



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD
FARMACEUTSKO INŽENJERSTVO

**Primena sistema hitozan-jonska površinski aktivna
materija za dobijanje mikrokapsula uljnog sadržaja**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Dr Lidija Petrović, vanredni profesor

Kandidat:
Dipl.farm. Jelena Milinković Budinčić

Novi Sad, 2019

Mojim roditeljima, s ljubavlju

Ovu stranicu svoje doktorske disertacije iskoristiću da se zahvalim svima onima koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije.

Najveću zahvalnost dugujem mom mentoru, dr Lidiji Petrović, vanrednom profesoru Tehnološkog fakulteta Novi Sad pre svega na ukazanom poverenju, prenesenom znanju, nesebičnoj pomoći, savetima i svakodnevnoj podršci. Beskrajno hvala!

Veliku zahvalnost dugujem i profesoru dr Jaroslavu Katoni, za svaku nesebičnu sugestiju tokom laboratorijskog rada, kao i na prenesenom znanju i iskustvu.

Mojim kolegama Sandri Bučko, dr Jadranki Fraj, Ljiljani Spasojević i Slobodanu Tanasinu na velikoj podršci tokom svih dana eksperimentalnog rada, veliko hvala na strpljenju, pomoći, nesebičnom deljenju iskustva i znanja i iskrenim razgovorima. Ogromna je čast saradivati sa vama.

Posebnu zahvalnost dugujem mom članu komisije dr Ljiljani Đekić, na pruženoj pomoći i korisnim sugestijama tokom izrade doktorske disertacije.

Velika pomoć mojih dragih studenata uvek je dolazila u pravom trenutku, hvala im na tome. Među njima veliku zahvalnost dugujem jednoj perspektivnoj, odgovornoj, preciznoj, miloj i meni danas jako dragoj Milijani ALeksić.

Svima onima, koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije, najiskrenije se zahvaljujem.

Na kraju hvala najbitnijim osobama u mom životu, onima koji su svakog trenutka verovali, bili moj oslonac i bez čije podrške ne bih uspela, a to su moji roditelji, brat i njegova porodica, rodbina i prijatelji i naravno danas meni najdraži moji Nikola i Sara.

Jelena

Univerzitet u Novom Sadu
Tehnološki fakultet Novi Sad
Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip publikacije: Monografska publikacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Jelena Milinković Budinčić, dipl. farm.
AU

Mentor: Dr Lidija Petrović, vanredni profesor
MN

Naslov rada: Primena sistema hitozan-jonska površinski aktivna materija
za dobijanje mikrokapsula uljnog sadržaja
NR

Jezik publikacije: Srpski, latinica
JP

Jezik izvoda: Srpski/Engleski
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina
UGP

Godina: 2018
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: 21000 Novi Sad, Srbija, Bulevar cara Lazara 1
MA

Fizički opis rada: (poglavlja 7/ strana 103/ slika 46/ tabela 9/ reference 148/
priloga 2)
FO

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo
NO

Naučna disciplina: Farmaceutsko inženjerstvo
ND

Predmetna odrednica/ključne reči: Interakcija polimer-jonska PAM, hitozan, mikrokapsulacija
PO

UDK

Čuva se: U biblioteci Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Bulevar cara
Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
ČU

Važna napomena:

Nema

VN

Izvod/abstract:

IZ

Mikrokapsulacija je tehnika kojom se nestabilne, međusobno inkompatibilne i biološki aktivne supstance prevode u stabilniji oblik, ili se omogućuje njihovo kontrolisano i ciljano oslobađanje. Osobine formiranih mikrokapsula, kinetika i mesto otpuštanja inkapsuliranih materija zavise, pre svega, od njihovog omotača. Savremene tendencije razvoja prehrambenih proizvoda i proizvoda farmaceutske i kozmetičke industrije, su sve više usmerene ka upotrebi prirodnih i biorazgradivih polimernih materija za formiranje omotača mikrokapsula.

Cilj ove disertacije je mogućnost primene hitozana, netoksičnog, biorazgradivog derivata hitina, kao materije omotača mikrokapsula sa uljnim sadržajem. S obzirom na njegovu slabu površinsku aktivnost, istraživanja su usmerena na primenu interakcija hitozana sa suprotno naelektrisanim jonskim površinski aktivnim materijama (PAM) u vodenim rastvorima, kao mehanizmu za njegovo deponovanje na graničnoj površini ulje/voda.

Primenom različitih metoda (tenziometrija, viskozimetrija, turbidimetrija, merenje elektroforetske pokretljivosti) interakcije hitozana sa natrijum-dodecil-sulfatom (SDS) i natrijum-lauriletar-sulfatom (SLES) su detaljno ispitane. Definisane su promene kako na granici faza, tako i unutar rastvora, a mehanizam formiranja kompleksa hitozan/PAM različitih osobina je u potpunosti razjašnjen. Utvrđeno je da do formiranja stabilnog koacervata dolazi pri masenom odnosu hitozan:SLES 1:2 i hitozan:SDS 1:2.

Ispitivanje uticaja interakcije hitozan-PAM na osobine emulzionih sistema tipa ulje u vodi (veličina i raspodela veličina kapi, stabilnost) omogućilo je odabir hitozan-SLES sistema kao omotača pogodnog za dobijanje mikrokapsula uljnog sadržaja. Na osnovu ovih rezultata kao uljna faza odabrani su trigliceridi srednje dužine ugljovodoničnih lanca (TSDL). Sušenjem emulzija primenom *spray drying* postupka dobijene se mikrokapsule uljnog sadržaja sa vitaminom E i ispitan je uticaj umreživača na njihove osobine. Karakterizacijom dobijenih mikrokapsula (određivanje sadržaja vlage, ispitivanje morfologije površine, efikasnost inkapsulacije vitamina E, kinetika otpuštanja vitamina E u *in vitro* uslovima) zaključeno je da na osobine mikrokapsula utiče vrsta i koncentracija umreživača. Mikrokapsule čiji omotač nije umrežen pokazale su najbolje karakteristike.

Datum prihvatanja
teme od strane Senata:

9.02.2017.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(naučni stepen/ime i

prezime/zvanje/fakultet)

KO

Dr Jaroslav Katona, vanredni profesor, Tehnološki fakultet
Novi Sad, predsednik

Dr Lidija Petrović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet
Novi Sad, mentor

Dr Jadranka Fraj, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad,
član

Dr Ljiljana Đekić, vanredni profesor, Univerzitet u
Beogradu-Farmaceutski fakultet, član

University of Novi Sad
Faculty of Tehnology Novi Sad
Keywords documentation

Accession number:
ANO
Identification number:
INO

Document type: Monographic publication
DT
Type of record: Textual material, printed
TR
Contents code: PhD thesis
CC
Author: Jelena Milinković Budinčić
AU
Menthor: Lidija Petrović, PhD, Associate Professor
MN
Title: Application of chitosan-ionic surfactant system for the
TI preparation of microcapsules with oil content
Language of text: Serbian, Latin
LT
Language of abstract: Serbian/English
LA
Country of publication: The Republic of Serbia
CP
Locality of publication: Vojvodina
LP
Publication year: 2018
PY
Publisher: Author's reprint
PB
Publction place: 21000 Novi Sad, Srbija, Bulevar cara Lazara 1
PL
Physical description: (chapters 7/ pages 103/ figures 46/ tables 9/ references 148/
PD accessories 2)
Scientific field: Technological engineering
SF
Scientific discipline: Pharmaceutical engineering
SD
Subject/key words: Polymer-ionic surfactant interactions, chitosan,
SKW microencapsulation
UC

Holding date: Library of the Faculty of Technology, 21000 Novi Sad,
HD Serbia, Bulevar cara Lazara 1

Note:

N

Abstract:

AB

Microencapsulation is a technique that unstable, incompatible and biologically active substances converted to a more stable form, or allow their controlled and targeted release. The properties of formed microcapsules, kinetics and the place of release of encapsulated substances, primarily depend on their shell characteristic. Modern trends in the development of food products and products of the pharmaceutical and cosmetic industries are increasingly focused on the use of natural and biodegradable polymeric materials for coatings.

The aim of this dissertation is to investigate the possibility of using chitosan, non-toxic and biodegradable chitin derivative, as a shell material of microcapsules with oil content. Due to its low surface activity, the research is focused on the utilization of chitosan interactions with oppositely charged ionic surfactants (sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium lauryl ether sulfate (SLES)) in aqueous solutions as mechanisms for its depositing at the oil/water interface.

Based on detailed investigation of interactions in the chitosan-ionic surfactant systems using different methods (tensiometry, viscometry, turbidimetry, measurement of electrophoretic mobility), changes have been defined both at the interface and within the bulk, as well as the mechanism of formation of the coacervate phase. It has been determined that at chitosan:SLES and chitosan:SDS mass ratio of 1:2 stabile coacervate were formed.

An investigation of the influence of interaction on the properties of oil-in-water emulsion systems (size and distribution of droplet size, stability) enabled the chitosan-SLES system to be selected as a shell suitable for obtaining microcapsules of the oil content. Also, based on these results, medium-chain triglycerides were selected as the oil phase of the emulsion.

Microcapsules with vitamin E were obtained by spray drying of emulsions stabilized with chitosan/SLES complex. The influence of the crosslinker on the properties of microcapsules was investigated. Characterization of obtained microcapsules (moisture content determination, investigation of the surface morphology, efficiency of the vitamin E encapsulation, release in vitro kinetics of vitamin E) showed that type and concentration of crosslinking agents had influences the properties of microcapsules. Microcapsules without crosslinking agents have the most suitable characteristics.

Baord on:

ASB

Defended on:

DE

Thesis Defend Board:
(degree/name and
surname/title/faculty)

DB

Jaroslav Katona, PhD, Associate Professor, Faculty of
Technology Novi Sad, president

Lidija Petrović, PhD, Associate Professor, Faculty of
Technology Novi Sad, mentor

Jadranka Fraj, PhD, Assistant professor, Tehnološki
fakultet Novi Sad, member

Ljiljana Đekić, PhD, Associate Professor, University of
Belgrade-Faculty of Pharmacy, member

Naučni radovi koji su do sada objavljeni u okviru ove doktorske disertacije su:

1. Milinković Jelena, Petrović Lidija, Fraj Jadranka, Bučko Sandra, Katona Jaroslav, Spasojević Ljiljana, Interfacial and emulsifying properties of chitosan/sodium lauryl ether sulfate system, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 557 (2018) 9-13
2. Petrović Lidija, Milinković Jelena, Fraj Jadranka, Bučko Sandra, Katona Jaroslav, Spasojević Ljiljana, Study of interaction between chitosan and sodium lauryl ether sulfate, *Colloid and Polymer Science*, 295 (2017) 2279–2285
3. Milinković Jelena, Aleksić Milijana, Petrović Lidija, Fraj Jadranka, Bučko Sandra, Katona Jaroslav, Spasojević Ljiljana, Interfacial properties of chitosan/sodium dodecyl sulfate complexes, *Acta Periodica Technologica*, 48 (2017) 221-229
4. Petrović Lidija, Milinković Jelena, Fraj Jadranka, Bučko Sandra, Katona Jaroslav, An investigation of chitosan and sodium dodecyl sulfate interactions in acetic media, *Journal of Serbian Chemical Society*, 81 (5) (2016) 575-587

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 CILJ DISERTACIJE	2
2. TEORIJSKI DEO SA PREGLEDOM LITERATURE	3
2.1 HITOZAN	3
2.1.1 Primena hitozana.....	4
2.1.2 Umrežavanje hitozana.....	7
2.2 JONSKE POVRŠINSKI AKTIVNE MATERIJE (PAM).....	10
2.2.1 Natrijum-dodecil-sulfat.....	11
2.2.2 Natrijum-lauriletar-sulfat	13
2.3 INTERAKCIJE U VODENIM RASTVORIMA POLIMERA	14
2.3.1 Interakcije hitozan-polimer	15
2.3.2 Tenziometrijsko ispitivanje polimer-PAM interakcije u vodenim rastvorima.....	16
2.3.3 Interakcije hitozan-PAM.....	19
2.4 NOSAČI AKTIVNIH MATERIJIA	22
2.4.1 Emulzioni nosači aktivnih materija.....	25
2.5 AKTIVNE MATERIJE U PREHRAMBENOJ I KOZMETIČKOJ INDUSTRIJI	29
2.5.1 Ulje koštica grožđa.....	29
2.5.2 Vitamin E.....	30
2.6 POSTUPCI MIKROKAPSULACIJE	33
2.6.1 Mikrokapsulacija koacervacijom	34
3. EKSPERIMENTALNI DEO	40
3.1 MATERIJAL.....	40
3.2 UREĐAJI	41
3.3 METODE ISPITIVANJA.....	42
3.3.1 Karakterizacija uzorka hitozana.....	42
3.3.2 Priprema rastvora	42
3.3.3 Merenje mutnoće.....	42
3.3.4 Tenziometrijska merenja.....	42
3.3.5 Viskozimetrijska merenja	43
3.3.6 Merenje elektroforetske pokretljivosti i zeta potencijala	43
3.3.7 Priprema emulzija U/V	43
3.3.8 Praćenje sedimentacione nestabilnosti emulzija	44
3.3.9 Dobijanje mikrokapsula	44

