz korišćenje navedene jednačine:

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.10)$$

gde su β_0 , β_i , β_{ii} i β_{ij} regresioni koeficijenti u jednačini, odnosno odsečak, linerni, kvadratni koeficijent i koeficijent interakcije, redom, X_i nezavisno promenljive, dok je \hat{y} zavisna promenljiva. Koeficijenti regresije su fitovani u cilju dobijanja jednačine koja daje vezu između promenljivih sa minimalnom razlikom između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti. Efikasnost modela i validnost izračunatih koeficijenata procenjuje se preko vrednosti koeficijenta determinacije (R^2) i vrednosti p parametra koji predstavlja statistički značaj određenog uticaja. Velika vrednost R^2 parametra i statistički značajna vrednost p parametra ($< 0,01$) potvrđuju validnost upotrebljenog modela.

Višekriterijumska optimizacija, odnosno definisanje funkcija poželjnosti zasnovano na pronalaženju funkcije cilja, realizovana je JOP metodom (eng. *joint optimization plot method*) u okviru softverskog paketa R. JOP se koristi za optimizaciju matrice parametara i odgovarajućih standardnih devijacija, korišćenjem simultano određenih težinskih faktora u celom posmatranom opsegu veličina, koji na taj način procenjuje njihove vrednosti i daje odgovarajuće dijagrame (Nikolovski i sar., 2018).

3.2.5.2. Merenje veličine i raspodele veličina kapi višestrukih emulzija

Veličina kapi višestruke emulzije određivana je mikroskopskom metodom, uz korišćenje optičkog mikroskopa Bel 3000 (Bioptica, Italija). Naime, mikrofotografije emulzija snimljene su pomoću fotoaparata EC3 (Leica, Švajcarska), pri uvećanju $\times 40$, a zatim obrađene primenom odgovarajućeg *Leica* softvera. U cilju što relevantnijeg rezultata izmeren je prečnik minimum 1000 kapi za svaki uzorak, i srednji prečnik kapi izražen kao zapreminsko-površinski ili Sauterov (eng. *Sauter*) srednji prečnik kapi ($D_{3,2}$), definisan pomoću jednačine (3.11):

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (3.11)$$

Drugi način za definisanje srednjeg prečnika je korišćenjem optičkih metoda merenja, koje predstavljaju znatno precizniju, jednostavniju i bržu metodu analize uzoraka, i najčešće su korišćen način određivanja veličine i raspodele veličina u ovoj doktorskoj disertaciji. Za merenje je korišćen *Mastersizer 2000* (Malvern Instruments, UK), pri čemu je prečnik kapi višestruke emulzije određen neposredno nakon pripreme u tri ponavljanja. Za razliku od uređaja *Zetasizer*, *Mastersizer* ima širi merni opseg i može se primeniti za merenje veličine emulzija mikrometarskih veličina. Rezultati merenja predstavljeni su kao De Brukerov srednji prečnik kapi ($D_{4,3}$), koji je definisan pomoću jednačine (3.2), i/ili Sauterov srednji prečnik kapi ($D_{3,2}$), definisan jednačinom (3.11). Polidisperznost emulzija je izražena preko *span* vrednosti, definisanog jednačinom (3.3).

3.2.5.3. Merenje zeta potencijala

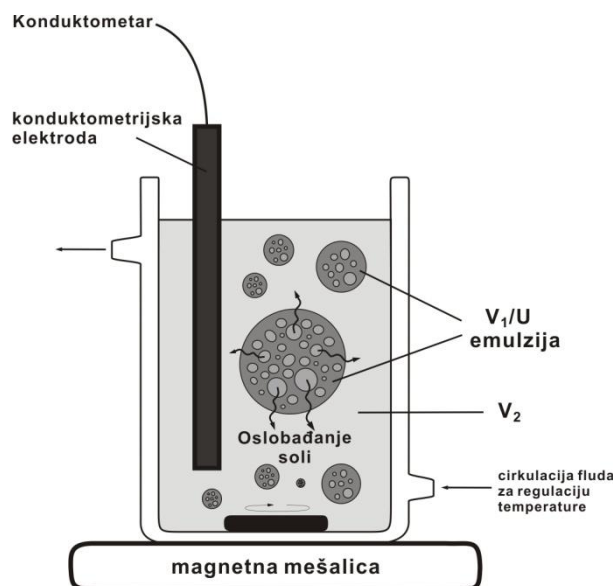
Naelektrisanje na graničnoj površini ulje/voda određeno je merenjem zeta potencijala (ζ) korišćenjem instrumenta *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments, UK), uz primenu odgovarajuće kapilarne ćelije za merenje. Za merenje su pripremljene U/V₂ emulzije na identičan način kao i odgovarajuće višestruke emulzije. Neposredno pre merenja, emulzije su razblažene kontinualnom fazom u odnosu 1:100, i merenje je rađeno minimum tri puta na temperaturi od 25 °C.

3.2.5.4. Konduktometrijsko određivanje sadržaja oslobođene soli

Provodljivost rastvora direktno je povezana sa koncentracijom jona u rastvoru, tako da promena koncentracije jona u spoljašnjoj vodenoj fazi višestruke emulzije, praćena merenjem provodljivosti sistema, proporcionalna je ukupnoj masi oslobođene komponente (NaCl) iz unutrašnje vodene faze.

Konduktometrijsko određivanje sadržaja oslobođene soli zasniva se na korišćenju digitalnog konduktometra (HACH, Engleska) sa *IntelliCAL™ CDC401* grafitnom elektrodom, povezanog sa računarom za precizno praćenje promene u provodljivosti na svakih 30 s, uz pomoć softvera *HQ40dDataLogger*. Merenje se zasniva na uranjanju

elektrode direktno u višestruku $V_1/U/V_2$ emulziju i merenju njene provodljivosti (k_e), pri čemu je procedura merenja prikazana na slici 3.4.



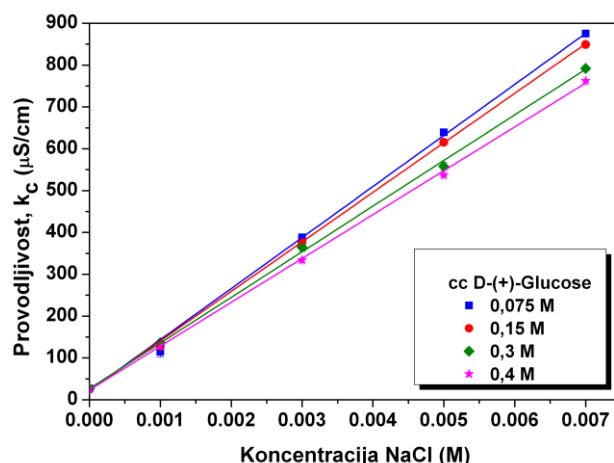
Slika 3.4. Ilustracija konduktometrijske procedure praćenja procenta oslobođene soli

Na osnovu izmerene provodljivosti višestruke emulzije (k_e), provodljivost spoljašnje vodene faze računata je korišćenjem jednačine (3.12) (Meredith i Tobias, 1961). Prema ovom modelu, u slučaju kada je provodljivost disperzne faze jednaka nuli ($k_d = 0$), provodljivost emulzije se može povezati sa provodljivošću kontinualne faze (k_c) i zapreminskim udelom disperzne faze u emulziji (φ):

$$k_e = 8k_c \frac{(2 - \varphi)(1 - \varphi)}{(4 + \varphi)(4 - \varphi)} \quad (3.12)$$

Izračunata vrednost provodljivosti spoljašnje vodene faze (k_c), redukovana je za parametar označen kao „aktivnost emulzije“ (eng. „*emulsifying activity*“). „Aktivnost emulzije“ se uzima u obzir kako bi se kompenzovala pojava naglog pada provodljivosti emulzije, prilikom dodavanja disperzne faze tokom emulgovanja, koja se javlja kao posledica razblaživanja sistema sa neprovodnom disperznom fazom, i predstavlja razliku između provodljivosti spoljašnje vodene faze pre homogenizacije i minimalne provodljivosti koja se postiže tokom homogenizacije (Azzam i Omari, 2002; Pawlik i sar., 2010).

Na osnovu izračunate vrednosti provodljivosti spoljašnje vodene faze i konstruisane kalibracione krive, dobija se koncentracija soli oslobođena u spoljašnju vodenu fazu. Kalibracione krive za različite sastave spoljašnje vodene faze, sa 2% (m/v) T20 i varijacijama u pogledu koncentracije glukoze (0,075; 0,15; 0,3; 0,4 M), prikazane su na slici 3.5. Vrednosti R^2 parametra nalaze se iznad 0,995, za sve četiri konstruisane kalibracione krive (Ilić i sar., 2016).



Slika 3.5. Kalibracione krive zavisnosti provodljivosti spoljašnje vodene faze (k_c) od koncentracije NaCl, za V_2 sa T20 (2% (m/v)) i različitim sadržajem glukoze

Oslobođena frakcija soli (%) iz unutrašnje vodene faze u spoljašnju vodenu fazu, FR , (eng. *fraction release*) može se definisati jednačinom (3.13):

$$FR = \frac{M_r}{M_t} \times 100 \quad (3.13)$$

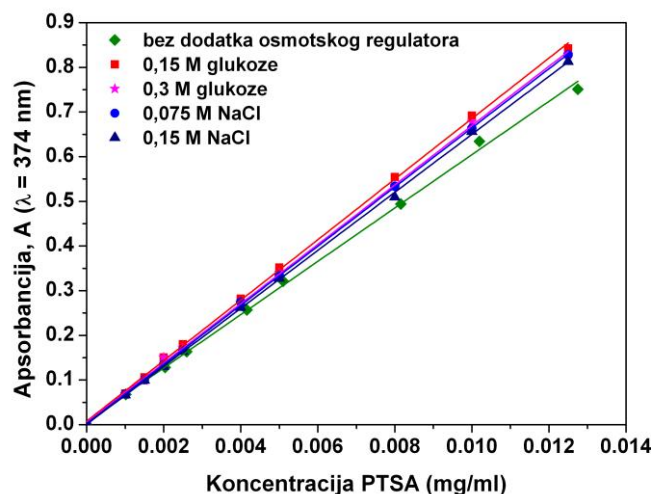
gde je M_t ukupna masa soli u spoljašnjoj vodenoj fazi ukoliko je celokupna količina dodatog NaCl difundovala u V_2 , a M_r je masa soli oslobođena u spoljašnju vodenu fazu u posmatranom trenutku (Sapei i sar., 2012).

3.2.5.5. Spektrofotometrijsko određivanje procenta inkapsulirane unutrašnje faze

Procenat „obuhvaćene“ unutrašnje vodene faze, aktivne komponente koju čini vodeni ili 50% etanolni rastvor ekstrakta belog luka, unutar višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija, definisan je merenjem koncentracije oslobođene hidrofilne marker boje u spoljašnju vodenu fazu, koja je primarno rastvorena u unutrašnjoj vodenoj fazi. U te svrhe kao hidrofilna marker supstanca primenjuje se natrijumova so 1,3,6,8 pirentetrasulfonske kiseline (PTSA) (Adachi i sar., 2004; Adachi i sar., 2003; Asegawa i sar., 2001; Surh i sar., 2007).

Postupak merenja se zasniva na rastvaranju PTSA (0,3% m/v) u unutrašnjoj vodenoj fazi višestrukih emulzija, pri čemu se višestruke emulzije pripremaju po već opisanom postupku u poglavlju 3.2.5. Paralelno sa pripremom eksperimenata sa rastvorenim marker bojom, na identičan način pripremane su i višestruke emulzije bez dodatog PTSA, koje su korišćene za pripremu „slepe probe“ za spektrofotometrijsku analizu. Pripremljene višestruke emulzije, odmah nakon pripreme, razdvajane su korišćenjem ultracentrifuge (Univerzal 320R, Hettich, Nemačka), 30 minuta na 4500 o/min (na 20 °C). Alikvot nakon centrifugiranja filtriran je kroz *syring* filtere (Macherey-Nagel, Düren, Nemačka), kako bi se uklonilo eventualno zaostalo ulje nakon centrifugiranja. Prečnik pora korišćenih *syring* filtera je bio 0,2 μm , dok su po potrebi korišćeni i filteri prečnika 0,1 μm . Apsorbancija uzoraka merena je

upotrebom UV-VIS spektrofotometra (HALO DB-20S, Dynamica, Engleska) na 374 nm, pri čemu je svaki uzorak pripreman minimum tri puta, a konačni rezultat predstavlja srednju vrednost merenja pojedinačnih uzoraka. Praćenje količine oslobođene unutrašnje vodene faze (aktivne komponente) iz emulzionih sistema tokom vremena, rađeno je istim postupkom, u određenim vremenskim intervalima, za vremenski period od 60 dana. Istovremeno su, u identičnim vremenskim intervalima, razdvajani i uzorci koji predstavljaju „slepu probu“, a čija je uloga eliminacija uticaja ostalih materija poreklom iz ekstrakta i/ili emulzije, koje doprinose izmerenoj vrednosti apsorbancije.



Slika 3.6. Kalibraciona kriva zavisnosti apsorbancije spoljašnje vodene faze (A) od koncentracije PTSA, za V_2 sa T20 (2% (m/v)) i različitim sadržajem glukoze

Koncentracija PTSA, u spoljašnjoj vodenoj fazi višestrukih emulzija, određena je konstruisanjem kalibracione krive zavisnosti apsorbancije od koncentracije PTSA u rastvoru spoljašnje vodene faze (V_2). Za dobijanje kalibracionih krivih 0,0125% (m/v) PTSA je rastvoreno u spoljašnjoj vodenoj fazi višestruke emulzije, i merena je apsorbancija razblaženih rastvora spektrofotometrijski na 374 nm. Dobijene kalibracione krive ($R^2 \geq 0,998$) za sve korišćene V_2 formulacije, prikazane su na slici 3.6.

Procenat „obuhvaćene“ unutrašnje vodene faze unutar emulzije, odnosno procenat inkapsulirane aktivne komponente, Y (%) (eng. *entrapment yield*) zadržan u unutrašnjoj vodenoj fazi, definiše se preko koncentracije PTSA oslobođene u spoljašnju vodenu fazu u posmatranom trenutku, definisane jednačinom (3.14) (Dragosavac i sar., 2012; Surh i sar., 2007; Vladisavljević i sar., 2006a):

$$Y = 1 - \frac{C_e}{C_i - C_e} \left(\frac{1 - \varphi_{VUV}}{\varphi_{VU} \cdot \varphi_{VUV}} \right) \quad (3.14)$$

gde je C_i koncentracija PTSA prvobitno dodata unutrašnjoj vodenoj fazi višestruke emulzije, C_e koncentracija PTSA u spoljašnjoj vodenoj fazi, dobijena na osnovu merenja apsorbancije pripremljenog uzorka neposredno nakon pripreme, i u određenim vremenskim intervalima, a

prevedena u koncentraciju korišćenjem kalibracione krive. Parametar φ_{VU} je zapreminski udeo unutrašnje vodene faze u V_1/U emulziji, a φ_{VUV} je zapreminski udeo V_1/U emulzije u višestrukoj $V_1/U/V_2$ emulziji (Ilić i sar., 2017).

S obzirom da neke hidrofilne marker supstance, kao što je na primer metilensko plavo, korišćene pri proceni Y pokazuju afinitet za adsorpciju na granicu faza, provera mogućnosti adsorbovanja PTSA na ulje/voda adsorpcioni sloj definisana je preko procenata neadsorbovane marker boje na ulje/voda granicu faza, R_y (%) (eng. *recovery yield*). Vrednost R_y zapravo predstavlja procenat PTSA koji je dodat u spoljašnju vodenu fazu, i zadržan u istoj nakon postupka separacije emulzije na uljanu i vodenu fazu. Postupak se sastoji u pripremi ulje-u-vodi emulzija (U/V_2) uz korišćenje iste uljane i spoljašnje vodene faze, kao i istog postupka pripreme, kao i odgovarajuće višestruke $V_1/U/V_2$ emulzije. Nakon pripreme, U/V_2 emulziji je dodata unutrašnja vodena faza sa rastvorenim PTSA (0,3% m/v), u zapremini koja odgovara zapremini unutrašnje vodene faze u $V_1/U/V_2$ emulziji. Dodavanjem V_1 emulziji u odgovarajućoj zapremini i sa odgovarajućom koncentracijom PTSA, zapravo se dobija emulzija u kojoj je sav sadržaj unutrašnje vodene faze (V_1) difundovao u spoljašnju vodenu fazu (V_2). Priprema uzoraka i spektrofotometrijska analiza rađeni su na identičan način kao i kod višestrukih emulzija, uz paralelnu pripremu uzoraka bez dodate marker boje koji predstavljaju „slepu probu“.

Izmerena apsorbancija uzorka prevedena je u koncentraciju PTSA korišćenjem kalibracione krive, dok je proračun procenta neadsorbovanog PTSA u V_2 definisan pomoću jednačine (3.15):

$$R_y = C_{e,Ry} \times \frac{100}{C_{i,Ry}} \quad (3.15)$$

gde je $C_{i,Ry}$ koncentracija PTSA na početku dodata spoljašnjoj vodenoj fazi U/V_2 emulzije, $C_{e,Ry}$ koncentracija PTSA izmerena u spoljašnjoj vodenoj fazi U/V_2 emulzija, dobijena nakon separacije faza na osnovu merenja apsorbancije pripremljenog uzorka, a prevedena u koncentraciju korišćenjem kalibracione krive (O`Regan i Mulvihill, 2009).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije mogu se podeliti u dva dela. U prvom delu prikazani su rezultati dobijanja jednostrukih V_1/U emulzionih sistema, uključujući optimizaciju njihovog sastava, i inkapsulaciju primarne i sekundarne aktivne komponente u ovako dobijene sisteme. U drugom delu je ukazano na prednosti primene membranskog emulgovanja u ćeliji sa mešanjem u proizvodnji višestrukih emulzionih sistema sa inkapsuliranim aktivnim komponentama, a u cilju poređenja karakteristika ovako dobijenih sistema sa sistemima dobijenim konvencionalnom metodom emulgovanja - homogenizacijom.

4.1. Priprema jednostrukih V_1/U emulzionih sistema

U okviru prvog dela rada, optimizovan je sastav primarnih V_1/U emulzija, koje će biti korišćene kao nosači primarne aktivne komponente (ekstrakta belog luka). Osnovni cilj, u prvom koraku, je bio inkapsulacija tikvinog ulja, kao sekundarne aktivne komponente, u formulaciju emulzionog sistema. U okviru drugog koraka, vodeni i etanolni ekstrakt belog luka inkapsulirani su u emulziju optimalnog sastava. Tokom ovog koraka pripreme primarnih emulzija sa inkapsuliranim aktivnim komponentama, prikazan je uticaj prisustva ekstrakta, kao kompleksne smeše, na svojstva emulzionih sistema.

4.1.1. Dobijanje formulacije V_1/U emulzije optimalnog sastava sa inkapsuliranim tikvinim uljem

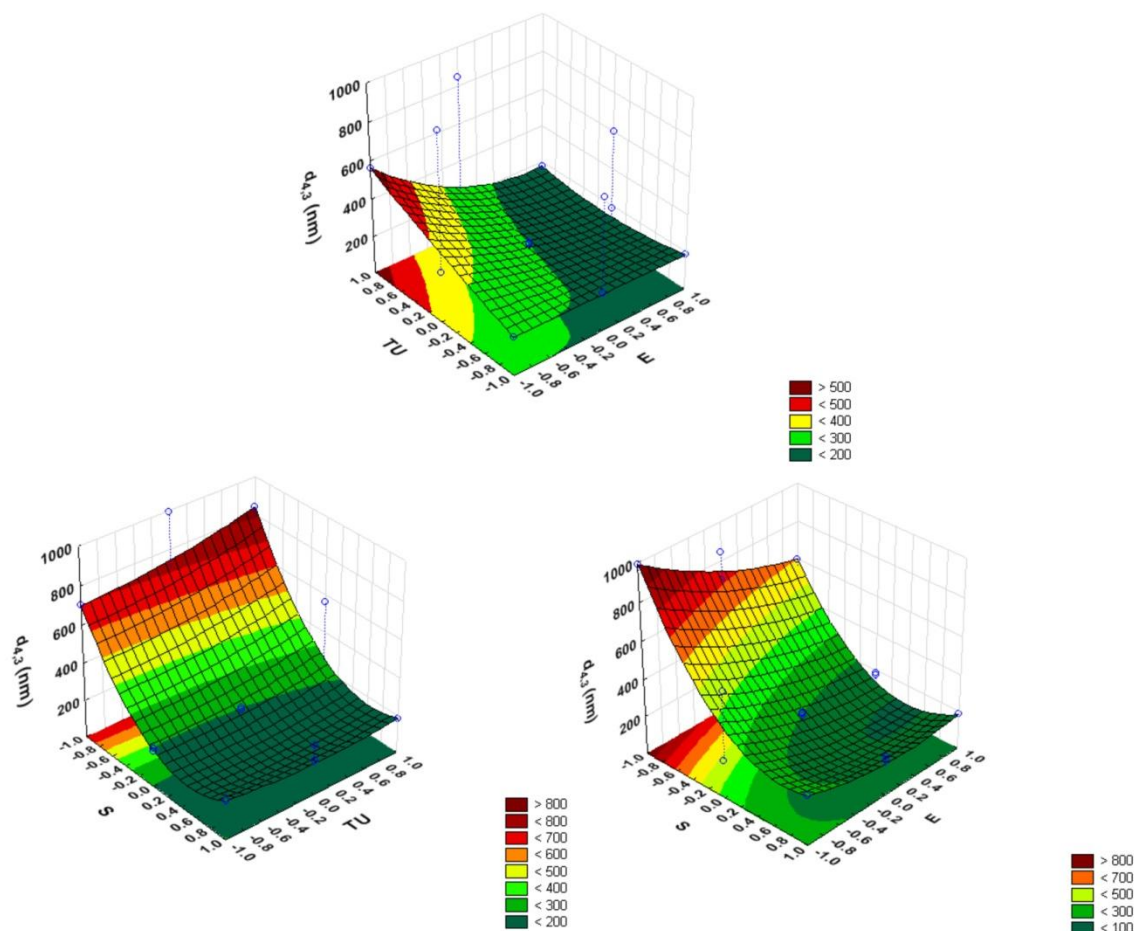
Za optimizovanje sastava V_1/U emulzionog sistema, odnosno ispitivanje uticaja pojedinih parametara formulacije na veličinu i raspodelu veličina kapi i sedimentacionu stabilnost emulzije, korišćen je Boks-Benkenov eksperimentalni dizajn, kao što je to opisano u poglavlju 3.2.2. Rezultati eksperimenata prikazani su u tabeli 4.1. Pored ispitivanja uticaja

variranih promjenljivih na izlazne parametre, jedan od osnovnih ciljeva ove optimizacije je bio i inkapsulacija tikvinog ulja unutar emulzionih sistema, koje kao jedna od aktivnih komponenti, poseduje izuzetna nutritivna svojstva, koja su opisana u poglavlju 2.5.1.

Tabela 4.1. Eksperimentalni rezultati dobijenog srednjeg prečnika kapi V_1/U emulzija ($d_{4,3}$), span vrednosti i indeksa sedimentacije (SI), za posmatrani period od 90 dana čuvanja

Red. br.	E, % (m/m)	TU, % (m/m)	S, M X_3	$d_{4,3}$, nm	span	SI (%)		
						1 dan	30 dana	90 dana
1	-1	-1	0	201,2 ± 12,1	0,74	0	17,5	33
2	+1	-1	0	187,0 ± 9,18	0,76	1	4	10,5
3	-1	+1	0	562,8 ± 45,8	1,22	1,5	10	22
4	+1	+1	0	174,8 ± 5,65	0,65	0,5	3,5	5,5
5	-1	0	-1	990,7 ± 63,2	0,65	24	41	50
6	+1	0	-1	598,3 ± 40,4	0,70	1	16	22
7	-1	0	+1	264,9 ± 22,3	1,04	1,5	6	30
8	+1	0	+1	185,1 ± 6,55	0,66	0	3	5,5
9	0	-1	-1	699,4 ± 6,09	0,60	1	8	25
10	0	+1	-1	843,6 ± 75,0	0,80	1	6	15
11	0	-1	+1	205,2 ± 7,13	0,80	0	7	14
12	0	+1	+1	186,0 ± 13,2	0,77	1	3,5	7
13	0	0	0	203,2 ± 19,0	0,86	0	2	5,5
14	0	0	0	192,4 ± 10,9	0,89	0	3	8
15	0	0	0	204,6 ± 13,3	0,86	1,5	4	8

Na osnovu eksperimentalnih rezultata formirani su dijagrami međusobnih uticaja variranih parametara na izlazne promjenljive. Na slici 4.1 prikazan je uticaj variranih promjenljivih na De Brukerov srednji prečnik kapi ($d_{4,3}$) V_1/U emulzija, dok su odgovarajuće vrednosti regresionih koeficijenata, definisanih jednačinom (3.5), prikazani u tabeli 4.2. Sa slike 4.1 može se uočiti da povećanje sadržaja PGPR pozitivno utiče na smanjenje $d_{4,3}$, potvrđeno negativnom vrednošću koeficijenta a_1 , što je u skladu sa literaturnim navodima (Márquez i sar., 2010; Wolf i sar., 2013). Smanjenjem prečnika kapi povećava se površina kontakta između dve faze, što praktično ukazuje da je većina emulgatora adsorbovana na granicu faza, čime se putem sterne stabilizacije sprečava međusobna koalescencija kapi tokom vremena, pa se može očekivati i njihova veća stabilnost (Capek, 2010). S druge strane, dodatak tikvinog ulja kontinualnoj fazi u izvesnoj meri negativno utiče na smanjenje $d_{4,3}$ (pozitivna vrednost a_3), ali manjim intenzitetom u odnosu na ostala dva ispitivana parametra, jer je vrednost odgovarajućeg regresionog koeficijenta ($a_3 = 59,3$) manja od a_1 i a_5 , koji definišu direktni uticaj sadržaja PGPR i NaCl. Dodatak soli vodenoj fazi doprinosi smanjenju srednjeg prečnika kapi V_1/U emulzije, što je i potvrđeno negativnom vrednošću koeficijenta a_5 . I ranija istraživanja su pokazala da postoji direktna veza između smanjenja prečnika kapi inverznih miniemulzija, kako V_1/U emulzije nazivaju pojedini autori i količine upotrebljene soli (lipofoba) (Landfester, 2006).



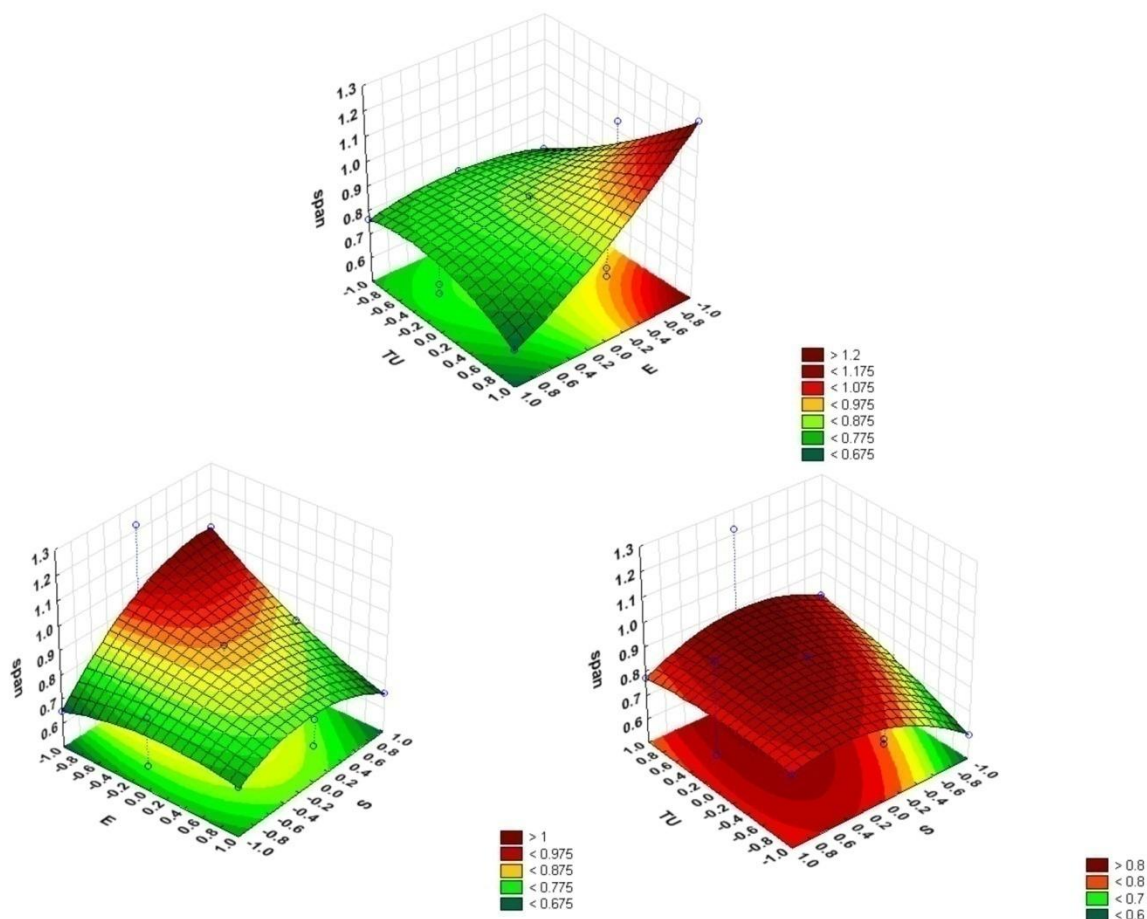
Slika 4.1. Uticaj variranih parametara na De Brukerov srednji prečnik kapi ($d_{4,3}$) V_1/U emulzija. E - PGPR koncentracija, TU - sadržaj tikvinog ulja u uljanoj fazi, S - koncentracija $NaCl$ u vodenoj fazi

S obzirom da je ukupni efekat rezultat sva tri pomenuta uticaja, sa slike 4.1 može se uočiti da veoma mali prečnici kapi ($d_{4,3} < 200$ nm), mogu biti dobijeni ukoliko je koncentracija PGPR dovoljno velika (veća od 3% (m/m)) i vodena faza u svom sastavu sadrži dodat elektrolit ($NaCl$). U slučaju prisustva elektrolita i dovoljne koncentracije PGPR, negativni uticaj prisustva tikvinog ulja na $d_{4,3}$ je zanemarljiv, odnosno moguće je formirati kapi prečnika manjeg od 200 nm pri bilo kojem sastavu uljane faze. Ukoliko $NaCl$ nije prisutan u vodenoj fazi, uticaj sastava uljane faze je nešto više izražen, pri čemu se favorizuje upotreba suncokretovog ulja. Identičan uticaj sastava uljane faze (negativan uticaj dodatka tikvinog ulja) na $d_{4,3}$ može se uočiti i pri niskom sadržaju emulgatora, čak i kada je $NaCl$ prisutan u vodenoj fazi, uz težnju ka formiranju nešto manjih prečnika kapi u odnosu na sistem bez elektrolita.

Tabela 4.2. Vrednosti regresionih koeficijenata i koeficijenata varijacije (R^2) polinomnih funkcija za predviđanje odziva $d_{4,3}$, $span$ i $SI90$ tokom pripreme V_1/U emulzija

$d_{4,3}$ $R^2 = 0,976$			$span$ $R^2 = 0,916$			$SI90$ $R^2 = 0,963$		
Koef.	Procenjena vrednost	SD	Koef.	Procenjena vrednost	SD	Koef.	Procenjena vrednost	SD
a_0	246,6	21,7	b_0	0,854	0,0235	c_0	8,08	1,37
a_1	-109,3	20,3	b_1	-0,110	0,0220	c_1	-10,6	1,01
a_3	59,30	20,3	b_3	0,068	0,0220	c_2	9,24	1,48
a_5	-286,4	20,3	b_5	0,065	0,0220	c_3	-2,69	1,01
a_6	250,1	29,7	b_6	-0,102	0,0322	c_5	-7,31	1,01
a_7	-93,40	28,7	b_7	-0,148	0,0311	c_6	8,12	1,48
a_8	78,20	28,7	b_8	-0,108	0,0311			

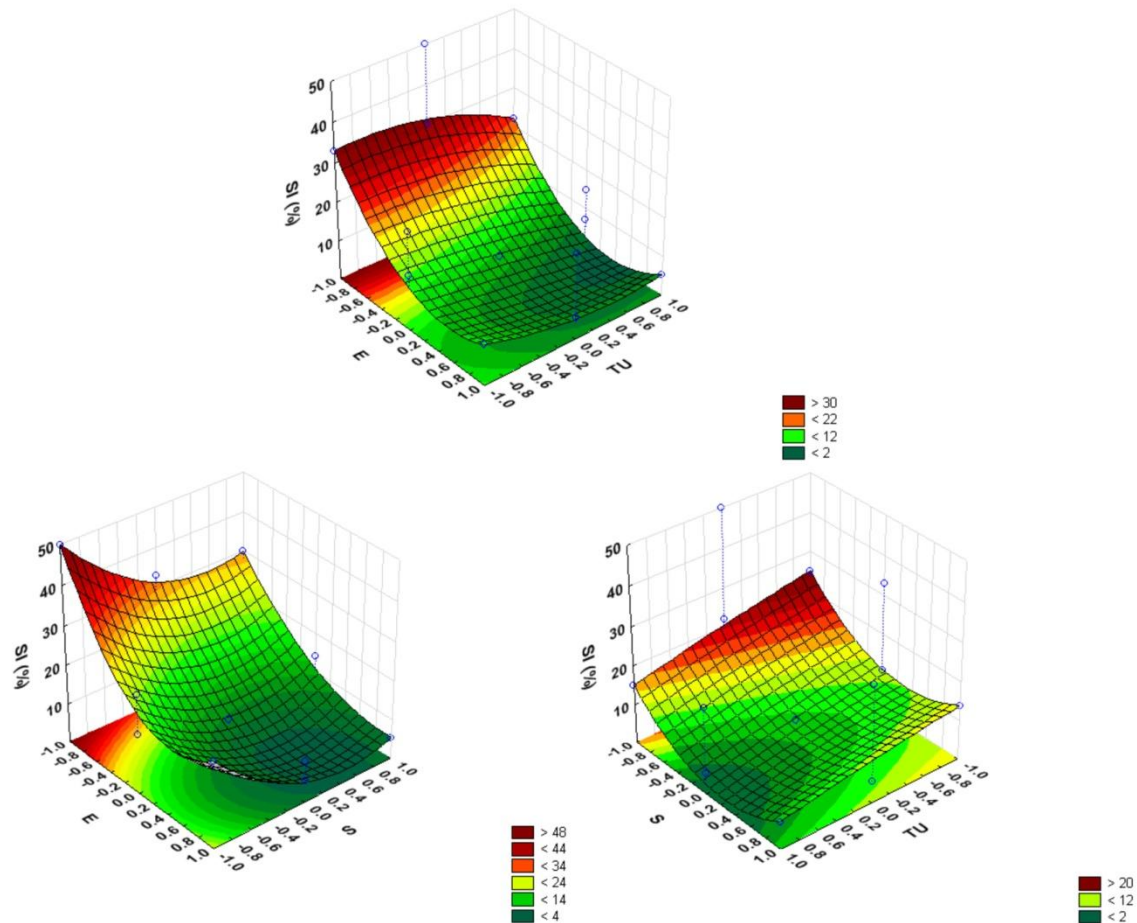
Na slici 4.2 prikazan je uticaj variranih parametara na raspodelu veličina kapi ($span$), koji je definisan jednačinom (3.3) u poglavlju 3.2.1.3. Kada se govori o raspodeli veličina kapi uticaj svih ulaznih promenljivih je nešto slabije izražen od uticaja na $d_{4,3}$, jer su V_1/U emulzije pripremljene homogenizacijom koja, u odnosu na druge metode, može dovesti do formiranja kapi široke raspodele veličina. Kao što je i očekivano, povećanje koncentracije PGPR povoljno utiče na sužavanje raspodele veličina kapi (negativna vrednost koeficijenta b_1). Suprotno pozitivnom uticaju PGPR, dodatak elektrolita neočekivano je pokazao negativan uticaj na $span$ vrednost, ukoliko je uljana faza smeša tikvinog i suncokretovog ulja, što je naročito izraženo ukoliko je sadržaj PGPR na minimalnoj potrebnoj vrednosti. Sličan uticaj pokazuje i prisustvo tikvinog ulja. Negativan uticaja obe promenljive na $span$ vrednosti potvrđen je kroz pozitivne vrednosti regresionih koeficijenata b_3 i b_5 (tabela 4.2). Naime, u prisustvu soli i pri malim koncentracijama PGPR, dodatak tikvinog ulja kontinualnoj fazi doprinosi povećanju $span$ vrednosti, pri čemu je, ukoliko je uljana faza većinom sastavljena od tikvinog ulja, $span$ vrednost veća od 1. Pri većim koncentracijama PGPR, pomenuti efekat tikvinog ulja je slabo izražen, ili čak suprotan, jer se minimalne $span$ vrednosti mogu dobiti pri koncentraciji PGPR od 5% (m/m), sa tikvinim uljem kao uljanom fazom. Pri vrednosti PGPR od 3% (m/m), tikvino ulje u prisustvu NaCl u vodenoj fazi nema značajan uticaj na $span$, dok ukoliko je vodena faza čista demineralizovana voda, manje $span$ vrednosti dobijaju se pri upotrebi suncokretovog ulja kao uljane faze. U ovim uslovima dobijena najmanja $span$ vrednost je 0,6, pri čemu se za ovu formulaciju V_1/U emulzije ne može reći da je optimalnog sastava, jer je formirani prečnik kapi dosta veliki ($d_{4,3} = 699,4 \pm 6,09$ nm), sa izraženijom sedimentacionom nestabilnošću ($SI = 25\%$ za period od 3 meseca) u odnosu na druge formulacije. Iz svega navedenog, može se reći da je optimalna $span$ vrednost rezultat uticaja sve tri ispitivane promenljive, čije određivanje je kompleksnog karaktera i zahteva višekriterijumsku optimizaciju, da bi se mogli izvesti konkretniji zaključci.