3.3.10	Određivanje veličine i raspodele veličine kapi emulzija.....	45
3.3.11	Ispitivanje morfologije površine mikrokapsula	45
3.3.12	Ispitivanje sadržaja vlage mikrokapsula	46
3.3.13	Ispitivanje efikasnosti mikrokapsulacije vitamina E.....	46
3.3.14	Ispitivanje oslobađanja vitamina E iz mikrokapsula.....	47
3.3.15	Kinetika oslobađanja vitamina E iz mikrokapsula.....	47
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	49
4.1	ISPITIVANJE INTERAKCIJE IZMEĐU HITOZANA I NATRIJUM-DODECIL-SULFATA	50
4.1.1	Turbidimetrijsko ispitivanje	50
4.1.2	Određivanje elektroforetske pokretljivosti.....	51
4.1.3	Tenziometrijsko ispitivanje.....	53
4.1.4	Viskozimetrijsko ispitivanje	57
4.2	ISPITIVANJE INTERAKCIJE IZMEĐU HITOZANA I NATRIJUM-LAURILETAR-SULFATA	59
4.2.1	Turbidimetrijsko ispitivanje i separacija faza u sistemu hitozan-SLES.....	59
4.2.2	Tenziometrijsko ispitivanje.....	61
4.2.3	Određivanje elektroforetske pokretljivosti.....	64
4.2.4	Viskozimetrijsko ispitivanje	65
4.3	UTICAJ INTERAKCIJE HITOZAN-JONSKA PAM NA OSOBINE U/V EMULZIJA.....	67
4.3.1	Adsorpcija hitozana i njegovih kompleksa sa SDS i SLES na granici faza ulje/voda.....	67
4.3.2	Dobijanje i osobine emulzija ulja u vodi stabilizovanih hitozan-SLES kompleksima	72
4.4	MIKROKAPSULACIJA ULJA U SISTEMU HITOZAN-JONSKA PAM.....	78
4.4.1	Sadržaj vlage u mikrokapsulama kompleksa hitozan-SLES.....	78
4.4.2	Uticaj udela umreživača na osobine mikrokapsula	79
4.4.2.1	Morfološka analiza omotača mikrokapsula	79
4.4.2.2	Efikasnost mikrokapsulacije i brzina oslobađanja vitamina E iz mikrokapsula	83
5.	ZAKLJUČCI.....	87
6.	LITERATURA	90
7.	PRILOG.....	102

1. UVOD

Mikrokapsulacija je jedna od tehnika kojom se osetljive materije, različitog agregatnog stanja oblažu omotačem, čime se značajno povećava njihova stabilnost, omogućuje njihovo inkorporiranje u sredinu sa kojom su inkompatibilne, ili se postigne kontrolisano oslobađanje inkapsuliranog sadržaja. Savremene formulacije proizvoda različitih grana industrije (hemijska, tekstilna, prehrambena, farmaceutska, agroindustrija i dr.) veoma često uključuju prisustvo mikrokapsula različitih materija, kao što su boje, mirisi, arome, vitamini, antioksidansi i farmakološki aktivne supstance. Na ovaj način je moguće dobiti proizvode sa unapređenim osobinama i/ili pozitivnim efektom na ljudsko zdravlje. Poseban aspekt primene mikrokapsula u farmaciji i kozmetičkoj industriji je dobijanje nosača aktivnih materija sa kontrolisanim i ciljnim otpuštanjem aktivne supstance.

Osobine formiranih mikrokapsula, kinetika i mesto otpuštanja inkapsuliranih materija zavise, pre svega, od osobina njihovog omotača. Razvoj prehrambenih proizvoda i proizvoda farmaceutske i kozmetičke industrije danas je sve više usmeren ka upotrebi prirodnih i biorazgradivih polimernih materija za formiranje omotača. Regulisanje osobina omotača mikrokapsula se može postići na razne načine, pri čemu je odlučujuća interakcija komponenata koje ga formiraju. Iz ovih razloga, interakcije polimer-polimer, polimer-površinski aktivna materija i polimer-aktivna materija imaju izuzetan značaj, kako sa teorijskog, tako i sa praktičnog stanovišta.

Savremene tendencije u proizvodnji disperznih sistema koji se koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, upućuju na smanjenu upotrebu sintetskih polimera i njihovu zamenu polimerima prirodnog porekla, koji poseduju izrazitu biokompatibilnost. Posebnu pažnju privlače biorazgradivi polimeri koji mogu stupiti u interakciju sa jonskim površinski aktivnim materijama male molekulske mase i na taj način grade komplekse koji mogu biti površinski aktivni i učestvovati u stabilizaciji emulzionih sistema tj. formirati omotač mikrokapsula. Hitozan, kao prirodni filmogeni polimer, predstavlja dobar izbor omotača mikrokapsula, koji se interakcijom sa površinski aktivnim materijama može deponovati na graničnoj površini. Osobine adsorpcionog sloja se mogu poboljšati dodatkom umreživača, čime se mogu postići efekti kontrolisanog oslobađanja aktivne supstance. Na ovaj način se smanjuje i upotreba niskomolekularnih površinski aktivnih materija u industriji, čemu se danas sve više teži.

1.1 Cilj disertacije

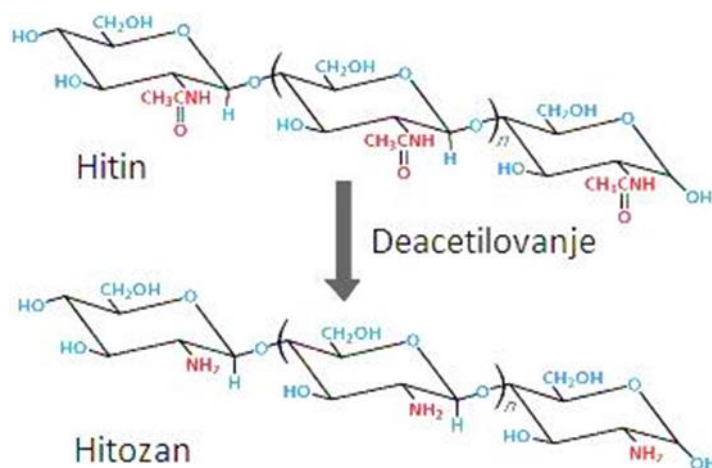
Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su usmerena ka mogućnosti primene hitozana, netoksičnog, biorazgradivog derivata hitina, kao materije omotača mikrokapsula sa uljnim sadržajem. S obzirom na slabu površinsku aktivnost hitozana, istraživanja su zasnovana na primeni interakcija sa jonskim površinski aktivnim materijama u vodenim rastvorima, kao mehanizmu za njegovo deponovanje na graničnoj površini ulje/voda. Na osnovu već navedenog, cilj ove disertacije je da se ispita mogućnost primene kompleksa hitozan-jonska površinski aktivna materija (natrijum-dodecil-sulfat, natrijum-lauriletar-sulfat) kao omotača mikrokapsula uljnog sadržaja, namenjenih za primenu u proizvodima prehrambene, kozmetičke i farmaceutske industrije. Osobine formiranog omotača, prvenstveno njegova morfologija i propustljivost, će se regulisati primenom pogodnih umreživača.

Detaljnim ispitivanjem interakcija u sistemu hitozan-jonska površinski aktivna materija, primenom različitih metoda (tenziometrija, viskozimetrija, turbidimetrija, merenje elektroforetske pokretljivosti), definisaće se promene, kako na granici faza, tako i unutar rastvora i razjasniti mehanizmi formiranja kompleksa različitih osobina. Ispitivanje uticaja interakcije na osobine emulzionih sistema tipa ulje u vodi (veličinu i raspodelu veličina kapi, stabilnost) omogućiće odabir komponenata omotača i njihovog masenog odnosa pogodnog za dobijanje mikrokapsula uljnog sadržaja. Sušenjem emulzija raspršivanjem u struji toplog vazduha dobiće se mikrokapsule uljnog sadržaja. Mogućnost inkorporiranja aktivne materije (vitamin E), kao i uticaj umreživača na osobine mikrokapsula takođe će biti ispitani.

2. TEORIJSKI DEO SA PREGLEDOM LITERATURE

2.1 Hitozan

Hitin, drugi najrasprostranjeniji prirodni polisaharid nakon celuloze, se nalazi u koži ili ljusci većine insekata i morskih organizama (rakovi, krabe, jastozi, školjke), dok se u biljnom svetu hitin nalazi samo u ćelijskom zidu gljiva i zelenih algi. Hemijska inertnost i stabilnost objašnjavaju njegovu gradivnu ulogu u biljkama i životinjama. U komercijalnom obliku, to je bela čvrsta supstanca u vidu praha, pahuljica ili ljuspica, nerastvorljiva u vodi, razblaženim kiselinama, hladnim alkalijama, kao i u organskim rastvaračima (Jocić i Topalović, 2004).



Slika 1. Dobijanje hitozana deacetilovanjem hitina (Martinez-Huitle i sar., 2009)

Hitozan je prirodni, linearni, biopoliaminosaharid, koji se dobija delimičnim ili potpunim N-deacetilovanjem hitina (slika 1). Hitin i hitozan su kopolimeri β (1 \rightarrow 4) vezanih 2-amino-2-dezoksi-D-glukočnih i N-acetil-2-amino-2-dezoksi-D-glukočnih jedinica. Ovi kopolimeri se karakterišu stepenom acetilovanja (engl. *degree of acetylation-DA*), što predstavlja prosek molarnog udela N-acetil-D-glukozamina u makromolekularnom lancu. Opšte je prihvaćeno da se hitozanom smatra kopolimer sa $DA < 0,5$. Način dobijanja hitozana iz hitina određuje njegove karakteristike kao što su molekulska masa, stepen deacetilovanja i kristalinitet, pri čemu je stepen deacetilovanja označen u literaturi kao jedan od najvažnijih parametara za karakterizaciju hitozana. Molekulska masa definiše viskozitet hitozana. Ove dve osobine imaju značajnu ulogu u biološkim osobinama hitozana (Estevinho i sar., 2013; Schulz i sar., 1998).

Hitozan poseduje tri tipa reaktivnih funkcionalnih grupa, amino grupu (-NH₂) na C₂ atomu i primarnu i sekundarnu hidroksilnu grupu (-OH) na C₃ i C₆ atomu. Molekulska masa hitozana je u intervalu od 38 do 2000 kDa, a procenat deacetilovanja je od 66 do 95%. Na osnovu molekulske mase hitozani se, obično, dele na hitozane male molekulske mase (<150 kDa), hitozane srednje molekulske mase i hitozane velike molekulske mase (>700 kDa). Prisustvo funkcionalnih grupa omogućuje postupke derivatizacije i promene fizičko-hemijskih osobina koje ga čine veoma cenjenim materijalom sa velikim potencijalom primene. Dokazano je da sam hitozan ima slabu površinsku aktivnost zbog izrazite hidrofilne prirode, međutim uvođenjem hidrofobne grupe na jednoj ili obema funkcionalnim grupama (-NH₂ ili -OH) on može da pokaže određenu površinsku aktivnost. Hidrofobno modifikovani hitozan se može koristiti u mnogim granama industrije kao emulgator, a zbog svoje biokompatibilnosti našao je primenu u postupcima inkapsulacije u vodi nerastvornih anti-tumornih i lekova sa ciljanim dejstvom na moždano tkivo, što predstavlja rastući trend na polju istraživanja u farmaciji (Agnihotri i sar., 2004; Elsabee i sar., 2009; Sinha i sar., 2004; Wong, 2009).

Hitozan je nerastvoran u vodi i organskim rastvaračima, ali na relativno niskim vrednostima pH (<6,5) rastvorljiv je u vodi i pokazuje polikatjonski karakter. Zbog protonovanja, lako dostupnih slobodnih amino grupa, dolazi do konverzije glukozaminskih jedinica u rastvorljiv oblik R-NH₃⁺, što rezultuje visokim stepenom hidratacije i jakim elektrostatičkim odbijanjem između molekula. Prisustvo pozitivno naelektrisanih grupa omogućuje stupanje u interakciju sa suprotno naelektrisanim površinski aktivnim materijama i polimerima, dobro svojstvo adsorpcije na negativno naelektrisane površine, kao i formiranje kompleksa sa jonima metala. Na višim pH vrednostima (≥6,5) amino grupe bivaju deprotonovane, hitozan gubi svoje pozitivno naelektrisanje i teži precipitaciji iz rastvora. Imajući ovo u vidu, očigledno je da svojstva hitozana u vodenom rastvoru zavise od molekulske mase i stepena deacetilovanja, ali i od ostalih uslova u rastvoru kao što su pH, jonska jačina rastvora i temperatura (Jocić i Topalović, 2004; McClements, 2005; Sinha i sar., 2004; Thongngam i Onésippe i Lagerge, 2008b).

2.1.1 Primena hitozana

Zahvaljujući svojim svojstvima hitozan i drugi derivati hitina imaju široku primenu u kozmetičkoj, farmaceutskoj, prehrambenoj industriji i biotehnologiji (slika 2). Zbog izražene biorazgradivosti i fizičko-hemijskih osobina hitozan se može koristiti i u pečišćavanju otpadnih voda, za modifikovanje tekstura ili uklanjanje veštačkih boja iz otpadnih voda tekstilne industrije, tako da na taj način učestvuje i u zaštiti životne sredine. Rastućem interesovanju za hitozan doprinosi njegovo poreklo iz obnovljivih izvora, što ga čini relativno jeftinim i lako dostupnim (Čalija i sar., 2013).

strukture u C₂ položaju daje derivatima hitozana različite osobine i omogućava široku primenu. Nosači farmakološki aktivnih supstanci na bazi hitozana uspešno se koriste za primenu antikancerogenih agensa, proteina/peptida, faktora rasta, antibiotika, antiinflamatornih lekova, kao i za primenu vakcina i u genskoj terapiji (Ahmed i Aljaeid, 2016; Hamman, 2010).

U istraživanju Cook i saradnika, ispitana je mogućnost izrade mikrokapsula od poli (D,L-laktid-ko-glikolne) kiseline (PLGA) koje sadrže prebiotik BimunoTM, inkorporiranih u matriks alginata i smešu alginat-hitozan, u kom se nalazi probiotik *Bifidobacterium breves*, sa ciljem utvrđivanja mogućnosti zaštite probiotika od delovanja želudačne kiseline kako bi neoštećen dospelo u tanko crevo gde se vrši njegovo oslobađanje. Dokazano je da veći broj probiotskih ćelija preživljava u alginat-hitozan mikrokapsulama, jer je usporena difuzija kiseline u matriks mikrokapsula, ali i zbog povećanja hidrofobnosti materijala nakon inkorporiranja PLGA mikrokapsula (Cook i sar., 2014).

Istraživanja u oblasti genske terapije postala su značajna tokom proteklih decenija, jer ovaj način terapije pokazuje veliki potencijal za lečenje mnogih naslednih ili stečenih bolesti zamenom neispravnih gena, supstitucijom gena koji nedostaju ili smanjenjem intenziteta neželjene ekspresije gena. S obzirom na to da se geni brzo razgrađuju nukleazama i teško dolaze do ćelija na koje treba da deluju (teško ispoljavaju osobinu transfekcije), javila se potreba za razvojem bezbednog i efikasnog nosača gena. Mao i saradnici istraživali su aspekt primene hitozana i njegovih derivata kao nosača aktivnih supstanci, kao što su DNK i RNK. Pokazano je da proces uvođenja nukleinskih kiselina u ćelije zavisi od različitih parametara: molekulske mase hitozana, stepena deacetilovanja, naelektrisanja hitozana i DNK/RNK, vrste soli hitozana, pH vrednosti, seruma, aditiva, načina dobijanja hitozana i delova nukleinskih kiselina, kao i načina administracije. Dokazano je da kompleksi formirani pomoću hitozana velike molekulske mase i velikog stepena deacetilovanja ispoljavaju visoku stabilnost (Mao i sar., 2010).

Kompozitne mikročestice sačinjene od hitozana impregniranog nanočesticama srebra ispoljavaju antibakterijsko dejstvo, te bi se mogli u budućnosti koristiti u biomedicini kao baktericidni agensi za dezinfekciju vode i antipatogeni. Pored do sad navedene primene, hitozan, zbog svog pozitivnog naelektrisanja, može da se ponaša kao helatni agens, koji selektivno vezuje metale u tragovima ili da se koristi kao koagulišući agens u tretmanu otpadnih voda ili u izradi kompozitnih materijala (Peretz i sar., 2013; Yang i sar., 2016).

Hitozan je našao primenu u medicini zbog hipobilirubinskog i hipoholesterolskog efekta, a takođe poseduje antacidna i antiulcerozna dejstva i svojstvo da pomaže pri lečenju rana i opekotina. Posebnu pažnju hitozan privlači u oblasti tkivnog inženjerstva, zahvaljujući mogućnosti obrazovanja biokompatibilnih poroznih trodimenzionalnih mreža, čiju je poroznost i brzinu degradacije u *in vivo* uslovima moguće kontrolisati. S obzirom da hitozan

ima sposobnost stvaranja biofilmova i poseduje sve potrebne karakteristike: optičku čistoću, mehaničku postojanost, gasnu permeabilnost, posebno prema kiseoniku, vlažnost, imunološku kompatibilnost i antimikrobno delovanje, predložen je kao biopolimer za izradu kontaktnih sočiva (mekih i tvrdih), a takođe se koristi za izradu očnih zavoja koji se koriste za zaštitu očiju kod akutnih ili hroničnih trauma očiju (Čalija i sar., 2013; Majeti i Kumar, 2000).

Hitozanske membrane su značajne kao veštačke membrane bubrega jer ispoljavaju pogodnu permeabilnost i visoku snagu istezanja. Dokazano je da hitozan ima mukoadhezivna svojstva zbog molekularne privlačne sile formirane elektrostatičkim interakcijama između pozitivno naelektrisanog hitozana i negativno naelektrisane mukozne površine. Ove osobine se mogu pripisati: jakim vodonično vezujućim grupama (-OH i -COOH), jakom naelektrisanju, velikim molekulskim masama, kao i fleksibilnošću lanca (Sinha i sar., 2004).

U farmaceutskoj industriji hitozan se koristi i kao direktno kompresibilni punioci, sredstvo za raspadanje, sredstvo za vezivanje, ekscipijens za dobijanje nosača lekovitih supstanci sa kontrolisanim oslobađanjem leka ili za njegovo poboljšano rastvaranje. Derivati hitozana se koriste u kozmetičkim preparatima jer poseduju sposobnost geliranja i formiranja filma, stvaraju prijatan osećaj na koži, omekšavaju, vlaže i štite kožu od spoljašnjih uticaja (Čalija i sar., 2013; Iium, 1998).

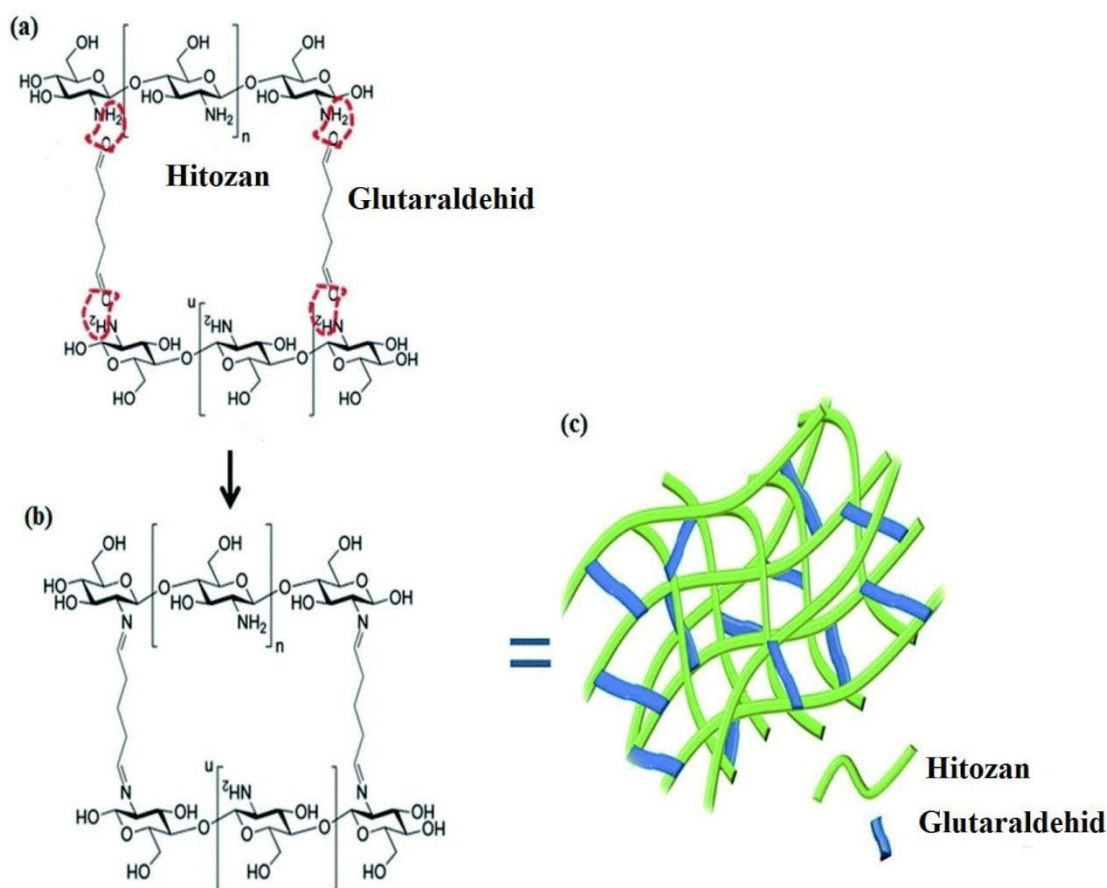
2.1.2 Umrežavanje hitozana

Biodegradabilni polimeri, poput hitozana, mogu se umrežavati kako bi im se podešavala opšta svojstva i kako bi mogli da otpuštaju aktivne supstance tokom određenog vremenskog perioda. Kao što je već spomenuto, jedna od važnih upotreba hitozana je njegova primena u sistemima sa kontrolisanim oslobađanjem supstance, kao što su mikrokapsule i nanokapsule (Chen i sar., 2006), hidrogeli (Berger i sar., 2004), nanovlakna (Bhattarai i sar., 2005), filmovi i tablete (Aranaz i sar., 2009). U odnosu na druge inkapsulirajuće materije hitozan ima značajnu prednost u odnosu na ostale polimere, jer poseduje mogućnost uspostavljanja kovalentnih i jonskih veza sa sredstvima za umrežavanje, pri čemu se gradi neka vrsta mreže unutar koje aktivna supstanca ostaje zarobljena. Shodno tome, ove hemijske veze imaju prednosti u kontrolisanom oslobađanju supstanci.

U zavisnosti od prirode umreživača, formiranje mreže može biti kovalentno ili jonsko. Kovalentno umrežavanje dovodi do stvaranja hidrogela ili mikročestica sa trajno umrežnom strukturom, jer se formiraju ireverzibilne hemijske veze. Ovaj tip veze omogućava apsorpciju vode i/ili bioaktivnih jedinjenja bez rastvaranja i dozvoljava oslobađanje leka difuzijom. Sredstva za umrežavanje, koja se koriste za uspostavljanje kovalentnih veza, su molekuli sa najmanje dve reaktivne funkcionalne grupe koje omogućuju stvaranje mostova između

polimernih lanaca. Najčešći korišćeni umreživači hitozana su dialdehidi, kao što su glioksal i glutaraldehid.

Proces umrežavanja hitozana glutaraldehidom podrazumeva kovalentno vezivanje aldehidnih grupa glutaraldehida za amino grupe hitozana (slika 3), pri čemu se ostvaruje hemijsko umreženje (Biswal i sar., 2016; Dini i sar., 2003).



Slika 3. a) Reakcija između neumreženog biopolimera hitozana i umreživača glutaraldehida; b) struktura umreženog molekula hitozana; c) šematski prikaz umreženog hitozana (Biswal i sar., 2016)

Glutaraldehid, kao agens za umrežavanje, sposoban je da očuva aktivnost bioloških materija poput imobilizovanih enzima i često se koristi za dobijanje hidrogela koji sadrže osetljiva jedinjenja. Ipak, jedan od nedostaka glutaraldehida je sposobnost da se transformiše u nepoželjna, reaktivna jedinjenja, pa se iz tog razloga javila potreba za pronalaženjem bezbednijeg agensa za umrežavanje.

Zahvaljujući prisustvu slobodnih amino grupa u lancu hitozana, koje u kiseloj sredini podležu protonovanju, hitozan ima sposobnost reagovanja sa dvo- ili više- valentnim anjonima. Natrijum-tripolifosfat je jedan od anjona koji može da reaguje sa hitozanom, pri čemu nastaju jonski, tj. fizički umreženi hidrogeli hitozana. Jonski umrežene mikrokapsule ili

hidrogeli hitozana se, generalno, smatraju biokompatibilnim i dobro se podnose, jer je njihova mreža povezana reverzibilnim vezama. Međutim, oni pokazuju veću osjetljivost na promene pH u poređenju sa kovalentno umreženim hitozanskim strukturama (Berger i sar., 2004; Desai i Park, 2005).