Slika 4.2. Uticaj variranih parametara na raspodelu veličina kapi (span) V_1/U emulzija. E - PGPR koncentracija, TU - sadržaj tikvinog ulja u uljanoj fazi, S - koncentracija NaCl u vodenoj fazi

Na slici 4.3 prikazan je uticaj variranih parametara na sedimentacionu stabilnost V_1/U emulzija, posmatranu za vremenski period od 90 dana od trenutka pripreme, a vrednosti odgovarajućih regresionih koeficijenata date u tabeli 4.2. Sve tri varirane ulazne promenljive doprinose sedimentacionoj stabilnosti emulzionog sistema (koeficijenti c_1 , c_3 i c_5 imaju negativan predznak), ali različitim intenzitetom. Najizraženiji je uticaj povećanja koncentracije emulgatora na smanjenje SI ($c_1 = -10,6$), dok je najmanje izražen uticaj dodatka tikvinog ulja ($c_3 = -2,69$). Povećenje koncentracije emulgatora pokazuje izražen uticaj na stabilnost, kao direktna posledica uticaja na smanjenje prečnika kapi, što doprinosi stabilnosti sistema (Capek, 2010). U prisustvu elektrolita i maksimalnom sadržaju emulgatora (5% (m/m)), sastav uljane faze nema značajan uticaj na stabilnost, što daje mogućnost formiranja emulzionog sistema sa malim vrednostima SI . U tom slučaju, optimalna vrednost sadržaja soli potrebna za postizanje minimalne vrednosti SI , je u opsegu između 0,15 M i 0,3 M. Ukoliko se sadržaj PGPR održava na vrednosti 3% (m/m), sastav uljane faze utiče na SI na taj način što dodatak tikvinog ulja doprinosi stabilnosti, bilo da formirana emulzija sadrži NaCl ili ne, pri čemu se veća stabilnost postiže u prisustvu elektrolita. I u ovom slučaju, očekivane minimalne vrednosti SI se nalaze pri sadržaju soli između 0,15 M i 0,3 M, ali pri upotrebi tikvinog ulja kao kontinualne faze. Imajući u vidu da sve tri ispitivane

promenljive doprinose stabilnosti, za postizanje minimalnih vrednosti SI neophodno je prisustvo elektrolita u vodenoj fazi, i maksimalna koncentracija PGPR, ili se ona može redukovati uz upotrebu tikvinog ulja kao komponente uljane faze. Naime, ovaj efekat se može objasniti prisustvom komponenti tikvinog ulja koje poseduju izvesnu površinsku aktivnost i doprinose stabilnosti sistema.



Slika 4.3. Uticaj variranih parametara na indeks sedimentacije (SI) V_1/U emulzija, nakon 90 dana čuvanja. E - PGPR koncentracija, TU - sadržaj tikvinog ulja u uljanoj fazi, S - koncentracija $NaCl$ u vodenoj fazi

Bolje razumevanje mehanizma adsorpcije komponenti na voda/ulje međupovršinski sloj, i eventualni uticaj komponenti tikvinog ulja na stabilnost, može se dobiti na osnovu izmerenih vrednosti međupovršinskog napona (γ), čije vrednosti su prikazane u tabeli 4.3. Izmerena vrednost ravnotežnog međupovršinskog napona za sistem voda/suncokretovo ulje je $27,49 \pm 0,33$ mN/m, dok je odgovarajuća vrednost za γ sistema voda/tikvino ulje $8,91 \pm 0,08$ mN/m. Prisustvo tikvinog ulja dovodi do značajnog smanjenja međupovršinskog napona, čija vrednost ukazuje na to da se emulzija voda/tikvino ulje može dobiti i bez prisustva emulgatora, verovatno kao posledica prisustva površinski aktivnih komponenti u ulju koje značajno smanjuju γ na granici faza. Međutim, stabilnost ovakvih emulzija tokom vremena je bila izuzetno niska, što ukazuje da se emulgator ipak mora primeniti za stabilizaciju V_1/U sistema sa tikvinim uljem. Dodatak PGPR kao emulgujućeg sredstva u

koncentraciji 5% (m/m) suncokretovom ulju dovodi do smanjenja γ na $3,03 \pm 0,05$ mN/m, dok dodavanje identične koncentracije tikvinom ulju smanjuje γ na $4,46 \pm 0,02$ mN/m, a u smeši dva ulja u jednakom odnosu međupovršinski napon iznosi $5,34 \pm 0,1$ mN/m. Kao što se može videti, najznačajnije smanjenje međupovršinskog napona postiže se dodatkom emulgatora suncokretovom ulju, dok u prisustvu tikvinog ulja ovo smanjenje je manje izraženo. Štaviše, ukoliko je tikvino ulje prisutno kao komponenta uljane faze, ne postoji značajna razlika između međupovršinskog napona u prisustvu različitih koncentracija PGPR. Ovakav efekat verovatno je posledica kompleksne strukture tikvinog ulja i prisustva velikog broja komponenti, koje menjaju kinetiku adsorpcije PGPR u međupovršinskom sloju ili eventualno vezuju određenu količinu PGPR, onemogućavajući njegovu potpunu adsorpciju na granicu faza. U tabeli 4.3 prikazan je i uticaj dodatka elektrolita vodenoj fazi na međupovršinski napon, koji ukazuje na izvesni pad vrednosti ovog parametra sa $5,30 \pm 0,10$ na $4,30 \pm 0,22$ mN/m, u prisustvu PGPR kao emulgatora (4% (m/m)). Iako ne značajno niža vrednost međupovršinskog napona, ova vrednost je dovoljna da doprinese stabilnosti emulzije, o čemu će kasnije biti reči.

Tabela 4.3. Uticaj sastava kontinualne faze i dodatka NaCl na ravnotežni međupovršinski napon (γ) voda-u-ulju (V_1/U) emulzionog sistema na 25 °C

Voda	TU (% (m/m))	E (% (m/m))	S (M)	γ (mN/m)
+	0	-	-	27,49±0,33
+	100	-	-	8,91±0,08
+	0	3	-	3,87±0,03
+	0	5	-	3,03±0,05
+	100	3	-	6,13±0,05
+	100	5	-	4,46±0,02
+	50	3	-	4,87±0,2
+	50	4	-	5,3±0,12
+	50	5	-	5,34±0,1
+	50	4	0,15	4,3±0,22

Statistička analiza rezultata ukazuje da postoji izvesna razlika između izlaznih parametara V_1/U emulzija sa i bez dodatka tikvinog ulja kontinualnoj fazi. Međutim, dok dodatak soli ima jasan uticaj za dobijanje stabilnih nanoemulzija, prisustvo tikvinog ulja u kontinualnoj fazi dovodi do izvesnog povećanja srednjeg prečnika kapi i smanjenja sedimentacionog indeksa. Uticaj dodavanja tikvinog ulja u kontinualnu fazu na smanjenje $d_{4,3}$ manje je izražen u odnosu na uticaj soli. Statistički dobijene vrednosti p parametra, dobijene pri ispitivanju uticaja tikvinog ulja su značajno veće, ali i dalje u granicama statistički značajnih ($p < 0,05$), u odnosu na p vrednosti dobijene pri ispitivanju uticaja soli. Odgovarajuće vrednosti za Dunetov test (eng. *Post Hoc Dunnett's test*) su $p = 0,038$, ukoliko se poredi uticaj tikvinog ulja na prečnik kapi u odnosu na kontinualnu fazu koja se sastoji iz smeše tikvinog i suncokretovog ulja, i $p = 0,010$ poređenjem emulzija sa tikvinim uljem u odnosu na prečnik kapi suncokretovo ulje-u-vodi emulzija. Odgovarajući rezultati za Fišerov test (eng. *Fisher's test*) su $p = 0,044$ i $p = 0,012$. Značajniji uticaj dodatka tikvinog ulja uočen

je na indeks sedimentacije, pri čemu su dobijene vrednosti p parametra za Dunetov test $p = 0,00003$ i Fišerov test $p = 0,00004$.

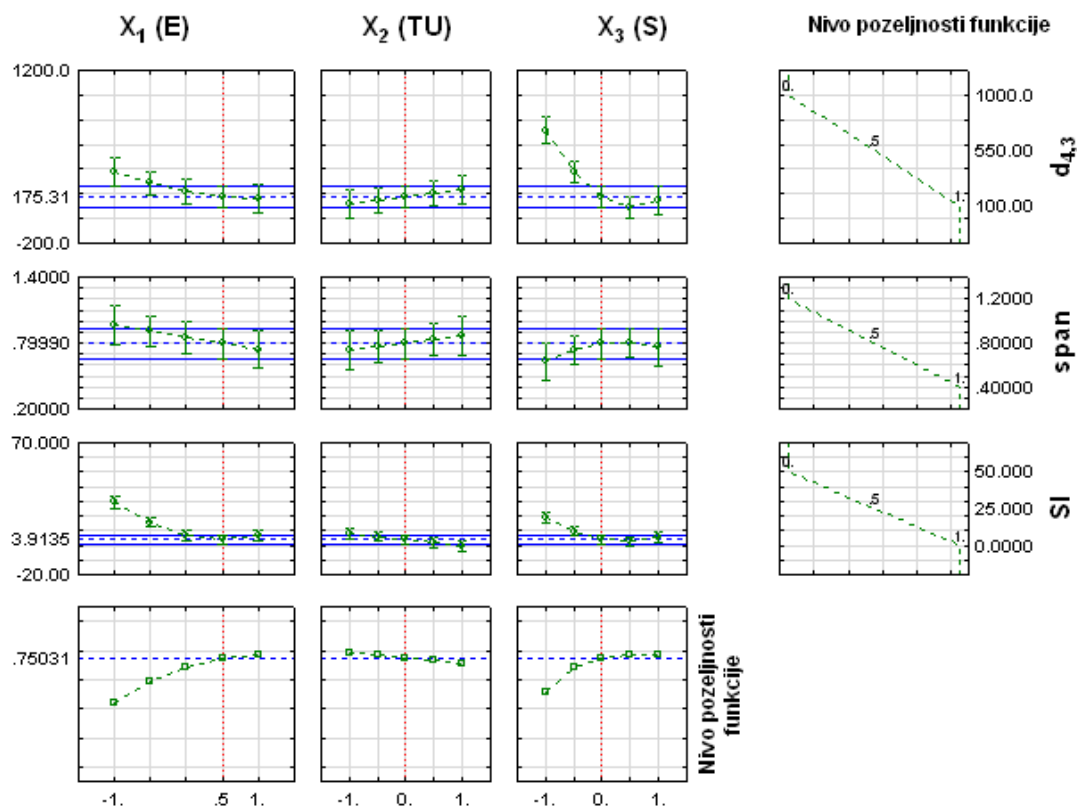
Kao što je navedeno, uticaj dodatka soli vodenoj fazi na srednji prečnik kapi i sedimentacionu stabilnost emulzija značajno je više izražen od efekta dodatka tikvinog ulja. Direktnim poređenjem emulzije bez dodatog elektrolita i sa 0,15 M dodate soli, dobijen je manji prečnik kapi vode sa dodatim elektrolitom ($p = 0,00004$ - Dunet test i $p = 0,00002$ - Fišer test) i niže vrednosti SI (Dunet test - $p = 0,00009$, Fišer test - $p = 0,00007$). Međutim, statističkim poređenjem izlaznih parametara emulzija sa 0,15 M i 0,3 M soli, nije uočena značajna rezlika, odnosno povećanje sadržaja soli nije statistički opravdano.

Višekriterijumska optimizacija korišćena za dobijanje optimalnih vrednosti parametara ($X_{1,opt}$, $X_{2,opt}$ i $X_{3,opt}$) uz definisanje minimuma funkcije, objašnjena je u poglavlju 3.2.2. Svaka pojedinačna regresiona jednačina je uzeta u obzir sa istom „težinom“ uticaja na konačan rezultat (svi korišćeni težinski faktori su bili 1/3). Kao rezultat višekriterijumske optimizacije definisane su optimalne vrednosti parametara: $X_1 = 0,75$; $X_2 = 1$; $X_3 = 0,45$. Odnosno, rezultati optimizacije ukazuju da se male i monodisperzne kapi vode u ulju, sa dobrom sedimentacionom stabilnošću, mogu dobiti pri PGPR koncentraciji oko 4,5% (m/m), tikvinim uljem kao uljanom fazom i u prisustvu soli u vodenoj fazi, u koncentraciji od oko 0,21 M.

Međutim, dobijena optimalna formulacija V_1/U emulzija podrazumeva 100% tikvinog ulja u kontinualnoj fazi, što se pokazalo kao nepraktično iz dva razloga: smanjenja termodinamičke stabilnosti (dolazi do formiranja bimodalne krive raspodele veličina nakon određenog vremena, o čemu će kasnije biti reči) i visoke cene tikvinog ulja (oko 22 puta veća od suncokretovog ulja). Iz tog razloga, još jedna matematička korelacija, koja uzima u obzir i ekonomski faktor, dodata je kao parametar višekriterijumske optimizacije. S obzirom da cena uljane faze linearno raste sa povećanjem sadržaja tikvinog ulja, veoma jednostavna funkcija može biti izvedena na bazi razlike u ceni dva ulja:

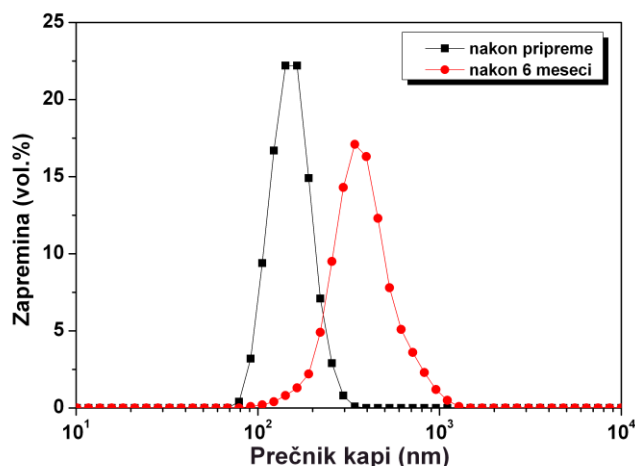
$$EC = d_0(1 + 22X_2) \quad (4.1)$$

Uzimajući u obzir i četvrtu funkciju prilikom optimizacije, sa težinskim faktorom 0,25 za svaku regresionu jednačinu, dobijene optimalne vrednosti su $X_1 = 0,58$; $X_2 = 0,03$; $X_3 = 0,45$, što odgovara PGPR koncentraciji od 4,16% (m/m), sadržaju tikvinog ulja od 51,5% i koncentraciji NaCl u vodenoj fazi od 0,22 M. Uvođenjem četvrte regresione jednačine (4.1) dobijen je optimalni sadržaj tikvinog ulja koji je i ekonomski i eksperimentalno povoljniji (slika 4.6). Međutim, bez obzira što je kao rezultat dobijeno da je predviđena optimalna vrednost sadržaja soli 0,22 M, gore navedenom statističkom analizom eksperimentalnih podataka utvrđeno je da je koncentracija soli od 0,15 M sasvim dovoljana da unapredi sedimentacionu stabilnost V_1/U emulzija i značajno utiče na smanjenje srednjeg prečnika kapi. U suštini, ne postoji statistički značajna razlika između primenjene koncentracije soli od 0,15 M i 0,3 M, tako da se dobijena optimalna vrednost od 0,22 M može redukovati na 0,15 M, koja postiže isti efekat i omogućava mnogo lakše podešavanje koncentracije nego predviđena koncentracija.



Slika 4.4. Profili predviđenih vrednosti i nivoa poželjnosti funkcija prečnika kapi ($d_{4,3}$), raspodele veličina kapi ($span$) i indeksa stabilnosti nakon tri meseca čuvanja (SI) V_1/U emulzija

Optimalna formulacija V_1/U emulzionog sistema dobijena višekriterijumskom optimizacijom, potkrepljena je profilom predviđenih vrednosti variranih parametara potrebnih za dobijanje minimuma izlaznih promenljivih i nivoima poželjnosti funkcija, što je prikazano na slici 4.4. Formulacija koja se metodom odzivne površine favorizuje kao najpovoljnija, i dovodi do minimalnih vrednosti izlaznih parametara, je $X_1 = 0,5$; $X_2 = 0$; $X_3 = 0$. Kodirane vrednosti odgovaraju koncentraciji emulgatora od 4% (m/m), sadržaju tikvinog ulja u kontinualnoj fazi od 50% (m/m) i koncentraciji NaCl u vodenoj fazi od 0,15 M. Data formulacija je veoma slična onoj koja je dobijena višekriterijumskom optimizacijom (4,16% PGPR, 51,5% tikvinog ulja i 0,15 M soli). Predviđene vrednosti zavisno promenljivih za datu formulaciju su $d_{4,3} = 175,31$ nm, $span = 0,79$ i $SI = 3,91\%$. Eksperimentalno dobijene vrednosti date formulacije za $d_{4,3}$, $span$ i SI su 155,8, 0,7 i 5,5%, redom, što je jako blisko predviđenim vrednostima ispitivanih parametara. Na taj način definisana je optimalna formulaciju V_1/U emulzionih sistema koja će biti dalje korišćena za pripremu višestrukih emulzija i inkapsulaciju primarne aktivne komponente, sa tikvinim uljem kao sekundarnom aktivnom komponentom. Pored toga, odabrana formulacija pokazala je veoma dobru stabilnost nakon 6 meseci čuvanja, što je prikazano na slici 4.5, pri čemu je prečnik kapi za tako dug vremenski period skladištenja udvostručen, zadržavajući monomodalnu krivu raspodele veličina kapi (Nikolovski i sar., 2016).

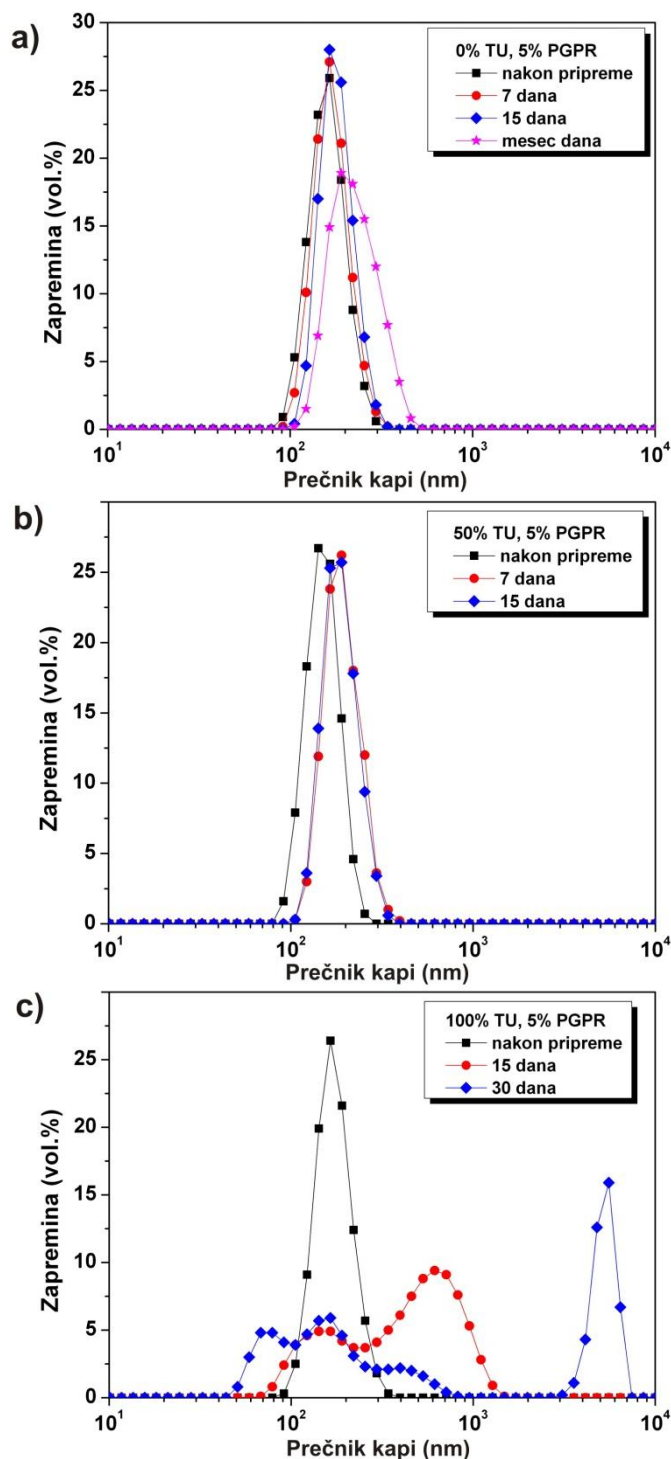


Slika 4.5. Raspodela veličina kapi optimalne formulacije V_1/U emulzija nakon pripreme i nakon 6 meseci čuvanja. $E = 4\%$ (m/m); $TU = 50\%$ (m/m); $S = 0,15 M$

4.1.2. Veličina i raspodela veličina kapi. Stabilnost V_1/U emulzija

Pored kinetičke stabilnosti emulzionog sistema, postoje i drugi vidovi emulzione nestabilnosti, koji mogu da utiču na svojstva krajnjeg proizvoda u čiji sastav ulazi emulzija. Iako su se nanoemulzije pokazale kao sistemi koji poseduju dobru kinetičku stabilnost, javlja se izražena težnja za unapređenjem njihove termodinamičke stabilnosti (Capek, 2010; Karthik i sar., 2017; Singh i sar., 2017). Praćenjem veličine i raspodele veličina kapi tokom vremena, utvrđeno je da sastav kontinualne faze može da utiče i na termodinamičku nestabilnost sistema. Iako je ranije utvrđeno da dodatak tikvinog ulja kontinualnoj fazi doprinosi sedimentacionoj stabilnosti emulzionog sistema, uticaj dodavanja tikvinog ulja na termodinamičku stabilnost emulzija pokazuje suprotan efekat (slika 4.6).

Promena veličine kapi tokom vremena, odnosno uticaj dodavanja tikvinog ulja kontinulnoj fazi na raspodelu veličina kapi za posmatrani vremenski period od mesec dana, prikazan je na slici 4.6. Rezultati praćenja pokazali su da ukoliko uljanu fazu sačinjava suncokretovo ulje sa dovoljnom koncentracijom emulgatora (5% (m/m)) i dovoljnim sadržajem soli u vodenoj fazi (0,15 M NaCl), emulzija je stabilna tokom mesec dana sa neznatnom promenom u veličini kapi, zadržavajući monomodalnu krivu raspodele veličina kapi (slika 4.6a)). Međutim, ukoliko se suncokretovo ulje zameni tikvinim uljem, pri istim uslovima čuvanja, dolazi do značajane koalescencije vodenih kapi već nakon 15 dana (slika 4.6c)). U pomenutoj formulaciji nakon posmatranog vremenog perioda dolazi do formiranja bimodalne krive raspodele veličina, gde 71,5 vol.% zauzimaju kapi sa prosečnom veličinom od 584,2 nm, dok kapi prečnika 148,5 nm zauzimaju 24,4 vol.%. Pojava koalescencije kapi tokom vremena, koja je verovatno posledica uticaja mnoštva različitih komponenti prisutnih u ulju tikve, izbegnuta je mešanjem ulja semena tikve sa suncokretovim uljem (slika 4.6b)). Na taj način pripremljena emulzija, sa smešom ovih ulja, dala je nepromenjenu krivu raspodele veličina formiranih kapi nakon 15 dana čuvanja, koja je po veličini kapi slična formulaciji pripremljenoj sa rafinisanim suncokretovim uljem.

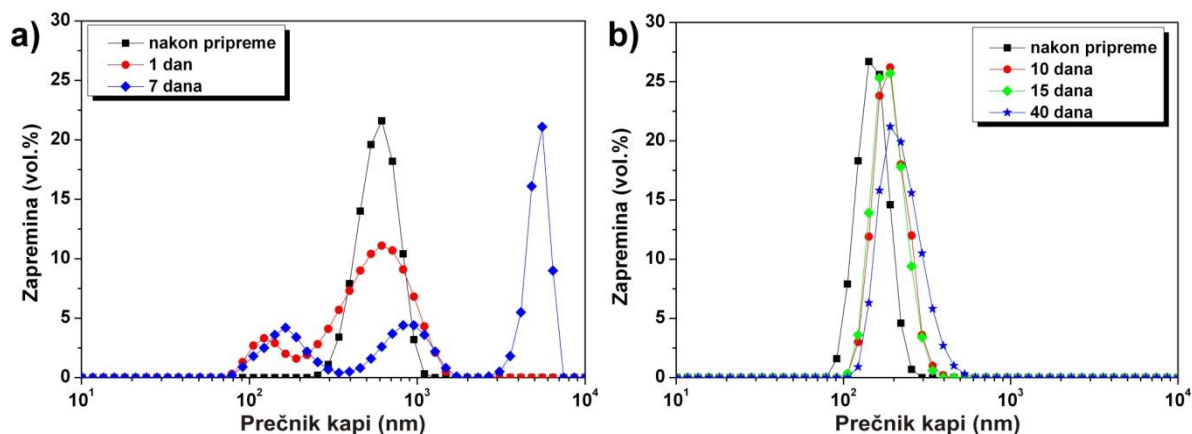


Slika 4.6. Uticaj dodatka tikvinog ulja kontinualnoj fazi na raspodelu veličina kapi V_1/U emulzija tokom vremena. Kontinualna faza: a) 0% TU; b) 50% TU; c) 100% TU sa PGPR koncentracijom od 5% (m/m). Sadržaj NaCl u vodenoj fazi je 0,15 M

Dakle, iako tikvino ulje smanjuje indeks sedimentacije V_1/U emulzionog sistema, za stabilnost veličine kapi tokom vremena njegova upotreba kao uljane faze može dovesti do koalescencije kapi, što je uzeto u obzir prilikom višekriterijumske optimizacije, kako bi se favorizovali pozitivni aspekti smeše tikvinog i suncokretovog ulja. Stoga, sastav uljane faze

koji se sastoji od smeše tikvinog i suncokretovog ulja u masenom odnosu 1:1, korišćen je u daljem radu.

Pored uticaja sastava kontinualne faze, u literaturi postoje jasni pokazatelji da na stabilnost veličine i raspodele veličina kapi V_1/U emulzija tokom vremena značajno utiče i dodatak elektrolita (Landfester, 2006; Pawlik i sar., 2010). Kako bi se pomenuti uticaj ispitao, na slici 4.7a) prikazana je promena raspodele veličina kapi V_1/U emulzije tokom vremena bez NaCl, dok je na slici 4.7b) prikazana ta ista promena sa dodatim elektrolitom, za formulaciju koju čini smeša tikvinog i suncokretovog ulja (1:1) kao kontinualnom fazom. Formulacija bez soli u vodenoj fazi pokazuje značajnu koalescenciju već nakon 7 dana čuvanja, što je uočeno i od strane drugih autora na primeru V_1/U emulzionih sistema sa suncokretovim uljem kao uljanom fazom (Volf i sar., 2013). Naime, tipična bimodalna kriva raspodele uočena je već nakon jednog dana, gde oko 86,2% zapremine vodene faze formira kapi veličine od 614,9 nm, dok su ostale kapi imale prosečan prečnik 133,2 nm (13,8 vol.%). Dalja koalescencija kapi tokom vremena ima za posledicu pojavu tri pika na krivoj raspodele veličina, pri čemu nakon 7 dana oko 21 vol.% zauzimaju kapi malih prečnika (veličina 169,5 nm), 25 vol.% čini frakciju srednje veličine kapi (869,4 nm), dok frakcija sa velikim kapima ima prosečnu veličinu oko 5,2 μm koje zauzimaju 53,8 vol.%. Dalja ispitivanja promene veličina kapi ukazala su na sve veće povećanje procenata frakcije sa velikim prečnicima.



Slika 4.7. Uticaj dodatka NaCl u vodenu fazu na raspodelu veličina kapi V_1/U emulzija tokom vremena: a) bez dodatog NaCl; b) sa dodatkom NaCl (0,3 M). Kontinualna faza: smeša tikvinog i suncokretovog ulja (1:1, (m/m)) sa 5% (m/m) PGPR

S druge strane V_1/U emulzija sa dodatim elektrolitom u vodenu fazu pokazuje veoma dobru stabilnost u posmatranom vremenskom periodu od 40 dana (slika 4.7b)), praćenu neznatnim povećanjem prečnika kapi od 185,1 nm do 227,2 nm.

Čak i kada dovoljna količina emulgatora definiše koloidnu stabilnost emulzija, razlika u veličinama formiranih kapi, odnosno razlika u njihovim Laplasovim pritiscima, koji se povećava sa smanjenjem prečnika, za posledicu ima pojavu difuzije materijala između susjednih kapi (Landfester, 2003). Kao što je već rečeno i eksperimentalnim radom i potvrđeno, kontinualno povećanje prečnika kapi V_1/U emulzija tokom vremena, može se

sprečiti dodatkom lipofobne materije (NaCl) koja veoma efikasno usporava difuzionu degradaciju dispergovanih kapi vode, odnosno Ostvaldovo sazrevanje (Capek, 2010). Naime, pravilno izabrana lipofobna materija koja se raspoređuje u svakoj pojedinačnoj kapi, ne sme imati sposobnost difuzije između susednih kapi kroz uljanu fazu, stvara osmotski pritisak u svakoj kapi koji se suprotstavlja Laplasovom pritisku, i zapravo smanjuje pogonsku silu za difuziju manjih kapi vode ka većim kapima (Ostvaldovo sazrevanje). Da bi emulzija bila potpuno termodinamički stabilna nakon formiranja, treba da se zadovolji uslov da je $p_{Laplas} - \Pi_{osm} = 0$ u svim kapima emulzije, pri čemu male promene prečnika dovode do značajne razlike u pritiscima. Odnosno, da bi se postigla željena stabilnost sistema tokom vremena i inhibicija Ostvaldovog sazrevanja, pritisak u malim kapima bi trebalo da bude veći i/ili jednak odgovarajućem Laplasovom pritisku (Landfester, 2006; Landfester, 2000). Iako prečnik formiranih kapi zavisi kako od koncentracije emulgatora, tako i od količine upotrebljene lipofobne komponente, mehanizam stabilizacije kapi, u principu, ne zavisi od količine upotrebljenog lipofoba, već od razlike u efektivnom pritisku (razlika u pritiscima $p_{Laplas} - \Pi_{osm}$) u susednim kapima. Iz tog razloga, nije uočena značajna razlika u stabilizacionom efektu između koncentracije soli od 0,15 M i 0,3 M.

Pored toga, mogući mehanizam stabilizacionog dejstva soli može se posmatrati preko uticaja dodatka NaCl na vrednost međupovršinskog napona. Utvrđeno je da veoma mala promena u međupovršinskom naponu, koja se javlja kao posledica dodavanja soli (tabela 4.3), pokazuje značajan efekat na stabilnost V_1/U emulzionog sistema. Uticaj dodatka NaCl na međupovršinski napon može biti rezultat boljeg pakovanja i interakcije PGPR u međupovršinskom sloju (u uslovima potrpune zasićenosti sloja, kada je koncentracije veća od KMK). Naime, dodavanje soli dovodi do izvesnog povećanja elastičnosti i viskoziteta međupovršinskog sloja, što vodi smanjenju pokretljivosti molekula PGPR u sloju. Time se praktično jača interakcija između adsorbovanih molekula u međupovršinskom sloju i omogućava bolje pakovanje PGPR na granici faza. Kao krajnji rezultat smanjuje se stepen drenaže sloja između susednih kapi, dovodeći do povećanja stabilnosti emulzije putem konformacionih promena koje izazivaju „skupljanje“ međupovršinskog sloja (Lutz i sar., 2009; Pawlik i sar., 2010).

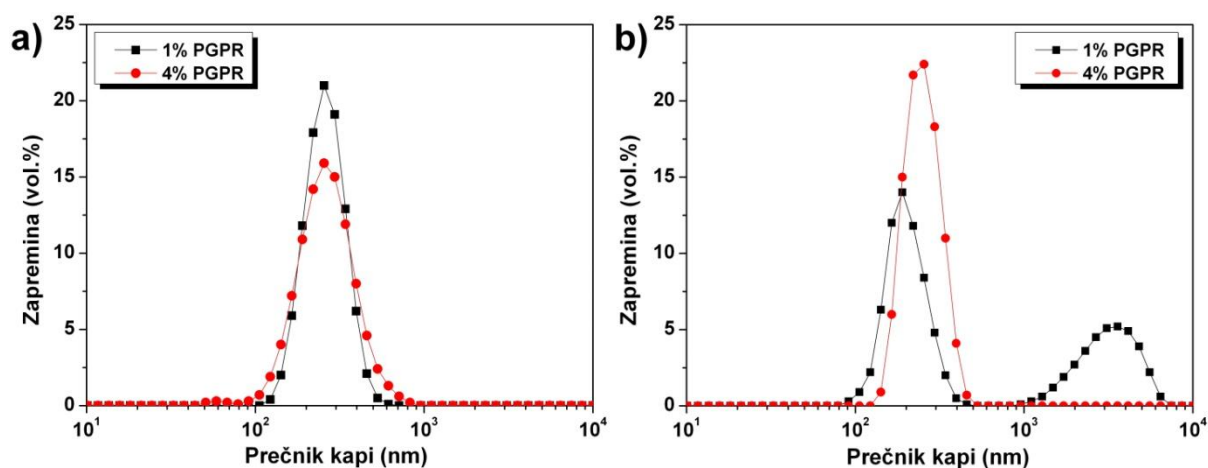
4.1.3. Umrežavanje unutrašnje vodene faze V_1/U emulzija

Pored dodavanja lipofoba vodenoj fazi, jedan od načina na koji se može unaprediti stabilnost V_1/U emulzionih sistema je i formiranjem umrežene strukture u unutrašnjoj vodenoj fazi. Mogućnost formiranja umrežene strukture Na-alginata umrežavanjem jonima $CaCl_2$ primenjena je na unutrašnju vodenu fazu V_1/U emulzije. Svojstva na taj način formirane emulzije sa tikvinim uljem kao komponentom uljane faze, upoređena su sa predhodno ispitivanim V_1/U formulacijama i njihovom stabilnošću, samim tim i sa optimalnom formulacijom koja je dobijena primenom Boks-Benkenovog eksperimentalnog dizajna i višekriterijumskom optimizacijom parametara.