Brojne studije su pokazale da su sintetski agensi za umrežavanje (glutaraldehyd, formaldehyd, tripolifosfat, etilen glikol, diglicidil etar i diizocijanat) manje ili više citotoksični i mogu smanjiti biokompatibilnost hitozanskog sistema za otpuštanje lekova. Iz ovog razloga je poželjno pronaći reagens za umrežavanje koji je niske citotoksičnosti i stvara stabilne i biokompatibilne umrežene proizvode.

Genipin je potpuno biokompatibilan reagens prirodnog porekla pogodan za umrežavanje hitozana, koji je 10 000 puta manje citotoksičan od glutaraldehyda, i odgovara zahtevima današnje regenerativne medicine (Muzarelli, 2009). Mi i saradnici su ispitivali osobine mikrokapsula hitozana umrežene genipinom i glutaraldehydom, malih veličina čestica, dobijenih postupkom sušenja raspršivanjem. Rezultati istraživanja su pokazali da mikrokapsule pripremljene sa genipinom imaju veliku biokompatibilnost i sporiju degradaciju nego mikrokapsule hitozana pripremljene sa glutaraldehydom kao umreživačem (Mi i sar., 2002).

Karnchanajindanun i saradnici su ispitivali mogućnost dobijanja mikrokapsula umrežavanjem hitozana sa genipinom postupkom difuzije rastvarača u emulziji V/U. Umrežene mikrokapsule se formiraju nakon difuzije vode iz kapljica emulzije rastvora hitozana u spoljnu kontinualnu fazu. Ispitivan je efekat odnosa umreživača i vremena umrežavanja na karakteristike hitozanskih mikrokapsula, kao što je morfologija, veličina čestica, rastvaranje i specifična gustina. Izveden je zaključak da se sa povećanjem udela genipina i vremena umrežavanja povećava hrapavost površine mikrokapsula, ali se ne menja njihov oblik. Matriks umreženih mikrokapsula imao je veću gustinu od neumreženih, a veličina čestica i specifična gustina su se neznatno povećale sa povećanjem udela genipina i vremena umrežavanja. Ovakva metoda se pokazala obećavajućom za pripremu hitozanskih mikrokapsula u čijem jezgru se nalaze lekovite supstance, a vreme otpuštanja lekovitih supstanci bi moglo biti kontrolisano podešavanjem masenog odnosa genipin/hitozan i vremena umrežavanja (Karnchanajindanun i sar., 2010). I pored svih prednosti genipina kao umreživača, nedostatak je to što formulacije boji u plavo, kao i njegova visoka cena na tržištu.

2.2 Jonske površinski aktivne materije (PAM)

Površinski aktivne materije - PAM (eng. *Surface Active Agents, Surfactants*; nem. *Tenside*) su supstance koje se pri niskoj koncentraciji adsorbuju na površini ili međupovršini sistema, pri čemu u znatnom stepenu menjaju slobodnu (površinsku) i međupovršinsku energiju, odnosno površinski ili međupovršinski napon. PAM imaju specifičnu hemijsku građu koja im daje dvojak karakter u odnosu na afinitet prema rastvaraču. Sastoje se od hidrofilnog (polarnog) i hidrofobnog (nepolarnog) dela molekula, koji su u određenom odnosu, zbog čega se nazivaju amfifili. Obično su klasifikovani u četiri kategorije na osnovu prirode polarne grupe: anjonske, katjonske, nejonske i amfoterne (Kume i sar., 2008; Petrović, 2016; Vasiljević i sar., 2019; Vuleta i sar., 2017).

Molekuli PAM pri malim koncentracijama obrazuju prave rastvore i u rastvaraču se nalaze kao pojedinačni molekuli-monomeri. Sa povećanjem koncentracije molekuli teže da se grupišu u veće agregate, koji se nazivaju micelle. Koncentracija PAM pri kojoj počinje formiranje micela naziva se kritična micelarna koncentracija (KMK). PAM rastvorena u određenom rastvaraču, najčešće u vodi, u količini koja je veća od kritične micelarne koncentracije, spontano obrazuje micelle različitog oblika. Nakon formiranja micela dolazi do promene osobina rastvora, tako da se KMK može odrediti praćenjem promena osobina rastvora PAM, kao što su: površinski napon, viskozitet, rasipanje svetlosti, difuzija, električna provodljivost itd (Đaković, 1990a).

PAM se ubrajaju u proizvode hemijske industrije koji imaju vrlo široku primenu. Prisutne su u sredstvima za pranje kao sapuni i deterdženti, u proizvodima za negu lica i tela i za ličnu higijenu, u agrohemikalijama, lekovima, prehrambenim proizvodima, u proizvodnji tekstila i vlakana, nanotehnologiji, bojama, mastilima, lepilima i mnogim drugim proizvodima. PAM imaju različitu ulogu kao pomoćne supstance u formulacijama farmaceutskih preparata tipa rastvora, emulzija, suspenzija, gelova, kapsula, tableta i dr. One mogu da pospeše apsorpciju lekovitih supstanci kroz biološke membrane do mesta delovanja. Značajne su i za formulaciju preparata sa produženim oslobađanjem lekovite supstance, uključujući i transdermalne terapijske sisteme.

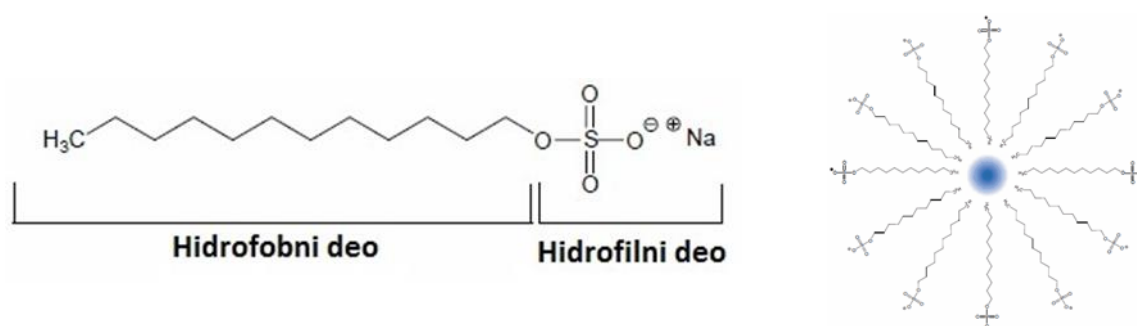
PAM koje se koriste u farmaceutskoj industriji moraju ispunjavati veoma stroge regulatorne zahteve u pogledu njihove bezbednosti (Myers, 2006). U razvoju formulacija sa lekovitim supstancama koje imaju ograničenu rastvorljivost u vodi, uglavnom je neophodna primena surfaktanata i kosurfaktanata u cilju poboljšanja njihove rastvorljivosti. Slabu rastvorljivost u biološkim tečnostima ima oko 50% lekova, što predstavlja glavno ograničenje za njihovu oralnu, parenteralnu i transdermalnu primenu. Sintetske PAM imaju mnoge prednosti, kao što su laka dostupnost, niska cena, široka oblast primene, dok su prednosti biosurfaktanata ekološki aspekti i povećana svest za očuvanje životne sredine (Holmberg i sar., 2002; Mishra i sar., 2009).

Alkil-sulfati i alkil-etar-sulfati su prema svojoj međunarodnoj nomenklaturi kozmetičkih sastojaka (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*, INCI), grupa jedinjenja u koju se ubrajaju: amonijum-lauril-sulfat, natrijum-lauril-sulfat, natrijum-lauriletar-sulfat, magnezijum-lauril-sulfat, natrijum-kokosulfat i dr.

2.2.1 Natrijum-dodecil-sulfat

Anjonski surfaktanti su amfifilna jedinjenja sačinjena iz hidrofobnog (alkil lanci različite dužine, alkilfenil etri, alkilbenzeni i dr.) i hidrofilnog dela (karboksilne grupe, sulfati, sulfonati, fosfati i dr.). Hidrofilni i hidrofobni delovi imaju osobinu da lako stupaju u interakciju sa polarnim i nepolarnim delovima makromolekula poput proteina i celuloze, ili sa polarnim i nepolarnim molekulima u smeši jedinjenja. Na ovaj način, anjonski surfaktanti mogu da snize energiju interakcije i energiju solvatacije između velikog broja heterogenih faza u mnogim tehnološkim procesima i biološkim sistemima adsorbujući se na granici faza ulje-voda (Cserhádi i sar., 2002).

Natrijum-dodecil-sulfat (natrijum-lauril-sulfat ili eng. *sodium dodecyl sulfate*-SDS) je surfaktant male molekulske mase, koji pripada grupi sulfatnih alkohola. To je natrijumova so dodecil-hidrogen-sulfata, estra dodecil alkohola i sulfatne kiseline. Njegov ugljovodonični rep u kombinaciji sa polarnom grupom daje jedinjenje koje ima amfifilne osobine, formira micelle, što omogućava da SDS ulazi u sastav komercijalnih formulacija za proizvodnju deterdženata. SDS je anjonska PAM koja se nalazi u mnogim sredstvima za čišćenje i održavanje lične higijene. Uobičajen je sastojak mnogih kozmetičkih, farmaceutskih i prehrambenih proizvoda. Na slici 4 je prikazana hemijska struktura i ilustracija micelle SDS.



Slika 4. Hemijska struktura i ilustracija micelle natrijum-dodecil-sulfata

Natrijum-dodecil-sulfat izuzetno dobro smanjuje površinski napon vodenih rastvora, te se koristi za uklanjanje masnih fleka. U većim koncentracijama se nalazi u proizvodima za odmaščivanje motora, podova i sapunima za pranje vozila. U nižim koncentracijama se nalazi u pastama za zube, rastvorima za ispiranje usta, šamponima, kremama za brijanje i u formulacijama kupki, zbog njegove sposobnosti da stvori obilnu penu, a delimično i zbog

efekta zgušnjavanja. U prehrambenoj industriji se primenjuje kao emulgator i smanjenje percepcije slatkoće (Adams, 1985; Dolkemeyer, 2000).

U biohemijskim procesima SDS se koristi kao komponenta koja izaziva lizu ćelija tokom ekstrakcije DNK i za denaturaciju proteina u pripremi za elektroforezu u tehnici SDS-poliakrilamid gel elektroforeza. To je tehnika za razdvajanje denaturisanih proteina na osnovu njihove relativne molekulske mase (Roy i sar, 2012). SDS se primenjuje u poboljšanoj tehnici za pripremu moždanog tkiva za studije optičke mikroskopije, gde se njegova uloga ogleda u uklanjanju lipida, pri čemu se eliminiše rasipanje svetlosti uz minimalan gubitak proteina (Chung i sar., 2013).

SDS ima primenu i u farmaceutskim preparatima kao emulgator, permeacioni inhenser, sredstvo za raspadanje i lubrikans. Kao anjonski surfaktant, široko se koristi u kozmetičkoj industriji (sapuni, zubne paste, šamponi i sl.), dok se u prehrambenoj industriji koristi kao aditiv.

Rezultati istraživanja Piret i saradnika sugerišu da bi SDS mogao da predstavlja sirovinu izbora potencijalnog mikrobiocidnog sredstva za sprečavanje prenosa HIV-a i eventualno drugih patogena koji izazivaju polno prenosive bolesti (Piret i sar., 2000).

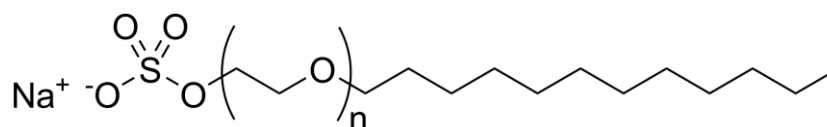
Pored svojih brojnih prednosti SDS ima i nedostatke, naime prodire u tkiva, zadržava se u njima i izaziva iritaciju. Stoga u kozmetičkim proizvodima namenjenim za duži kontakt sa kožom, koncentracija natrijum-dodecil-sulfata ne bi trebalo da prelaze 1% (Marrakchi i Maibach, 2006).

Dostupni podaci ukazuju da se upotreba SDS u raznim industrijskim i proizvodima domaćinstva povećava alarmantnom brzinom. Posledice koje proističu iz njegove preterane upotrebe i naknadne distribucije u vodotokove su za ozbiljnu zabrinutost. Dakle, postoji potreba za pronalaženjem metode za razgradnju ove supstance. Biodegradacija ovog surfaktanta bakterijama izgleda kao efikasna i jeftina metoda za njegovo uspešno uklanjanje. Postoje izveštaji da je određena grupa bakterija koje pripadaju *Pseudomonas sp.*, sposobna da degradira SDS i koristi ga kao izvor ugljenika (Chaturvedi i Kumar, 2010).