Kao što je već rečeno, korišćenjem PGPR kao emulgatora može se postići značajna sterna (prostorna) stabilizacija međupovršine, pri čemu povećanje njegove koncentracije

dovodi do većeg zasićenja voda/ulje međupovršine, smanjujući rastojanje između hidrofobnih delova molekula emulgatora, čime se smanjuje prečnik formiranih kapi i stepen koalescencije. Dodatak elektrolita dodatno stabilizuje međupovršinu, putem jačanja interakcije između adsorbovanih molekula i poboljšanja pakovanja PGPR u međupovršinskom sloju (Lutz i sar., 2009; Pawlik i sar., 2010), i/ili povećanjem osmotskog pritiska u kapima sprečavajući Ostvaldovo sazrevanje (Capek, 2010; Landfester, 2006).

S druge strane, formiranje umrežene strukture vodene faze potpuno je drugačiji mehanizam stabilizacije V_1/U emulzije, koji se pokazao kao uspešan pri povećanju stabilnosti pomenutih sistema, kako tokom čuvanja, tako i u slučaju izlaganja različitim temperaturnim tretmanima (Perez-Moral i sar., 2014; Sapei i sar., 2012). Na slici 4.8 prikazana je raspodela veličina kapi gel-u-ulju (G/U) emulzija i voda-u-ulju (V_1/U) emulzija sa dodatim NaCl u vodenu fazu, za emulzije stabilizovane sa različitim PGPR koncentracijama. Naime, ispitivanje uticaja koncentracije PGPR na veličinu kapi, rađeno je jer postoje literaturni navodi da se umrežavanjem vodene faze može značajno redukovati koncentracija upotrebljenog emulgatora, što je i potvrđeno eksperimentalno. Kao što se i može uočiti sa slike 4.8a), umrežavanjem unutrašnje vodene faze dobijena je veoma slična raspodela veličina kapi i sa smanjenom PGPR koncentracijom (1% (m/m)), za razliku od V_1/U emulzija gde veličina i raspodela veličina kapi veoma zavise od PGPR koncentracije.

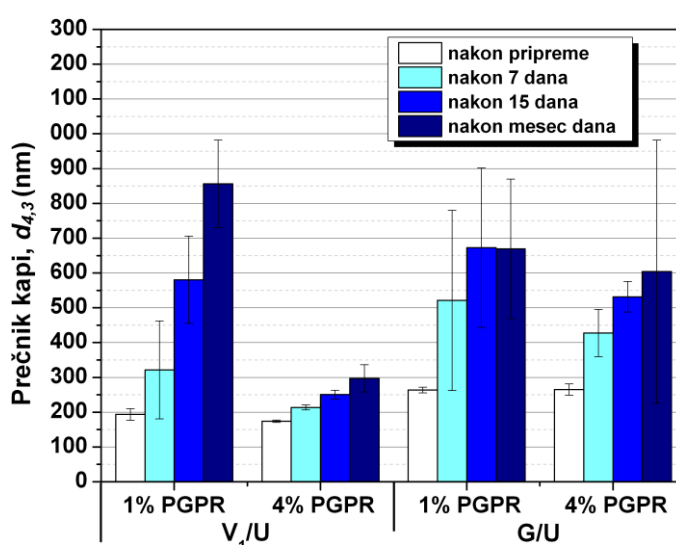


Slika 4.8. Poređenje raspodele veličina kapi a) G/U i b) V_1/U emulzionih sistema stabilizovanih sa različitim koncentracijom emulgatora. Koncentracija NaCl u vodenoj fazi V_1/U emulzije je 0,15 M

Međutim, ono što je bio krajnji cilj ovog eksperimentalnog rada jeste poređenje stabilnosti formiranih G/U i V_1/U emulzija, stabilizovanih pomoću dva različita mehanizma: umrežavanjem unutrašnje vodene faze i dodatkom inhibitora Ostvaldovog sazrevanja. Rezultati promene prečnika kapi ($d_{4,3}$) formiranih emulzija tokom mesec dana čuvanja prikazani su na slici 4.9. Zapravo, formiranje umrežene strukture unutar kapi može da omogući smanjenje PGPR koncentracije, bez značajnih promena u stabilnosti tokom vremena prilikom smanjenja koncentracije sa 4% na 1% (m/m). Međutim, bolju stabilnost tokom vremena, u smislu najmanje promene veličine kapi, pokazale su V_1/U emulzije sa dovoljnom PGPR koncentracijom (4% (m/m)) i dodatim NaCl u vodenu fazu, kao ko-emulgatorom.

Veličina kapi takvih emulzija se neznatno promenila za period od mesec dana od $174,2 \pm 3,38$ nm do $297,1 \pm 39,03$ nm. Za isti vremenski period veličina umreženih kapi G/U emulzija (pri istoj koncentraciji PGPR) promenila se od $265,3 \pm 16,31$ nm do $603,87 \pm 378,02$ nm, praćena veoma neravnomernom raspodelom veličina kapi.

Neravnomerna raspodela umrežene strukture unutar kapi, odnosno činjenica da nije celokupna vodena faza u kapima uhvaćena u jonima umreženu strukturu, može biti uzrok potencijalne nestabilnosti G/U emulzija tokom vremena. Ovakva pojava može dovesti do stapanja kapi koje ne poseduju potpuno formiranu umreženu strukturu i povećati udeo kapi koje su podložne koalescenciji. Praćenjem sedimentacione stabilnosti G/U emulzija utvrđeno je da ovi emulzioni sistemi pokazuju dobru stabilnost, pri čemu za posmatrani period od mesec dana nije došlo do izdvajanja sedimenta ili uljane faze, sa veoma sličnim vrednostima za SI kao i kod V_1/U emulzionih sistema (Ilić i sar., 2016).

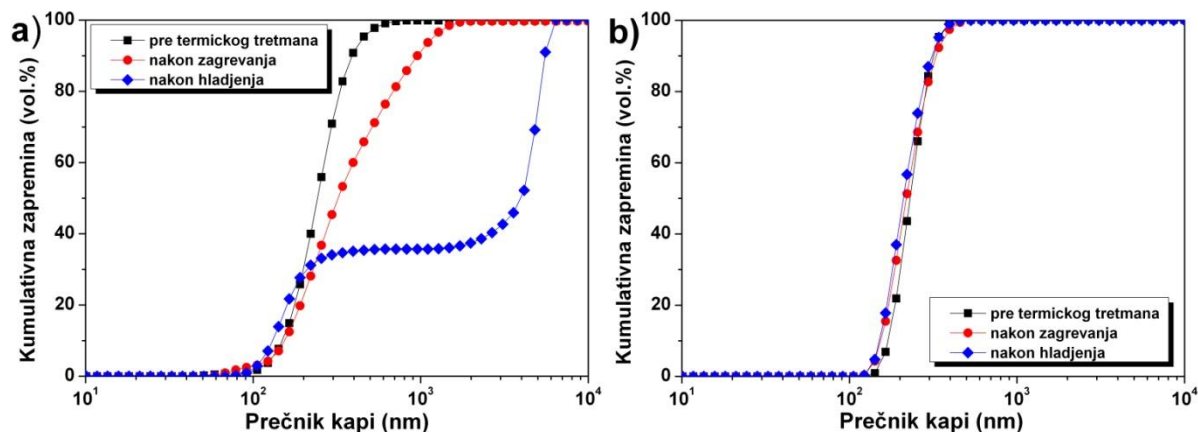


Slika 4.9. Promena prečnika kapi ($d_{4,3}$) V_1/U i G/U emulzija sa različitim sadržajem PGPR tokom vremena. Koncentracija NaCl u vodenoj fazi V_1/U emulzije je 0,15 M

Uticaj termičkog tretmana na raspodelu veličina kapi V_1/U i G/U emulzija, sa koncentracijom PGPR od 4% (m/m) prikazan je na slici 4.10. Veličina i raspodela veličina kapi zagrevanih G/U emulzija (5 minuta na 100 °C) pretrpela je minimalne promene, dok je zamrzavanje (24h na -20 °C) pomenutih emulzija dovelo do intenzivne koalescencije kapi. Zamrzavanje G/U emulzija za posledicu je imalo formiranje bimodalne krive raspodele sa 35,5 vol.% kapi sa veličinom od $d_{4,3} = 180,2$ nm i 64,5 vol.% koje su zauzimale velike kapi prečnika oko 5 μ m. Nasuprot G/U emulzijama, V_1/U emulzije pokazale su izuzetnu stabilnost prilikom oba korišćena termička tretmana, uz nepromenjenu veličinu i raspodelu veličina kapi nakon zagrevanja i zamrzavanja (slika 4.10b)).

Očuvanje stabilnosti kapi vode V_1/U emulzija prilikom zamrzavanja može biti posledica uticaja dodatog elektrolita u vodenu fazu. Naime, formirani kristali leda unutar kapi tokom zamrzavanja su okruženi tečnim slojem elektrolita koji deluje kao lubrikant, formirajući „omotač“ za kristale leda, čime sprečavaju njihovo spajanje sa susednim kapima (Aronson i Petko, 1993). Suprotno V_1/U emulzijama, umrežena struktura formirana

umrežavanjem Na-alginata jonima CaCl_2 poseduje veoma ograničenu mehaničku čvrstoću. Naime, mehanička svojstva hidrogela se mogu poboljšati povećanjem temperature i sporijim formiranjem gela (Lee i Mooney, 2012). Samim tim i izlaganje niskim temperaturama može imati negativan uticaj na strukturu formiranu unutar kapi, čime može doći do njihove koalescencije kao posledica narušavanja mehaničkih svojstava formirane umrežene strukture (Ilić i sar., 2016).



Slika 4.10. Uticaj termičkog tretmana na raspodelu veličina kapi: a) G/U emulzija; b) V_1/U emulzija. Koncentracija PGPR je 4% (m/m). Zagrevanje - 5 min na 100 °C; hlađenje - 24h na -20 °C

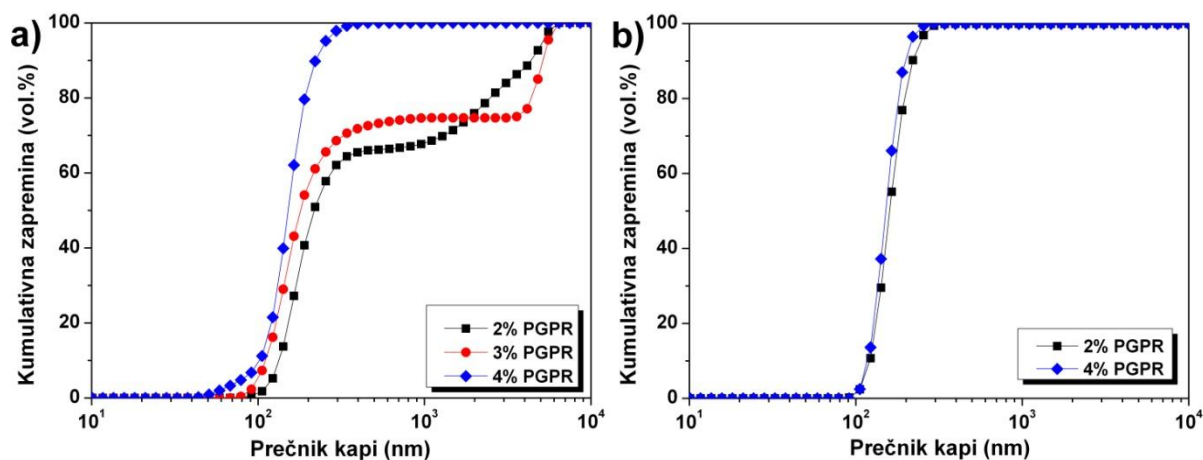
S obzirom da je utvrđeno da umrežavanje unutrašnje vodene faze može da redukuje koncentraciju upotrebljenog PGPR, ali da u odnosu na V_1/U emulzione sisteme koje su formirane sa dovoljnom koncentracijom emulgatora i uz dodatak lipofoba ne pokazuju bolju stabilnost veličina kapi tokom vremena, kao ni bolju stabilnost na primenjene termičke tretmane, za dalji rad i inkapsulaciju aktivnih materija unutar nosača, favorizovani su V_1/U emulzioni sistemi.

4.1.4. Inkapsulacija ekstrakta belog luka u V_1/U emulzione sisteme

4.1.4.1. Inkapsulacija vodenog ekstrakta belog luka

Inkapsulacija vodenog ekstrakta belog luka, kao primarne aktivne komponente, unutar V_1/U emulzija optimizovanog sastava, zasniva se na potpunoj zameni unutrašnje vodene faze ekstraktom belog luka. S obzirom da je ekstrakt belog luka izuzetno kompleksnog sastava, kao što je opisano u poglavlju 2.5.2, komponente koje su izdvojene ekstrakcijom mogu uticati na svojstva emulzionog sistema. Stoga, potrebno je prvenstveno ispitati da li postoji mogućnost formiranja ovakvih emulzionih sistema, odrediti optimalan sadržaj emulgatora potrebnog za formiranje stabilnih emulzija i utvrditi u kojoj meri se oni razlikuju od V_1/U emulzionih sistema bez dodate aktivne komponente. Drugim rečima, potrebno je ispitati uticaj komponenti ekstrakta belog luka na veličinu i raspodelu veličina kapi vodeni ekstrakt

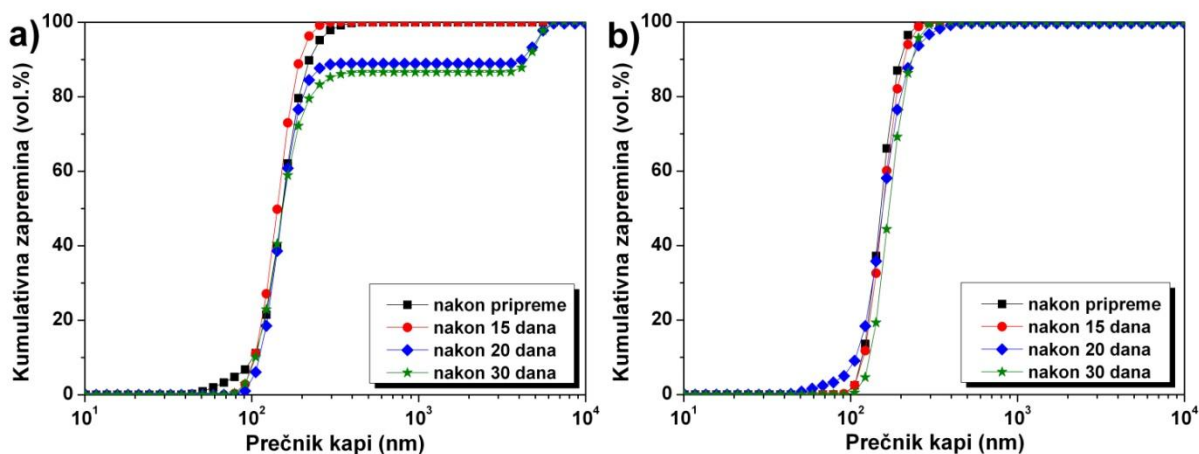
belog luka-u-ulju (V_E/U) emulzija, njihovu stabilnost tokom vremena, kao i utvrditi da li dodatak ko-emulgatora doprinosi njihovoj stabilnosti.



Slika 4.11. Uticaj koncentracije emulgatora (PGPR) na kumulativnu raspodelu veličina kapi V_E/U emulzija: a) bez dodate soli i b) sa dodatim NaCl u koncentraciji 0,15 M

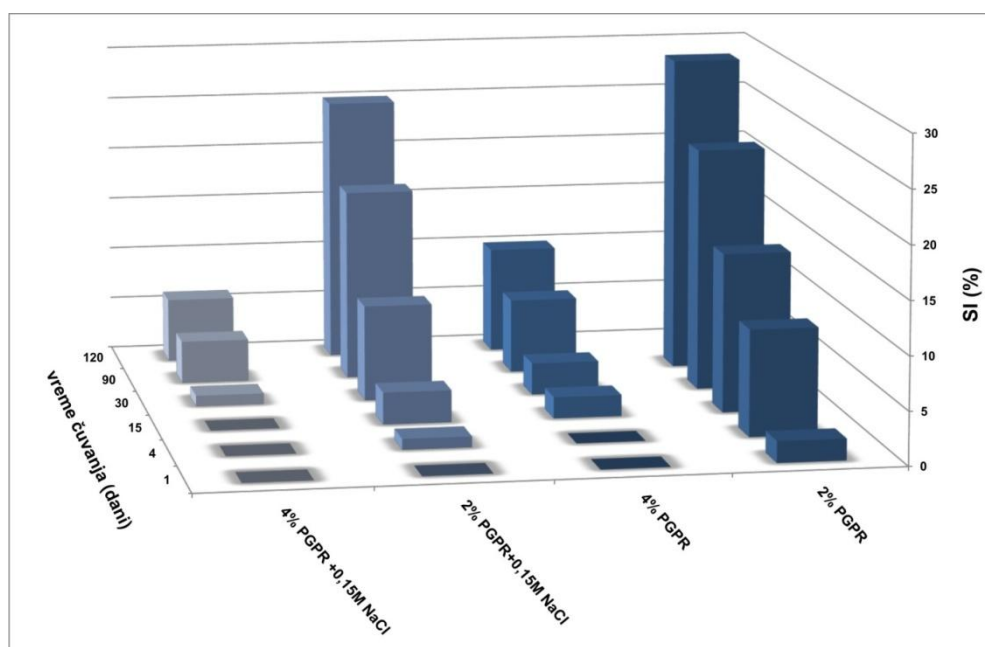
Uticaj koncentracije upotrebljenog emulgatora na raspodelu veličina kapi V_E/U emulzija i dodatka elektrolita (NaCl) u unutrašnju vodenu fazu prikazan je na slici 4.11. Može se uočiti da povećanje koncentracije emulgatora pozitivno utiče na smanjenje veličina formiranih kapi (slika 4.11a)), na sličan način kao i kod emulzionih sistema bez aktivne komponente, što znači da sam ekstrakt belog luka ne pokazuje značajan efekat na promenu prečnika kapi. Emulzioni sistemi bez dodatog NaCl i pri PGPR koncentracijama manjim od 4% (m/m) pokazuju bimodalnu krivu raspodele veličina kapi, dok povećanje koncentracije na 4% (m/m) omogućava dobijanje kapi prečnika $170,1 \pm 5,72$ nm. Pozitivan uticaj na krivu raspodele veličina kapi može se uočiti i dodavanjem NaCl (0,15 M), pri čemu je čak i u slučaju manje PGPR koncentracije (2% (m/m)) dobijen sličan prečnik kapi od $d_{4,3} = 178,6 \pm 7,05$ nm (slika 4.11b)). Dodatno, povećanje PGPR koncentracije u prisustvu elektrolita dovelo je do blage, ali ne i značajne promene u prečniku kapi ($d_{4,3} = 166,8 \pm 2,65$ nm).

Međutim, dodatak soli značajno je poboljšao stabilnost veličine kapi V_E/U emulzija tokom vremena (slika 4.12). Ukoliko su emulzije pripremljene bez NaCl i sa dovoljnom PGPR koncentracijom (4% (m/m)), koalescencija kapi se može uočiti nakon 20 dana čuvanja, uz formiranje bimodalne krive raspodele veličina kapi sa frakcijom srednjeg prečnika oko 3 μm koju čini 11,1 vol.%. Dodatak soli vodenom ekstraktu belog luka dovodi do formiranja kapi koje su stabilne najmanje mesec dana u pogledu veličine i raspodele veličina kapi.



Slika 4.12. Stabilnost V_E/U emulzija tokom vremena a) bez dodate soli i b) sa dodatim NaCl u koncentraciji 0,15 M. Kontinualna faza je smeša suncokretovog i tikvinog ulja (1:1) sa 4% (m/m) PGPR

Sedimentaciona stabilnost V_E/U emulzionih sistema zavisi kako od PGPR koncentracije, tako i od dodatka NaCl, pri čemu je navedeni uticaj oba parametra prikazan na slici 4.13. Izraženiji pozitivni efekat pokazuje povećanje koncentracije emulgatora, iako uticaj dodatka soli nije zanemarljiv, jer dvostruko smanjuje SI pri dovoljnoj koncentraciji emulgatora. Očekivano, najbolju sedimentacionu stabilnost, sa najmanjom vrednošću SI za period od 4 meseca pokazala je formulacija sa 4% (m/m) PGPR i elektrolitom prisutnim u koncentraciji od 0,15 M.



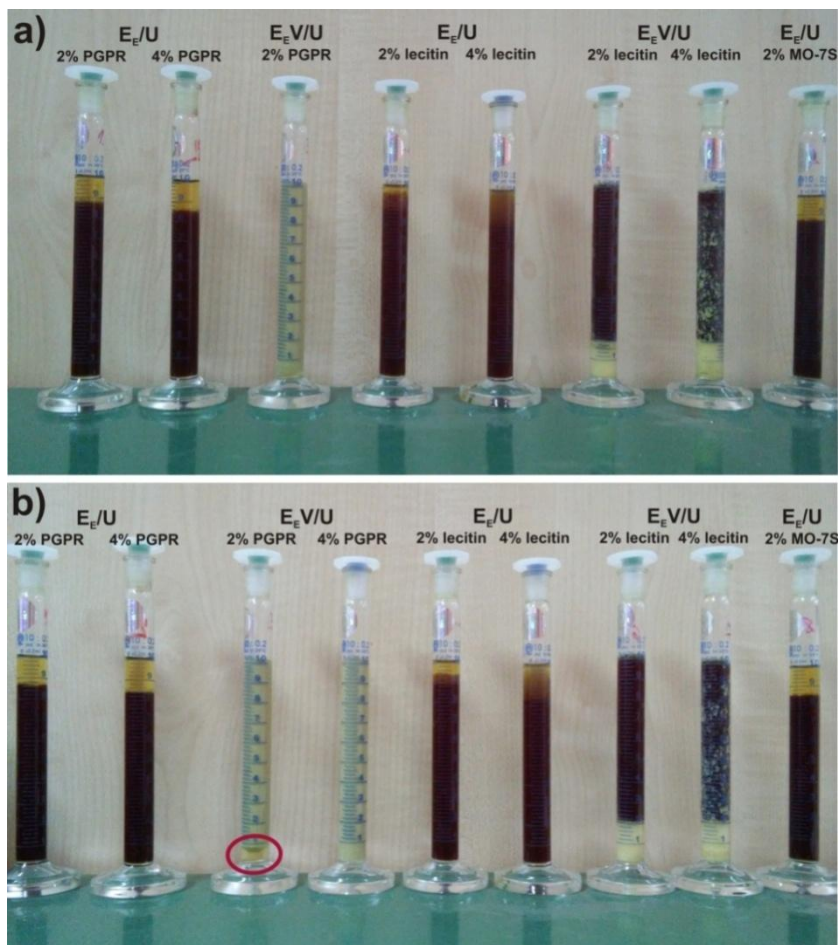
Slika 4.13. Uticaj PGPR koncentracije i dodavanja NaCl u vodenu fazu na sedimentacioni indeks (SI) V_E/U emulzija

Na identičan način kao i kod V_1/U emulzija, i PGPR koncentracija i dodatak soli su ključni parametri za formiranje stabilnih emulzionih sistema, ukazujući na to da se ekstrakt belog luka može inkapsulirati kao aktivna komponenta na ovakav način u emulzione sisteme, bez bojazni da će dovesti do destabilizacije emulzije.

4.1.4.2. Inkapsulacija etanolnog ekstrakta belog luka

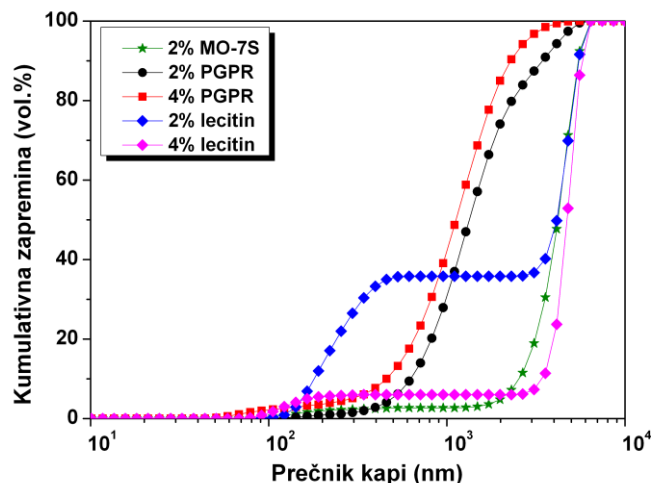
Inkapsulacija etanolnog ekstrakta belog luka unutar emulzionih sistema, za razliku od vodenog ekstrakta predstavlja veliki izazov, jer podrazumeva formiranje etanol-u-ulju emulzija (E/U). Razlog inkapsulacije etanolnog ekstrakta belog luka je višedecenijska upotrebe ovog preparata kao prirodnog leka protiv gripa i prehlade, koji se zbog jačine i ukusa ne preporučuje za direktno oralno konzumiranje. Međutim, literaturni podaci ukazuju da je veoma teško formirati stabilne E/U emulzione sisteme zbog nedostatka emulgatora koji imaju dobra emulgujuća svojstva za formiranje ovakvih sistema, a da se pritom mogu koristiti u ljudskoj ishrani. Od ispitivanih emulgatora za ovu namenu najbolja emulgujuća svojstva pokazali su poliglicerol estri oleinske kiseline, gde se kao najbolji iz ove grupe izdvojio MO-7S (Xu i sar., 2001a; Xu i sar., 2001b), iako se njegova primena bazira na formiranju E/U emulzija čija se upotreba vezuje za proizvodnju biodizela (De Los Reyes i Charcosset, 2010), ili formiranju prehrambenih U/V_2 emulzija (Khalid i sar., 2017). Pored ispitivanja mogućnosti primene MO-7S za dobijanje etanolnog ekstrakta belog luka-u-ulju emulzija (E_E/U), ispitana je i mogućnost primene PGPR i sojinog lecitina, kao emulgatora koji se uobičajeno primenjuju za dobijanje V_1/U emulzija.

Korišćenje MO-7S, PGPR i lecitina za formiranje E_E/U emulzija sa inkapsuliranim etanolnim ekstraktom belog luka, dovelo je do formiranja nestabilnih sistema, uz pojavu vidljivog raslojavanja faza već nakon nekoliko sati, bez obzira na tip upotrebljenog emulgatora (slika 4.14a)). Kao kontinualna faza u svim emulzijama korišćena je smeša tikvinog i suncokretovog ulja (1:1). Na slici 4.15 prikazan je uticaj tipa emulgatora na kumulativnu raspodelu veličina kapi E_E/U emulzija. Upotrebom MO-7S kao emulgatora formiraju se emulzije srednjeg prečnika kapi mikrometarskih dimenzija ($d_{4,3} = 3055 \pm 2273$ nm), sa izuzetno širokom raspodelom veličina kapi. Očekivano, upotreba drugih emulgatora nije dala značajan pomak pri formiranju E_E/U emulzionih sistema. Naime, sojin lecitin kao emulgator pokazao je veoma slične rezultate kao i MO-7S, bilo da se koristi u koncentraciji 2 ili 4% (m/m). S druge strane, upotreba PGPR pri stabilizaciji etanolnih kapi dovodi do delimičnog smanjenja prečnika kapi ($d_{4,3} = 1567 \pm 682,7$ nm za 2% (m/m) PGPR i $d_{4,3} = 1248 \pm 365,9$ nm za 4% (m/m) PGPR), sa jasnom tendencijom za međusobnim spajanjem i formiranjem kinetički veoma nestabilnog sistema, odnosno emulzije koja se potpuno rasloji nakon par sati (slika 4.14a)).



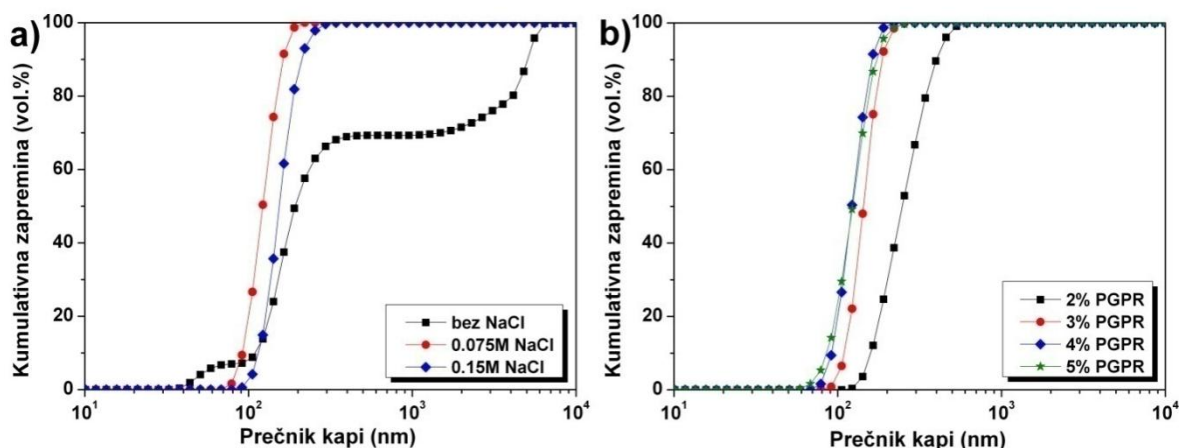
Slika 4.14. Sedimentaciona stabilnost različitih formulacija E_E/U i E_EV/U emulzija: a) 4h nakon pripreme i b) nakon mesec dana čuvanja. Vodena faza E_EV/U emulzija je 0,15 M rastvor NaCl. Kontinualna fazaje smeša suncokretovog i tikvinog ulja (1:1)

Unapređenje stabilnosti emulzija sa inkapsuliranim etanolnim ekstraktom belog luka može se postići mešanjem ekstrakta sa vodenom fazom, u zapreminskom odnosu 1:1, i upotrebom emulgatora koji su se pokazali kao dobri stabilizatori V_1/U emulzionih sistema. Time se praktično formira V_1/U emulzija sa inkapsuliranim etanolnim ekstraktom belog luka (50% v/v), odnosno etanolni ekstrakt luka/voda-u-ulju emulzija (E_EV/U). Mešanje ekstrakta sa vodenim rastvorom elektrolita (0,15 M NaCl) dovodi do formiranja emulzionih sistema koji su vizuelno stabilni samo ukoliko je upotrebljeni emulgator PGPR, dok upotreba sojinog lecitina dovela je do pojave intenzivne flokulacije, za obe ispitivane koncentracije emulgatora (2 i 4% (m/m)), već nakon nekoliko časova (slika 4.14a)). Kao što se može uočiti, pri PGPR koncentraciji od 2% (m/m) nakon izvesnog vremena na dnu cilindra dolazi do izdvajanja providnog vodenog sloja intenzivne žute boje koja potiče od etanolnog ekstrakta luka, što se može sprečiti povećanjem PGPR koncentracije na 4% (slika 4.14b)) (Ilić i sar., 2015).



Slika 4.15. Uticaj tipa emulgatora i njegove koncentracije na kumulativnu raspodelu veličina kapi E_E/U emulzija. Kontinualna faza je smeša suncokretovog i tikvinog ulja (1:1)

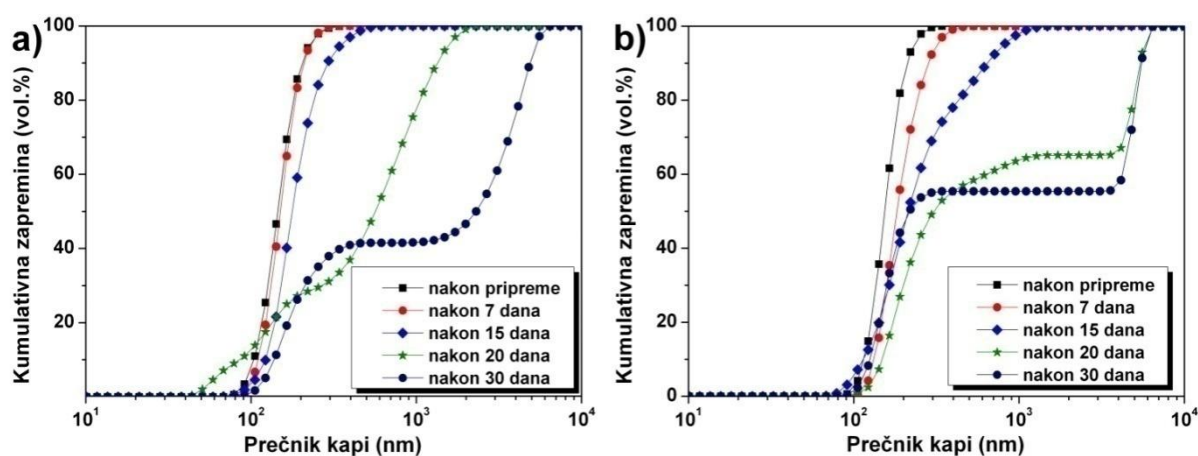
Na slici 4.16 prikazan je uticaj PGPR koncentracije i dodatka soli, na veličinu i raspodelu veličina kapi E_EV/U emulzije, po analogiji sa predhodnim istraživanjima primenjenim na ostale ispitivane emulziona sisteme. Ispitivanje uticaja dodavanja elektrolita u vodenu fazu na veličinu i raspodelu veličina kapi (slika 4.16a)), ukazuje da dodatak NaCl može uticati na poboljšanje raspodele veličina kapi E_EV/U emulzija. Naime, ukoliko je unutrašnja faza nastala mešanjem etanolnog ekstrakta belog luka i vodene faze, formirana veličina kapi je $d_{4,3} = 195,8$ nm, uz pojavu bimodalne krive raspodele i formiranja frakcije prosečnog prečnika preko $1\mu\text{m}$. Dodatak soli unutrašnjoj fazi u koncentraciji $0,075$ M smanjuje prečnik kapi do $d_{4,3} = 131,9 \pm 7,4$ nm, pri istoj koncentraciji PGPR (4% (m/m)), dok dalje povećanje koncentracije nije značajno uticalo na prečnik kapi ($d_{4,3} = 187,1 \pm 20,3$ nm). Međutim, prisustvo NaCl pri bilo kojoj koncentraciji omogućava formiranje monodisperznih emulzija.