Zbog svoje niske cene, efikasnog uklanjanja masnoće, izostanka uticaja na ukus, sposobnosti stvaranja pene, kompatibilnosti sa drugim supstancama i drugih pogodnih osobina natrijum-dodecil-sulfat je još uvek široko primenjivana supstanca, bez obzira na potencijalno štetno dejstvo. S obzirom na to, istraživanja sa ciljem smanjenja njegove zastupljenosti u proizvodima, kroz interakciju sa drugim jedinjenjima, naročito prirodnog porekla, radi ostvarivanja istog ili boljeg željenog efekata, zauzimaju primarno mesto.

2.2.2 Natrijum-lauriletar-sulfat

Alkil-etar-sulfati (AES) se primenjuju u preparatima za ličnu negu, deterdžentima, u poljoprivredi, rudarstvu, za premazivanje mašina u industriji i dr. Njihove osobine su posebno prilagođene za upotrebu u šamponima, kozmetičim proizvodima za čišćenje i pranje kože i prehrambenim proizvodima. Neki proizvodi su posebno efikasni u čišćenju površina sa pH 5, obezbeđuju dobro pranje i penjenje i zadovoljavajući viskozitet. AES su anjonski surfaktanti koji su dobro rastvorljivi u vodi. Stabilni su u alkalnoj sredini i nisu kompatibilni sa katjonima, zbog formiranja kompleksa i smanjene površinske aktivnosti. Ekonomski su isplativi, a njihova bezbednost za ljude i životinje je istražena od strane *Cosmetic Ingredient Review*. I pored toga što natrijum- i amonijum-lauriletar-sulfat mogu izazvati iritaciju očiju i kože, na osnovu dostupnih informacija, zaključeno je da su natrijum- i amonijum-lauriletar-sulfat u ovom trenutku sigurni i bezbedni za korišćenje u kozmetičkim proizvodima i to u formulacijama dizajniranim za diskontinuirano, kratko korišćenje, praćeno temeljnim ispiranjem sa površine kože. U proizvodima namenjenim za produženi kontakt sa kožom, koncentracija ne bi trebalo da prelazi 1%.



Slika 5. Hemijska struktura natrijum-lauriletar-sulfata

Natrijum-lauriletar-sulfat (eng. *Sodium laurylether sulfate-SLES*) (slika 5) je anjonski surfaktant koji poseduje etilenoksidne grupe između hidrofilnog dela i dodecilnih hidrofobnih grupa, što povećava sveukupnu hidrofobnost ovog jedinjenja (Peretz i sar., 2013). Dobija se iz natrijum-lauril-sulfata, čime nastaje etoksilat, koji se transformiše u poliestar sulfatne kiseline i neutrališe kako bi nastao SLES. Karakteriše se dužinom alkil lanaca i prosečnom dužinom etilen oksidnih lanaca (EO), čija raspodela utiče na važne fizičke osobine, kao što su rastvorljivost i viskoznost. Pored toga, dužina EO lanca utiče i na osnovne funkcije (kao što su kvašenje, penušanje, emulgovanje, dispergovanje i čišćenje) SLES u proizvodima. Najčešće se u deterdžentima i šamponima za kosu primenjuje SLES sa dužinom alkil lanca 12-16 C-atoma i sa 2-3 mol EO, pri čemu sa povećanjem dužine EO lanca raste rastvorljivost i viskozitet ove PAM.

Emulgujuća svojstva i mogućnost stvaranja pene čine ga značajnim sastojkom kozmetičkih proizvoda, proizvoda za čišćenje (u koncentraciji od 0,1% do 50%) i proizvodima za ličnu higijenu. Široku primenu našao je zbog niske cene i osobine da blago iritira oči i kožu, pa se zato koristi i u proizvodima za negu beba, a često se koristi i u kombinaciji sa drugim PAM (Hyun i Jeong, 2009; Caracciolo i sar., 2017).

2.3 Interakcije u vodenim rastvorima polimera

U vodenim rastvorima različitih biopolimera mogu se javiti sinergističke i antagonističke interakcije između njihovih molekula. Osnovni tipovi interakcija u vodenim rastvorima polimera mogu se svrstati u četiri grupe: elektrostatičke interakcije (gde makromolekuli poseduju izvesno naelektrisanje i one mogu biti privlačne ili odbojne u zavisnosti od toga da li su molekuli istoimeno ili suprotno naelektrisani), hidrofobne interakcije (značajne kod vodenih rastvora biopolimera koji poseduju nepolarne grupe, i ispoljavaju se kroz tendenciju nepolarnih grupa ka asocijaciji), sterno istiskivanje (relativno velika zapremina koju zauzimaju makromolekuli u rastvoru uslovljava smanjenje entropije mešanja u sistemu usled smanjenja zapremine dostupne drugim molekulima biopolimera) i vodonične veze (biopolimeri koji duž lanca imaju segmente, ili bočne grupe, koji mogu da formiraju jake vodonične veze sa segmentima na molekulima drugih biopolimera, a kao rezultat nastaju spiralne ili lamelarne strukture).

Relativni udeo različitih interakcija u određenom sistemu zavisi od osobina makromolekula (molekulske mase, gustine naelektrisanja, fleksibilnosti, hidrofobnosti), osobina rastvora (pH i jonske jačine), kao i od uslova sredine (temperature, smicanja). Modelovanjem ovih parametara moguće je kontrolisati interakcije u smešama biopolimera sa ciljem dobijanja sistema odgovarajućih funkcionalnih karakteristika (McClements, 2006).

Posmatranjem sastava različitih prehrambenih, kozmetičkih, farmaceutskih i hemijskih proizvoda, može se uočiti prisustvo jednog ili više polimera zajedno sa jednom ili više PAM. Pri određenim uslovima može doći do interakcije između samih molekula polimera, kao i između molekula PAM i molekula polimera, i stvaranja kompleksa koji može značajno promeniti osobine sistema.

Polimer-anjonska PAM interakcije u smeši mogu biti relativno slabe, a javljaju se između polimernog lanca i glave surfaktanta, ili mogu biti jake, u slučaju kada se formiraju elektrostatičke veze između suprotno naelektrisanih grupa prisutnih na molekulima polielektrolita. Hidrofobne interakcije između polimera i surfaktanta su uvek prisutne i mogu predstavljati predominantne privlačne veze. Jake interakcije u ovakvim sistemima, koje su uglavnom uzrokovane elektrostatičkim i hidrofobnim silama, dovode do formiranja kompleksa različitih struktura i karakteristika, a u nekim slučajevima i do formiranja koacervata i razdvajanja faza (Cooper i sar., 2005; Onesippe i Lagerge, 2008a).

Do najvećih promena usled interakcije dolazi u sistemu kod koga su polimer i PAM suprotno naelektrisane. Interakcija je posebno izražena u sistemu jak polielektrolit-suprotno naelektrisana PAM, gde već pri vrlo niskoj koncentraciji PAM dolazi do precipitacije kompleksa polielektrolit/PAM. Kod takvih sistema, da bi se povećao raspon koncentracija u kome se interakcijom formira koacervat pre pojave precipitacije, elektrostatičko privlačenje suprotno naelektrisanih grupa se mora redukovati. Obično se to postiže dodatkom elektrolita

ili nejonske PAM. Struktura kompleksa polimer/PAM zavisi od naelektrisanja, hidrofobnosti i molekulske mase polimera, kao i naelektrisanja i oblika molekula PAM. Konstatovano je da još pri nižoj koncentraciji od kritične micelarne koncentracije počinje čvrsto vezivanje molekula PAM za suprotno naelektrisane molekule polimera, usled jakog elektrostatičkog potencijala oko polimernog lanca (Huang i sar., 2001; Sovilj i sar., 2000).

2.3.1 Interakcije hitozan-polimer

Prisustvo protonovane amino grupe na lancu hitozana u kiseloj sredini, njega čini katjonskim polielektrolitom, što omogućuje formiranje polielektrolitnog kompleksa sa negativno naelektrisanim polielektrolitima, koji imaju široku primenu. Iz ovih razloga interakcije hitozana sa različitim polimerima prirodnog porekla (alginat, pektin, ksantan guma, karagenan, celuloza, kolagen i dr.), kao i sa sintetskim polimerima, metalnim anjonima, tripolifosfatom i dr. intenzivno su ispitivana poslednjih godina (Luo i Wang, 2014).

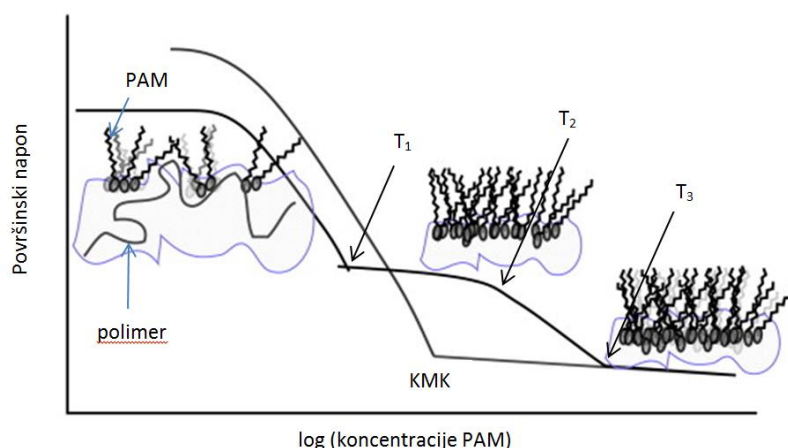
Interakciju u sistemu hitozan-natrijum-karboksimetil celuloza ispitivali su Rosca i saradnici, različitim metodama (konduktometrijska, potenciometrijska i turbidimetrijska titracija) i zaključili da je kompleks polielektrolita formiran pri određenom stehiometrijskom odnosu uz pomoć elektrostatičkog privlačenja (Rosca i sar., 2005). Ispitivanja interakcije hitozana i kolagena ukazala su na dva različita mehanizma njihovog povezivanja. Prvi mehanizam, elektrostatičke prirode pri niskim koncentracijama hitozana i drugi, kada se hitozan doda u velikom višku, dolazi do delimičnog deprotonovanja hitozana praćenog jakom interakcijom sa kolagenom, najverovatnije vodoničnim i hidrofobnim interakcijama (Taravel i Domard, 1996). Hitozan stupa u interakciju i sa alginskom pri čemu se formira biodegradabilan i biokompatibilan kompleks (Hein i sar., 2008), a odnos naelektrisanja, molekulska masa, jonska jačina, pH, brzina mešanja i prečnik propelera mešalice utiču na veličinu čestica, zeta potencijal i stabilnost ovog kompleksa (Seather i sar., 2008). Takođe, postoji veliki broj studija koje su ispitivale interakcije hitozana i karagenana, sulfatnog polisaharida (tri tipa κ , ι , λ) gde se došlo do zaključka da priroda i tip karagenana utiču na formiranje i osobine polielektrolitnog kompleksa sa hitozanom (Shumilina i sar., 2002). Da bi došlo do interakcije hitozana i pektina nije dovoljno pomešati acetatni rastvor hitozana sa rastvorom pektina, već se polielektrolitni kompleks dobija podešavanjem pH ove smeše na 5,5, kada dolazi do elektrostatičkog privlačenja između negativno naelektrisanih karboksilnih grupa pektina i pozitivno naelektrisanih amino grupa hitozana (Bernabe i sar., 2005). Kao i u slučaju pektina, želatin tipa B i hitozan stupaju u interakciju samo pri pH iznad 4,7 (što predstavlja izoelektričnu tačku želatina tipa B i iznad ove vrednosti želatin tipa B je negativno naelektrisan) i ispod 6,2 (iznad koje se hitozan taloži iz rastvora) (Yin i sar., 2005).

2.3.2 Tenziometrijsko ispitivanje polimer-PAM interakcije u vodenim rastvorima

Fenomeni interakcija u sistemu polimer-površinski aktivna materija omogućili su široku primenu ovih sistema u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, jer mogu u velikoj meri da utiču na osobine proizvoda. Neke od njih su stabilnost, reološke i teksturalne karakteristike, penivost i fazno ponašanje. Promene u sistemu koje su nastale kao posledica interakcija se mogu pratiti različitim tehnikama kao što su tenziometrija, viskozimetrija, reologija, konduktometrija, spektroskopija itd.

Promene u vodenim rastvorima polimera i površinski aktivne materije, praćene primenom tenziometrije, detaljno su opisali Taylor i saradnici (Taylor i sar., 2007). Primenom ove metode, najčešće se prate promene površinskog napona na graničnoj površini voda-vazduh u funkciji koncentracije PAM, za konstantnu koncentraciju polimera u rastvoru.

Slabo interaktivni sistemi se obično sastoje iz nejonskog polimera (polivinilpirolidon, polietilenoksid) i jonske površinski aktivne materije (SDS). Idealna kriva površinskog napona za slabo interaktivne sisteme polimer-PAM šematski je prikazana na slici 6, zajedno sa krivom površinskog napona rastvora PAM u odsustvu polimera.