Slika 4.16. Kumulativna raspodela veličina kapi E_EV/U emulzija sa a) dodatkom NaCl u različitim koncentracijama (4% (m/m) PGPR); b) promenom PGPR koncentracije (0,075 M NaCl). Kontinualna faza je smeša suncokretovog i tikvinog ulja (1:1)

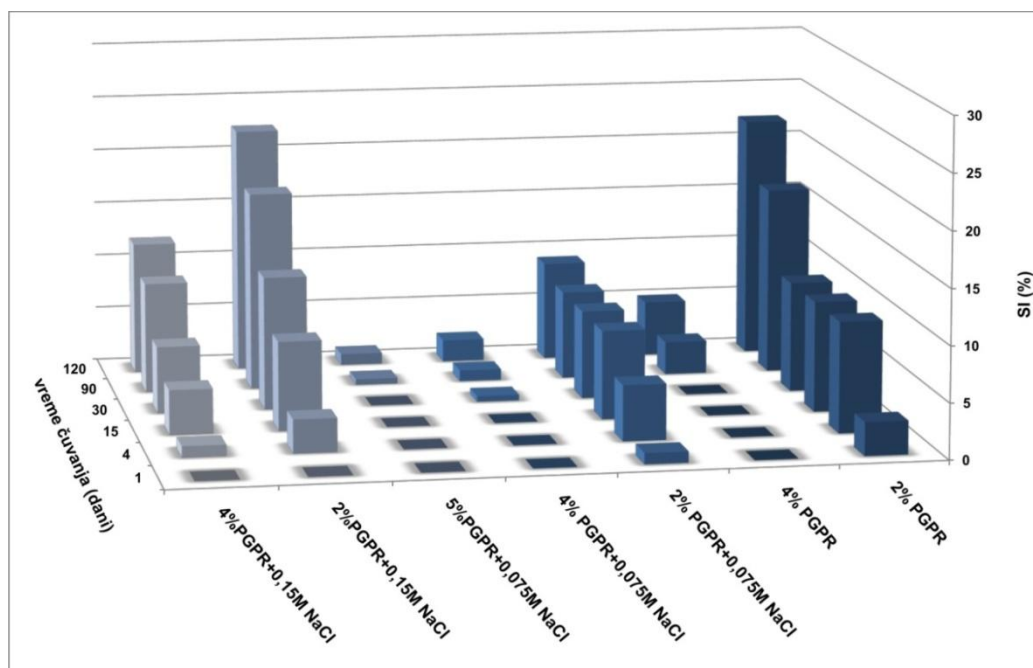
Povećanje PGPR koncentracije sa 2% na 4% (m/m), uz prisustvo lipofoba (0,075 M) (slika 4.16a)), smanjuje prečnik kapi od $311,1 \pm 19,6$ nm do $131,9 \pm 7,4$ nm, dok dalje povećanje PGPR koncentracije na 5% (m/m) ne dovodi do značajnog smanjenja prečnika kapi ($d_{4,3} = 136,6 \pm 4,65$ nm) (slika 4.16b)) (Ilić i sar., 2017).

Povećanje koncentracije soli od 0,075 M do 0,15 M, nije značajno uticalo ni na stabilnost veličina kapi formiranih E_EV/U emulzija tokom vremena, čiji uticaj je prikazan na slici 4.17. Naime, veličina i raspodela veličina kapi emulzije sa 0,075 M NaCl ostala je nepromenjena u vremenskom periodu od 15 dana čuvanja. Nakon toga dolazi do koalescencije kapi dajući bimodalnu krivu raspodele veličina (slika 4.17a)), dok je povećanje koncentracije NaCl na 0,15 M dovelo do pojave bimodalne krive raspodele u istom ispitivanom vremenskom periodu (20 dana), uz pojavu frakcije nešto većih prečnika kapi (slika 4.17b)).



Slika 4.17. Stabilnost E_EV/U emulzija tokom vremena sa: a) 0,075 M NaCl, b) 0,15 M NaCl. Kontinualna faza je smeša suncokretovog i tikvinog ulja (1:1) sa 4% (m/m) PGPR

Na slici 4.18 prikazana je kvantifikacija uticaja dodatka soli i PGPR koncentracije na sedimentacionu stabilnost E_EV/U emulzija, za posmatrani period od 4 meseca čuvanja. Utvrđen je uticaj oba pomenuta faktora na vrednost SI . Povećanje PGPR koncentracije utiče na smanjenje SI , bilo da se u unutrašnjoj vodenoj fazi nalazi elektrolit ili ne, pri čemu je uticaj najviše izražen pri koncentraciji NaCl od 0,075 M. Drugim rečima, dodatak soli u koncentraciji od 0,075 M značajno smanjuje SI za bilo koju vrednost PGPR koncentracije, dok dalje povećanje koncentracije NaCl do 0,15 M pokazuje donekle negativan uticaj na sedimentacionu stabilnost. Najstabilnija formulacija u smislu najniže vrednosti SI dobija se zajedničkim delovanjem pomenuta dva uticaja, i predstavlja E_EV/U formulaciju sa 0,075 M NaCl i dovoljnom velikom količinom PGPR, bez značajne razlike u vrednosti SI emulzija pripremljenih sa 4% ili 5% (m/m) PGPR.



Slika 4.18. Uticaj PGPR koncentracije i dodatka NaCl na sedimentacioni indeks (SI) E_EV/U emulzija

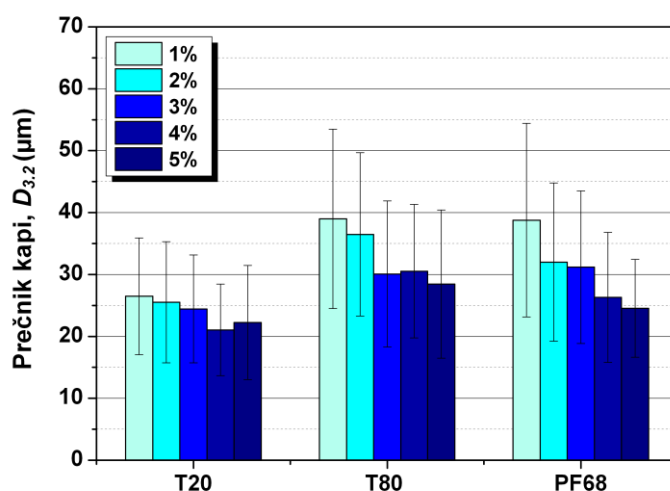
Kao rezultat istraživanja mogućnosti inkapsulacije etanolnog ekstrakta belog luka, a na osnovu prikazanih rezultata, formulacija koja izabrana za dalji rad i pripremu višestrukih emulzionih sistema je E_EV/U emulzija sa 4% (m/m) PGPR u uljanoj fazi i 0,075 M NaCl u unutrašnjoj fazi, uz korišćenje smeše tikvinog (kao sekundarne aktivne komponente) i suncokretovog ulja kao uljane faze.

4.2. Priprema višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzionih sistema

Nakon određivanja optimalnog sastava jednostrukih emulzija, pristupilo se pripremi višestrukih emulzionih sistema različitog sastava faza i odabiru optimalne formulacije, uz ispivanje uticaja inkapsuliranog ekstrakta na svojstva same višestruke emulzije. Potom je ispitana mogućnost korišćenja membranskog emulgovanja u ćeliji sa mešanjem za pripremu višestrukih emulzija sa inkapsuliranim aktivnim komponentama, a u cilju unapređenja karakteristika formiranih emulzija, u odnosu na često korišćen proces homogenizacije. U okviru ovog koraka, prikazana je i kompletna optimizacija procesnih parametara membranskog emulgovanja. Konačno, definisana je efikasnost inkapsulacije poređenjem procenata inkapsulirane aktivne materije unutar višestrukih emulzija, u zavisnosti od sastava emulzije, tipa inkapsuliranog ekstrakta i metode korišćene za pripremu emulzije.

4.2.1. Izbor hidrofilnog emulgatora za $V_1/U/V_2$ emulzione sisteme

Prvi korak pripreme višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzionih sistema podrazumeva izbor najpovoljnijeg hidrofilnog emulgatora neophodnog za stabilizaciju međupovršine između uljane kapi i spoljašnje vodene faze (V_2), koji omogućava pripremu emulzija sa minimalnim prečnikom uljanih kapi. Kako bi se utvrdilo koji od ispitivanih emulgatora pokazuje najbolja svojstva emulgovanja, na slici 4.19 prikazana je veličina kapi višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija pripremljenih uz upotrebu tri različita emulgatora: T20, T80 i PF68. Kao disperzna faza korišćena je optimalna formulacija V_1/U emulzije sa tikvinim uljem, predhodno definisana višekriterijumskom optimizacijom (smeša tikvinog i suncokretovog ulja (1:1) sa 4% (m/m) PGPR kao uljanom fazom).



Slika 4.19. Varijacija Sauterovog srednjeg prečnika kapi ($D_{3,2}$) višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija sa promenom tipa emulgatora i njegove koncentracije. Disperzna faza je V_1/U emulzija sa smešom suncokretovog i tikvinog ulja (1:1) i 4% (m/m) PGPR

Na osnovu dobijenih rezultata i poredenja prečnika kapi, izraženog kao Sauterov srednji prečnik ($D_{3,2}$), može se favorizovati T20 kao emulgator koji daje emulzije sa najmanjim prečnikom kapi, čija veličina se nalazi u intervalu od 21-26,5 μm , u zavisnosti od korišćene koncentracije samog emulgatora. Za razliku od T20, T80 pokazao je tendenciju ka formiranju nešto većih prečnika kapi, koji se smanjuju sa povećanjem koncentracije do ispitivanih 5% (m/v). Takođe, prečnik kapi $V_1/U/V_2$ emulzija pripremljenih sa PF68 zavisi od korišćene koncentracije, dajući sličan interval prečnika kapi kao i T80. Korišćenjem PF68 dobija se sličan prečnik kapi pri koncentraciji 5% ($D_{3,2} = 24,52 \pm 7,9 \mu\text{m}$), kao i sa T20, pri nešto manjim koncentracijama od 3% (m/v) ($D_{3,2} = 24,44 \pm 8,7 \mu\text{m}$). S obzirom da je isti prečnik dobijen sa manjom koncentracijom T20, on je izabran kao najpogodniji za pripremu višestrukih emulzija. Osim toga, promena prečnika višestrukih emulzija sa promenom koncentracije T20 prilično je slabo izražena, usled niske vrednosti kritične micelarne koncentracije (KMK = 0,061 mmol/l), tako da je optimalna koncentracija ovog emulgatora izabrana dodatnim praćenjem stabilnosti veličine formiranih kapi.

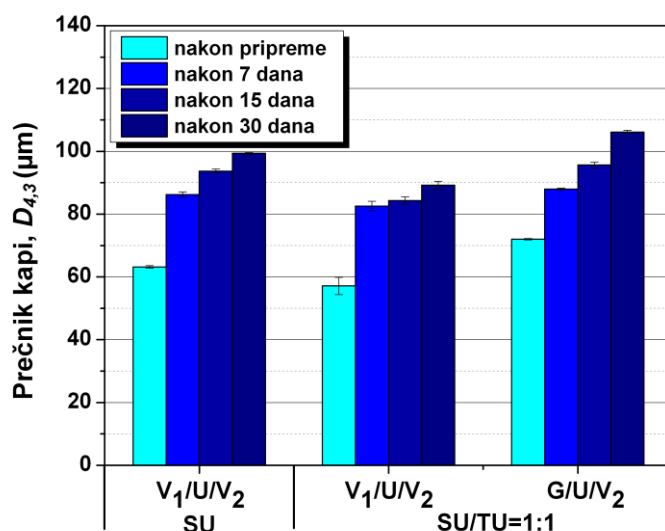
Dakle, praćenjem stabilnosti višestrukih emulzija formiranih upotrebom pomenutih emulgatora (tabela 4.4), utvrđeno je da i u pogledu stabilnosti veličine kapi ulja, može se dati blaga prednost upotrebi T20, u odnosu na ostale korišćene emulgatore (T80, PF68). Na osnovu analize prečnika praćenih tokom vremena i karakteristika opisanih u tabeli 4.4, za dalji rad izabran je T20 u koncentraciji od 2% (m/v), smatrajući navedenu koncentraciju odgovarajućom za formiranje višestrukih emulzionih sistema. Pored toga, postoji niz naučnih publikacija, kao potvrda da je navedena koncentracija T20 dovoljna za formiranje 20% emulzije, kako pri dobijanju U/V_2 (Dragosavac i sar., 2012, 2008; Matos i sar., 2013; Suárez i sar., 2014; Vladisavljević i sar., 2006b), tako i pri formiranju $V_1/U/V_2$ višestrukih emulzija (Matos i sar., 2014; Pawlik i Norton, 2012; Vladisavljević i Schubert, 2003b). Poslednjih godina postoji izražena težnja da se monomerni emulgatori zamene sa makromolekulskim ili polimernim emulgatorima, jer doprinose stabilnosti $V_1/U/V_2$ emulzija, usled manje mobilnosti na granici faza, čime doprinose boljoj pokrivenosti međupovršinskog sloja (Kanouni i sar., 2002; Pays i sar., 2001; Pays i sar., 2002). Međutim, njihova upotreba kao emulgatora u procesu direktnog membranskog emulgovanja može biti ograničena sporom adsorpcijom velikih molekula na granicu faza i/ili njihovom adsorbcijom na membransku površinu (Christov i sar., 2002), tako da se najčešće prilikom direktnog ME zadržava upotreba monomernih visoko difuzivnih emulgatora. S obzirom da je krajnji cilj ove doktorske disertacije priprema emulzija ME, uticaj makromolekulskih emulgatora na samu pripremu emulzionih sistema nije ispitivan.

Tabela 4.4. Karakteristike $V_1/U/V_2$ emulzija stabilizovanih različitim hidrofилnim emulgatorima u V_2

Emulgator	Karakteristike
T20	Kapi stabilne tokom vremena ukoliko je koncentracija emulgatora veća od 1% (m/v); blaga koalescencija kapi pri koncentraciji od 1% (m/v).
T80	Izražena koalescencija kapi pri koncentracijama manjim od 3% (m/v); delimična koalescencija pri većim koncentracijama.
PF68	Umerena koalescencija kapi pri koncentraciji manjoj od 2% (m/v); povećanje koncentracije sprečava koalescenciju; veći prosečni prečnik kapi u poređenju sa T20.

S obzirom da se navedene karakteristike odnose na $V_1/U/V_2$ emulzije sa smešom dva ulja različitih svojstava, nameće se pitanje da li tikvino ulje kao komponenta uljane faze utiče na krajnji prečnik formiranih kapi višestrukih emulzija. Naime, utvrđeno je da prisustvo površinski aktivni komponenti tikvinog ulja smanjuje međupovršinski napon, usled njihove adsorbcije na granicu faza (tabela 4.3). Pored toga, ranijim istraživanjima dokazano je da upotreba tikvinog ulja doprinosi smanjenju prečnika kapi U/V_2 emulzija u odnosu na suncokretovo ulje, kao direktna posledica manjeg dinamičkog međupovršinskog napona koji se postiže njegovim korišćenjem (Dragosavac i sar., 2008). Da bi se ovaj uticaj ispitaio, na slici 4.20 prikazana je veličina kapi višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija, izražena preko De

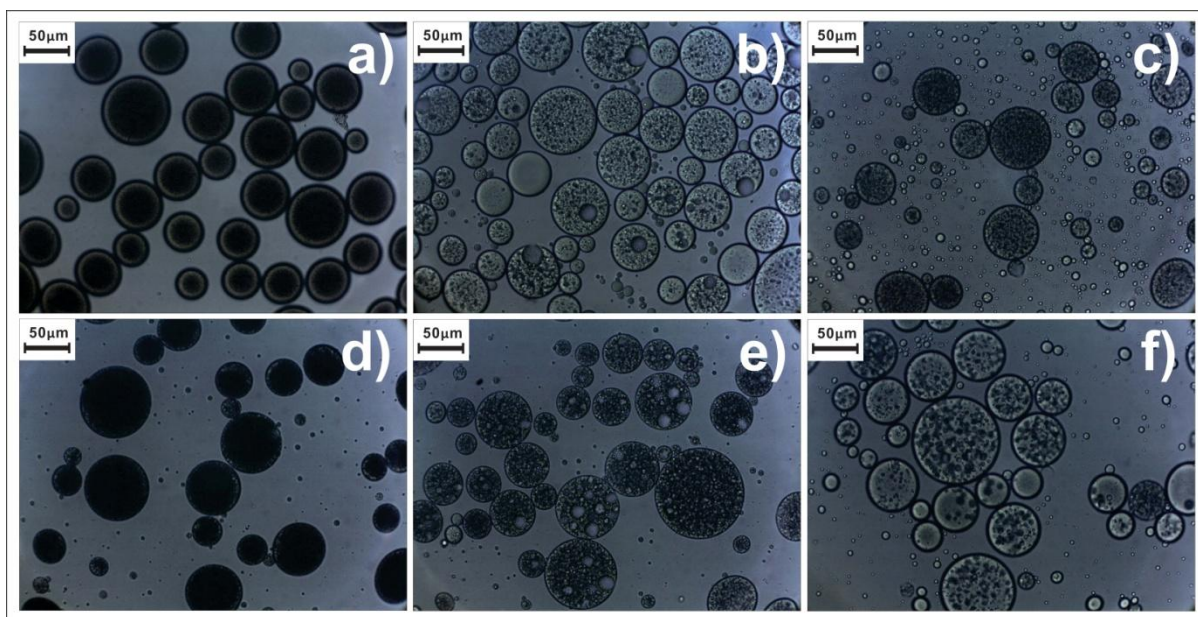
Broj srednjeg prečnika kapi ($D_{4,3}$), pripremanih sa različitim uljanim fazama. Utvrđeno je da inkapsulacija tikvinog ulja u uljanu fazu dovodi do formiranja nešto manjih kapi, verovatno kao posledica prisustva fosfolipida i drugih površinski aktivnih komponenti nerafinisanog ulja tikve, koje se mogu adsorbovati na međupovršinu i dodatno stabilizovati kapi. U tom slučaju prečnik formiranih kapi blago opada od $D_{4,3} = 63,19 \pm 0,38 \mu\text{m}$ na $D_{4,3} = 57,13 \pm 2,77 \mu\text{m}$, u odnosu na $V_1/U/V_2$ emulzije sa suncokretovim uljem. Dodavanje tikvinog ulja u kontinualnu fazu može donekle unaprediti i stabilnost formiranih emulzionih sistema. Naime, $D_{4,3}$ formiranih kapi sa suncokretovim uljem kao uljanom fazom porastao je do $99,35 \pm 0,25 \mu\text{m}$ tokom mesec dana čuvanja, dok je odgovarajući prečnik kapi koje sadrže tikvino ulje, za isti vremenski period porastao do $D_{4,3} = 89,22 \pm 1,24 \mu\text{m}$. Pored značajnih nutritivnih svojstava (Stevenson i sar., 2007), koje upotrebu tikvinog ulja favorizuje u odnosu na rafinisana ulja, prikazan skromni uticaj na veličinu kapi i stabilnost $V_1/U/V_2$ emulzija samo je dodatni razlog za njegovu upotrebu kao aktivne komponente, koja ulazi u sastav emulzionih sistema.



Slika 4.20. Promena prečnika kapi ($D_{4,3}$) višestrukih $V_1/U/V_2$ i $G/U/V_2$ emulzija sa različitim sastavom uljane faze (sa 4% (m/m) PGPR) tokom vremena. SU - uljana faza suncokretovo ulje; SU/TU – uljana faza smeša suncokretovog i tikvinog ulja u masenom odnosu 1:1. Hidrofilni emulgator - 2% (m/v) T20

Međutim, s obzirom da je utvrđeno da umrežavanje unutrašnje vodene faze, pored uticaja na stabilnost V_1/U emulzionih sistema, može da doprinese stabilnosti višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija u odnosu na emulzije samo sa vodom kao V_1 (Perez-Moral i sar., 2014), javila se potreba za poređenjem ovako umreženih sistema, sa tikvinim uljem, sa gore navedenim višestrukim $V_1/U/V_2$ emulzijama. Međutim, u slučaju kada je V_1/U emulzija dodatno stabilizovana elektrolitom, umrežavanje unutrašnje vodene faze nije pozitivno uticalo na stabilnost višestrukih emulzija (slika 4.20). Štaviše, formirane kapi ulja koje sadrže umreženu (gel) strukturu, imale su veći prečnik i nakon formiranja i nakon mesec dana čuvanja.

Promena veličine kapi, praćena optičkom mikroskopijom kroz mikroskopsku analizu višestrukih $V_1/U/V_2$ i $G/U/V_2$ emulzija koje su termički tretirane, na identičan način kao i odgovarajuće V_1/U i G/U emulzije, prikazana je na slici 4.21. Njihovim poređenjem sa fotografijama emulzija koje su fotografisane neposredno nakon pripreme, utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u veličini kapi ulja. Jedina razlika se ogleda u morfologiji unutrašnjih kapi vode unutar višestrukih emulzija, na čiju strukturu je uticaj termičkog tretmana već prikazan u poglavlju 4.1.3.



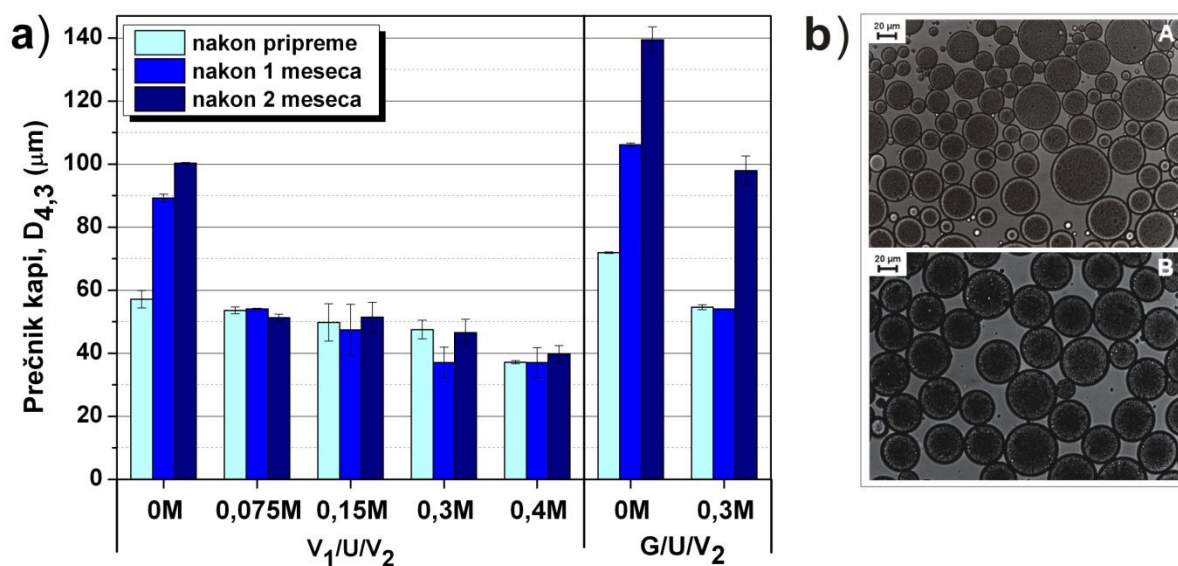
Slika 4.21. Mikrofotografije $V_1/U/V_2$ i $G/U/V_2$ višestrukih emulzija nakon pripreme i nakon termičkog tretmana: a) $V_1/U/V_2$ emulzije nakon pripreme; b) $V_1/U/V_2$ nakon zagrevanja (5 min na 100 °C); c) $V_1/U/V_2$ nakon hlađenja (24h na -20 °C); d) $G/U/V_2$ emulzije nakon pripreme; e) $G/U/V_2$ nakon zagrevanja (5 min na 100 °C); f) $G/U/V_2$ nakon hlađenja (24h na -20 °C). Hidrofilni emulgator je 2% (m/v) T20

4.2.2. Uticaj dodavanja osmotskog regulatora u spoljašnju vodenu fazu na veličinu i stabilnost $V_1/U/V_2$ emulzija

U cilju ispitivanja uticaja regulacije osmotskog pritiska između dve vodene faze na svojstva emulzionog sistema, pripremljene su četiri različite formulacije $V_1/U/V_2$ emulzija. Razlika u pojedinačnim formulacijama ogleda se u koncentraciji glukoze u spoljašnjoj vodenoj fazi (V_2), koja je korišćena kao sredstvo za regulaciju osmotskog pritiska. Odgovarajuće koncentracije glukoze u V_2 su 0,075; 0,15; 0,3 i 0,4 M, pri čemu formulacija sa 0,3 M glukoze predstavlja emulziju za izjednačenim osmotskim pritiscima u vodenim fazama.

Na slici 4.22 prikazan je uticaj gradijenta osmotskog pritiska, odnosno dodatka glukoze u V_2 , na veličinu formiranih kapi i stabilnost emulzionih sistema, ispitivanog preko promene veličine formiranih kapi tokom vremena (Frasch-Melnik i sar., 2010). Formirane

višestruke $V_1/U/V_2$ emulzije bez prisustva glukoze u V_2 (veći osmotski pritisak u unutrašnjoj vodenoj fazi) imaju najveće prečnike kapi, sa izmerenim vrednostima za $D_{4,3} = 57,13 \pm 2,77 \mu\text{m}$, dok emulzije sa najvećim sadržajem glukoze i većim osmotskim pritiskom u spoljašnjoj vodenoj fazi (0,4 M) imaju najmanje kapi sa vrednostima $D_{4,3} = 37,18 \pm 0,48 \mu\text{m}$. Smanjenje prečnika kapi sa dodatkom glukoze može se objasniti time što šećeri zapravo snižavaju međupovršinski napon u određenoj meri, u prisustvu hidrofilnog i hidrofobnog emulgatora, pri čemu je stepen tog umanjenja proporcionalan koncentraciji dodatog šećera (Pawlik i sar., 2010). Dokazano je da PGPR povećava lipofilnost saharoze čineći je površinski aktivnom komponentom (Rousset i sar., 2002), čime indirektno omogućava šećerima da utiču na smanjenje prečnika kapi emulzija.



Slika 4.22. a) Promena srednjeg prečnika kapi ($D_{4,3}$) višestrukih $V_1/U/V_2$ i $G/U/V_2$ emulzija sa dodatkom različitih koncentracija glukoze tokom vremena; b) mikrofotografije $V_1/U/V_2$ emulzije sa 0,4 M glukoze u V_2 : A - odmah nakon pripreme; B - nakon dva meseca

Pored uticaja glukoze na veličinu formiranih kapi višestrukih emulzija, dodatak glukoze utiče i na poboljšanje stabilnosti formiranih emulzija. Višestruke $V_1/U/V_2$ emulzije bez glukoze u V_2 pokazuju povećanje prečnika kapi od $D_{4,3} = 57,13 \pm 2,77 \mu\text{m}$ do $D_{4,3} = 100,36 \pm 0,2 \mu\text{m}$, za ispitivani period od dva meseca. Naime, u odsustvu glukoze u V_2 usled većeg osmotskog pritiska u unutrašnjoj vodenoj fazi (V_1), dolazi do difuzije vode iz V_2 u V_1 , koja vodi povećanju zapremine unutrašnjih vodenih kapi i „oticanja“ uljanih kapi. Dodatak glukoze smanjuje osmotski gradijent između vodenih faza, čime dovodi do smanjenja stepena difuzije i osmotskog „oticanja“ kapi, na taj način doprinoseći stabilnosti emulzija. Kao što su rezultati pokazali, sam dodatak glukoze kao aditiva u spoljašnju vodenu fazu doprinosi stabilnosti emulzionog sistema, jer se prečnik kapi svih ispitivanih formulacija vešestrukih emulzija sa glukozom u V_2 neznatno menjao tokom dva meseca čuvanja (slika 4.22a)). Potvrda izmerenih eksperimentalnih vrednosti prečnika kapi prikazana je na mikrofotografiji, koja je snimljena odmah nakon pripreme i nakon dva meseca čuvanja (slika 4.22b)), gde se takođe može uočiti da ne dolazi do značajne promene prečnika kapi tokom vremena. S druge strane, pozitivan uticaj prisustva glukoze u V_2 na prečnik kapi $G/U/V_2$

emulzija, i njihovu stabilnost, nije uočen pri dodavanju glukoze u spoljašnju vodenu fazu ovih emulzija. Naime, prečnik kapi G/U/V₂ emulzija ostao je isti u vremenskom periodu od mesec dana, dok je merenjem nakon dva meseca prečnik kapi emulzije bio udvostručen (slika 4.22a)). Prednost V₁/U/V₂ emulzija, u smislu manjeg prečnika i bolje stabilnosti veličina, u odnosu na G/U/V₂ emulzije uočena je i u formulacijama bez dodatka glukoze.

Način na koji glukoza utiče na pojedine parametre sistema, a time neposredno i na veličinu kapi višestrukih emulzija i kinetiku oslobađanja soli iz unutrašnje vodene faze, utvrđen je karakterizacijom spoljašnje vodene faze, merenjem uticaja dodavanja glukoze na viskozitet i provodljivost V₂. Nakon toga, ispitan je i uticaj dodavanja glukoze na vrednost zeta potencijala (ζ) na graničnoj površini ulje/voda, koji može ukazati na bolje razumevanje pomenutih uticaja na stabilnost formiranih kapi.

Tabela 4.5. Uticaj dodavanja T20 (2% (m/v)) i glukoze na viskozitet (μ_c) i provodljivost (k_c) spoljašnje vodene faze (V₂), i uticaj koncentracije glukoze na viskozitet V₁/U/V₂ emulzije (μ_e)

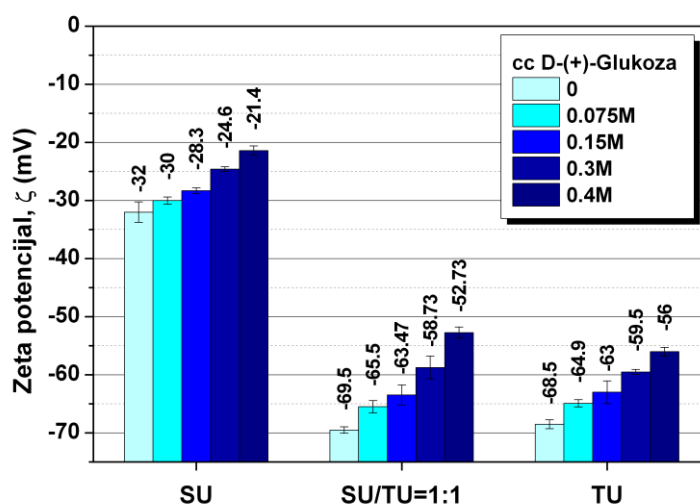
Voda	+	+	+	+	+	+	+
T20 (2%)	-	-	+	+	+	+	+
Glukoza (M)	-	0,3	-	0,075	0,15	0,3	0,4
μ_c (mPa s)	0,998	-	0,999	1,025	1,067	1,134	1,206
k_c (μ S/cm)	4,1 \pm 0,2	4,5 \pm 0,1	27,7 \pm 0,3	27,0 \pm 0,1	26,7 \pm 0,7	25,6 \pm 0,2	24,5 \pm 0,1
μ_e (mPa s)	-	-	-	3,81	3,50	3,40	3,13

Tabela 4.5 prikazuje rezultate merenja provodljivosti (k_c) i viskoziteta (μ_c) kontinualne faze višestrukih emulzija, sa promenom sastava V₂, u cilju utvrđivanja komponenti odgovornih za promenu ispitivanih veličina. Kao što se može uočiti, provodljivost demineralizovane vode slabo se menja sa dodatkom glukoze, što je donekle i očekivano, jer je glukoza nenaelektrisan molekul. Međutim, dodatak T20 kao nejonskog emulgatora doveo je do neočekivanog povećanja provodljivosti sistema. Razlog za naglo povećanje provodljivosti V₂ sa dodatkom T20 verovatno je posledica prisustva nečistoća u hemikaliji, koje doprinose provodljivosti, ili je rezultat formiranja vodoničnih veza polioksietilen lanaca T20 sa hidroksilnim grupama iz vode, koje dovode do promene naelektrisanja sistema (Hsu i Nacu, 2003). S druge strane, dodavanjem glukoze spoljašnjoj vodenoj fazi (2% (m/v) T20), provodljivost V₂ se blago smanjuje sa povećanjem koncentracije glukoze od 0,075 M do 0,4 M. Slična zapažanja i uticaj ispitivanih šećera na provodljivost V₂, pre svega fruktoze i saharoze, uočen je i od strane drugih autora (Pawlik i sar., 2010).

Slika 4.23 prikazuje uticaj dodavanja glukoze spoljašnjoj vodenoj fazi na vrednosti zeta potencijala (ζ) U/V₂ emulzionih sistema. U/V₂ emulzije pripremane su na isti način i imale su isti sastav kao i odgovarajuće V₁/U/V₂ emulzije: koncentracija hidrofilnog emulgatora je 2% (m/v), hidrofobnog emulgatora je 4% (m/m), uz dodatak istih koncentracija glukoze u V₂ (0,075; 0,15; 0,3 i 0,4 M). Pored uticaja glukoze, ispitan je i uticaj dodavanja tikvinog ulja na ζ , tako da prikazani rezultati predstavljaju rezultat merenja tri seta eksperimenata sa različitim sastavom uljane faze: suncokretovim uljem (SU), tikvinim uljem (TU) i smešom tikvinog i suncokretovog ulja u masenom odnosu 1:1 (SU/TU). Kao što se

može uočiti, vrednosti zeta potencijala se smanjuju sa povećanjem koncentracije glukoze u spoljašnjoj vodenoj fazi za sve ispitivane U/V₂ emulzije.

Pojava smanjenja zeta potencijala sa dodatkom glukoze može se objasniti na dva načina. Naime, dodatak glukoze u V₂ vezuje nečistoće i time smanjuje naelektrisanje na kapima ulja, odnosno zeta potencijal, što je zapravo i razlog smanjenja provodljivosti V₂. Drugo moguće objašnjenje je da povećanje viskoziteta spoljašnje vodene faze sa dodatkom glukoze (tabela 4.5) onemogućava efikasno merenje, odnosno dovodi do usporavanja i sprečavanja migracije naelektrisanih kapi emulzije ka elektrodama, što ima za posledicu smanjenje vrednosti zeta potencijala (Pawlik i sar., 2010).



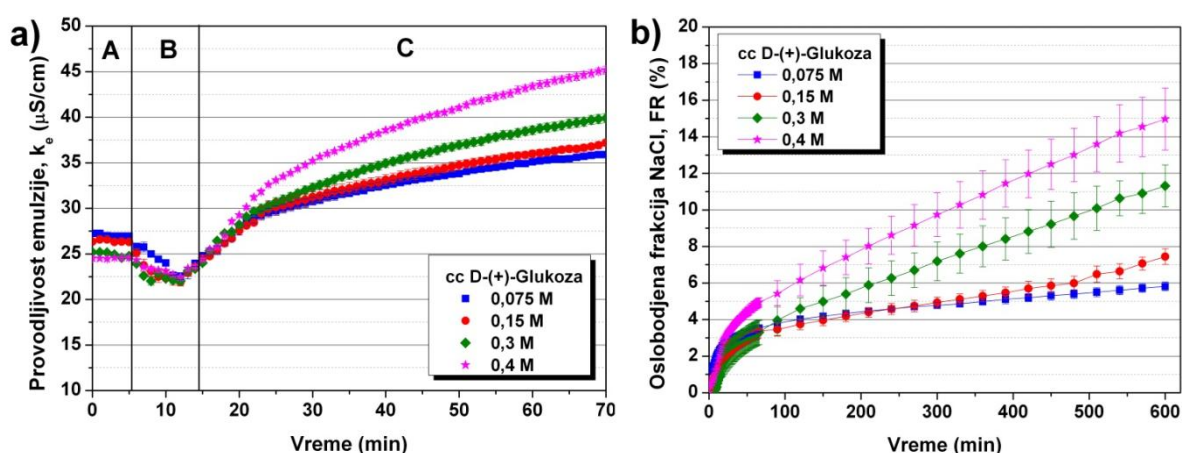
Slika 4.23. Promena zeta potencijala (ζ) U/V₂ emulzija, različitog sastava uljane faze, sa promenom koncentracije glukoze. Koncentracija PGPR je 4% (m/m). Koncentracija T20 je 2% (m/v). SU - uljana faza suncokretovo ulje; TU – uljana faza tikvino ulje; SU/TU – uljana faza smeša suncokretovog i tikvinog ulja u masenom odnosu 1:1

Upotreba tikvinog ulja kao uljane faze udvostručuje naelektrisanje na kapima ulja u poređenju sa U/V₂ emulzijama pripremljenim sa suncokretovim uljem. Uticaj tikvinog ulja na povećanje vrednosti zeta potencijala u svim ispitivanim formulacijama može doprineti stabilnosti emulzionog sistema, jer što je naelektrisanje veće sedimentaciona stabilnost kapi je veća. U odsustvu glukoze, zeta potencijal kapi tikvinog ulja u spoljašnjoj vodenoj fazi ima vrednost od $\zeta = -68,56 \pm 0,76$ mV, dok je odgovarajuća vrednost za emulziju sa suncokretovim uljem $\zeta = -32 \pm 1,76$ mV. Zeta potencijal U/V₂ emulzija pripremljenih uz korišćenje smeše ulja, koja je zapravo korišćena kao optimalna formulacija uljane faze, veoma je sličan zeta potencijalu emulzija sa samim tikvinim uljem. Slične vrednosti zeta potencijala sa 50% i 100% tikvinog ulja u uljanoj fazi U/V₂ emulzija, možda su posledica dostupnosti graničnog međupovršinskog sloja za adsorpciju komponenti tikvinog ulja. S obzirom da u sistemu postoje dva emulgatora (hidrofilni i hidrofobni), koji pokazuju tendenciju adsorpcije na granicu faza, samo određena količina površinski aktivnih komponenti tikvinog ulja može biti integrisana na granicu faza. S druge strane, afinitet prisutnih emulgatora ka granici faza nesumljivo veći od afiniteta površinskih aktivnih komponenti tikvinog ulja, tako da samo ona količina komponenti koja je dovoljna da zasiti

U/V_2 međupovršinu može biti adsorbovana. U skladu sa tim, povećanje sadržaja tikvinog ulja ne utiče dodatno na smanjenje ζ . Međutim, iako je dokazano da postoji izražen uticaj prisustva „prirodno ugrađenih“ površinski aktivnih materija tikvinog ulja na vrednosti zeta potencijala, njihov uticaj na veličinu kapi i stabilnost nije očekivano veliki. Naime, uticaj njihovog prisustva na krajnju veličinu i raspodelu veličina formiranih kapi jeste uočen, ali shodno uticaju na zeta potencijal, krajnji pozitivan ishod na smanjenje prečnika kapi nedovoljno je izražen (slika 4.20) (Ilić i sar., 2016).

4.2.3. Uticaj dodavanja osmotskog regulatora u V_2 na kinetiku oslobađanja soli iz unutrašnje vodene faze $V_1/U/V_2$ emulzija

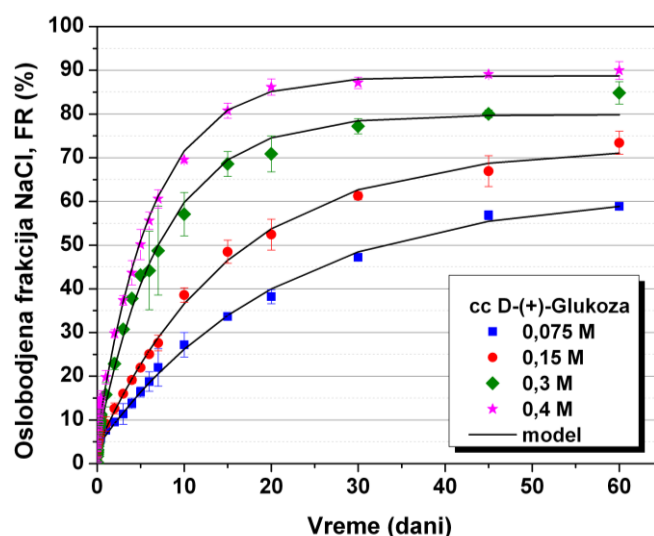
U cilju određivanja uticaja dodatka osmotskog regulatora i njegove koncentracije na kinetiku oslobađanja soli iz unutrašnje vodene faze, primenjena je konduktometrijska metoda merenja koncentracije otpuštene soli u spoljašnju vodenu fazu tokom vremena, čija procedura je opisana u poglavlju 3.2.5.4. Promena provodljivosti višestrukih emulzija sa različitim sadržajem glukoze u V_2 , tokom procesa pripreme emulzije i nakon završene homogenizacije, prikazana je na slici 4.24a). Krive provodljivosti višestrukih emulzija sličnog oblika prijavljene su i od strane drugih autora, koji su koristili isti metod ispitivanja kinetike oslobađanja soli (Pawlik i sar., 2010). Prvi deo dijagrama, označen sa A, prikazuje konstantne vrednosti provodljivosti spoljašnjih vodenih faza, neposredno pre početka homogenizacije. Drugi deo dijagrama, označen sa B, predstavlja sam proces homogenizacije. Iz ovog dela krive može se uočiti da provodljivost svih ispitivanih emulzija, k_e , u početku procesa pripreme opada, usled razblaživanja spoljašnje vodene faze disperznom fazom (V_1/U emulzija), koja zapravo ne doprinosi provodljivosti sistema, jer je vrednost provodljivosti k_d jednaka 0. Povećanje provodljivosti emulzije započinje još tokom procesa homogenizacije i nastavlja se nakon što se homogenizacija završi, što je označeno kao oblast C na slici 4.24a).



Slika 4.24. a) Krive provodljivosti višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija tokom procesa emulgovanja i b) oslobođena frakcija NaCl (FR) iz unutrašnje vodene faze $V_1/U/V_2$ emulzija, pripremljenih sa različitim koncentracijama glukoze u V_2 . Hidrofilni emulgator - 2% (m/v) T20; Hidrofobni emulgator - 4% (m/m) PGPR.

Oslobođene frakcije soli iz višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija sa različitim sadržajem glukoze u V_2 , praćene tokom procesa homogenizacije i 10h nakon pripreme, prikazane su na slici 4.24b). Očigledne razlike u pojedinačnim formulacijama uočene su već u toku prvog sata nakon homogenizacije. U slučaju kada je osmotski pritisak veći u unutrašnjoj vodenoj fazi (0,075 M glukoze u V_2), 5,81% soli iz V_1 oslobodi se u spoljašnju vodenu fazu u toku 10 h. S druge strane, znatno brže oslobađanje uočeno je u slučaju manjeg osmotskog pritiska u V_1 (0,4 M glukoze u V_2), pri čemu procenat soli koji je oslobođen iznosi 14,97% za isti ispitivani period.

Slika 4.25 prikazuje uticaj razlike osmotskog pritiska na kinetiku oslobađanja soli iz unutrašnje vodene faze višestrukih emulzija, za vremenski period od dva meseca. Može se reći da procenat zadržavanja soli u unutrašnjoj vodenoj fazi u velikoj meri zavisi od koncentracije glukoze u V_2 , i da kao što je već utvrđeno, povećanjem koncentracije glukoze povećava se i procenat soli koja se oslobodi iz unutrašnje vodene faze. Pri sadržaju glukoze od 0,4 M, merenjem već nakon 20 dana čuvanja emulzije, oslobođena frakcija iznosi 86,17%, nakon čega se oslobađanje soli značajno usporava, da bi nakon dva meseca oslobođena frakcija iznosila 89,94%. S druge strane, ukoliko je sadržaj glukoze 0,075 M, procenat oslobođene soli značajno je manji i kinetika oslobađanja je sporija. U tom slučaju, procenat oslobođene soli iznosi 58,84%, za ispitivani vremenski period od 60 dana, pri čemu je za postizanje ravnotežne koncentracije, koja je slična krajnje oslobođenoj koncentraciji, potrebno oko 45 dana.



Slika 4.25. Uticaj koncentracije glukoze u V_2 na kinetiku oslobađanja NaCl iz V_1 višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija. Hidrofilni emulgator - 2% (m/v) T20; Hidrofobni emulgator - 4% (m/m) PGPR. Crna linija predstavlja model jednačinu.

Podaci dobijeni eksperimentalnim merenjem provodljivosti opisani su matematički, korišćenjem model jednačine koja predstavlja jednostavnu eksponencijalnu korelaciju, a koja može biti korišćena za predviđanje količine oslobođene soli, FR (%), u određenom vremenskom intervalu (jednačina (4.2)):

$$FR = P_0 + (P_1 - P_0)(1 - \exp(-Kt)) \quad (4.2)$$

gde su vrednosti parametara P_0 , P_1 i K dobijene regresionom analizom eksperimentalnih podataka. Vrednosti procenjenih korelacionih parametara su date u tabeli 4.6, zajedno sa standardnom devijacijom parametara i koeficijentom determinacije (R^2). Izvedena model jednačina pokazala je dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima, i može uspešno biti korišćena za predviđanje procenta oslobođenog elektrolita iz V_1 višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija.

Tabela 4.6. Vrednosti korelacionih parametara i koeficijenta determinacije (R^2) u jednačini (4.2.)

$C_{\text{glukoza u } V_2} \text{ (M)}$	P_0	P_1	K	R^2
0,075	$3,79 \pm 0,20$	$62,03 \pm 1,19$	$0,0486 \pm 0,0022$	0,9954
0,15	$3,63 \pm 0,27$	$72,40 \pm 1,14$	$0,0652 \pm 0,0026$	0,9954
0,3	$4,47 \pm 0,48$	$79,86 \pm 1,24$	$0,1325 \pm 0,0063$	0,9926
0,4	$6,09 \pm 0,49$	$88,73 \pm 1,20$	$0,1572 \pm 0,0069$	0,9938

Kao što je već opisano u poglavlju 2.3.2.1, oslobađanje soli iz višestrukih emulzija može biti posledica razlike osmotskog pritiska, pri čemu su moguća dva mehanizma transporta hidrofilnog materijala iz unutrašnjosti emulzionog sistema: transport celokupnog sadržaja iz unutrašnje vodene faze uz pucanje tečnog filma ili molekulska difuzija/permeacija bez narušavanja strukture kapi unutrašnje vodene faze. Za drugu vrstu transporta postoji nekoliko mehanizama koji uključuju transport hidrofilnih komponenti (NaCl) inkapsuliranih u unutrašnju vodenu fazu, a koji su opisani u teorijskom delu (Bonnet i sar., 2010b; Cheng i sar., 2007; Garti, 1997). Od navedenih mogućih vidova transporta, s obzirom na izraženu hidrofilnu prirodu NaCl, mehanizam direktne difuzije soli kroz uljanu fazu, bez transporta vode, praktično je nemoguć mehanizam i može biti isključen (Wen i Papadopoulos, 2001). S druge strane, PGPR kao oligomer rastvoren u ulju nema sklonost ka asocijaciji u micelarne strukture, i češće se može naći kao pojedinačan molekul nego u obliku agregata (Orfanakis i sar., 2013), čime se isključuje mogućnost formiranja inverznih micela, kao jednog od načina transporta iz unutrašnje vodene faze. Eliminacijom predhodna dva mehanizma, pretpostavlja se da je glavni mehanizam za transport jona NaCl zapravo hidratacija/dehidratacija molekula PGPR na graničnoj površini (Nadin i sar., 2014), pri čemu je pogonska sila za transport hidratiranih molekula razlika u koncentraciji NaCl između dve vodene faze. Ovakav oblik aktivnog transporta uključuje vezivanje jona NaCl (hidrataciju) za hidrofilne delove adsorbovanog lipofilnog PGPR na V_1/U granici faza, zatim difuziju kroz uljanu fazu i dehidrataciju molekula PGPR na U/V_2 granici faza, otpuštajući transportovan materijal (jone NaCl) u spoljašnju vodenu fazu.

Međutim, konačna oslobođena frakcija soli zapravo je rezultat pojave više različitih mehanizama. S jedne strane, razlika osmotskih pritisaka između vodenih faza dovodi do transporta vode između ove dve faze, čiji smer zavisi od sastava višestruke emulzije, odnosno gradijenta osmotskog pritiska. S druge strane, hidratacija/dehidratacija molekula PGPR dodatno olakšava oslobađanje soli ka spoljašnjoj vodenoj fazi. U formulaciji $V_1/U/V_2$

emulzije sa pozitivnim osmotskim pritiskom, nasuprot ulasku vode u unutrašnju vodenu fazu i „oticanju“ uljanih kapi, transport hidratiranih molekula PGPR se odvija ka spoljašnjoj vodenoj fazi. S obzirom da je transport putem hidratiranih molekula emulgatora značajno brži od transporta spontano emulgovanih kapi (Wen i Papadopoulos, 2000), verovatno predstavlja primarni mehanizam za migraciju hidrofilnog materijala unutar sistema višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija. U slučaju formulacije sa izjednačenim osmotskim pritiscima gde ne dolazi do transporta vode, oslobođena frakcija je posledica isključivo hidratacije/dehidratacije molekula PGPR. Kada se posmatra formulacija sa negativnim osmotskim pritiskom, izmerena koncentracija soli u spoljašnjoj vodenoj fazi rezultat je oba pomenuta mehanizma, uključujući transport vode iz unutrašnje vodene faze ka spoljašnjoj, pod uticajem razlike osmotskog pritiska, i aktivnog transporta putem hidratiranih molekula PGPR. Shodno tome, kombinacija dva mehanizma dovodi do najvećeg procenta oslobođene soli, i to u slučaju formulacije sa 0,4 M glukoze u V_2 (slika 4.25).

4.2.4. Inkapsulacija ekstrakta belog luka u višestruke emulzione sisteme

Konačno, inkapsulacija ekstrakta belog luka, kao aktivne komponente, unutar višestrukih emulzionih sistema, podrazumeva emulgovanje izabranih formulacija V_E/U i $E_E V/U$ primarnih emulzija u spoljašnju vodenu fazu. Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je, pored inkapsulacije aktivne komponente, određivanje optimalnih uslova za pripremu višestrukih emulzija membranskim emulgovanjem u ćeliji sa mešanjem. Poređenjem ME sa konvencijalnom metodom pripreme višestrukih emulzionih sistema, može se favorizovati povoljnija metoda za pripremu emulzija sa inkapsuliranim ekstraktima belog luka.

4.2.4.1. Priprema višestrukih emulzija sa inkapsuliranim ekstraktima belog luka primenom homogenizera

Uticaj sastava unutrašnje vodene faze, odnosno uticaj inkapsulacije vodenog ili etanolnog ekstrakta belog luka na veličinu i raspodelu veličina formiranih kapi višestrukih emulzija prikazan je u tabeli 4.7. Kao što se može uočiti, $D_{4,3}$ emulzija sa inkapsuliranim vodenim ekstraktom belog luka iznosi $54,76 \pm 0,07 \mu\text{m}$, dok je odgovarajući prečnik sa inkapsuliranim etanolnim ekstraktom belog luka $58,81 \pm 4,52 \mu\text{m}$. Formirani prečnik višestrukih emulzija sa aktivnom komponentom u unutrašnjoj vodenoj fazi je veoma sličan veličini formiranih kapi višestrukih emulzija bez inkapsulirane aktivne komponente, čiji je prečnik $D_{4,3} = 57,13 \pm 2,77 \mu\text{m}$ (slika 4.20). Može se reći da ne postoji izražen uticaj sastava unutrašnje vodene faze na veličinu kapi višestrukih emulzija, pripremanih homogenizacijom ($N = 3600 \text{ o/min}$), pri čemu je akcenat na činjenici da inkapsulacija aktivne komponente ekstrakta belog luka u tečnom obliku ne menja osnovne karakteristike višestrukih emulzija.

Pored toga, ispitivani uticaj sastava spoljašnje vodene faze (V_2) na veličinu formiranih kapi, pripremljenih na isti način, pokazao je izvesne razlike u pojedinim formulacijama. Korišćenjem različitih osmotskih aditiva (glukoze ili NaCl) za izjednačavanje osmotskog

pritiska između dve vodene faze, može se donekle uticati na veličinu formiranih kapi. U slučaju kada je V_1 vodeni ekstrakt belog luka, najmanji prečnik dobijen je za formulaciju bez izjednačenog osmotskog pritiska ($D_{4,3} = 54,76 \pm 0,07 \mu\text{m}$). Posmatrana razlika nije značajna u odnosu na formulaciju sa glukozom u V_2 ($D_{4,3} = 58,80 \pm 2,62 \mu\text{m}$), za razliku od korišćenja NaCl kao osmotskog regulatora koji značajno povećava prečnik formiranih kapi ($D_{4,3} = 65,93 \pm 2,60 \mu\text{m}$). S druge strane, pri inkapsulaciji etanolnog ekstrakta belog luka, dobijaju se prilično drugačiji rezultati, gde je najmanji prečnih formiran u slučaju dodavanja glukoze kao osmotskog regulatora ($D_{4,3} = 39,80 \pm 0,57 \mu\text{m}$), dok su formulacije bez aditiva i sa NaCl u V_2 pokazale slične rezultate. U odnosu na višestruku $V_1/U/V_2$ emulziju bez aktivnih komponenti u svom sastavu, sa izjednačenim osmotskim pritiscima korišćenjem glukoze u V_2 , gde je dobijena vrednost za $D_{4,3} = 47,53 \pm 2,95 \mu\text{m}$ (slika 4.22a)), ubacivanje vodenog ekstrakta u njihov sastav dovodi do povećanja prečnika kapi, dok inkapsulacija etanolnog ekstrakta dovodi do smanjenja formiranih kapi.

Tabela 4.7. Veličina kapi i span različitih formulacija višestrukih emulzija sa inkapsuliranim vodenim ($V_E/U/V_2$) ili etanolnim ekstraktom belog luka ($E_EV/U/V_2$), pripremljenih sa dodatkom različitih osmotskih regulatora u V_2 , upotrebom homogenizera ($N = 3600 \text{ o/min}$; $t = 5 \text{ min}$)

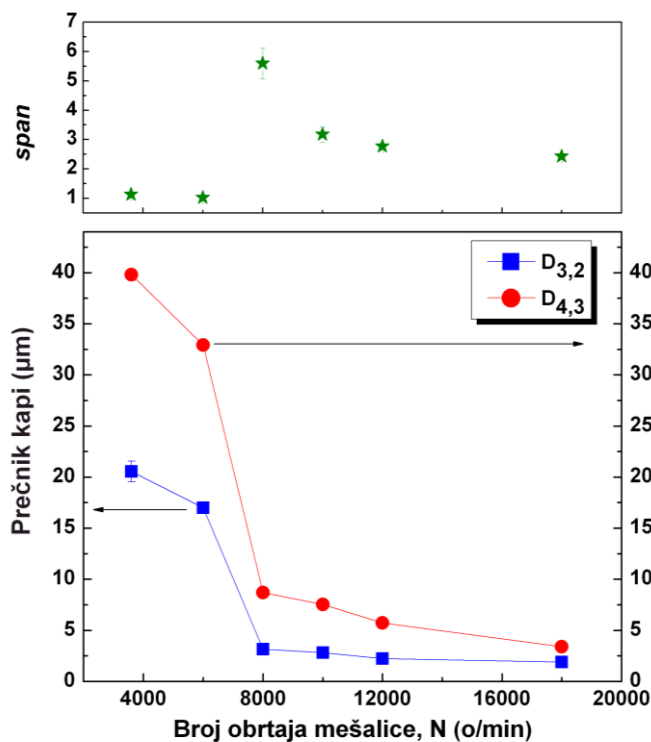
Regulator osmotskog pritiska u V_2	$V_E/U/V_2$ emulzija		$E_EV/U/V_2$ emulzija	
	$D_{4,3}$ (μm)	span (-)	$D_{4,3}$ (μm)	span (-)
Bez dodatka	$54,76 \pm 0,07$	$1,14 \pm 0,001$	$58,81 \pm 4,52$	$1,23 \pm 0,017$
D-(+)-glukoza	$58,86 \pm 2,62$	$1,14 \pm 0,020$	$39,80 \pm 0,57$	$1,13 \pm 0,031$
NaCl	$65,93 \pm 2,30$	$1,02 \pm 0,021$	$54,88 \pm 0,09$	$1,13 \pm 0,007$

Raspodela veličina kapi svih ispitivanih formulacija imala je slične *span* vrednosti, koje su veće od 1 i ukazuju na prisustvo široke raspodele veličina kapi. Ovakve *span* vrednosti su očekivane, jer pomenuti parametar u najvećoj meri zavisi od metode koja se koristi za pripremu emulzija. Potreba za poboljšanjem raspodele veličina kapi dovela je do razvoja novih metoda koji se u te svrhe mogu primenjivati, kao što su emulgovanje na mikrokanalima i membransko emulgovanje. Dakle, njihovom upotrebom se može redukovati *span* vrednost, dok homogenizacija kao metoda nije favorizovana za pripremu monodisperznih višestrukih emulzija (Leal-Calderon i sar., 2007; Muschiolik, 2007; Sugiura i sar., 2004).

4.2.4.1.1. Uticaj brzine mešanja homogenizera na veličinu formiranih kapi

Priprema višestrukih emulzija na homogenizeru i uticaj broja obrtaja mešalice na veličinu formiranih kapi i *span* vrednost prikazani su na slici 4.26. Prikazani su rezultati na primeru pripreme višestruke emulzije sa inkapsuliranim etanolnim ekstraktom belog luka ($E_EV/U/V_2$ emulzija) i glukozom kao osmotskim regulatorom u spoljašnjoj vodenoj fazi (0,15 M). Sa slike se može uočiti da povećanje brzine mešanja doprinosi smanjenju prečnika

formiranih kapi, bilo da se posmatra Sauterov srednji prečnik kapi ($D_{3,2}$) ili De Brukerov srednji prečnik kapi ($D_{4,3}$). Uticaj na smanjenje prečnika kapi je naročito izražen do vrednosti broja obrtaja mešalice oko 8000 o/min, nakon čega daljim povećanjem dolazi do smanjenja prečnika kapi, ali je uticaj brzine manje izražen. Na taj način, povećanjem broja obrtaja mešalice do 8000 o/min, $D_{4,3}$ se može smanjiti od $39,8 \pm 0,57 \mu\text{m}$ do $8,7 \pm 0,05 \mu\text{m}$, dok daljim povećanjem broja obrtaja do 18000 o/min, ova vrednost može biti smanjena čak i do $3,39 \pm 0,03 \mu\text{m}$. Međutim, s obzirom da se radi o višestrukim emulzijama, postoji velika verovatnoća da na raskidanje kapi i oslobađanje sadržaja iz unutrašnje vodene faze može da utiče, pored različitog osmotskog pritiska u fazama, i primena velike sile smicanja (Muguet i sar., 2001). Samim tim, primena velikih brzina mešanja može da smanji prečnik formiranih kapi, ali istovremeno može da dovede do curenja sadržaja unutrašnje vodene faze u spoljašnju, odnosno da smanji procenat inkapsulirane unutrašnje vodene faze unutar višestruke emulzije. S obzirom da je, kao krajnji cilj, inkapsulacija aktivne materije bitnija od smanjenja prečnika kapi, dalja priprema višestrukih emulzija se bazirala na primeni najmanjeg broja obrtaja ($N = 3600$ o/min), kako bi se isključila mogućnost ove pojave.



Slika 4.26. Uticaj broja obrtaja mešalice (N) na promenu Sauterovog ($D_{3,2}$), De Brukerovog srednjeg prečnika kapi ($D_{4,3}$) i *span* vrednosti višestrukih $V_1/U/V_2$ emulzija pripremljenih homogenizacijom ($t = 5$ min). Disperzna faza - $E_{EV/U}$ emulzija sa 4% (m/m) PGPR; V_2 - 2% (m/v) T20 sa 0,15 M glukoze; $\phi = 20\%$

S druge strane, utvrđen je i negativan uticaj povećanja broja obrtaja mešalice na raspodelu veličina formiranih kapi (slika 4.26). Naime, sa povećanjem broja obrtaja mešalice preko 8000 o/min *span* vrednost formiranih kapi je veoma velika ($span > 2,5$), što znači da su formirane emulzije izuzetno polidisperzne. Ni pri radu sa manjim brzinama mešanja, iako su

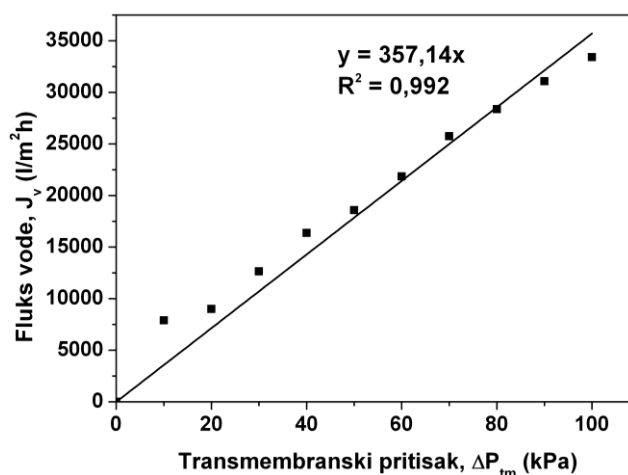
dobijene *span* vrednosti nešto niže ($span \approx 1$), ne formiraju se monodisperzne emulzije, što ukazuje na osnovni nedostatak primene ove tehnike emulgovanja pri formiranju višestrukih emulzionih sistema.

4.2.4.2. Priprema višestrukih emulzija sa inkapsuliranim ekstraktom belog luka membranskim emulgovanjem u ćeliji sa mešanjem

Priprema višestrukih emulzija membranskim emulgovanjem (ME) u ćeliji sa mešanjem, podrazumeva prevashodno određivanje optimalnih uslova procesa ME, odnosno definisanje optimalnog transmembranskog pritiska (ΔP_{tm}) i napona smicanja na površini membrane (τ), kontrolisanog promenom broja obrtaja mešalice (N). Međutim, s obzirom da je u ovoj disertaciji korišćena aparatura napravljena za potrebe istraživanja, a koja je imala za cilj primenu sinterovanog stakla kao membranskog materijala, koji se prvi put primenjuje za formiranje emulzionih sistema, neophodno je prvenstveno definisati pojedine parametre samog materijala. Karakterizacijom membranskog materijala mogu se dobiti korisne informacije od kojih će da zavise svojstva formiranih emulzija.

4.2.4.2.1. Karakterizacija membranskog materijala

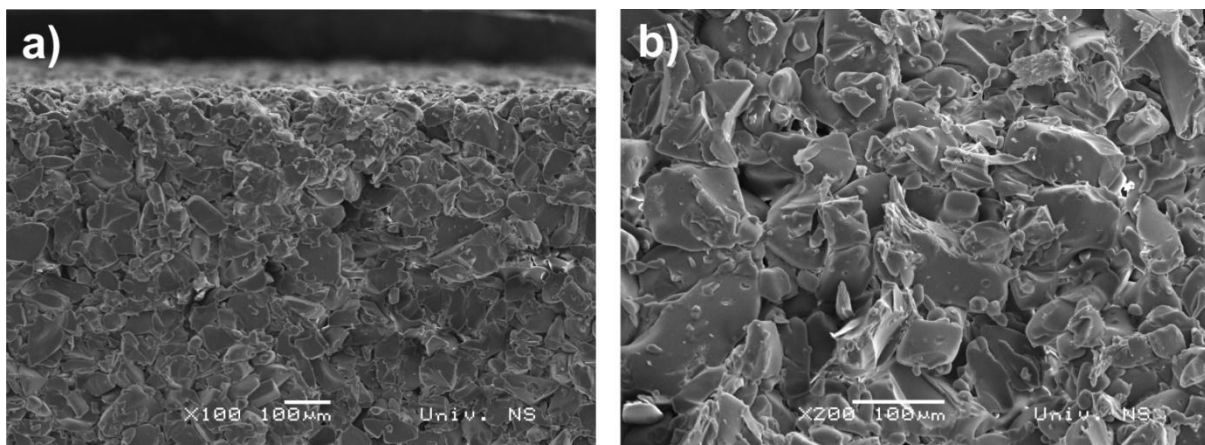
Sinterovano staklo kao medijum za formiranje emulzija, predstavlja materijal za koji ne postoje literaturni podaci da je korišćen u svrhu formiranja disperznih sistema, naročito ne za dobijanje višestrukih emulzionih sistema. Stoga, karakterizacija samog materijala može da pruži korisne informacije o samoj strukturi i mogućnosti njegove primene u procesu ME. Karakterizacija membranskog materijala najčešće podrazumeva određivanje hidrauličke otpornosti membrane (R_m), poroznosti (ϵ) i faktora tortuoznosti pora membrane (ζ), kao i definisanje oblika pora i strukture aktivne površine membrane sa koje se odvajaju kapi emulzije.



Slika 4.27. Promena fluksa vode (J_v) sa povećanjem transmembranskog pritiska (ΔP_{tm})

Postupak određivanja R_m , koji je već definisan u literaturi (Vladisavljević i sar., 2004), prvenstveno podrazumeva merenje fluksa demineralizovane vode kroz membranu u širokom intervalu pritiska. Nakon toga, prikazuje se njihova međusobna zavisnost koja je data na slici 4.27, gde se može uočiti da postoji linearna veza između J_v and ΔP_m u skladu sa literaturnim navodima, pri čemu izračunata vrednost R_m za korišćenu membranu iznosi $1,008 \cdot 10^{10} \text{ m}^{-1}$. Prečnik pora membrane određen živinom porozimetrijom iznosi $10,2 \text{ }\mu\text{m}$.

Poroznost membranskog materijala, određena živinom porozimetrijom, iznosi 0,26, što predstavlja malu vrednost u odnosu na poroznost SPG membrana koja se kreće u intervalu 0,5-0,6 u zavisnosti od prečnika pora (Vladisavljević i sar., 2004; Vladisavljević i sar., 2005; Vladisavljević i sar., 2006a), ali veoma blisku poroznosti keramičkih membrana, čija vrednost iznosi oko 0,2 (Matos i sar., 2013). Izračunata vrednost faktora tortuoznosti pora, korišćenjem jednačine koju su definisali Vladisavljević i sar. (2005) iznosi 1,45, koja se ne razlikuje značajno od faktora tortuoznosti SPG membrane ($\zeta = 1,3$), koje se u literaturi karakterišu kao membrane sa cilindričnim porama. Radi poređenja, vrednosti faktora tortuoznosti membrana koje se smatraju da imaju izuvijane pore, koje uključuju polipropilenske membrane i šuplja vlakna od polipropilena, korišćena najčešće pri procesu mikrofiltracije, nalazi se između 1,9 i 2,8 (Vladisavljević i sar., 2005).



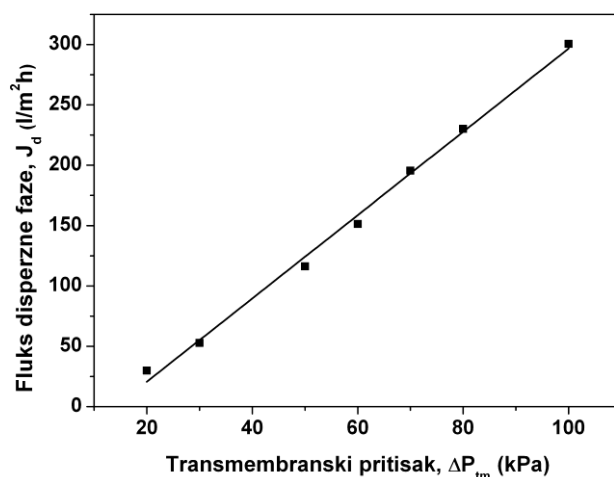
Slika 4.28. SEM mikrofografije: a) poprečnog preseka membrane; b) površinskog aktivnog sloja membrane

Oblik i dužina pora veoma su važni parametri procesa membranskog emulgovanja, jer ukazuju na vreme zadržavanja disperzne faze u porama membrane. Struktura pora membrane od sinterovanog stakla korišćene za proces ME, analizirana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Na slici 4.28 prikazana je mikrostruktura poprečnog preseka (slika 4.28a) i aktivnog sloja površine membrane (slika 4.28b)), sa kojeg se zapravo otkidaju kapi u procesu ME. Struktura membrane od sinterovanog stakla je potpuno drugačija od strukture keramičkih membrana, koje se uobičajeno primenjuju u procesima ME. Keramičke membrane imaju više slojeva različitog prečnika pora, pri čemu aktivni sloj predstavlja sloj sa najmanjim prečnikom pora (koji definiše prečnik pora membrane), koji je deponovan na jedan ili više slojeva nosača aktivnog sloja veće granulacije. Membrana od sinterovanog stakla ima nasumično raspoređene pore po celoj površini poprečnog preseka, formirane međusobnim povezivanjem čestica sinterovanog stakla odgovarajućeg prečnika. Pored toga,

sa slike 4.28b) može se uočiti da otvori pora na površini membrane, koja je zapravo odgovorna za formiranje kapi, nisu idealno kružnog oblika, koji predstavlja najpogodniji oblik za formiranje kapi. Zapravo, otvori pora nisu ni pravilnog oblika ni ujednačene veličine, što može značajno uticati na mehanizam otkidanja kapi sa površine membrane prilikom procesa emulgovanja, i na taj način i na polidisperznost formiranih emulzija (Ilić i sar., 2017).

4.2.4.2.2. Uticaj transmembranskog pritiska na veličinu i raspodelu veličina kapi

Uticaj transmembranskog pritiska (ΔP_{tm}) na srednji prečnik kapi ($D_{4,3}$) i raspodelu veličina kapi (*span*) višestrukih emulzija, ispitivan je na primeru pripreme višestrukih emulzija sa inkapsuliranim etanolnim ekstraktom belog luka ($E_E V/U/V_2$ emulzija). Transmembranski pritisak variran je u opsegu od 20 do 100 kPa, uz pretpostavku da je pritisak na samoj površini membrane (P_0), koja je u kontaktu sa kontinualnom fazom, približno jednak atmosferskom pritisku. Pri ispitivanju uticaja ΔP_{tm} na veličinu i raspodelu veličina kapi, broj obrtaja mešalice održavan je konstantnim ($N = 590$ o/min).

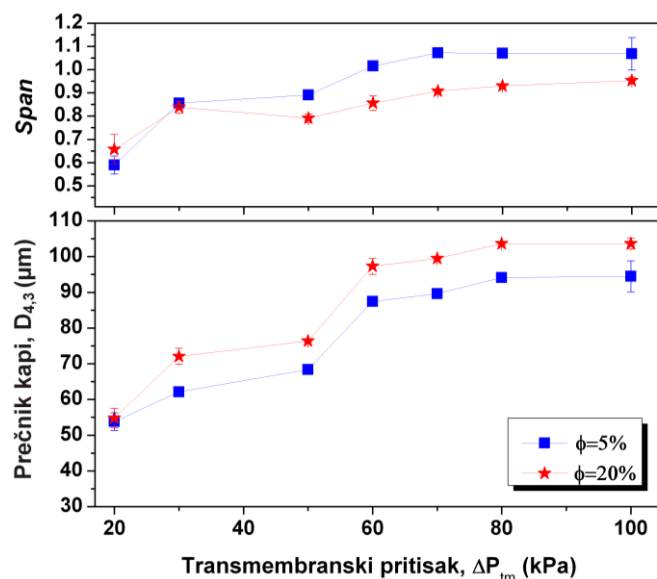


Slika 4.29. Uticaj promene transmembranskog pritiska (ΔP_{tm}) na promenu fluksa disperzne faze (J_d) kroz membranu. Disperzna faza - $E_E V/U$ emulzija

Na slici 4.29 prikazan je uticaj promene ΔP_{tm} , za ispitivani merni opseg, na promenu vrednosti fluksa disperzne faze ($E_E V/U$ emulzije) kroz membranu. Izmerene vrednosti fluksa nalaze se između 29,4 l/m²h (za najmanji ispitivani pritisak $\Delta P_{tm} = 20$ kPa) i 300,5 l/m²h (za najveći ispitivani pritisak $\Delta P_{tm} = 100$ kPa), pri čemu koeficijent korelacije linearne zavisnosti J_d od ΔP_{tm} iznosi $R^2 = 0,996$.

Uticaj promene ΔP_{tm} na veličinu i raspodelu veličina kapi višestrukih emulzija ($D_{4,3}$ i *span*), prikazan je na slici 4.30. Rezultati su prikazani za dva različita sadržaja disperzne faze (5% i 20%), a V_2 je rastvor T20 (2% (m/v)) sa 0,15 M glukoze kao osmotskim regulatorom (formulacija sa izjednačenim osmotskim pritisacima u fazama). Dobijena vrednost prečnika kapi formiranih višestrukih emulzija nalazi se između 50 i 110 μm , za ceo ispitivani opseg ΔP_{tm} . U tom slučaju, odnos D_d/D_p se nalazi između 5,03 i 8,33 u zavisnosti od primenjenog pritiska i sadržaja disperzne faze u emulziji. Najmanji prečnik kapi dobijen je pri vrednosti

transmembranskog pritiska od 20 kPa i iznosi $D_{4,3} = 53,81 \pm 2,49 \mu\text{m}$ pri sadržaju od $\phi = 5\%$, odnosno $D_{4,3} = 54,80 \pm 2,75 \mu\text{m}$ za sadržaj disperzne faze od $\phi = 20\%$. Očekivano, povećanje ΔP_{tm} dovodi do povećanja prečnika formiranih kapi.