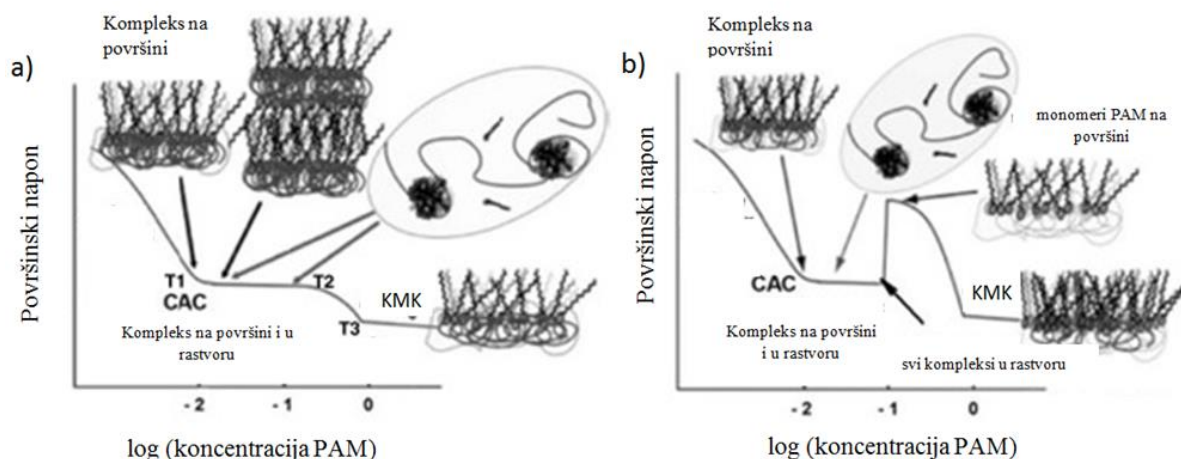
Slika 6. Šematski prikaz zavisnosti površinskog napona od koncentracije PAM i struktura adsorbovanih kompleksa polimer-PAM za sisteme sa slabim interakcijama

Kako se može primetiti sa slike 6 postoje tri prelomne tačke koje su konvencionalno označene sa T₁, T₂ i T₃. Prva prelomna tačka, T₁, označava kritičnu agregacionu koncentraciju (CAC), odnosno koncentracija PAM pri kojoj započinje vezivanje za molekule polimera, dok pri T₂ dolazi do zasićenja polimera molekulima PAM. T₃ ukazuje na početak formiranja slobodnih micela PAM u rastvoru.

Početno smanjenje površinskog napona uzrokovano je adsorpcijom PAM na graničnoj površini sa ili bez polimera. Polimer i PAM se adsorbuju zajedno na površini zbog slabih interakcija između njih (jon-dipol interakcija, između dipola hidrofилnih delova polimera i

jonske grupe PAM, ili hidrofobne interakcije, između hidrofobnih delova polimera i ugljovodničnih lanaca). Stoga je površinski napon smeše niži od površinskog napona čistih rastvora PAM odgovarajućih koncentracija. Povećanje koncentracije PAM u ovom koncentracionom opsegu dovodi do povećanog broja adsorbovanih monomera PAM na slobodnoj površini, te površinski napon opada sa povećanjem koncentracije PAM sve do T_1 . Pri T_1 dolazi do formiranja kompleksa polimer/PAM u rastvoru, i svako dalje povećanje koncentracije PAM rezultira njenim vezivanjem za polimer usled čega ne dolazi do značajnih promena površinskog napona rastvora sve do T_2 kada polimer postaje zasićen vezanim PAM. Nakon T_2 , sa povećanjem koncentracije PAM sve veći broj monomera PAM se adsorbuje na graničnu površinu, uz istovremenu desorpciju kompleksa, što dovodi do opadanja površinskog napona. Adsorpcija PAM se nastavlja sve do zasićenja slobodne površine monomerima PAM, T_3 , kada dolazi do formiranja prvih slobodnih micela PAM u rastvoru. Koncentracija slobodnih molekula PAM u celoj oblasti interakcije je konstantna i kreće se oko kritične micelarne koncentracije date PAM. Takođe, prelomne tačke T_1 i T_3 u praktičnom eksperimentalnom radu mnogo su bolje definisane i uočljivije nego što je to slučaj sa T_2 (Taylor i sar., 2007). Eksperimentalno je potvrđeno da je T_1 koncentracija karakteristična i nepromenljiva za određeni polimer-PAM sistem, dok T_2 linearno zavisi od koncentracije polimera u rastvoru (Sovilj i sar., 2006).

Jake interakcije u vodenim rastvorima polimera i PAM se javljaju kod smeša jonski polimer-suprotno naelektrisana PAM i uslovljene su, prvenstveno, elektrostatičkim privlačnim silama između naelektrisanih delova molekula polimera i polarne glave molekula PAM. Istovremeno, hidrofobne interakcije koje se javljaju između nepolarnih delova molekula polimera i PAM, takođe utiču na ponašanje kompleksa polimer-PAM na graničnoj površini i izgled adsorbovanih slojeva. Praćenjem promena površinskog napona u funkciji koncentracije PAM, koje se detektuju u ovim kompleksnim sistemima, ukazuju da postoje dva tipa ponašanja, prikazani na slici 7a i 7b.



Slika 7. Šematski dijagrami zavisnosti površinskog napona od koncentracije PAM u sistemima sa jakim elektrostatičkim interakcijama a) anjonski polimer-katjonska PAM; b) katjonski polimer-anjonska PAM

Na slici 7a je šematski prikazana promena površinskog napona sa koncentracijom PAM i izgled adsorbovanih kompleksa za smešu anjonski polimer-katjonska PAM. Naime, jasno je da do elektrostatičkih interakcija između polimera i PAM dolazi i pri vrlo niskim koncentracijama PAM, daleko ispod T1, kada se formiraju kompleksi nastali kooperativnim vezivanjem pojedinačnih molekula PAM za naelektrisane centre na molekulima polimera. Ovaj fenomen dovodi do značajnog smanjenja površinskog napona vodenog rastvora smeše u odnosu na rastvor odgovarajućih koncentracija PAM. Istovremeno, pri većim koncentracijama PAM, nakon T1, površinski napon se veoma malo menja do T2, a zatim naglo smanjuje do T3, odnosno do dostizanja KMK. Pojava T1-T2 platoa povezana je sa formiranjem kompleksa drugačije strukture, nastalih kooperativnim povezivanjem supramolekulskih agregata PAM za molekule polimera, što ne utiče površinski napon sistema, ali su na graničnoj površini adsorbovani slojevi veće debljine.

Taylor i saradnici eksperimentalno su potvrdili prikazanu šemu tenziometrijskim ispitivanjima smeše anjonskog polimera, natrijum-polistiren-sulfonata (NaPSS) i katjonske PAM, dodecil-trimetil-amonijum-bromida (C12TAB). Zaključili su da iako kriva zavisnosti površinskog napona smeše od koncentracije C12TAB liči na krivu karakterističnu za slabo interaktivne sisteme, ipak postoje izvesne razlike. Prvo, položaj T1 zavisi od koncentracije polimera, NaPSS. Drugo, položaj T3 nije značajno veći od KMK, uprkos proširenom platau T1-T2. I treće, KMK ne zavisi od koncentracije polimera u rastvoru.

Na slici 7b je šematski prikazana promena površinskog napona sa koncentracijom PAM i izgled adsorbovanih kompleksa za smešu katjonskii polimer/anjonska PAM. U ovom sistemu jasno se uočavaju četiri karakteristične prelomne tačke, koje ukazuju na promene u strukturi adsorpcionih slojeva. I ovaj predloženi tip ponašanja eksperimentalno je potvrđen merenjima u sistemu katjonski polimer, poli-dimetil-dialil amonijum-hlorid, i anjonska PAM,

SDS. Uočeno je da T1 ne zavisi od koncentracije polimera u smeši, dok KMK pokazuje malo povećanje sa porastom koncentracije polimera. Međutim, u intervalu T1-T2, gde se očekuje da ne dođe do promene površinskog napona rastvora, registrovan je njegov nagli skok, koji ukazuje da su u tom trenutku formirani kompleksi desorbovani sa granične površine i uglavnom prisutni u rastvoru (Taylor i sar. 2007 i Guzman i sar 2016). Ovakve promene uslovljene su reorganizacijom strukture kompleksa i karakteristične su za sisteme koji se adsorbuju u obliku monoslojeva.

Na osnovu do sada poznatih istraživanja, može se zaključiti da su sistemi polielektrolit-suprotno naelektrisana PAM mnogo kompleksniji, te se mehanizmi interakcije ne mogu objasniti jednom univerzalnom šemom koja odgovara svim realnim sistemima. Mehanizmi njihovih interakcija u vodenim rastvorima uslovljene većim brojem faktora koje treba definisati kako bi se mogli sa uspehom primeniti u praksi.

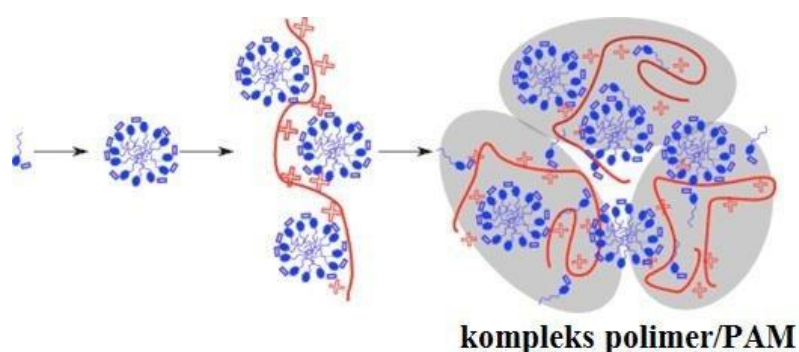
2.3.3 Interakcije hitozan-PAM

Osobine polielektrolita bitno utiču na formiranje kompleksa sa PAM, pri čemu je najvažnije naelektrisanje, a zatim hidrofobnost i fleksibilnost polimernog lanca. PAM se mogu vezivati za polielektrolite putem elektrostatičke i/ili hidrofobne interakcije. Vezivanje putem elektrostatičke interakcije dovodi do formiranja supramolekulskih agregata nazvanih površinski polielektrolitski kompleksi (Elsabee i sar., 2009).

Hitozan može da stupa u intrakciju sa anjonskim PAM i da gradi rastvorne ili nerastvorne komplekse, što zavisi od uslova u rastvoru. Kompleksi hitozana sa PAM su stabilizovani kombinacijom elektrostatičkih, jon-dipol i hidrofobnih interakcija i mogu se formirati čak i kad je koncentracija surfaktanta ispod svoje kritične micelarne koncentracije. S obzirom na činjenicu da hitozan nema izraženu površinsku aktivnost, dobijanje stabilnih emulzionih sistema i mikrokapsula uljnog sadržaja nije moguće bez dodatka površinski aktivne matrije. Sa ovog stanovišta posebno su interesantne jonske PAM, koje pri određenim uslovima mogu formirati jonske komplekse sa hitozanom, različitih osobina. Iako se intenzivno radi na objašnjavanju mehanizma interakcije, što rezultira značajnim brojem publikacija koje se odnose na konkretne sisteme hitozan-PAM (SDS, Tween 20, Triton X 100, lecitin, Poloxamer), one su još uvek nedovoljno ispitane (Magdassi i sar., 2009; Saikia i sar., 2014; Tamillvan i sar., 2010).

Ispitivanje karakteristika smeše hitozana i SDS bilo je predmet interesovanja mnogih naučnika. Neki od njih su ispitivali emulgujuće osobine hitozana kao i kompleksa hitozan-SDS pripremajući dvojne emulzije (V/U/V) (Shulz i sar., 1998), dok su drugi ispitivali uticaj jonske jačine, pH i temperature na formiranje kompleksa hitozan-SDS primenom različitih tehnika (Dedinate i Ernstsson, 2003; Lundin i sar., 2008; Thongngam i McClements, 2005). Onesippe i Lagerge su ispitivanjem formiranja kompleksa između hitozana i SDS došli do

zaključka da do interakcija između ovih jedinjenja dolazi čak i pri najnižim koncentracijama SDS. Izoterme vezivanja pokazale su veoma snažno elektrostatičko privlačenje. Na osnovu merenja zeta potencijala, turbidimetrije i izotermalne titracione kalorimetrije, zaključeno je da se ovaj polielektrolit/PAM kompleks može primenjivati kao zid mikrokapsula formiran kompleksnom koacervacijom (Onesippe i Lagerge, 2008a; Onesippe i Lagerge, 2008b). Efekat SDS na kompleks hitozana i β -karotena ispitivao je Kongsri sa saradnicima i pokazao da anjonska glava SDS stupa u elektrostatičku interakciju direktno sa katjonskom površinom hitozana, dok njegov hidrofobni rep može stupiti u hidrofobnu interakciju sa glavnim lancem β -karotena. Indukovani β -karoten/hitozan kompleks može se formirati pod optimalnim agregacionim i flokulacionim uslovima (Kongsri i sar., 2012).