Slika 4.30. Promena De Brukerovog srednjeg prečnika kapi ($D_{4,3}$) i span vrednosti sa promenom transmembranskog pritiska (ΔP_{tm}) višestrukih emulzija sa različitim sadržajem disperzne faze ($\phi = 5$ i 20%). Disperzna faza - E_EV/U emulzija sa 4% (m/m) PGPR; $V_2 - 2\%$ (m/v) T20 sa $0,15$ M glukoze; $N = 590$ o/min

Primenjeni transmembranski pritisak treba da bude veći od odgovarajućeg kritičnog pritiska (P_c), koji je neophodno primeniti da bi se obezbedio protok disperzne faze kroz membranu. Raniji literaturni podaci ukazuju da uticaj ΔP_{tm} na srednji prečnik kapi zavisi od napona smicanja na površini membrane i odnosa $\Delta P_{\text{tm}} / P_c$. Naime, pri vrednostima odnosa $\Delta P_{\text{tm}} / P_c > 4$, napon smicanja treba da bude dovoljno visok da obezbedi formiranje monodisperznih emulzija sa malim prečnikom kapi, dok pri vrednostima $\Delta P_{\text{tm}} / P_c < 2$ prečnik kapi veoma malo zavisi od napona smicanja (Matos i sar., 2013; Vladislavljević i Schubert, 2003a; Vladislavljević i sar., 2004). Shodno velikom prečniku pora od $10,2 \mu\text{m}$, izračunata vrednost kritičnog pritiska za membranu od sinterovanog stakla je veoma mala i iznosi $1,5$ kPa, pri čemu za vrednosti primenjenog pritiska daje odnos $\Delta P_{\text{tm}} / P_c$ koji je veći od 4. Samim tim, postoje jasne naznake da veličina i raspodela veličina kapi zavise od primenjenog napona smicanja, koji mora biti dovoljno visok kako bi se formirale monodisperzne emulzije (Ilić i sar., 2017). Uticaj napona smicanja će biti dodatno ispitan i prikazan u narednom poglavlju.

Negativan uticaj povećanja ΔP_{tm} na veličinu i raspodelu veličina kapi (slika 4.30), može se dovesti u vezu sa udelom aktivnih pora (K) na membrani i maksimalno dozvoljenim udelom aktivnih pora (K_{max}). Naime, udeo aktivnih pora treba da bude manji od maksimalno dozvoljene vrednosti, kako bi se sprečila pojava koalescencije i spajanje kapi na samoj membranskoj površini još pre njihovog otkidanja, odnosno sprečilo napajanje jedne kapi iz više pora (Matos i sar., 2013; Vladislavljević i Schubert, 2002). Međutim, karakteristike samog membranskog materijala korišćenog u ovom radu ne omogućavaju ispunjavanje ovog

kriterijuma. Izračunate vrednosti za K_{\max} ukazuju da udeo aktivnih pora treba da bude manji od 11,9% i 4,4%, za ispitivani opseg ΔP_{tm} od 20 do 100 kPa, dok se odgovarajuće vrednosti za K nalaze između 49 i 99%, za iste vrednosti pritiska. Ovakva istraživanja ukazuju na činjenicu da se kapi višestruke emulzije prilikom formiranja u ćeliji sa mešanjem verovatno napajaju iz više pora istovremeno, čemu doprinose i same performanse površine membranskog materijala i nepravilni otvori pora, koje su prikazane u prethodnom poglavlju na slici 4.28. Što je transmembranski pritisak veći i odnos K/K_{\max} ima veću vrednost, dovodeći do napajanja kapi iz sve većeg broja pora, odnosno intenzivnije koalescencije na membranskoj površini (Ilić i sar., 2017).

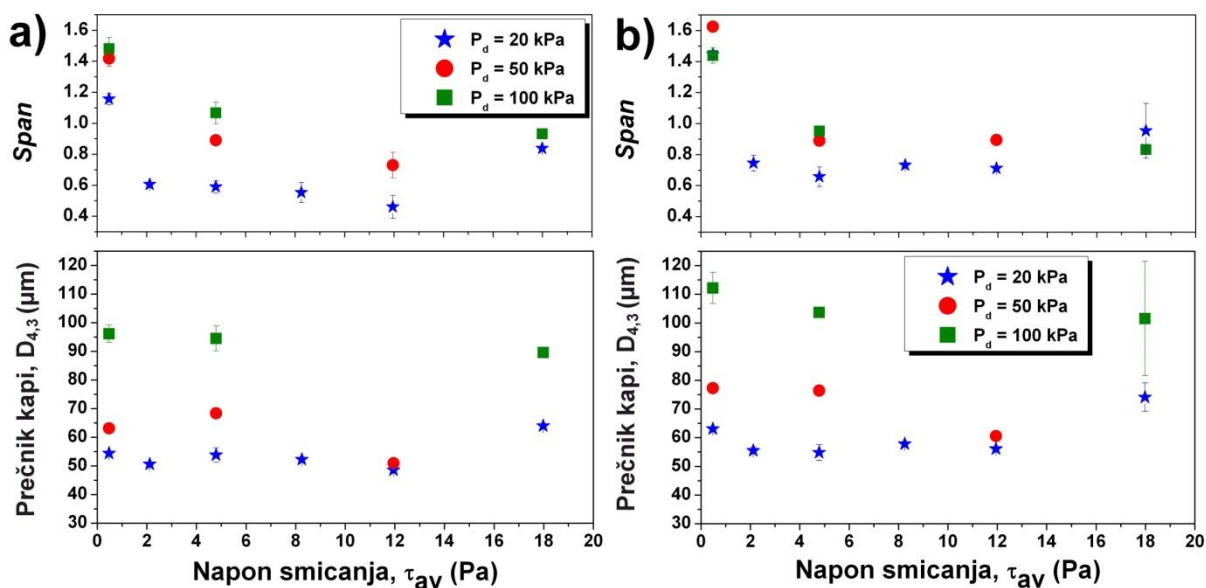
Sa slike 4.30 može biti uočeno da se najuniformnije kapi dobijaju pri vrednosti ΔP_{tm} od 20 kPa ($J_d = 29,44 \text{ l/m}^2\text{h}$). Za ispitivani transmembranski pritisak dobijene *span* vrednosti su $0,59 \pm 0,047$ pri sadržaju disperzne faze od $\varphi = 5\%$ i $0,66 \pm 0,06$ za $\varphi = 20\%$. Rezultati su pokazali da, i pored činjenice koja se navodi u literaturi da se monodisperzne emulzije ne mogu dobiti ukoliko postoji koalescencija kapi na membranskoj površini (Matos i sar., 2013), čak i u slučaju kada dođe do pojave napajanja jedne kapi iz više pora membrane, *span* vrednosti mogu biti na zadovoljavajućem nivou. Naime, prilikom pripreme U/V₂ emulzija od strane drugih autora, membranskim emulgovanjem uz korišćenje keramičkih membrana u ćeliji sa mešanjem (prečnika pora 0,45 i 0,8 μm), dobijene su kapi sa sličnim *span* vrednostima (*span* = 0,58). Dobijene *span* vrednosti formirane su pri nešto višim vrednostima fluksa (od 30,8 $\text{l/m}^2\text{h}$ do 49 $\text{l/m}^2\text{h}$ u zavisnosti od korišćene membrane) i u odsustvu koalescencije na površini membrane, pri čemu su ovakve emulzije zapravo okarakterisane kao monodisperzne emulzije (Matos i sar., 2013). Upotrebom sinterovanog stakla implementiranog u ćeliji sa mešanjem, mogu se formirati višestruke emulzije sa *span* vrednostima od 0,59 koje se, prema rezultatima prikazanim u literaturi, mogu smatrati monodisperznim sistemima.

4.2.4.2.3. Uticaj napona smicanja na površini membrane na veličinu i raspodelu veličina kapi

Napon smicanja duž površine membrane nije konstantan, već se menja u odnosu na osu rotacije, na način na koji je prikazan u poglavlju 3.2.5.1 (slika 3.3), dok je njegova prosečna vrednost (τ_{av}) izračunata na osnovu jednačine (3.9). U opsegu ispitivanih brojeva obrtaja mešalice (140-1400 o/min), odgovarajuća vrednost napona smicanja nalazi se u intervalu od 0,49 do 18,29 Pa.

Slika 4.31 definiše uticaj napona smicanja na srednji prečnik i raspodelu veličina kapi višestrukih emulzija, prikazanog za tri različite vrednosti transmembranskog pritiska i različit sadržaj disperzne faze. Za konstantnu ispitivanu vrednost fluksa disperzne faze od $J_d = 29,44 \text{ l/m}^2\text{h}$ ($\Delta P_{\text{tm}} = 20 \text{ kPa}$), što je pritisak koji omogućava formiranje najmanjeg prečnika kapi i *span* vrednosti, povećanje napona smicanja od 0,49 do 2,16 Pa, dovodi do veoma malih promena u prečniku formiranih kapi (slika 4.31a)). Pomenuti uticaj više je izražen za veći sadržaj disperzne faze (slika 4.31b)). Povećanje napona smicanja do 12,15 Pa ne utiče u značajnoj meri na prečnik formiranih kapi. Veoma velika vrednost napona smicanja ($\tau_{\text{av}} = 18,29 \text{ Pa}$) negativno utiče na $D_{4,3}$, ukazujući na mogućnost koalescencije kapi

izazvane velikim brzinama mešanja, koje može biti posledica koalescencije kapi usled njihovog međusobnog kontakta i sudaranja izazvanog intenzivnom turbulencijom u sudu.



Slika 4.31. Promena De Brukerovog srednjeg prečnika kapi ($D_{4,3}$) i span vrednosti sa promenom lokalnog napona smicanja (τ_{av}) na površini membrane višestrukih emulzija sa različitim sadržajem disperzne faze: a) $\phi = 5\%$; b) $\phi = 20\%$. Disperzna faza - $E_E V/U$ emulzija 4% (m/m) PGPR; V_2 - 2% (m/v) T20 sa 0,15 M glukoze

Očekivano, *span* vrednosti u velikoj meri zavise od primenjenog napona smicanja na površini membrane (slika 4.31). Za ispitivani opseg τ_{av} , kao što može biti uočeno, ne mogu se favorizovati veoma niske i veoma visoke vrednosti napona smicanja. Drugim rečima, najniže *span* vrednosti dobijene su u oblasti napona smicanja 2-12 Pa, dok je najuža kriva raspodele veličina dobijena pri $\tau_{av} = 12,15$ Pa i $\Delta P_{tm} = 20$ kPa (*span* = $0,46 \pm 0,07$) (slika 4.31a)). Povećanjem sadržaja disperzne faze dolazi do povećanja i polidisperznosti sistema (slika 4.31b)). Međutim, pri sadržaju $E_E V/U$ emulzije od 20%, minimalna *span* vrednost se postiže pri nešto nižoj vrednosti napona smicanja ($\tau_{av} = 4,88$ Pa), i iznosi $0,66 \pm 0,06$.

Uzimajući u obzir uticaj napona smicanja i na veličinu i na raspodelu veličina kapi u celom opsegu ispitivanog sadržaja disperzne faze, kao i njegov relativno mali uticaj pri vrednostima napona smicanja u opsegu vrednosti 2-12 Pa, napon smicanja od $\tau_{av} = 12,15$ Pa može se smatrati najpogodnijom vrednošću. Pri ovoj vrednosti τ_{av} dobijene *span* vrednosti su 0,46; 0,62; 0,69 i 0,71 za sadržaj disperzne faze 5, 10, 15 i 20%, redom. Pored toga, ukoliko je napon smicanja na površini membrane dovoljno visok (optimalan), može se uočiti da je prečnik kapi prilično nezavisan od primenjenog pritiska, odnosno odnosa $\Delta P_{tm} / P_c$, što je donekle u skladu sa ranijim literaturnim navodima (Vladislavljević i Schubert, 2003a; Vladislavljević i sar., 2004).

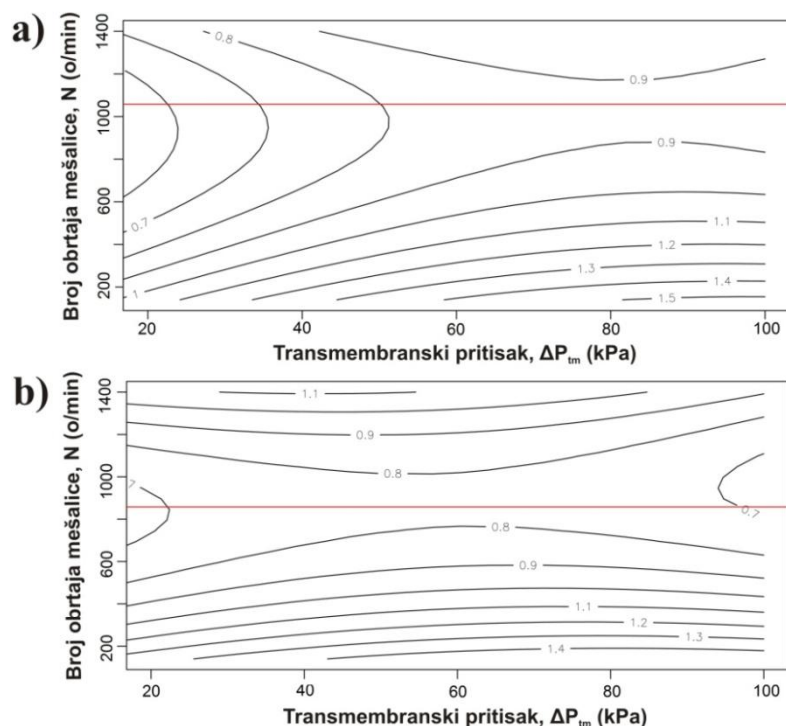
Međutim, ono što nije u skladu sa literaturom je veza između srednjeg prečnika kapi i napona smicanja, pri čemu prema drugim autorima $D_{4,3}$ obično opada naglo sa povećanjem napona smicanja, sve do postizanja maksimalne vrednosti napona smicanja, dok dalje povećanje nema značajnog uticaja na veličinu kapi. Ovakva istraživanja se najčešće vezuju za

uticaj napona smicanja na smanjenje veličine kapi U/V_2 emulzije, koja je formirana na cevnim Al_2O_3 membranama u unakrsnom režimu rada, i u velikoj meri zavisi od veličine pora, pri čemu je pomenuti uticaj izraženiji ukoliko su veličine pora membrane manjeg prečnika (Schröder i Schubert, 1999). U slučaju pripreme U/V_2 emulzije ME u ćeliji sa mešanjem, uz upotrebu metalnih membrana, prikazan je izražen uticaj povećanja broja obrtaja mešalice na smanjenje prečnika kapi. Naime, pri sličnom opsegu broja obrtaja mešalice ($N = 230-1330$ o/min), primećen je uticaj na smanjenje prečnika kapi u celokupnom opsegu ispitivanih brzina, bez obzira da li su pomenute metalne membrane korišćene za pripremu U/V_2 ili $V_1/U/V_2$ emulzionih sistema (Dragosavac i sar., 2012, 2008). Ovakvo izražen uticaj nije u skladu sa prikazanim rezultatima, gde se sa slike 4.31 može uočiti blagi, ali ne u velikoj meri izražen uticaj napona smicanja na smanjenje prečnika kapi. Razlike koje su dobijene u odnosu na već objavljena istraživanja, verovatno su posledica različitih performansi membranskog materijala koji je korišćen u procesu pripreme emulzija, i manje verovatno posledica razlike u formulaciji iste.

4.2.4.2.4. Optimizacija procesa membranskog emulgovanja u ćeliji sa mešanjem

Osnovni cilj procesa optimizacije ME je definisanje optimalne formulacije višestruke emulzije sa kapima što manjeg prečnika i uske raspodele veličina (niska *span* vrednost), koja se dobija pri maksimalnoj vrednosti fluksa disperzne faze, kako bi proces membranskog emulgovanja imao veću efikasnost, a formulacija višestruke emulzije imala zadovoljavajući kvalitet. Ispitivani opseg variranih promenljivih, koji je obuhvaćen optimizacijom, nalazi se u granicama $N = 140-1400$ o/min i $\Delta P_{tm} = 20-100$ kPa ($J_d = 29-300$ l/m²h). Izračunata vrednost Re broja za ispitivani opseg broja obrtaja mešalice, nalazi se u intervalu od 4268 do 42684. Za definisani opseg variranih parametara, eksperimentalno dobijene *span* vrednosti nalazile su se u intervalu od 0,46 do 1,62 i Sauterov srednji prečnik kapi, $D_{3,2}$, od 45 do 78 μ m.

Konturni dijagrami zavisnosti *span* vrednosti od variranih parametara (N i ΔP_{tm}), konstruisani za različit sadržaj primarne ($E_E V/U$) emulzije u višestrukome emulzionome sistemu ($\varphi = 5\%$ i $\varphi = 20\%$), prikazani su na slici 4.32, dok su odgovarajuće vrednosti regresionih koeficijenata dobijenih metodom odzivne površine, koeficijenti varijacije i odgovarajuće p vrednosti definisane u tabeli 4.8. Kao što je i ranije prikazano, a statistički potvrđeno, pri malim vrednostima broja obrtaja mešalice *span* vrednost opada sa povećanjem brzine mešanja, dok pri većim brojevima obrtaja mešalice dešava se suprotan uticaj na raspodelu veličina kapi, odnosno *span* vrednosti se povećavaju sa povećanjem brzine mešanja. Dobijeni konturni dijagrami definišu prevojne tačke korišćene funkcije, a s obzirom da se iste *span* vrednosti mogu dobiti za nekoliko kombinacija variranih parametara, to može dodatno otežati postupak optimizacije.



Slika 4.32. Konturni dijagrami međusobnog uticaja ispitivanih parametara (N i ΔP_{tm}) na $span$ vrednost za: a) $\varphi = 5\%$ i b) $\varphi = 20\%$ $E_E V/U$ emulzije u višestrukoj emulziji

Na osnovu statistički dobijenih regresionih koeficijenata (tabela 4.8) uočene su male razlike između njihovih vrednosti za različite koncentracije disperzne faze u emulziji. Njihova mala razlika se može povezati sa prirodom upotrebljene model jednačine (uslovi prvog i drugog reda mogu uticati jedni na druge), kao i sa neznatnim promenama svojstava samog sistema (npr. viskoziteta) sa promenom koncentracije. Vrednosti odsečka (β_0) se mogu tumačiti kao polazna tačka za poređenje $span$ vrednosti, a čija je brojna vrednost posledica uticaja mnogih faktora koji nisu uključeni u proces optimizacije, kao što su karakteristike same membrane (poroznost, permeabilnost), međupovršinski napon, kao i prisustva komponenti u emulzionom sistemu koje mogu uticati na $span$ vrednost. Veća vrednost koeficijenta β_0 za emulziju sa većom koncentracijom ($\varphi = 20\%$), može da ukazuje na to da pri dovoljno velikoj koncentraciji $E_E V/U$ emulzije, usled gušće raspodele kapi u masi višestruke emulzije i njihovog neposrednog kontakta, a kao rezultat slučajnog sudara, dolazi do njihove međusobne koalescencije, što doprinosi $span$ vrednosti (Nikolovski i sar., 2018).

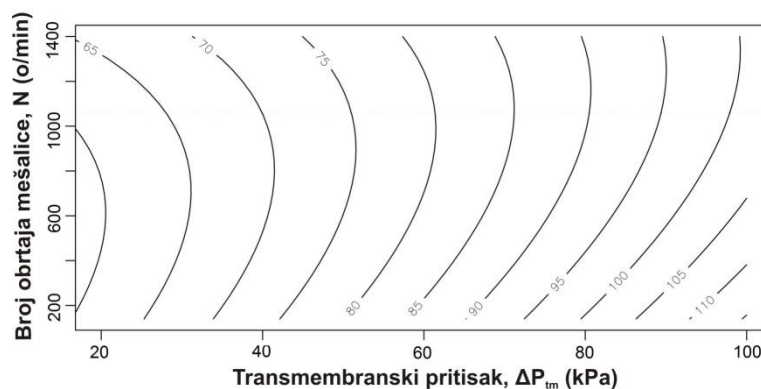
Stacionarna tačka dobijena optimizacijom (koja definiše minimalnu $span$ vrednost) nalazi se pri $\Delta P_{tm} = 83,57$ kPa i $N = 1025,92$ o/min za $\varphi = 5\%$, odnosno $\Delta P_{tm} = 58,24$ kPa i $N = 889,81$ o/min za $\varphi = 20\%$. Pri većim vrednostima Reynoldsovog broja ($Re > 32\ 000$, prikazan crvenom linijom na dijagramu 4.32a)), sile smicanja koje deluju na kap postaju dominantne, tako da svojstva emulgatora na međupovršini nisu dovoljno snažna da im se suprotstave i spreče koalescenciju kapi, što za posledicu ima širenje raspodele veličina kapi. Optimalna brzina mešanja manja je za emulziju sa koncentracijom 20% nego za emulziju sa koncentracijom od 5%. Ovo može biti objašnjeno blagim porastom viskoziteta emulzije sa povećanjem sadržaja primarne emulzije, što ima direktan uticaj na vrednost Re , pa se

stacionarna tačka pomera ka nižim vrednostima Re broja ($Re \approx 27\ 000$, prikazana crvena linija na dijagramu 4.32b)).

Tabela 4.8. Vrednosti regresionih koeficijenata, R^2 i p parametara, dobijenih prilikom predviđanja odziva span vrednosti višestrukih emulzija sa 5% i 20% disperzne faze

φ (%)	5		20	
R^2	0,905		0,826	
p	$3,224 \cdot 10^{-6}$		$1,658 \cdot 10^{-4}$	
	Koeficijent, β	p	Koeficijent, β	p
Odsečak	$9,616 \cdot 10^{-1}$	$1,083 \cdot 10^{-5}$	1,334	$4,972 \cdot 10^{-6}$
ΔP_{tm} (kPa) (X_1)	$1,552 \cdot 10^{-2}$	$2,800 \cdot 10^{-3}$	$1,033 \cdot 10^{-2}$	$7,993 \cdot 10^{-2}$
N (o/min) (X_2)	$-1,417 \cdot 10^{-3}$	$1,491 \cdot 10^{-4}$	$-1,920 \cdot 10^{-3}$	$9,350 \cdot 10^{-5}$
$X_1 \cdot X_2$	$-2,494 \cdot 10^{-6}$	$2,292 \cdot 10^{-1}$	$-3,836 \cdot 10^{-6}$	$1,558 \cdot 10^{-1}$
X_1^2	$-7,755 \cdot 10^{-5}$	$5,233 \cdot 10^{-2}$	$-5,941 \cdot 10^{-3}$	$2,264 \cdot 10^{-1}$
X_2^2	$7,924 \cdot 10^{-7}$	$2,704 \cdot 10^{-4}$	$1,205 \cdot 10^{-6}$	$5,881 \cdot 10^{-5}$

Konturni dijagrami uticaja parametara (N i ΔP_{tm}) na vrednost Sauterovog srednjeg prečnika kapi prikazani su na slici 4.33, dok su odgovarajuće vrednosti regresionih koeficijenata, koeficijenta determinacije, R^2 , i p faktora definisane u tabeli 4.9.



Slika 4.33. Konturni dijagram međusobnog uticaja ispitivanih parametara (N i ΔP_{tm}) na Sauterov srednji prečnik kapi, $D_{3,2}$ (μm). $\varphi = 20\%$ (v/v)

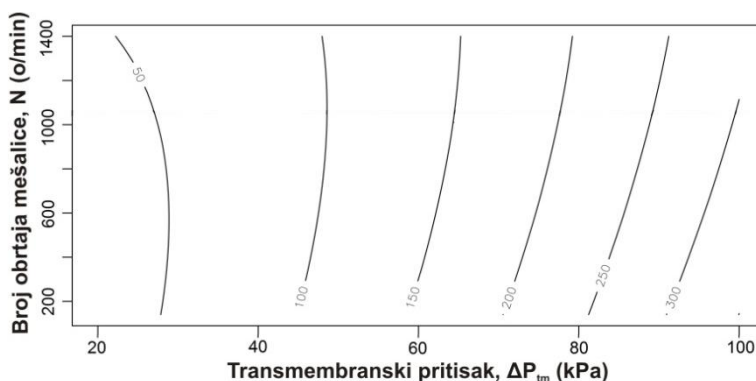
Na osnovu vrednosti regresionih koeficijenata (tabela 4.9), može se primetiti najizraženiji uticaj odsečka (β_0) na veličinu formiranih kapi, ukazujući na to da osnovni parametri sistema (veličina pora, permeabilnost membrane i druge karakteristike membranskog materijala) definišu red veličina kapi, odnosno ispoljavaju najveći uticaj na vrednost $D_{3,2}$. Kao što je već ranije opisano, a optimizacijom i potvrđeno preko vrednosti regresionih koeficijenata, transmembranski pritisak pokazuje izraženiji uticaj na prečnik formiranih kapi od brzine mešanja (veće vrednosti regresionih koeficijenata za uticaj ΔP_{tm} u

odnosu na N). Negativan uticaj povećanja ΔP_{tm} na dobijanje kapi minimalnog prečnika (pozitivan predznak ispred vrednosti regresinih koeficijenata koje definišu dati uticaj), povezan je sa odgovarajućim povećanjem odnosa K / K_{max} , odnosno činjenicom da na većim pritiscima shodno povećanju broja aktivnih pora, smanjuje se njihovo međusobno rastojanje, što doprinosi koalescenciji na samoj površini membrane (Ilić i sar., 2017; Nikolovski i sar., 2018). Pored toga, povećanje pritiska doprinosi formiranju krupnih kapi na samoj površini membrane, jer se zapravo mali prečnici kapi formiraju u uslovima niskog pritiska, dok se najmanji prečnici kapi dobijaju u slučaju kada je pritisak nešto veći od kritičnog (Hancocks, 2011). Brzina mešanja pokazuje različit uticaj na prečnik kapi u zavisnosti od Re broja, na sličan način kao i na raspodelu veličina kapi (*span*).

Tabela 4.9. Vrednosti regresionih koeficijenata, R^2 i p parametara, dobijenih prilikom predviđanja odziva Sauterovog srednjeg prečnika kapi, $D_{3,2}$, višestrukih emulzija sa 5% i 20% disperzne faze

φ (%)	5		20	
R^2	0,892		0,900	
p	$7,126 \cdot 10^{-6}$		$4,535 \cdot 10^{-6}$	
	Koeficijent, β	p	Koeficijent, β	p
Odsečak	52,021	$1,910 \cdot 10^{-5}$	52,484	$5,728 \cdot 10^{-5}$
ΔP_{tm} (kPa) (X_1)	$2,092 \cdot 10^{-1}$	$4,020 \cdot 10^{-1}$	$5,262 \cdot 10^{-1}$	$7,522 \cdot 10^{-2}$
N (o/min) (X_2)	$-7,797 \cdot 10^{-3}$	$6,200 \cdot 10^{-1}$	$-8,799 \cdot 10^{-3}$	$6,196 \cdot 10^{-1}$
$X_1 \cdot X_2$	$-1,546 \cdot 10^{-4}$	$1,945 \cdot 10^{-1}$	$-1,905 \cdot 10^{-4}$	$1,586 \cdot 10^{-1}$
X_1^2	$3,256 \cdot 10^{-3}$	$1,408 \cdot 10^{-1}$	$1,401 \cdot 10^{-3}$	$5,598 \cdot 10^{-1}$
X_2^2	$7,738 \cdot 10^{-6}$	$4,140 \cdot 10^{-1}$	$1,037 \cdot 10^{-5}$	$3,339 \cdot 10^{-1}$

Poslednji uticaj koji je obuhvaćen optimizacijom uključuje analizu uticaja variranih parametara na fluks disperzne faze, J_d . Povećanje fluksa je proporcionalno povećanju pritiska (slika 4.29), dok drugi varirani parametar (N) pokazuje veoma mali pozitivan uticaj na promenu fluksa disperzne faze. Razlika između uticaja ova dva parametra se jasno može uočiti na osnovu konturnog dijagrama prikazanog na slici 4.34. Još bolja potvrda značajno izraženijeg uticaja transmembranskog pritiska od broja obrtaja mešalice na J_d je veća vrednost koeficijenta β (1,439 u odnosu na 0,004957) i manja vrednost p parametra (0,04513 u odnosu na 0,9063) za pomenuti uticaj (tabela 4.10).



Slika 4.34. Konturni dijagram međusobnog uticaja ispitivanih parametara (N i ΔP_{tm}) na fluks disperzne faze, J_d (l/m^2h). $\varphi = 20\%$ (v/v)

Pored toga, negativna vrednost odsečka, data u tabeli 4.10, ukazuje na negativan uticaj drugih parametara procesa koji nisu obuhvaćeni optimizacijom (karakteristika samog membranskog materijala) na dobijenu vrednost fluksa disperzne faze. Kao što je već poznato, da bi se proces emulgovanja mogao nesmetano izvoditi mora biti savladan otpor same membrane. Minimalni pritisak koji treba primeniti u svrhu savladavanja samog otpora membrane zapravo približno bi trebalo da odgovara vrednosti odsečka (5 kPa). Ispod ove vrednosti transmembranskog pritiska ne bi trebalo da dolazi do protoka emulzije kroz pore membrane. Iako je izračunata vrednost P_c iznosila 1,5 kPa, pri proračunu su uvedene izvesne pretpostavke koje mogu da utiču na izračunatu vrednost, dok su obe veličine kritičnog pritiska izuzetno male da bi bile eksperimentalno merljive sa zadovoljavajućom preciznošću, tako da se mogu smatrati približnim.

Tabela 4.10. Vrednosti regresionih koeficijenata, R^2 i p parametara, dobijenih prilikom predviđanja odziva fluksa disperzne faze, J_d , višestrukih emulzija sa 20% disperzne faze

φ (%)	20	
R^2	0,982	
p	$5,567 \cdot 10^{-11}$	
	Koeficijent, β	p
Odsečak	-5,286	$8,089 \cdot 10^{-1}$
ΔP_{tm} (kPa) (X_1)	1,439	$4,513 \cdot 10^{-2}$
N (o/min) (X_2)	$4,957 \cdot 10^{-3}$	$9,063 \cdot 10^{-1}$
$X_1 \cdot X_2$	$-7,499 \cdot 10^{-4}$	$2,825 \cdot 10^{-2}$
X_1^2	$2,212 \cdot 10^{-2}$	$1,626 \cdot 10^{-3}$
X_2^2	$1,465 \cdot 10^{-5}$	$5,627 \cdot 10^{-1}$

Osnovni problem koji se javlja pri optimizaciji su suprotni uticaji variranih parametara na izlazne promenljive. Naime, kao što je već rečeno, povećanje ΔP_{tm} doprinosi

povećanju fluksa, ali doprinosi i povećanju prečnika kapi i *span* vrednosti, koje je zapravo potrebno minimizovati. Shodno tome, potrebno je izabrati koji od ova tri ispitivana parametra je važniji sa aspekta kvaliteta konačne formulacije, i na taj način pažljivo izabrati optimalnu vrednost ΔP_{tm} . S druge strane, brzina mešanja pokazuje drugačiji uticaj u zavisnosti od bilansa sila koje deluju na kap u toku procesa emulgovanja, tako da u slučaju uticaja na *span* postoji nekoliko stacionarnih tačaka koje definišu više optimalnih vrednosti variranih parametara.

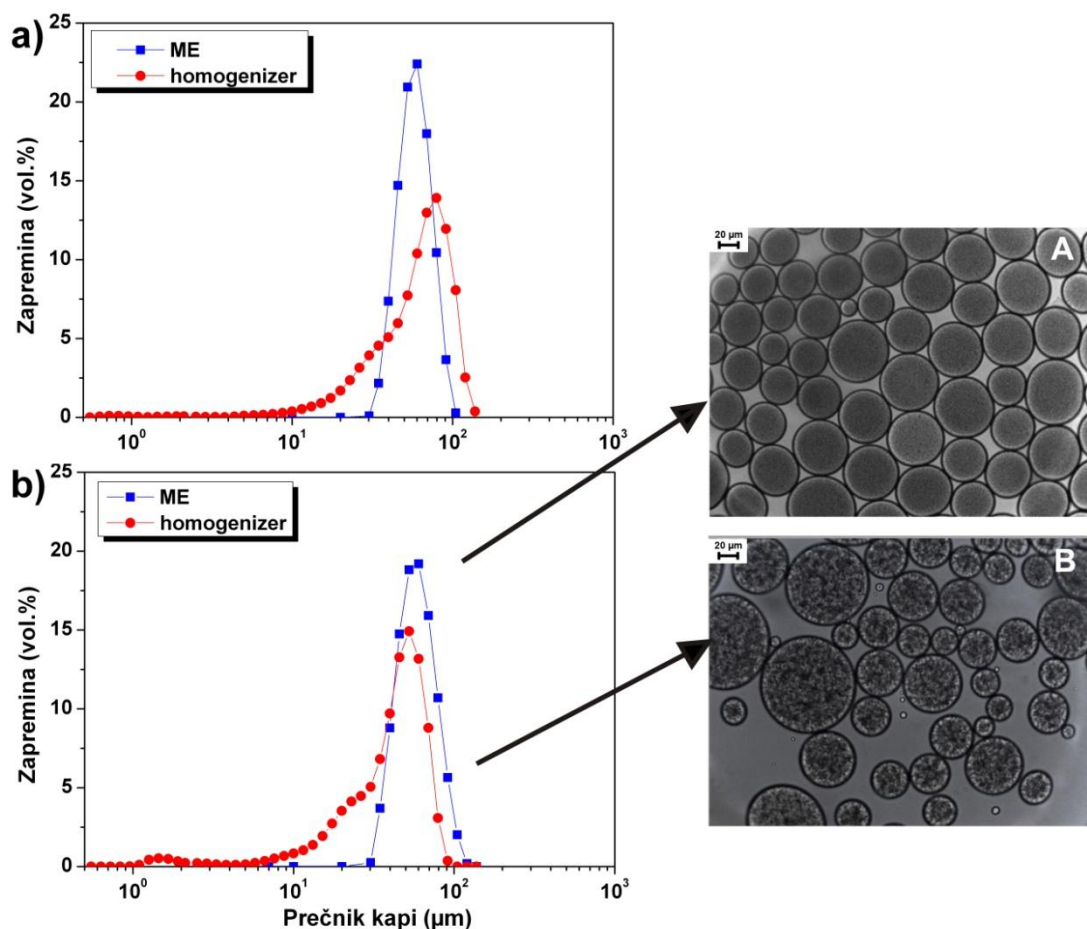
Predviđene vrednosti izlaznih promenljivih ($D_{3,2}$, *span*, J_d), dobijene u procesu višekriterijumske optimizacije, za ceo opseg variranih parametara, prikazane u tabeli 4.11. Konačna vrednost željenog parametra zavisi od primene finalnog proizvoda, odnosno da li se želi postići kvalitet u pogledu formulacije višestruke emulzije ili se želi pospešiti efikasnost procesa. Optimalna vrednost pritiska je kompromis između željenog prečnika kapi i fluksa disperzne faze. Ukoliko je favorizovano dobijanje minimalnih prečnika i uske raspodele veličina kapi, rezultati optimizacije ukazuju na to da se ME u ćeliji sa mešanjem mogu dobiti emulzije sa minimalnim prečnikom kapi od $D_{3,2} = 52,87 \mu\text{m}$ i minimalnom *span* vrednošću od 0,554, pri vrednosti fluksa od $22,53 \text{ l/m}^2\text{h}$ ($\Delta P_{tm} = 7,96 \text{ kPa}$) i broju obrtaja mešalice od 590 o/min, ukoliko je sadržaj disperzne faze 20% (v/v). Na isti način može se predvideti minimalna vrednost izlaznih parametara pri koncentraciji $E_E V/U$ emulzije od 5% (v/v), od $D_{3,2} = 52,87 \mu\text{m}$ i *span* = 0,561, koja bi se dobila pri $J_d = 24,65 \text{ l/m}^2\text{h}$ ($\Delta P_{tm} = 11,09 \text{ kPa}$) i $N = 640 \text{ o/min}$ (Nikolovski i sar., 2018). Međutim, predviđene vrednosti ΔP_{tm} koje daju minimalnu vrednost izlaznih parametara bilo je nemoguće eksperimentalno podesiti, tako sa se kao optimalna vrednost može smatrati $\Delta P_{tm} = 20 \text{ kPa}$.

Tabela 4.11. Optimalne vrednosti parametara (ΔP_{tm} i N) određene JOP metodom i odgovarajuće predviđene vrednosti izlaznih promenljivih ($D_{3,2}$, *span* i J_d), za različit sadržaj disperzne faze u višestrukoj emulziji

ΔP_{tm} (kPa)	N (o/min)	$D_{3,2}$ (μm)	<i>span</i> (-)	J_d ($\text{l/m}^2\text{h}$)	ΔP_{tm} (kPa)	N (o/min)	$D_{3,2}$ (μm)	<i>span</i> (-)	J_d ($\text{l/m}^2\text{h}$)
$\varphi = 20\% \text{ (v/v)}$					$\varphi = 5\% \text{ (v/v)}$				
73,48	940	93,62	0,841	198,7	70,37	1145	71,52	0,858	184,1
67,32	878	89,79	0,848	170,3	69,35	1159	70,90	0,855	179,4
54,29	774	81,69	0,842	118,4	63,35	1230	67,60	0,835	153,4
30,78	598	67,06	0,758	52,47	56,96	1287	64,61	0,812	128,2
22,40	449	61,85	0,736	37,57	50,73	1325	62,15	0,784	106,1
19,72	147	60,18	0,913	33,76	45,19	1347	60,29	0,753	88,65
7,960	590	52,87	0,554	22,53	11,09	640	52,87	0,561	24,65

4.2.4.3. Poređenje homogenizacije i membranskog emulgovanja u ćeliji sa mešanjem

Osnovni razlog primene ME kao metode za pripremu višestrukih emulzija, jeste poboljšanje monodisperznosti sistema (dobijanje emulzija sa manjom *span* vrednošću). Poređenjem krive raspodele veličina kapi dobijenih ME, na uslovima koji su izabrani kao optimalni za pripremu monodisperznih emulzionih sistema ($\tau_{av} = 12,15$ Pa, $\Delta P_{tm} = 20$ kPa) i homogenizacijom ($N = 3600$ o/min, $t = 5$ min), uočeno je značajno poboljšanje uniformnosti kapi, što se jasno vidi na slici 4.35. Poboljšanje uniformnosti uočeno je, kako kod višestrukih emulzija sa inkapsuliranim vodenim ekstraktom belog luka (slika 4.35a)), tako i kod $E_E V/U/V_2$ emulzija sa inkapsuliranim etanolnim ekstraktom belog luka (slika 4.35b)). Spoljašnja vodena faza obe pomenute emulzije sa aktivnim komponentama u svom sastavu, je 2% (m/v) T20 sa dodatkom glukoze kao aditivom za regulaciju osmotskog pritiska.



Slika 4.35. Raspodela veličina kapi višestrukih emulzija dobijenih ME u ćeliji sa mešanjem ($\Delta P_{tm} = 20$ kPa, $\tau_{av} = 12,15$ Pa) i homogenizacijom ($N = 3600$ o/min) sa inkapsuliranim: a) vodenim ekstraktom i b) etanolnim ekstraktom belog luka u unutrašnjoj vodenoj fazi. Na slici desno prikazane su mikrofotografije odgovarajućih emulzija.

Poboljšanje raspodele veličina kapi upotrebom ME ogleda se u smanjenju *span* vrednosti do $0,62 \pm 0,02$ za $V_E/U/V_2$ emulziju i $0,71 \pm 0,003$ za $E_E V/U/V_2$ emulziju, dok je *span* vrednost ovih emulzija pripremljenih homogenizacijom bio oko 1,15, nezavisno od

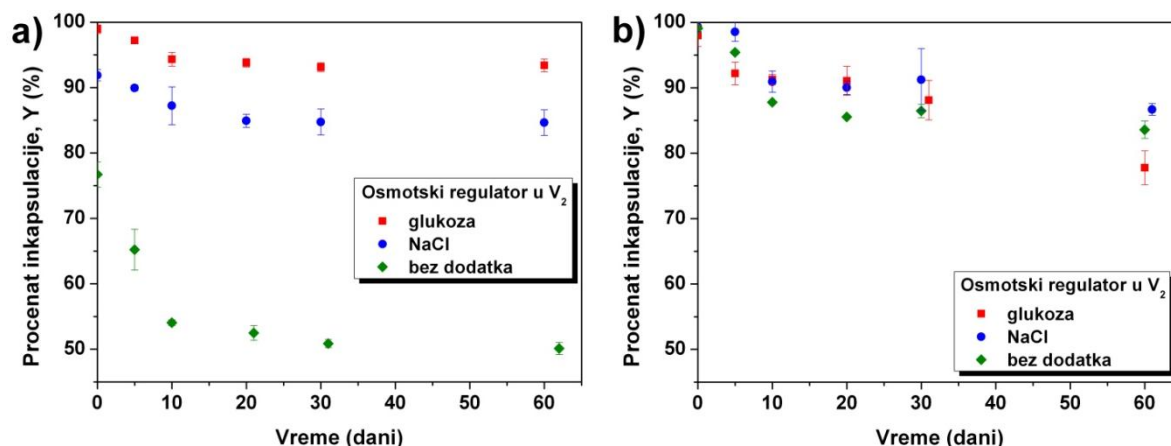
vrste ekstrakta koji je dodavan (tabela 4.7). Poboljšanje uniformnosti prečnika kapi pripremljenih ME može se potvrditi i vizuelno, pomoću mikrofotografija višestrukih emulzija pripremljenih korišćenjem obe pomenute tehnike (slika 4.35, desno). Pored razlike u uniformnosti, mikrofotografije pokazuju dobro slaganje sa izmerenim vrednostima veličina formiranih kapi, kao i vizuelnu potvrdu prisustva višestrukih emulzija.

S druge strane, u odnosu na proces homogenizacije, veličina kapi emulzija formiranih ME u ćeliji sa mešanjem nije značajno promenjena, jer je dobijena vrednost $D_{4,3}$ direktna posledica veličine pora i svojstava samog membranskog materijala. Kao što je već ranije prikazano, $D_{4,3}$ emulzija formiranih primenom ME u ćeliji sa mešanjem na definisanim optimalnim uslovima ($\tau_{av} = 12,15$ Pa, $\Delta P_{tm} = 20$ kPa) iznosi $54,66 \pm 0,93$ μm i $56,04 \pm 0,20$ μm za $V_E/U/V_2$ i $E_E V/U/V_2$ emulzije, redom. Pomenuti prečnici kapi su bliski prečnicima kapi koje su dobijene upotrebom homogenizera (Ilić i sar., 2017).

4.2.5. Procenat inkapsulacije unutrašnje vodene faze u višestrukim emulzijama

Kompleksan sastav ekstrakta belog luka, u smislu prisustva velikog broja komponenti koje su nestabilne prirode i podložne kako transformaciji iz jednog oblika u drugi (Block i sar., 1992; Lanzotti, 2006), tako i degradaciji tokom vremena, čini praćenje oslobađanja pojedinih aktivnih komponenti belog luka iz višestrukih emulzija inkapsuliranih u unutrašnju vodenu fazu, praktično nerealnim i nemogućim. Stoga, procenat inkapsuliranog sadržaja u unutrašnjosti višestrukih emulzionih nosača, praćen je preko procenta oslobođene marker boje u spoljašnju vodenu fazu (PTSA), koja se uobičajeno koristi za procenu sadržaja inkapsuliranog hidrofilnog materijala u unutrašnjoj vodenoj fazi (Adachi i sar., 2003; Surh i sar., 2007). PTSA je po prirodi hidrofilna materija, na šta ukazuju ranija istraživanja koeficijenta raspodele PTSA između vodene i uljane faze, koja su ukazala na izraziti afinitet PTSA ka vodenoj fazi. S obzirom da na preraspodelu PTSA između uljane i vodene faze može uticati i sama priroda uljane faze (Adachi i sar., 2003), a da korišćena uljana faza u ovom istraživanju (smeša dva ulja različitih karakteristika), nije bila predmet ranijih istraživanja za pripremu emulzija, kako bi se utvrdio eventualni procenat adsorbovane boje u uljanoj fazi, definisan je procenat neadsorbovane boje (R_y). R_y je definisan prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.5.5, jednačinom (3.15). Eksperimentalno dobijene vrednosti za R_y iznosile su $97,18 \pm 2,56\%$ za $V_E/U/V_2$ emulzije i $99,34 \pm 1,06\%$ za $E_E V/U/V_2$ emulzije, što ga čini pogodnim za dalji rad.

Procenat inkapsulirane unutrašnje vodene faze (Y) unutar višestrukih emulzija, neposredno nakon pripreme i tokom vremena, prikazan je na slici 4.36. Praćen je uticaj na oslobađanje sadržaja iz unutrašnje vodene faze koju čini vodeni ekstrakt belog luka (slika 4.36a) ili je u V_1 inkapsuliran etanolni ekstrakt belog luka (slika 4.36b)). Razlika u individualnim formulacijama se ogleda u dodatku osmotskog regulatora u spoljašnju vodenu fazu, glukoze ili NaCl, u količini potrebnoj da izjednači osmotski pritisak između V_1 i V_2 . Emulzije su pripremljene upotrebom homogenizera na $N = 3600$ o/min, prema već opisanoj proceduri.



Slika 4.36. Uticaj regulacije osmotskog pritiska između vodenih faza višestruke emulzije sa inkapsuliranim: a) vodenim ekstraktom belog luka; b) etanolnim ekstraktom belog luka u V_1 na procenat inkapsulacije unutrašnje faze (Y) tokom vremena

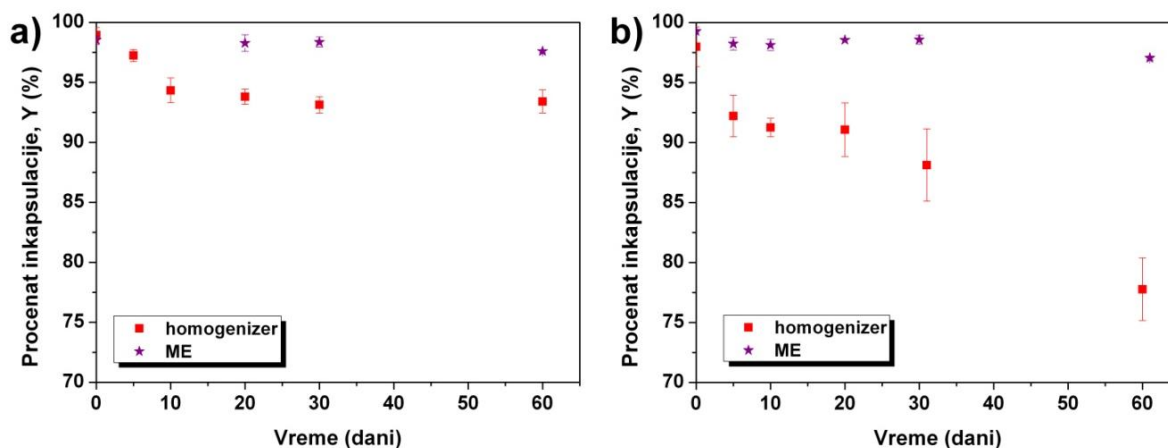
Kao što se može uočiti sa slike 4.36a), procenat inkapsulacije vodenog ekstrakta belog luka zavisi od tipa osmotskog regulatora u V_2 . U formulaciji sa izjednačenim osmotskim pritiskom, sa glukozom kao aditivom za regulaciju osmotskog pritiska, formirane emulzije neposredno nakon pripreme daju visok stepen inkapsulacije aktivne materije, $Y \geq 99\%$. Vremenom, vrednost Y se smanjuje usled difuzije inkapsuliranog materijala. Međutim, nakon dva meseca skladištenja emulzije, Y je i dalje na izuzetno visokom nivou i iznosi $93,41 \pm 0,9\%$, što se može smatrati visokim strepenom zadržavanja inkapsuliranog materijala unutar nosača za tako dug ispitivani vremenski period. Upotreba elektrolita u V_2 kao regulatora osmotskog pritiska, dovodi do manje početne vrednosti od $Y = 91,89 \pm 0,9\%$, ali je kinetika oslobađanja inkapsuliranog materijala veoma slična. U slučaju kada je osmotski pritisak u unutrašnjoj vodenoj fazi veći, odnosno kad u spoljašnju vodenu fazu nije dodat osmotski regulator, Y nakon homogenizacije ima značajno nižu vrednost ($76,6 \pm 1,9\%$), dok je oslobađanje aktivne materije iz unutrašnjosti emulzionog sistema znatno veće i dovodi do gubitka $50,11 \pm 0,9\%$ inkapsuliranog ekstrakta belog luka. Pored toga, oslobađanje je značajno brže, jer se većina materijala oslobodi već nakon 10 dana čuvanja emulzije.

Na slici 4.36b) prikazan je Y za višestruke emulzije sisteme sa etanolnim ekstraktom belog luka inkapsuliranim u unutrašnju vodenu fazu ($E_E V/U/V_2$ emulzija). Procenat „uhvaćenog“ materijala unutar $E_E V/U/V_2$ emulzija pokazuje izuzetno visoku vrednost za sve tri ispitivane formulacije. Dobijene vrednosti za Y su $99,08 \pm 1,3\%$, $97,98 \pm 1,6\%$ i $99,35 \pm 0,8\%$, za emulzije bez izjednačenog osmotskog pritiska, sa glukozom i NaCl kao osmotskim regulatorom u V_2 , redom. Kao što se može primetiti, iako je očekivano da će sadržaj aditiva u V_2 imati efekat na oslobađanje inkapsuliranog sadržaja iz V_1 , kinetika oslobađanja materijala iz unutrašnje vodene faze je slična za sve tri ispitivane formulacije. Nakon dva meseca skladištenja, Y za $E_E V/U/V_2$ emulziju bez izjednačenog osmotskog pritiska ima prilično visoku vrednost od $83,59 \pm 1,3\%$, dok su odgovarajuće vrednosti Y višestrukih emulzija sa glukozom kao osmotskim regulatorom $77,77 \pm 2,6\%$ i NaCl kao regulatorom $86,7 \pm 0,9\%$. Posmatrajući dobijene rezultate, ne može se tvrditi da postoji bilo kakav uticaj dodatka aditiva za regulaciju osmotskog pritiska u V_2 , na kinetiku oslobađanja

PTSA iz unutrašnje vodene faze $E_EV/U/V_2$ emulzija. Tačnije, rezultati ukazuju da mehanizam oslobađanja inkapsuliranog sadržaja iz $E_EV/U/V_2$ emulzija nije osmotski zavisian.

S obzirom da uočeno oslobađanje unutrašnje vodene faze $E_EV/U/V_2$ emulzija nije osmotski indukovano, može se pretpostaviti da prisustvo etanolne faze utiče na ovakvo ponašanje sistema, odnosno na svojstva međupovršinskog sloja emulzionih sistema (Garti i sar., 2001; Kahiweit i sar., 1991). Iako je etanolni ekstrakt luka potpuno mešljiv sa unutrašnjom vodenom fazom, postoje naznake da alkoholi mogu imati uticaj na svojstva amfifilnog monosloja na granici faza voda/ulje, pa ih iz tog razloga često klasifikuju kao ko-emulgatore (Garti i sar., 2001). Drugi način posmatranja njihovog uticaja na međupovršinska svojstva je što ih često smatraju ko-rastvaračima, koji mogu biti preraspoređeni između vodene faze, uljane faze i samog međupovršinskog sloja. Preraspodela alkohola zavisi od broja atoma ugljenika u molekulu alkohola, sastava uljane faze i tipa upotrebljenog emulgatora za formiranje emulzionih sistema (Kahiweit i sar., 1991). Ovakve pretpostavke se uglavnom odnose na alkohole sa dugim ugljovodoničnim lancima. Međutim, dokazano je da i alkoholi sa kratkim ugljovodoničnim lancem mogu menjati fleksibilnost međupovršinskog sloja surfaktanta, čime utiču na poboljšanje sposobnosti solubilizacije ulja u mikroemulzijama, ali se smatraju slabim površinski aktivnim materijama u poređenju sa izuzetno velikim afinitetom sredstava za emulgovanje prema međupovršinskom sloju (Garti i sar., 2001; Kahiweit i sar., 1991).

U suštini, iako postoje osnovane naznake da alkoholi sa kratkim ugljovodoničnim nizom mogu difundovati u međupovršinski sloj i menjati svojstva međupovršinskog sloja, uzimajući u obzir njihovu potpuno mešljivost sa vodom, ne može se u ovom stadijumu istraživanja tvrditi da razlike u Y zapravo potiče od prisustva alkohola, a ne od razlike u sastavu vodenog i etanolnog ekstrakta.



Slika 4.37. Uticaj metode pripreme na procenat inkapsulirane unutrašnje vodene faze (Y) višestrukih emulzija sa inkapsuliranim: a) vodenim ekstraktom belog luka; b) etanolnim ekstraktom belog luka. Homogenizacija ($N = 3600$ o/min, $t = 5$ min); ME u ćeliji sa mešanjem ($\Delta P_{tm} = 20$ kPa, $\tau_{av} = 12,15$ Pa)

Poređenje procenta inkapsuliranog sadržaja unutar višestrukih emulzija pripremanih homogenizacijom i ME u ćeliji sa mešanjem, prikazano je na slici 4.37. Poređenje je

prikazano na primeru formulacija emulzija sa izjednačenim osmotskim pritiscima između vodenih faza, uz korišćenje glukoze kao osmotskog regulatora u V_2 . Y neposredno nakon pripreme za $V_E/U/V_2$ višestruke emulzije (slika 4.37a)) ima sličnu vrednost nezavisno od primenjene tehnike emulgovanja. Ukoliko su emulzije pripremljene homogenizacijom odgovarajuća vrednost za Y je $98,93 \pm 0,65\%$, dok za višestruke emulzije pripremljene ME ta vrednost iznosi $98,52 \pm 0,36\%$. Međutim, oslobađanje inkapsuliranog sadržaja je značajno sporije za emulzije pripremljene ME, verovatno kao posledica ujednačenije raspodele veličina kapi emulzije i samim tim slabije izražene koalescencije kapi ulja tokom vremena. Upotreba ME u ćeliji sa mešanjem uticala je na povećanje procenta inkapsulacije za 4,14% za period od dva meseca čuvanja, odnosno Y je povećan od $93,41 \pm 0,99\%$ koliko je dobijeno homogenizacijom do $97,59 \pm 0,14\%$ dobijeno ME (Ilić i sar., 2017).

Izuzetno visok stepen inkapsulacije unutrašnje vodene faze u višestruku emulziju uočen je i od strane drugih autora (Surh i sar., 2007), prilikom korišćenja PGPR kao emulgatora i ME kao tehnike za njihovo formiranje. Naime, prema literaturnim podacima dobijena vrednost za Y je veća od 99,8%, za emulzije stabilizovane sa relativno velikom koncentracijom PGPR (8% (m/m)) u kukuruznom ulju, a koja nije u velikoj meri zavisila od dodatka izolata proteina surutke (WPI) kao sredstva za želiranje unutrašnje vodene faze (Surh i sar., 2007). Za razliku od ovog istraživanja, prikazani rezultati na slici 4.37a) takođe pokazuju visok stepen inkapsulacije unutrašnje faze ($Y > 98,5\%$) i to sa dvostruko manjom PGPR koncentracijom (4% (m/m)), s tim što se korišćena uljana faza razlikuje (smeša tikvino/suncokretovo ulje). S druge strane, Su i sar., (2006) su ispitivali uticaj koncentracije PGPR na procenat inkapsuliranog sadržaja u V_1 , pri čemu su vrednosti Y veće od 90% dobijene za sadržaj PGPR od 4% (m/m), dok dalje povećanje koncentracije do 6 i 8% dovodi do povećanja Y do vrednosti koje su bliske 100%. Njihova istraživanja pri PGPR koncentracijama manjim od 4% (m/m) dala su izuzetno niske vrednosti za Y ($< 70\%$), dok se navedeni podaci odnose na višestruke emulzije sa sojinim uljem kao uljanom fazom, stabilizovane sa drugim hidrofilnim emulgatorom (0,5% natrijum kazeinata), koje su pripremane na homogenizeru visokog pritiska, što takođe može pokazati određeni uticaj na dobijene rezultate merenja.

Posebno značajan rezultat, dobijen prilikom ovog istraživanja, podrazumeva pozitivan uticaj upotrebe membranskog emulgovanja na Y pri inkapsuliranju etanolnog ekstrakta belog luka (slika 4.37b)). Jedan od osnovnih ciljeva ovog istraživanja zapravo je inkapsulacija etanolnog ekstrakta belog luka, kako sa aspekta mogućnosti njegovog „uklapanja“ u višestruku emulziju u formi koja se generacijama koristi kao narodni lek, tako i poboljšanja njegovog zadržavanja u emulziji tokom vremena, usled potencijalne nestabilnosti E/U emulzija. Upotreba ME je obezbedila poboljšanje zadržavanja etanolnog ekstrakta unutar emulzionog nosača za oko 20%, koje je značajno izraženije u odnosu na pozitivan aspekt ME kao metode na inkapsulaciju vodenog ekstrakta. Korišćenje ME u ćeliji sa mešanjem dovodi do povećanja procenta inkapsuliranog materijala, za ispitivani period od dva meseca čuvanja, od $77,77 \pm 2,6\%$ do $97,05 \pm 0,2\%$, u odnosu na proces homogenizacije (Ilić i sar., 2017).

5. ZAKLJUČCI

U okviru ove doktorske disertacije prikazana je mogućnost primene membranskog emulgovanja u ćeliji sa mešanjem za dobijanje višestrukih emulzija sa inkapsuliranim aktivnim komponentama, i poređenje karakteristika formiranih emulzija sa emulzijama dobijenim primenom homogenizera. Na osnovu detaljne analize rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Optimizacijom sastava jednostrukih emulzionih nosača, primenom metode odzivne površine i višekriterijumske optimizacije, dobijena je optimalna formulacija V_1/U emulzije sa tikvinim uljem u kontinualnoj fazi. Formulacija pri kojoj se formiraju kapi najmanjeg prečnika, uske raspodele veličina i sa najboljom sedimentacionom stabilnošću, sadrži PGPR u koncentraciji oko 4,5% (m/m), tikvino ulje kao uljanu fazu i NaCl u vodenoj fazi, u koncentraciji od 0,21 M. Međutim, negativan uticaj tikvinog ulja na koalescenciju kapi, kompenzovan je uvođenjem regresione jednačine u okviru višekriterijumske optimizacije, koja uzima u obzir i visoku cenu tikvinog ulja. Na taj način dobijena je optimalna formulacija koja sadrži PGPR u koncentraciji 4,16% (m/m), sadržaj tikvinog ulja od 51,5% i koncentraciju NaCl u vodenoj fazi od 0,22 M. S obzirom da ne postoji statistički značajna razlika u rezultatima dobijenim pri koncentraciji NaCl od 0,15 M i 0,22 M, i da je sadržaj soli od 0,15 M sasvim dovoljan da unapredi stabilnost i prečnik formiranih kapi, može se smatrati optimalnom vrednošću. Predviđene vrednosti konačne optimalne formulacije (4,16% PGPR, 51,5% tikvinog ulja i 0,15 M NaCl) su $d_{4,3} = 175,31$ nm, $span = 0,79$ i $SI = 3,91\%$. Eksperimentalno dobijene vrednosti, pri sličnim vrednostima variranih promenljivih, su bliske predviđenim, i iznose $d_{4,3} = 155,8$ nm, $span = 0,7$ i $SI = 5,5\%$.

- Umrežavanje unutrašnje vodene faze nije dovelo do značajnog smanjenja prečnika kapi i povećanja njihove stabilnosti, u odnosu na emulzije sa dodatim inhibitorom Ostvaldovog sazrevanja (NaCl), verovatno usled formiranja neravnomerne umrežene strukture unutar kapi nanometarskih veličina. Ovako nastala umrežena struktura pokazala je i veću osetljivost na termičke tretmane.

- Inkapsulacija vodenog ekstrakta belog luka zasniva se na zameni unutrašnje vodene faze ekstraktom. Promena koncentracije upotrebljenog emulgatora (PGPR) i soli u V_E/U

emulzijama, pokazuje sličan efekat na veličinu kapi kao i kod V_1/U emulzija bez primarne aktivne komponente, ukazujući na to da kompleksan sastav vodenog ekstrakta belog luka ne pokazuje značajan uticaj na svojstva emulzionih sistema. Prečnik formiranih kapi sa 4% (m/m) PGPR i 0,15 M NaCl u vodenoj fazi je $d_{4,3} = 166,8 \pm 2,65$ nm, sa izraženim pozitivnim efektom dodatka elektrolita na stabilnost prečnika kapi tokom vremena i sedimentacionu stabilnost.

- Inkapsulacija etanolnog ekstrakta belog luka zahteva formiranje E/U emulzija, koje se ne odlikuju velikom stabilnošću. Primena MO-7S, sojinog lecitina i PGPR, dovela je do formiranja E_E/U emulzija sa kapima mikrometarskih veličina, sa tendencijom koalescencije tokom vremena i vizuelnim raslojavanjem emulzije već nakon nekoliko sati. Unapređenje stabilnosti emulzija postignuta je mešanjem etanolnog ekstrakta belog luka sa vodom, u zapreminskom odnosu 1:1, uz korišćenje PGPR kao emulgatora. Prečnik na taj način formiranih kapi E_EV/U emulzija u opsegu je nanovelicina, i zavisi od PGPR koncentracije i koncentracije dodate soli. Povećanje PGPR koncentracije do 4% (m/m), kao i dodatak lipofoba (0,075 M), dovodi do smanjenja prečnika kapi do $131,9 \pm 7,4$ nm. Dalje povećanje koncentracije emulgatora i NaCl ne dovodi do značajnog smanjenja prečnika, kao ni do sprečavanja koalescencije kapi i/ili unapređenja sedimentacione stabilnosti, sa donekle negativnim uticajem povećanja koncentracije soli na *SI*.

- Prilikom pripreme višestrukih emulzionih nosača, od ispitivanih hidrofilnih emulgatora (T20, T80 i PF68), prednost je data T20 kao emulgatoru koji daje najmanje prečnike kapi, sa najmanje izraženom koalescencijom kapi tokom vremena. Koncentracija koja je dovoljna za pripremu emulzionih sistema je 2% (m/v).

- Prisustvo tikvinog ulja kao komponente uljane faze višestrukih emulzija dovodi do formiranja nešto manjih kapi, u odnosu na $V_1/U/V_2$ emulzije sa suncokretovim uljem, verovatno kao posledica prisustva fosfolipida i drugih površinski aktivnih komponenti, koje se mogu adsorbovati na međupovršinu i dodatno stabilizovati kapi. Upotreba tikvinog ulja redukuje prečnik kapi od $D_{4,3} = 63,19 \pm 0,38$ μm do $D_{4,3} = 57,13 \pm 2,77$ μm , sa blagim uticajem i na smanjenje stepena koalescencije kapi tokom vremena. Međutim, iako korišćenje tikvinog ulja udvostručuje naelektrisanje na kapima, mereno preko vrednosti zeta potencijala, u odnosu na U/V_2 emulzije sa suncokretovim uljem, očekivani izražen uticaj „prirodno ugrađenih“ površinski aktivnih materija tikvinog ulja na veličinu kapi i njihovu stabilnost je izostao. Umrežavanje unutrašnje vodene faze nije pokazalo pozitivan uticaj na stabilnost višestrukih emulzija. Formirane $V_1/U/V_2$ emulzije sa tikvinim uljem pokazale su zadovoljavajuću termičku stabilnost.

- Veličina kapi višestrukih emulzija zavisi od dodatka glukoze u spoljašnju vodenu fazu, odnosno gradijenta osmotskog pritiska između vodenih faza. Ukoliko je osmotski pritisak u V_1 veći (bez glukoze u V_2), prečnik formiranih kapi je $D_{4,3} = 57,13 \pm 2,77$ μm , dok emulzije sa većim osmotskim pritiskom u V_2 (pri najvećem sadržaju glukoze od 0,4 M), imaju najmanje kapi sa vrednostima $D_{4,3} = 37,18 \pm 0,48$ μm . Uticaj glukoze na smanjenje prečnika kapi može biti direktna posledica snižavanja međupovršinskog napona na granici faza i/ili uticaja PGPR na povećanje lipofilnosti šećera, koji ga zapravo čini površinski aktivnom komponentom. Dodatak glukoze utiče i na poboljšanje stabilnosti formiranih emulzija, pri čemu se prečnik kapi višestruke emulzije bez glukoze povećao do

$D_{4,3} = 100,36 \pm 0,2 \mu\text{m}$, za period od dva meseca, dok su prečnici kapi emulzija sa glukozom ostali približno nepromenjeni.

- Kinetika oslobađanja soli iz unutrašnje vodene faze u velikoj meri zavisi od koncentracije glukoze u V_2 . Najsporija kinetika otpuštanja i najmanji procenat oslobođene soli postiže se pri koncentracija glukoze od 0,075 M, koja za ispitivani vremenski period od 60 dana iznosi 58,84%, nasuprot oslobođenoj frakciji od 89,94%, koja je dobijena pri sadržaju glukoze od 0,4 M. Konačna oslobođena frakcija soli, verovatno je posledica transporta celokupnog sadržaja između faza, čiji smer zavisi od gradijenta osmotskog pritiska, i transporta jona NaCl putem hidratacije/dehidratacije molekula PGPR na graničnoj površini, kao glavnog mehanizma difuzije.

- Inkapsulacija aktivne komponente (ekstrakta belog luka) unutar višestrukih emulzija, pripremljenih upotrebom homogenizera, ne utiče na prečnik formiranih kapi, u odnosu na emulzione sisteme bez aktivne komponente, pri čemu su dobijeni prečnici $54,76 \pm 0,07 \mu\text{m}$ (za $V_E/U/V_2$) i $58,81 \pm 4,52 \mu\text{m}$ (za $E_E V/U/V_2$). Dodatak osmotskog aditiva u V_2 donekle utiče na veličinu formiranih kapi i zavisi od tipa osmotskog regulatora, koji je korišćen, kao i tipa inkapsuliranog ekstrakta. Pri formiranju $V_E/U/V_2$ emulzija ne favorizuje se upotreba NaCl u V_2 , jer dovodi do povećanja prečnika, dok kod $E_E V/U/V_2$ emulzija upotreba glukoze u V_2 dovodi do smanjenja prečnika kapi u odnosu na ostale formulacije. *Span* vrednost ne zavisi od dodatka i tipa osmotskog aditiva.

- Primena ME u ćeliji sa mešanjem uz korišćenje membrane od sinterovanog stakla korišćena je u cilju unapređenja karakteristika formiranih višestrukih emulzija. Membrana od sinterovanog stakla odlikuje se malom poroznošću (0,26), malim faktorom torzije (1,45), nasumično raspoređenim porama po celoj površini poprečnog preseka, sa nepravilnim otvorima pora različite veličine, koji mogu značajno uticati na mehanizam otkidanja kapi sa površine membrane. Optimalni uslovi za formiranje monodisperznih emulzija sa minimalnim prečnikom kapi, podrazumevaju korišćenje minimalnog ΔP_{tm} , jer sa povećanjem pritiska raste i $D_{4,3}$ i *span*, i napona smicanja na površini membrane u intervalu 2-12 Pa ($N = 345-1070$ o/min), pri čemu treba izbeći veoma niske i veoma visoke vrednosti τ_{av} . Sadržaj disperzne faze ($\phi = 5-20\%$) neznatno utiče na vrednost optimalnih parametara. $E_E V/U/V_2$ emulzija sa najnižom *span* vrednošću od $0,46 \pm 0,07$ dobijena je pri $\tau_{av} = 12,15$ Pa i $\Delta P_{tm} = 20$ kPa ($\phi = 5\%$), odnosno od $0,66 \pm 0,06$ pri $\tau_{av} = 4,88$ Pa i $\Delta P_{tm} = 20$ kPa ($\phi = 20\%$).

- Prečnik kapi je parametar koji se nije značajno razlikovao u zavisnosti od tipa upotrebene metode, gde su upotrebom homogenizera ($N = 3600$ o/min) i ME u ćeliji sa mešanjem ($\tau_{av} = 12,15$ Pa i $\Delta P_{tm} = 20$ kPa), dobijene slične vrednosti za $D_{4,3}$. Međutim, značajno unapređenje uniformnosti prečnika kapi postignuto je upotrebom ME, čija primena je omogućila snižavanje *span* vrednosti od $span > 1$ do $span \leq 0,5$ koja ih svrstava u red monodisperznih višestrukih emulzija.

- Višekriterijumskom optimizacijom procesa ME u ćeliji sa mešanjem, dobijene su optimalne vrednosti ΔP_{tm} i N , potrebne za formiranje monodisperznih emulzija sa minimalnim prečnikom kapi sa maksimalnom vrednošću fluksa disperzne faze. Međutim, s obzirom da je povećanje pritiska proporcionalno povećanju J_d , što negativno utiče na $D_{3,2}$ i *span* vrednost, konačna optimalna vrednost parametara zavisi od primene finalnog proizvoda,

odnosno predstavlja kompromis između kvaliteta višestruke emulzije i efikasnosti procesa. Favorizovanjem dobijanja minimalnih prečnika i *span* vrednosti, optimizacijom dobijene predviđene vrednosti ukazuju na to da se ME može dobiti emulzija sa $D_{3,2,\min} = 52,87 \mu\text{m}$ i $\text{span}_{\min} = 0,554$, pri $J_d = 22,53 \text{ l/m}^2\text{h}$ ($\Delta P_{\text{tm}} = 7,96 \text{ kPa}$) i $N = 590 \text{ o/min}$ ($\varphi = 20\% \text{ (v/v)}$). Na isti način može se predvideti minimalna vrednost izlaznih parametara pri $\varphi = 5\% \text{ (v/v)}$, od $D_{3,2,\min} = 52,87 \mu\text{m}$ i $\text{span}_{\min} = 0,561$, koja bi se dobila pri $J_d = 24,65 \text{ l/m}^2\text{h}$ ($\Delta P_{\text{tm}} = 11,09 \text{ kPa}$) i $N = 640 \text{ o/min}$.

- ME u ćeliji sa mešanjem utiče i na povećanje procenata inkapsulacije primarnih aktivnih komponenti, u odnosu na proces homogenizacije. Upotreba ME dovela je do poboljšanja zadržavanja inkapsuliranog sadržaja unutar $V_E/U/V_2$ za 4,14%, za period od dva meseca čuvanja. Još izraženiji uticaj ME na sposobnost zadržavanja inkapsuliranog sadržaja dobijen je kod $E_E V/U/V_2$ emulzija, gde je upotreba ME pospešila Y za oko 20%, u odnosu na proces homogenizacije.