Slika 8. Opšti model formiranja kompleksa hitozan-anjonska PAM
(<http://www.sepawa.com/index/sepawa-congress/de-2012-abstracts-poster.html#p2>)

Uticaj pH, jonske jačine i temperature na stvaranje kompleksa hitozan/SDS (slika 8) je ispitivan od strane Thongangam-a i saradnika. Dokazano je da na odabranim pH vredostima (3 i 7) dolazi do elektrostatičke interakcije ali je primećeno da je pri pH 7 ona značajno slabija. Međutim, kada se SDS i hitozan pomešaju na pH 3 i naknadno podesi pH rastvora na 7, SDS ostaje vezan za hitozan, što ukazuje na to da je formiranje kompleksa nepovratan proces. Dodatak soli (NaCl) smanjuje KMK SDS (i u odsustvu i u prisustvu hitozana). Pokazalo se da su KMK SDS i količina vezanog SDS za hitozan, uglavnom nezavisni od temperature (10-50°C) (Lundin i sar., 2008; Thongngam i McClements, 2005). Cilj mnogih istraživanja u oblasti interakcije hitozan-SDS je primena njihovog kompleksa za stabilizaciju emulzionih sistema U/V. Sunintaboon i saradnici su ispitivali efekat hitozana, SDS i ulja đumbira na vrednost prosečne veličine kapljica emulzije, hitozan-SDS adsorpciju i koloidnu stabilnost nastale emulzije. Primena ove kombinacije se pokazala kao efikasan metod za kontrolu prečnika i stabilnosti nastalog emulzionog sistema (Sunintaboon i sar., 2012).

Hitozan formira polielektrolitske komplekse i sa natrijum-lauriletar-sulfatom. U istraživanju koje su sproveli Peretz i saradnici, ispitivana je mogućnost stvaranja mikro-

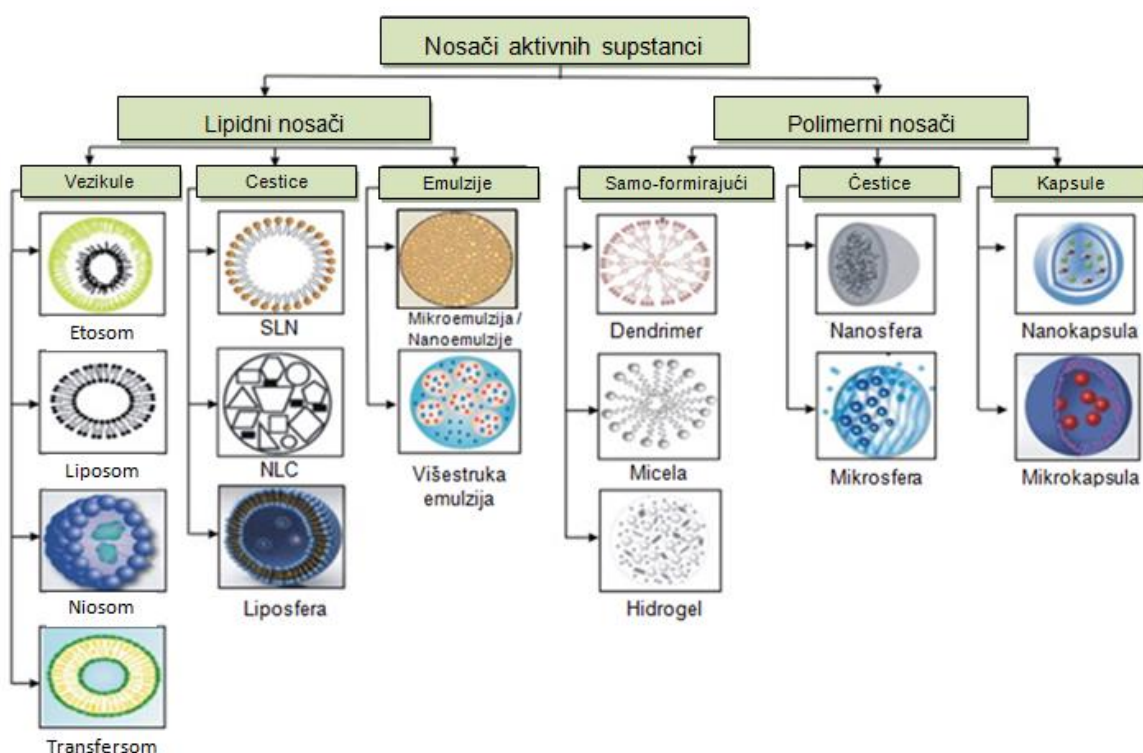
čestica interakcijom između hitozana i SLES na različitim pritiscima i izvedena je njihova karakterizacija. Dobijene čestice su potom korišćene za uklanjanje jona bakra iz vodenih rastvora. Eksperimentalno je potvrđeno da amino grupe učestvuju u vezivanju Cu(II) jona u komplekse, a adsorpcija bakarnih jona se odvija u skladu sa Langmuir-ovim modelom (Peretz i sar., 2013).

Pored velikog broja istraživanja koja su fokusirana na ispitivanje interakcija između hitozana i SDS, kao i malog broja publikacija koje su proučavale osobine kompleksa hitozan/SLES, ove interakcije još uvek nisu u potpunosti razjašnjene, naročito kada se radi o mogućnosti njihove primene za dobijanje stabilnih emulzija i mikrokapsula kao nosača liposolubilnih aktivnih materija.

2.4 Nosači aktivnih materija

Efikasnost savremenih proizvoda uglavnom podrazumeva multifunkcionalnost. Navedeni zahtevi nameću proizvođačima sirovina i proizvoda koji ih sadrže stalno usavršavanje formulacija postojećih nosača aktivnih materija, upotrebu novih sirovina i tehnologija za izradu preparata, kao i razvoj potpuno novih nosača aktivnih materija i veliki broj različitih izvora i koncepta za dobijanje nosača aktivnih supstanci.

Nosači aktivnih supstanci se u širem smislu mogu klasifikovati prema osnovnoj komponenti koja ih formira na nosače sa lipidnom osnovom i polimerne nosače (slika 9) (Pradhan i sar., 2013).



Slika 9. Nosači aktivnih supstanci

Neki od najviše proučavanih nosača aktivne materije su: liposomi, niosomi, mikro/nanočestice i emulzije. Liposomi su sferne vezikule sastavljene od fosfolipidnih dvoslojeva i vodenog jezgra. Niosomi su sferne strukture građene od jednog ili više dvoslojeva nejonskih surfaktanata koji zatvaraju vodenu fazu. Mikro/nano čestice se definišu kao sistemi izrađeni od polimera (biodegradabilni ili ne, koji su generalno prepoznatljivi kao bezbedni). Makromolekuli prirodnog porekla, koji se najčešće koriste u ovim sistemima su: albumin, želatin, hitin, hitozan, alginati, derivat skroba, dekstran, kazein i lipidi. U skladu sa postupkom izrade mogu se dobiti mikro- ili nanosfere i mikro- ili nanokapsule. Mikrokapsule

su sistemi u kojima je aktivna supstanca smeštena u rezervoar (jezgro) obavijeno ovojnicom od drugog materijala makromolekularne ili polimerne supstance u cilju zaštite aktivne supstance od degradacije pod uticajem spoljašnjih faktora (Koroleva i sar., 2016; Srikanth i sar., 2012). U tabeli 1 date su prednosti, nedostaci i primena nekih od nosača aktivnih supstanci (Chime i sar., 2012; Li i sar., 2017; Martinho i sar., 2011; Pradhan i sar., 2013).

Tabela 1. Prednosti, nedostaci i primena nosača aktivnih supstanci

Nosači aktivnih supstanci	Prednosti	Nedostaci	Primena
Mikrosfere	Jednostavna priprema, može se primeniti subkutano, intramuskularno i intraperitonealno.	Prevrneno otpuštanje lekovite supstance.	U terapiji očnih oboljenja, oboljenja debelog creva, dermatitisa, povišenog krvnog pritiska.
Liposfere	Biokompatibilne, biorazgradive i unutar njih se može inkorporirati veliki broj aktivnih supstanci. Jednostavne za pripremu.	Mali kapacitet, brzo otpuštanje leka, ograničena fizička i hemijska stabilnost prilikom skladištenja.	Široka mogućnost primene. Mogu biti nosači antibiotika, antiinflamatornih, antifungalnih i antivirusnih lekova, anestetika, antigena, peptida, vakcina, dijetetskih suplemenata i mnogih drugih aktivnih supstanci.
Polimerne nanočestice	Biokompatibilne, biorazgradive i mogu se koristiti kao nosači velikog broja različitih aktivnih supstanci.	Toksičnost polimera i poteškoće kod obimne proizvodnje.	Ciljna isporuka antibiotika i lekova u hemoterapiji.
Čvrste lipidne Nanočestice (SLN)	Biokompatibilne, biorazgradive, visoka efikasnost isporuke aktivne supstance do ciljnih ćelija i organa i laka manipulacija zbog fleksibilnosti veličine i površine.	Slaba stabilnost, poteškoće pri sterilizaciji, nizak kapacitet za inkapsulaciju, slaba reproduktivnost od serije do serije.	U medicinskoj dijagnostici, kozmetičkim i dermatološkim preparatima, lečenju kancera.
Nanostrukturirani lipidni nosači (NLC)	Biorazgradivi, imaju veći kapacitet za aktivnu supstancu i manje ispuštanje leka tokom skladištenja. Pobljšava apsorpciju aktivnih supstanci, naročito lipofilnih.	Problem sterilizacije.	Lokalna primena kod kožnih oboljenja. Kao gastorozistentni film u farmaceutskim oblicima za peroralnu primenu.
Micelle	Samofirmirajuće, termodinamički stabilne sa mogućnošću ciljanog delovanja.	Nisu pogodne za hidrofilne lekove.	Potencijalno se primenjuju za poboljšanje efikasnosti isporuke kako malih molekula tako i gena i antitela.
Dendrimeri	Jednostavna priprema i modifikacija.	Biokompatibilnost zavisi od polimera.	Terapija kancera.
Liposomi	Biokompatibilni, laka modifikacija površine, amfifilna priroda.	Slab kapacitet punjenja, brzo otpuštanje leka, ograničena fizička i hemijska stabilnost prilikom skladištenja.	Za isporuku antiinflamatornih, antitumornih, antireumatskih lekova i neurotransmitera.
Niosomi	Pobljšavaju biološku raspoloživost peroralno primenjenih lekovitih supstanci koje imaju ograničenu apsorpciju.	Slaba penetracija kroz kožu, ne dolazi do dubljih slojeva kože.	U ciljnoj isporuci gena, peptida i kod antineoplastičnog tretmana.
Transfersomi	Neinvazivno dostavljanje lekova velike molekulske mase kroz kožu.	Hemijski nestabilni i veoma skupi.	Terapija kožnih bolesti.
Etosomi	Veoma dobra moć propuštanja, visoka kompatibilnost sa pacijentima. Sastav je bezbedan za dermalnu i farmaceutsku upotrebu.	Mali prinos.	U tretmanu kožnih oboljenja (dermatitis, alopecija, psorijaza).

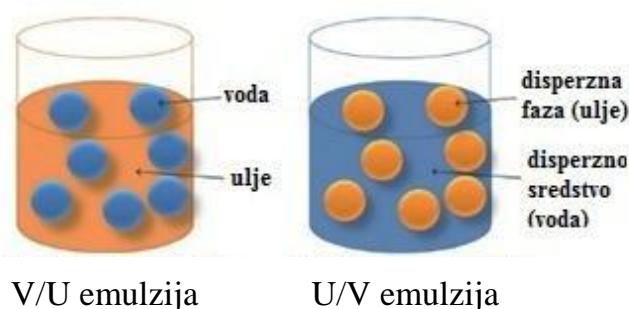
Emulzioni nosači aktivnih supstanci su disperzni sistemi tipa tečno-tečno, kod kojih je jedna tečnost dispergovana u drugoj u vidu finih kapljica stabilizovanih emulgatorom, koji prevashodno obezbeđuju fizičko odbijanje kapi, oblaganje kapi i smanjenje međupovršinskog napona kako bi se izbegla koalescencija. Široko se koriste za zaštitu, solubilizaciju, inkapsuliranje i kontrolisano oslobađanje aktivnih materija. Takođe, ovi sistemi mogu biti upotrebljeni pri dobijanju nano- i mikročestica, sistema za ciljno oslobađanje aktivne materije (Grigoriev i sar., 2008; Pradhan i sar., 2013).