- Na procenat inkapsuliranog ekstrakta belog luka utiče i dodatak osmotskog aditiva u V_2 . U slučaju inkapsulacije vodenog ekstrakta belog luka, upotreba glukoze kao aditiva za regulaciju osmotskog pritiska omogućava visok stepen inkapsulacije aktivne materije, $Y \geq 99\%$, sa izuzetnim procentom zadržavanja iste u toku dva meseca ($Y = 93,41 \pm 0,9\%$), upotreba NaCl utiče na smanjenje inicijalne vrednosti $Y = 91,89 \pm 0,9\%$, sa sličnom kinetikom oslobađanja, dok $V_E/U/V_2$ emulzije bez osmotskog aditiva pokazuju mali stepen inkapsulacije ($Y = 76,6 \pm 1,9\%$), uz gubitak $50,11 \pm 0,9\%$ aktivne materije. Procenat inkapsuliranog materijala unutar $E_E V/U/V_2$ emulzija pokazuje izuzetno visoku vrednost nezavisno od tipa osmotskog regulatora ($Y \approx 99\%$), dok mehanizam oslobađanja inkapsuliranog sadržaja nije osmotski zavisna i pokazuje visok Y za sve tri formulacije, nakon dva meseca čuvanja ($Y = 83,59 \pm 1,3\%$ u formulaciji bez osmotskog regulatora, $Y = 77,77 \pm 2,6\%$ sa glukozom u V_2 i $Y = 86,7 \pm 0,9\%$ sa NaCl u V_2).

REFERENCE

- Adachi, S., Imaoka, H., Ashida, H., Maeda, H. i Matsuno, R. (2004). Preparation of microcapsules of W/O/W emulsions containing a polysaccharide in the outer aqueous phase by spray-drying. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 225–231.
- Adachi, S., Imaoka, H., Hasegawa, Y. i Matsuno, R. (2003). Preparation of a water-in-oil-in-water (W/O/W) type microcapsules by a single-droplet-drying method and change in encapsulation efficiency of a hydrophilic substance during storage. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(6), 1376–1381.
- Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of Nutrition*, 136(2), 736–740.
- Amagase, H. i Milner, J. A. (1993). Impact of various sources of garlic and their constituents on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis*, 14(8), 1627–1631.
- Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S. i Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition*, 955–962.
- Arimoto, H., Asano, S. i Uemura, D. (1997). Total synthesis of allixin; an anti-tumor promoter from garlic. *Tetrahedron Letters*, 38(44), 7761–7762.
- Aronson, M. P. i Petko, M. F. (1993). Highly concentrated water-in-oil emulsions: influence of electrolyte on their properties and stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 159, 134-149.
- Asegawa, Y. H., Maoka, H. I., Dachi, S. A. i Atsuno, R. M. (2001). Preparation of W/O/W emulsions at low emulsifier concentrations. *Food Science and Technology Research*, 7(4), 300–302.
- Aust, O., Sies, H., Stahl, W. i Polidori, M. C. (2001). Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: Tocopherols and carotenoids. *Journal of Chromatography A*, 936(1-2), 83–93.
- Azzam, M. O. J. i Omari, R. M. (2002). Stability of egg white-stabilized edible oil emulsions using conductivity technique. *Food Hydrocolloids*, 16(2), 105–110.
- Badolato, G. G., Aguilar, F., Schuchmann, H. P., Sobisch, T. i Lerche, D. (2008). Evaluation of long term stability of model emulsions by multisample analytical centrifugation. Chapter in a book: *Surface and Interfacial Forces – From Fundamentals to Applications*, Progress in Colloid and Polymer Science, 134, 66-73.
- Banerjee, S. K. i Maulik, S. K. (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutrition Journal*, 1, 4.

- Bastida-Rodríguez, J. (2013). The food additive polyglycerol polyricinoleate (E-476): structure, applications, and production methods. *ISRN Chemical Engineering*, 1–21.
- Benichou, A., Aserin, A. i Garti, N. (2007). W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 294, 20–32.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, 37(2), 263–268.
- Berendsen, R. (2014). Encapsulation of procyanidins in double emulsions stabilized by protein – polysaccharide complexes, Doctoral thesis, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain.
- Block, E., Birringer, M., Jiang, W., Nakahodo, T., Thompson, H. J., Toscano, P. J., Uzar, H., Zhang, X. i Zhu, Z. (2001). *Allium* chemistry: Synthesis, natural occurrence, biological activity, and chemistry of *Se*-alk(en)ylselenocysteines and their γ -glutamyl derivatives and oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 458–470.
- Block, E., Naganathan, S., Putman, D. i Zhao, S. H. (1992). *Allium* chemistry - HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (Ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (Great-headed) garlic, chive, and chinese chive - uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(12), 2418–2430.
- Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M. H., Anton, M. i Leal-Calderon, F. (2009). Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23, 92–101.
- Bonnet, M., Cansell, M., Placin, F., Anton, M. i Leal-Calderon, F. (2010a). Impact of sodium caseinate concentration and location on magnesium release from multiple W/O/W emulsions. *Langmuir*, 26(21), 9250–9260.
- Bonnet, M., Cansell, M., Placin, F., David-Briand, E., Anton, M. i Leal-Calderon, F. (2010b). Influence of ionic complexation on release rate profiles from multiple water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7762–7769.
- Borek, C. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *The Journal of Nutrition*, 1010–1015.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J. L. i Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1-2), 359–378.
- Buonomenna, M. G. (2013). Membrane processes for a sustainable industrial growth. *RSC Advances*, 3(17), 5694.
- Caili, F., Huan, S. i Quanhong, L. (2006). A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(2), 73–80.
- Capek, I. (2010). On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1-2), 35–61.
- Cappel, M. J. i Kreuter, J. (1991). Effect of nonionic surfactants on transdermal drug delivery: I. Polysorbates. *International Journal of Pharmaceutics*, 69(2), 143–153.

- Charcosset, C. (2009). Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry. *Journal of Food Engineering*, 92(3), 241–249.
- Charcosset, C., Limayem, I. i Fessi, H. (2004). The membrane emulsification process - A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 209–218.
- Cheng, J., Chen, J. F., Zhao, M., Luo, Q., Wen, L. X. i Papadopoulos, K. D. (2007). Transport of ions through the oil phase of $W_1/O/W_2$ double emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 305, 175–182.
- Christov, N. C., Ganchev, D. N., Vassileva, N. D., Denkov, N. D., Danov, K. D. i Kralchevsky, P. a. (2002). Capillary mechanisms in membrane emulsification: oil-in-water emulsions stabilized by Tween 20 and milk proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 209(1), 83–104.
- Chung, H., Kim, T. W., Kwon, M., Kwon, I. C. i Jeong, S. Y. (2001). Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *Journal of Controlled Release*, 71(3), 339–350.
- ALC, American Lecithins Company (2009). *Lecithins and Phospholipids: A simple guide to use and selection*, Oxford.
- Cook, N. C. i Samman, S. (1996). Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66–76.
- Corzo-Martínez, M., Corzo, N. i Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, 18(12), 609–625.
- Cushnie, T. P. T. i Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356.
- Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I. i Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science and Technology*, 20(9), 388–395.
- Dickinson, E. (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, 6, 1–11.
- Dragosavac, M. M., Holdich, R. G., Vladisavljević, G. T. i Sovilj, M. N. (2012). Stirred cell membrane emulsification for multiple emulsions containing unrefined pumpkin seed oil with uniform droplet size. *Journal of Membrane Science*, 392-393, 122–129.
- Dragosavac, M. M., Sovilj, M. N., Kosvintsev, S. R., Holdich, R. G. i Vladisavljević, G. T. (2008). Controlled production of oil-in-water emulsions containing unrefined pumpkin seed oil using stirred cell membrane emulsification. *Journal of Membrane Science*, 322, 178–188.
- Eidi, A., Eidi, M. i Esmaili, E. (2006). Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum L.*) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 13(9-10), 624–629.
- El-Sayed, H. S., Chizzola, R., Ramadan, A. A. i Edris, A. E. (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. *Food Chemistry*, 221, 196–204.
- Ficheux, M., Bonakdar, L. i Bibette, J. (1998). Some stability criteria for double emulsions. *Langmuir*, 14(11), 2702–2706.

- Flanagan, J. i Singh, H. (2006). Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(3), 221–37.
- Florence, A. T. i Whitehill, D. (1982). The formulation and stability of multiple emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 11(4), 277–308.
- Fraj, J. (2016). Primena protein-polimer interakcije za formiranje mikrokapsula sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne supstance. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Frasch-Melnik, S., Spyropoulos, F. i Norton, I. T. (2010). $W_1/O/W_2$ double emulsions stabilised by fat crystals - Formulation, stability and salt release. *Journal of Colloid and Interface Science*, 350(1), 178–185.
- Friberg, S. E., Larsson, K. i Sjoblom, J. (2004). Food emulsions, 4th edition, University of Missouri Rolla, Missouri and Clarkson University Potsdam, New York, USA.
- Fruhworth, G. O. i Hermetter, A. (2007). Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 1128–1140.
- Fruhworth, G. O. i Hermetter, A. (2008). Production technology and characteristics of Styrian pumpkin seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(7), 637–644.
- Fuchigami, T., Toki, M. i Nakanishi, K. (2000). Membrane emulsification using sol-gel derived macroporous silica glass. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 19(1-3), 337–341.
- Garti, N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 222–235.
- Garti, N., Yaghmur, A., Leser, M. E., Clement, V. i Watzke, H. J. (2001). Improved oil solubilization in oil/water food grade microemulsions in the presence of polyols and ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2552–2562.
- Geerken, M. J., Lammertink, R. G. H. i Wessling, M. (2007). Interfacial aspects of water drop formation at micro-engineered orifices. *Journal of Colloid and Interface Science*, 312(2), 460–469.
- Gijsbertsen-Abrahamse, A. J., Van Der Padt, A. i Boom, R. M. (2004). Status of cross-flow membrane emulsification and outlook for industrial application. *Journal of Membrane Science*, 230, 149–159.
- Giorno, L., Li, N. i Drioli, E. (2003). Preparation of oil-in-water emulsions using polyamide 10 kDa hollow fiber membrane. *Journal of Membrane Science*, 217(1-2), 173–180.
- Giroux, H. J., Constantineau, S., Fustier, P., Champagne, C. P., St-Gelais, D., Lacroix, M. i Britten, M. (2013). Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. *International Dairy Journal*, 29(2), 107–114.
- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Drzewiecki, J., Cvikrová, M., Martincová, O., Katrich, E. i Trakhtenberg, S. (2008). Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4418–4426.

- Gülseren, I. i Corredig, M. (2012). Interactions at the interface between hydrophobic and hydrophilic emulsifiers: Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and milk proteins, studied by drop shape tensiometry. *Food Hydrocolloids*, 29, 193–198.
- Gülseren, I. i Corredig, M. (2014). Interactions between polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and pectins at the oil-water interface and their influence on the stability of water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 34, 154–160.
- Hancocks, R. D. (2011). Controlled emulsification using microporous membranes. Doctoral thesis. University of Birmingham, United Kingdom.
- Harris, J. C., Cottrell, S. L., Plummer, S. i Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 282–286.
- Hatate, Y., Ohta, H., Uemura, Y., Ijichi, K. i Yoshizawa, H. (1997). Preparation of monodispersed polymeric microspheres for toner particles by the Shirasu Porous Glass membrane emulsification technique. *Journal of Applied Polymer Science*, 64(6), 1107–1113.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. i Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
- Henry, J. V. L., Fryer, P. J., Frith, W. J. i Norton, I. T. (2009). Emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron emulsions stabilised with Tweens (20 and 80), Brij 96v and sucrose monoesters. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), 201–206.
- Herzi, S., Essafi, W., Bellagha, S. i Leal-Calderon, F. (2012). Influence of diffusive transport on the structural evolution of W/O/W emulsions. *Langmuir*, 28, 17597–17608.
- Herzi, S., Essafi, W., Bellagha, S. i Leal-Calderon, F. (2014). Influence of the inner droplet fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 441, 489–495.
- Hrabovski, N., Sinadinović-Fišer, S., Nikolovski, B., Sovilj, M. i Borota, O. (2012). Phytosterols in pumpkin seed oil extracted by organic solvents and supercritical CO₂. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 1204–1211.
- Hsu, J. P. i Nacu, A. (2003). Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 259, 374–381.
- Huang, Q., Yu, H. i Ru, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals and functional foods using nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75(1), 593–604.
- Huang, Z. R., Lin, Y. K. i Fang, J. Y. (2009). Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: Potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, 14(1), 540–554.
- Hussein, H. J., Hameed, I. H. i Hadi, M. Y. (2017). A Review: Anti-microbial, Anti-inflammatory effect and Cardiovascular effects of Garlic: *Allium sativum*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(11), 4069–4078.
- Ilić, J. D., Lončarević, I. S., Petrović, J. S. i Nikolovski, B. G. (2015). Preparation of the W/O/W emulsions containing garlic extract incorporated into internal water phase using stirred cell membrane emulsification. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 12, 139–145.

- Ilić, J. D., Nikolovski, B. G., Lončarević, I. S., Petrović, J. S., Bajac, B. M. i Vučinić-Vasić, M. (2016). Release properties and stability of double $W_1/O/W_2$ emulsions containing pumpkin seed oil. *Journal of Food Process Engineering*, 40 (2), 1-13.
- Ilić, J. D., Nikolovski, B. G., Petrović, L. B., Kojić, P. S., Lončarević, I. S. i Petrović, J. S. (2017). The garlic (*A. sativum* L.) extracts food grade $W_1/O/W_2$ emulsions prepared by homogenization and stirred cell membrane emulsification. *Journal of Food Engineering*, 205, 1–11.
- Irkin, R. i Korukluoglu, M. (2007). Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. *African Journal of Biotechnology*, 6(4), 384–387.
- Jiao, J., Rhodes, D. G. i Burgess, D. J. (2002). Multiple emulsion stability: pressure balance and interfacial film strength. *Journal of Colloid and Interface Science*, 450, 444–450.
- Jiménez-Colmenero, F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52(1), 64–74.
- Joscelyne, S. M. i Trägårdh, G. (1999). Food emulsions using membrane emulsification: Conditions for producing small droplets. *Journal of Food Engineering*, 39, 59–64.
- Kabanov, A. V., Nazarova, I. R., Astafieva, I. V., Batrakova, E. V., Yu Alakhov, V., Yaroslavov, A. A. i Kabanov, V. A. (1995). Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) solutions. *Macromolecules*, 28, 2303–2314.
- Kahiweit, M., Strey, R. i Busse, G. (1991). Effect of alcohols on the phase behavior of microemulsions. *Journal of Physical Chemistry A*, 95(13), 5344–5352.
- Kanouni, M., Rosano, H. L. i Naouli, N. (2002). Preparation of a stable double emulsion ($W_1/O/W_2$): Role of the interfacial films on the stability of the system. *Advances in Colloid and Interface Science*, 99, 229–254.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453–464.
- Karthik, P., Ezhilarasi, P. N. i Anandharamakrishnan, C. (2017). Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (7), 1435-1450.
- Katoh, R., Asano, Y., Furuya, A., Sotoyama, K. i Tomita, M. (1996). Preparation of food emulsions using a membrane emulsification system. *Journal of Membrane Science*, 113, 131–135.
- Kelder, J. D. H., Janssen, J. J. M. i Boom, R. M. (2007). Membrane emulsification with vibrating membranes: A numerical study. *Journal of Membrane Science*, 304(1-2), 50–59.
- Kerwin, B. A. (2008). Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2924–2935.
- Khalid, N., Shu, G., Kobayashi, I., Nakajima, M. i Barrow, C. J. (2017). Formulation and characterization of monodisperse O/W emulsions encapsulating astaxanthin extracts using microchannel emulsification: Insights of formulation and stability evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, 355–365.

- Kobayashi, I., Murayama, Y., Kuroiwa, T., Uemura, K. i Nakajima, M. (2009). Production of monodisperse water-in-oil emulsions consisting of highly uniform droplets using asymmetric straight-through microchannel arrays. *Microfluidics and Nanofluidics*, 7(1), 107–119.
- Kobayashi, I., Yasuno, M., Iwamoto, S., Shono, A., Satoh, K. i Nakajima, M. (2002). Microscopic observation of emulsion droplet formation from a polycarbonate membrane. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 207(1-3), 185–196.
- Kodera, Y., Ayabe, M., Ogasawara, K., Yoshida, S., Hayashi, N. i Ono, K. (2002a). Allixin accumulation with long-term storage of garlic. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 50(3), 405–7.
- Kodera, Y., Ichikawa, M., Yoshida, J., Kashimoto, N., Uda, N., Sumioka, I., Ide, N. i Ono, K. (2002b). Pharmacokinetic study of allixin, a phytoalexin produced by garlic. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 50(3), 354–63.
- Kukizaki, M. (2009). Shirasu porous glass (SPG) membrane emulsification in the absence of shear flow at the membrane surface: Influence of surfactant type and concentration, viscosities of dispersed and continuous phases, and transmembrane pressure. *Journal of Membrane Science*, 327(1-2), 234–243.
- Landfester, K. (2000). Recent developments in miniemulsions - formation and stability Mechanisms. *Macromolecular Symposia*, 150, 171–178.
- Landfester, K. (2003). Miniemulsions for nanoparticle synthesis. *Topics in Current Chemistry*, 75–123.
- Landfester, K. (2006). Synthesis of colloidal particles in miniemulsions. *Annual Review of Materials Research*, 36(1), 231–279.
- Landfester, K., Willert, M. i Antonietti, M. (2000). Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. *Macromolecules*, 33(7), 2370–2376.
- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 3–22.
- Le Révérend, B. J. D., Norton, I. T., Cox, P. W. i Spyropoulos, F. (2010). Colloidal aspects of eating. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1-2), 84–89.
- Leal-Calderon, F., Thivilliers, F. i Schmitt, V. (2007). Structured emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(4-5), 206–212.
- Lee, K. Y. i Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 106–126.
- Liu, W., Yang, X. L. i Winston Ho, W. S. (2011). Preparation of uniform-sized multiple emulsions and micro/nano particulates for drug delivery by membrane emulsification. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(1), 75–93.
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L. i Garti, N. (2009). Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74, 178–185.
- Márquez, A. L., Medrano, A., Panizzolo, L. A. i Wagner, J. R. (2010). Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared

- with polyglycerol polyricinoleate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341(1), 101–108.
- Matos, M. (2013). Production of emulsions with controlled droplet size containing bioactive compounds using membranes. Doctoral thesis. University of Oviedo, Spain.
- Matos, M., Gutiérrez, G., Coca, J. i Pazos, C. (2014). Preparation of water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) double emulsions containing trans-resveratrol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 69–79.
- Matos, M., Gutiérrez, G., Iglesias, O., Coca, J. i Pazos, C. (2015). Enhancing encapsulation efficiency of food-grade double emulsions containing resveratrol or vitamin B₁₂ by membrane emulsification. *Journal of Food Engineering*, 166, 212–220.
- Matos, M., Suárez, M. A., Gutiérrez, G., Coca, J. i Pazos, C. (2013). Emulsification with microfiltration ceramic membranes: A different approach to droplet formation mechanism. *Journal of Membrane Science*, 444, 345–358.
- Matsumoto, S. i Sherman, P. (1969). The viscosity of microemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 30(4), 525–536.
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719.
- McClements, D. J., Decker, E. A. i Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8), 109–124.
- McClements, D. J. i Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285–330.
- McClements, D. J. (2004). *Food Emulsion: Principle, Practices, and Techniques*. 2th edition, University of Massachusetts (CRC Press), Amherst, USA.
- Meredith, R. E. i Tobias, C. W. (1961). Conductivities in Emulsions. *Journal of The Electrochemical Society*, 108(3), 286.
- Miean, K. H. i Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3106–3112.
- Moriguchi, T., Matsuura, H., Itakura, Y., Katsuki, H., Saito, H. i Nishiyama, N. (1997). Allixin, a phytoalexin produced by garlic, and its analogues as novel exogenous substances with neurotrophic activity. *Life Sciences*, 61(14), 1413–1420.
- Muguet, V., Seiller, M., Barratt, G., Ozer, O., Marty, J. P. i Grossiord, J. L. (2001). Formulation of shear rate sensitive multiple emulsions. *Journal of Controlled Release*, 70, 37–49.
- Mun, S., Choi, Y., Rho, S. J., Kang, C. G., Park, C. H. i Kim, Y. R. (2010). Preparation and characterization of water/oil/water emulsions stabilized by polyglycerol polyricinoleate and whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 75(2), 116–125.
- Murkovic, M. i Pfannhauser, W. (2000). Stability of pumpkin seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102(10), 607–611.
- Murkovic, M., Piironen, V., Lampi, A. M., Kraushofer, T. i Sontag, G. (2004). Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 1: Non-volatile compounds). *Food Chemistry*, 84(3), 359–365.

- Muschiolik, G. (2007). Multiple emulsions for food use. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12, 213–220.
- Nadin, M., Rousseau, D. i Ghosh, S. (2014). Fat crystal-stabilized water-in-oil emulsions as controlled release systems. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 248–255.
- Nakić, S. N., Rade, D., Škevin, D., Štrucelj, D., Mokrovčak, Ž. i Bartolić, M. (2006). Chemical characteristics of oils from naked and husk seeds of *Cucurbita pepo L.* *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 936–943.
- Nazir, A., Schroën, K. i Boom, R. (2010). Premix emulsification: A review. *Journal of Membrane Science*, 362(1-2), 1–11.
- Nikolovski, B. (2009). Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz bobica kleke (*Juniperus communis L.*) i semenki tikve (*Cucurbita pepo L.*) natkritičnim ugljendioksidom. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Nikolovski, B. G., Bajac, J. D., Martinovic, F. L. i Bogunović, N. (2018). Optimizing stirred cell membrane emulsification process for making a food-grade multiple emulsion. *Chemical Papers*, 72(3), 533-542.
- Nikolovski, B. G., Ilić, J. D. i Sovilj, M. N. (2016). How to formulate a stable and monodisperse water-in-oil nanoemulsion containing pumpkin seed oil: The use of multiobjective optimization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(4), 919–931.
- Nurajii, C., Karvekar, M. D. i Das, A. K. (2007). Biological importance of organoselenium compounds. *Indian Journal of Pharmaceutichal Sciences*, (5), 344–351.
- O'Regan, J. i Mulvihill, D. M. (2009). Water soluble inner aqueous phase markers as indicators of the encapsulation properties of water-in-oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2339–2345.
- O'Regan, J. i Mulvihill, D. M. (2010). Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Research International*, 43(1), 224–231.
- Ohtani, S. G. i Rasert, W. P. (2014). Nano-emulsion; emulsification using low energy methods. *Japan Journal of Food Engineering*, 15(3), 119–130.
- Okushima, S., Nisisako, T., Torii, T. i Higuchi, T. (2004). Controlled production of monodisperse double emulsions by two-step droplet breakup in microfluidic devices. *Langmuir*, 20(23), 9905–9908.
- Orfanakis, A., Hatzakis, E., Kanaki, K., Pergantis, S. A., Rizos, A. i Dais, P. (2013). Characterization of polyglycerol polyricinoleate formulations using NMR spectroscopy, mass spectrometry and dynamic light scattering. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90, 39–51.
- Papageorgiou, C., Corbet, J. P., Menezes-Brandao, F., Pecegueiro, M. i Benezra, C. (1983). Allergic contact dermatitis to garlic (*Allium sativum L.*) identification of the allergens: the role of mono-, di-, and trisulfides present in garlic. *Archives of Dermatological Research*, 275, 229–234.
- Patel, A. R. i Velikov, K. P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1958–1964.

- Pawlik, A., Cox, P. W. i Norton, I. T. (2010). Food grade duplex emulsions designed and stabilised with different osmotic pressures. *Journal of Colloid and Interface Science*, 352(1), 59–67.
- Pawlik, A. i Norton, I.T. (2012). Encapsulation stability of duplex emulsions prepared with SPG cross-flow membrane, SPG rotating membrane and rotor-stator techniques-A comparison. *Journal of Membrane Science*, 415-416, 459–468.
- Pays, K., Giermanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J. i Leal-Calderon, F. (2001). Coalescence in surfactant-stabilized double emulsions. *Langmuir*, 17(2), 7758–7769.
- Pays, K., Giermanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J. i Leal-Calderon, F. (2002). Double emulsions: How does release occur? *Journal of Controlled Release*, 79, 193–205.
- Peng, S. J. i Williams, R. A. (1998). Part I: Droplet formation from a single pore. *Trans IChemE*, 76, 894–901.
- Perez-Moral, N., Watt, S. i Wilde, P. (2014). Food hydrocolloids comparative study of the stability of multiple emulsions containing a gelled or aqueous internal phase. *Food Hydrocolloids*, 42, 1–8.
- Piacentini, E., Drioli, E. i Giorno, L. (2014). Membrane emulsification technology: Twenty-five years of inventions and research through patent survey. *Journal of Membrane Science*, 468, 410–422.
- Piacentini, E., Giorno, L., Dragosavac, M. M., Vladislavljević, G. T. i Holdich, R. G. (2013). Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification. *Food Research International*, 53, 362–372.
- Procida, G., Stancher, B., Cateni, F. i Zacchigna, M. (2013). Chemical composition and functional characterisation of commercial pumpkin seed oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1035–1041.
- Raharjo, T. J., Nurliana, L. i Mastjeh, S. (2011). PHOSPHOLIPIDS FROM PUMPKIN (*Cucurbita moschata* (Duch.) Poir) SEED KERNEL OIL AND THEIR FATTY ACID COMPOSITION. *Indonesian Journal of Chemistry*, 11(1), 48–52.
- Rahman, K. i Billington, D. (2000). Dietary supplementation with aged garlic extract inhibits ADP-induced platelet aggregation in humans. *The Journal of Nutrition*, 130(11), 2662–2665.
- Ramirez, D. A., Locatelli, D. A., Torres-Palazzolo, C. A., Altamirano, J. C. i Camargo, A. B. (2017). Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis: Cooked and biological fluids samples. *Food Chemistry*, 215, 493–500.
- Rao, J. i McClements, D. J. (2012). Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 326–334.
- Rayner, M., Trägårdh, G., Trägårdh, C. i Dejmek, P. (2004). Using the surface evolver to model droplet formation processes in membrane emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 279(1), 175–185.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. i Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4), 519–534.

- Rezig, L., Chouaibi, M., Msaada, K. i Hamdi, S. (2012). Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 82–87.
- Rousset, P., Sellappan, P. i Daoud, P. (2002). Effect of emulsifiers on surface properties of sucrose by inverse gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 969, 97–101.
- Ruiz-Peña, M., Oropesa-Nuñez, R., Pons, T., Louro, S. R. W. i Pérez-Gramatges, A. (2010). Physico-chemical studies of molecular interactions between non-ionic surfactants and bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 282–289.
- Rydhag, L. i Wilton, I. (1981). The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(8), 830–837.
- Saloua, F., Eddine, N. I. i Hedi, Z. (2009). Chemical composition and profile characteristics of Osage orange *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider seed and seed oil. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 1–8.
- Sapei, L., Naqvi, M. A. i Rousseau, D. (2012). Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 316–323.
- Sastry, N. V. i Hoffmann, H. (2004). Interaction of amphiphilic block copolymer micelles with surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 250(1-3 SPEC. ISS.), 247–261.
- Scholfield, C. R. (1981). Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58(10), 889–892.
- Schröder, V., Behrend, O. i Schubert, H. (1998). Effect of dynamic interfacial tension on the emulsification process using microporous, ceramic membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 202, 334–340.
- Schröder, V. i Schubert, H. (1999). Production of emulsions using microporous, ceramic membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 103–109.
- Shu, G., Khalid, N., Zhao, Y., Neves, M. A., Kobayashi, I. i Nakajima, M. (2016). Formulation and stability assessment of ergocalciferol loaded oil-in-water nanoemulsions: Insights of emulsifiers effect on stabilization mechanism. *Food Research International*, 90, 320–327.
- Silvestre De Los Reyes, J. i Charcosset, C. (2010). Preparation of water-in-oil and ethanol-in-oil emulsions by membrane emulsification. *Fuel*, 89(11), 3482–3488.
- Simin, N. (2014). Sekundarni biomolekuli u vrstama *Allium* Sect. *Codonoprasum* Rchb. – biološke aktivnosti, fitohemijski i hemotaksonomski aspekti. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K. i Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 252, 28–49.
- Smoczkiwicz, M. A., Nitschke, D. i Wielądek, H. (1982). Microdetermination of steroid and triterpene saponin glycosides in various plant materials I. *Allium* species. *Mikrochimica Acta*, 78(1-2), 43–53.

- Steiner, M. i Li, W. (2001). Aged garlic extract, a modulator of cardiovascular risk factors: a dose-finding study on the effects of AGE on platelet functions. *The Journal of Nutrition*, 131(3s), 980S–4S.
- Stevenson, D. G., Eller, F. J., Wang, L., Jane, J. L., Wang, T. i Inglett, G. E. (2007). Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4005–4013.
- Su, J., Flanagan, J., Hemar, Y. i Singh, H. (2006). Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water-oil-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20, 261–268.
- Suárez, M. A., Gutiérrez, G., Coca, J. i Pazos, C. (2013). Stirred tank membrane emulsification using flat metallic membranes: A dimensional analysis. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 69, 31–43.
- Suárez, M. A., Gutiérrez, G., Matos, M., Coca, J. i Pazos, C. (2014). Emulsification using tubular metallic membranes. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 81, 24–34.
- Sugiura, S., Nakajima, M. i Seki, M. (2002). Effect of channel structure on microchannel emulsification. *Langmuir*, 18(15), 5708–5712.
- Sugiura, S., Nakajima, M., Yamamoto, K., Iwamoto, S., Oda, T., Satake, M. i Seki, M. (2004). Preparation characteristics of water-in-oil-in-water multiple emulsions using microchannel emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 270(1), 221–228.
- Surh, J., Vladislavljević, G. T., Mun, S. i McClements, J. D. (2007). Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 175–184.
- Suzuki, K., Fujiki, I. i Hagura, Y. (1998). Preparation of corn oil/water and water/corn oil emulsions using PTFE membranes. *Food Science Technology International*, 4(2), 164–167.
- Tadros, T. F. (1994). Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91(C), 39–55.
- Tedajo, G. M., Bouttier, S., Fourniat, J., Grossiord, J. L., Marty, J. P. i Seiller, M. (2005). Release of antiseptics from the aqueous compartments of a w/o/w multiple emulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 288, 63–72.
- Thompson, K. L., Armes, S. P. i York, D. W. (2011). Preparation of pickering emulsions and colloidosomes with relatively narrow size distributions by stirred cell membrane emulsification. *Langmuir*, 27(6), 2357–2363.
- Timgren, A., Trägårdh, G. i Trägårdh, C. (2010). A model for drop size prediction during cross-flow emulsification. *Chemical Engineering Research and Design*, 88(2), 229–238.
- Ushikubo, F. Y. i Cunha, R. L. (2014). Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 34, 145–153.
- Van Der Graaf, S., Schroën, C. G. P. H. i Boom, R. M. (2005). Preparation of double emulsions by membrane emulsification - A review. *Journal of Membrane Science*, 251, 7–15.
- Van Nieuwenhuizen, W. (1976). Lecithin production and properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 53(6), 425–427.

- Vasiljevic, D., Parojcic, J., Primorac, M. i Vuleta, G. (2006). An investigation into the characteristics and drug release properties of multiple W/O/W emulsion systems containing low concentration of lipophilic polymeric emulsifier. *International Journal of Pharmaceutics*, 309, 171–177.
- Velikov, K. P. i Pelan, E. (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter*, 4, 1964–1980.
- Vladisavljević, G. T., Lambrich, U., Nakajima, M. i Schubert, H. (2004). Production of O/W emulsions using SPG membranes, ceramic α -aluminium oxide membranes, microfluidizer and a silicon microchannel plate - A comparative study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 232, 199–207.
- Vladisavljevic, G. T. i Schubert, H. (2002). Preparation and analysis of oil-in-water emulsions with a narrow droplet size distribution using Shirasu-porous-glass (SPG) membranes. *Desalination*, 144(1-3), 167–172.
- Vladisavljevic, G. T. i Schubert, H. (2003a). Preparation of emulsions with a narrow particle size distribution using microporous alpha-alumina membranes. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 24(6), 811–819.
- Vladisavljević, G. T. i Schubert, H. (2003b). Influence of process parameters on droplet size distribution in SPG membrane emulsification and stability of prepared emulsion droplets. *Journal of Membrane Science*, 225, 15–23.
- Vladisavljević, G. T., Shimizu, M. i Nakashima, T. (2004). Preparation of monodisperse multiple emulsions at high production rates by multi-stage premix membrane emulsification. *Journal of Membrane Science*, 244, 97–106.
- Vladisavljević, G. T., Shimizu, M. i Nakashima, T. (2005). Permeability of hydrophilic and hydrophobic Shirasu-porous-glass (SPG) membranes to pure liquids and its microstructure. *Journal of Membrane Science*, 250, 69–77.
- Vladisavljević, G. T., Shimizu, M. i Nakashima, T. (2006a). Production of multiple emulsions for drug delivery systems by repeated SPG membrane homogenization: Influence of mean pore size, interfacial tension and continuous phase viscosity. *Journal of Membrane Science*, 284, 373–383.
- Vladisavljević, G. T., Surh, J. i McClements, J. D. (2006b). Effect of emulsifier type on droplet disruption in repeated Shirasu porous glass membrane homogenization. *Langmuir*, 22(14), 4526–4533.
- Vladisavljević, G. T., Tesch, S. i Schubert, H. (2002). Preparation of water-in-oil emulsions using microporous polypropylene hollow fibers: Influence of some operating parameters on droplet size distribution. *Chemical Engineering and Processing*, 41(3), 231–238.
- Vladisavljević, G. T. i Williams, R. A. (2005). Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 113(1), 1–20.
- Vladisavljević, G. T. i Williams, R. A. (2006). Manufacture of large uniform droplets using rotating membrane emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299, 396–402.
- Vladisavljević, Goran T. Mitrović, M. V. (2000). Membrane emulsification - state of the art. *Chemical Industry*, 12(54), 523–529.

- Vujasinovic, V., Djilas, S., Dimic, E., Romanic, R. i Takaci, A. (2010). Shelf life of cold-pressed pumpkin (*Cucurbita pepo L.*) seed oil obtained with a screw press. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(12), 1497–1505.
- Wen, L. i Papadopoulos, K. D. (2000). Visualization of water transport in $W_1/O/W_2$ emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 174, 159–167.
- Wen, L. i Papadopoulos, K. D. (2001). Effects of osmotic pressure on water transport in $W_{(1)}/O/W_{(2)}$ emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 235, 398–404.
- Whanger, P. D. (2004). Selenium and its relationship to cancer: an update. *The British Journal of Nutrition*, 91(1), 11–28.
- Wilson, R. i Smith, M. (1998). Human studies on polyglycerol polyricinoleate (PGPR). *Food and Chemical Toxicology*, 36, 743–745.
- Wilson, R., Van Schie, B. J. i Howes, D. (1998). Overview of the preparation, use and biological studies on polyglycerol polyricinoleate (PGPR). *Food and Chemical Toxicology*, 36, 711–718.
- Wolf, F., Koehler, K. i Schuchmann, H. P. (2013). Stabilization of water droplets in oil with PGPR for use in oral and dermal applications. *Journal of Food Process Engineering*, 36, 276–283.
- Xanthopoulou, M. N., Nomikos, T., Fragopoulou, E. i Antonopoulou, S. (2009). Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. *Food Research International*, 42(5-6), 641–646.
- Xu, Q., Nakajima, M., Nabetani, H., Iwamoto, S. i Liu, X. (2001a). The effects of ethanol content and emulsifying agent concentration on the stability of vegetable oil-ethanol emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(12), 1185–1190.
- Xu, Q. Y., Nakajima, M., Nabetani, H., Ichikawa, S. i Liu, X. Q. (2001b). Effect of the dispersion behavior of a nonionic surfactant on surface activity and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 242(2), 443–449.
- Yamasaki, T., Teel, R. W. i Lau, B. H. S. (1991). Effect of allixin, a phytoalexin produced by garlic, on mutagenesis, DNA-binding and metabolism of aflatoxin B₁. *Cancer Letters*, 59(2), 89–94.
- Zhu, J. i Barrow, D. (2005). Analysis of droplet size during crossflow membrane emulsification using stationary and vibrating micromachined silicon nitride membranes. *Journal of Membrane Science*, 261(1-2), 136–144.