2.4.1 Emulzioni nosači aktivnih materija

Emulzioni sistemi su najčešće sačinjeni od dve faze koje se međusobno ne mešaju. Faza koja je raspodeljena u vidu kapljica predstavlja dispergovanu ili disperznu fazu, koja se još naziva i interna faza ili diskontinualna faza. Faza u kojoj su kapljice disperzne faze raspodeljene naziva se disperzno sredstvo, eksterna faza ili kontinualna faza. Emulzije koje čine samo dve komponente nisu stabilni sistemi i dolazi do lakog razdvajanja faza. Kako bi se dobile stabilne emulzije, neophodno je dodati treću komponentu koja ne predstavlja posebnu fazu, već ima za cilj da dovede do stabilizacije emulzije (Dokić, 2005; Đaković, 1990b).

Razlikuju se dva osnovna tipa emulzija (slika 10):

- Emulzije tipa ulje u vodi (U/V) – ulje je disperzna, a voda kontinualna faza
- Emulzije tipa voda u ulju (V/U) – voda je disperzna, a ulje kontinualna faza.



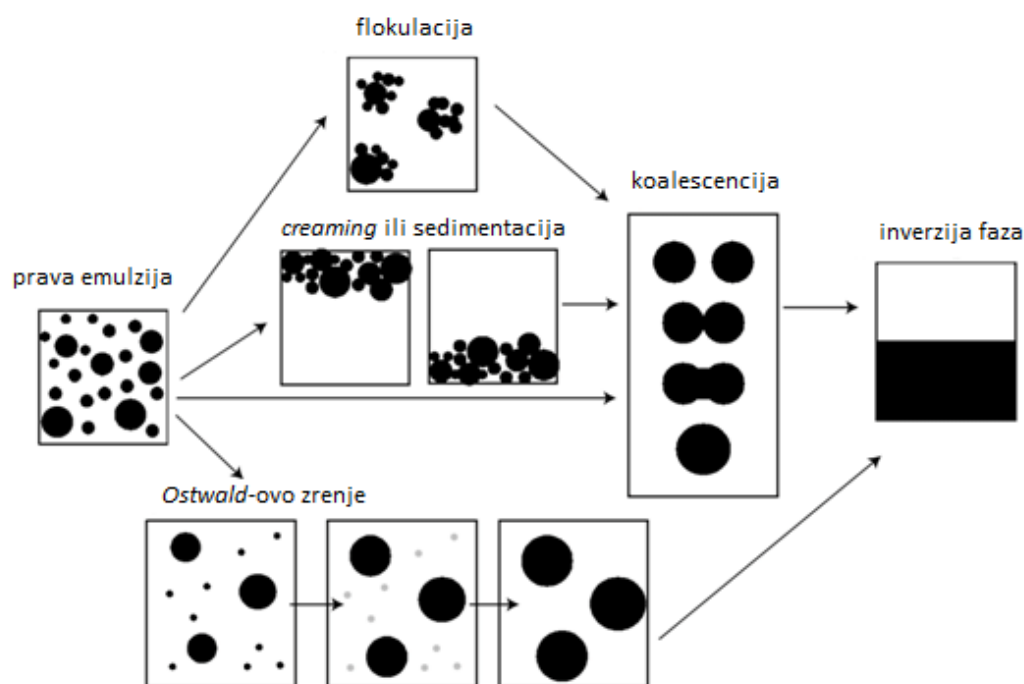
Slika 10. Osnovni tipovi emulzija

Pored ova dva tipa emulzija, postoje i višestruke emulzije, koje se nazivaju još i dvojne emulzije ili emulzije višeg reda:

- V/U/V – gde je emulzija V/U dispergovana u vodi;
- U/V/U – gde je emulzija U/V dispergovana u ulju.

Značaj emulzija ispoljava se u njihovoj širokoj primeni u različitim granama industrije i drugim oblastima svakodnevnog života. Mnogi prehrambeni, farmaceutski i hemijski proizvodi nalaze se u obliku emulzija. Emulzije imaju sasvim različite osobine od komponenata koje ih čine, a osobine mogu da se podešavaju tokom procesa pripreme emulzija. Na primer, različita ulja, koja se koriste u ishrani, kozmetici ili medicinskoj terapiji imaju osobine njutnovskih tečnosti. Kada se koriste u emulgovanom obliku, dobijaju se proizvodi drugačijih reoloških osobina. Njihova konzistencija pri emulgovanju može da se menja od izrazito tečne do polučvrste. Pogodnost korišćenja prehrambenih ulja u formi emulzije u prehrambenim proizvodima ili medicinskim i kozmetičkim preparatima ogleda se u smanjenju osećaja masnoće i maskiranju neprijatnog ukusa. Izvesne lekovite supstance postaju prihvatljiviji za primenu *per-os* kada su u obliku emulzije, a takođe ispoljavaju veću efikasnost u ovom obliku (bolja adsorpcija i transport do željenog mesta delovanja), ili u nosačima dobijenim iz emulzija (mikrokapsule i nanokapsule). Liposolubilni vitamini i visoko nutritivne masti koriste se u obliku emulzija. Emulzioni sistemi se najčešće koriste u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Najvažniji nedostatak emulzionih sistema je njihova termodinamička nestabilnost.

Najčešći vidovi nestabilnosti prikazani su na slici 11.



Slika 11. Različiti oblici nestabilnosti emulzija (Lopetinsky i sar., 2006)

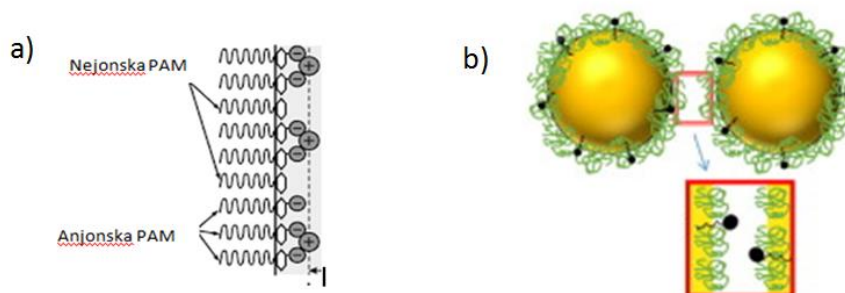
Ove vidove nestabilnosti možemo podeliti u reverzibilne i ireverzibilne tj. nepovratne procese. Reverzibilni mehanizmi koji se javljaju su isplivavanje (*creaming*), sedimentacija i flokulacija. **Sedimentaciona nestabilnost** (*creaming*/sedimentacija) je proces koji se javlja kao rezultat spoljašnjih sila obično gravitacionih ili centrifugalnih. Do njega dolazi usled

razlike u gustinama disperzne faze i disperznog sredstva, a ogleda se u separaciji emulzije na krem (koncentrovana disperzna faza) i serum (uglavnom kontinualna faza). **Flokulacija** se odnosi na agregaciju kapi (bez bilo kakve promene u primarnoj veličini kapi) u veće jedinice-flokule i potencijalno ubrzava proces koalescencije i sedimentacionu nestabilnost. Kako agregati nisu uzajamno vezani jakim silama (*Van der Waals*-ove privlačne sile) mogu lako ponovo emulgovati blagim mešanjem.

Koalescencija predstavlja proces istanjivanja i razrušavanja adsorbovanog sloja emulgatora tokom vremena, što rezultira fuzijom dve ili više kapi u jednu kap većeg prečnika, ali manje granične površine. Koalescencija je nepovratan proces i zavisi od osobine sloja emulgatora prisutnog u površini između dve faze. Ako je ovaj sloj naelektrisan, gusto pakovan i mehanički otporan, koalescencija je veoma spora. **Separacija faza** je posledica veoma intezivne koalescencije gde je izdvojena dispergovana faza u vidu kontinualnog sloja. Ovim procesom emulzija se potpuno i nepovratno razrušava. Takođe u ireverzibilne procese ubraja se i **inverzija faza** kao vid nestabilnosti pri kom dolazi do promene tipa emulzije, što se dešava kao posledica povećanja zapreminskog udela disperzne faze. Na nju utiču vrsta emulgatora, temperatura i prisustvo viševalentnih jona u emulziji. **Ostwald-ovo zrenje** predstavlja kontinualnu difuziju molekula dispergovane faze kroz kontinualnu fazu iz manjih kapi u veće, pokretačka sila ovog procesa je razlika u rastvorljivosti i ima za posledicu povećanje srednjeg prečnika kapi (Bouyer i sar., 2012; Petrović, 2016).

Da bi emulzioni sistem ostao stabilan u toku određenog vremenskog perioda, potrebno je smanjiti međupovršinski napon na granici faza ili ga stabilizovati nekim drugim mehanizmom. PAM smanjuju međupovršinsku slobodnu energiju, prave električne, mehaničke i sterne smetnje čime sprečavaju koalescenciju kapi i tako daju veoma stabilne emulzije. Adsorpcija molekula PAM je takva da je polarni deo okrenut prema vodenoj fazi, a nepolaran prema uljnoj fazi.

Za stabilizaciju topikalnih emulzija najčešće se koriste anjonske i nejonske PAM koje zbog svoje specifične građe, imaju afinitet prema granici faza ulje-voda, adsorbuju se na graničnu površinu i smanjuju međupovršinski napon. Najstabilnije emulzije se dobijaju kad je površina kapljica prekrivena naelektrisanim molekulima emulgatora i kada je pakovanje njihovih molekula najgušće, a mehanička čvrstoća adsorbovanog sloja najveća. Dobro pakovanje i veća čvrstoća površinskog zaštitnog filma se dobija upotrebom nejonskih ili još bolje mešanih emulgatora, posebno ako se u smeši nalaze jonski i nejonski emulgatori (slika 12a). Najbolje rezultate daju mešani emulgatori koji se sastoje iz jonskog emulgatora rastvorljivog u vodi i neke PAM, koja je rastvorljiva u ulju, ali koja poseduje neke grupe sposobne da stupaju u međudejstvo sa molekulima jonskog emulgatora. Kombinacija PAM stvara "kompleks" na graničnoj površini koja ima sinergistički efekat tj. smanjuje vrednost međupovršinskog napona na nižu vrednost nego što bi svaki od njih to činio pojedinačno (Holmberg, 2002; McClements i Jafari, 2018).



Slika 12. Mehanizam stabilizacije emulzije primenom smeše a) nejonske i anjonske PAM i b) polimer-PAM (Kralchevsky i sar., 2003; McClements i Jafari, 2018)

Savremene tendencije u tehnologiji kozmetičkih proizvoda ukazuju na sve češću primenu polimernih emulgatora za stabilizaciju emulzija. Polimerni emulgatori su manje iritantni za kožu i lakše se podnose. Hidrofobno modifikovani polimeri prirodnog i sintetskog porekla su danas našli široku primenu. Za stabilizaciju emulzija se takođe koriste fenomeni izazvani polimer-PAM interakcijama (slika 12b), ali je za njihovu uspešnu primenu potrebno poznavati mehanizme interakcije određenih sistema polimer-PAM. Interakcija polimer-PAM, pri određenim uslovima, koncentraciji polimera i PAM, temperature i pH sredine, može dovesti do neželjenih pojava kao što su smanjenje viskoziteta, flokulacija ili separacija faza i samim tim do destabilizacije emulzionog sistema (Petrović, 2016).

Polielektrolit/surfaktant kompleksi su posebna grupa samoformirajućih struktura koje se javljaju na granici faza kao dispergovane koloidne čestice. Njihovo formiranje, pored elektrostatičkih veza između polielektrolita i naelektrisane glave surfaktanta, uključuje i hidrofobne i *Van der Waals*-ove sile između nepolarnih delova molekula surfaktanta. Ova asocijacija molekula započinje na tačno definisanoj koncentraciji koja se definiše kao kritična agregaciona koncentracija i često je dosta niža od kritične micelarne koncentracije PAM (Vleugels i sar., 2015).

2.5 Aktivne materije u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji

Savremene tendencije konzumiranja hrane baziraju se, između ostalog, na njenim sastojcima koji se nalaze u malim količinama, a koji mogu imati povoljan uticaj na zdravlje. Takve sastojke nazivamo biološki aktivne komponente hrane. Biološki aktivni sastojci hrane su fiziološki aktivne materije u hrani ili prehrambenim dodacima koji potiču iz biljnih i životinjskih izvora, a uključuju i nutritivne sastojke koji su pokazali da imaju korisnu ulogu u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja. Kliničke studije kao i dobra dijetetska praksa, pokazuju da tačno određene komponente iz hrane imaju potencijal u smanjenju rizika od nekih bolesti, kao što su bolesti probavnog sistema, metaboličkog sindroma, kancera, osteoporoze, upale i drugih hroničnih bolesti. Tako u kardiovaskularnim bolestima, izoflavonoidi mogu smanjiti kruženje lipoproteina, sirova vlakna mogu vezati holesterol u gastrointestinalnom traktu i smanjiti njegovu apsorpciju, a time i nivo holesterola u krvi. Poseban značaj imaju antioksidansi koji eliminišu uticaj slobodnih radikala u organizmu (Guaadaoui i sar., 2014).

Savremene formulacije kozmetičkih proizvoda podrazumevaju primenu različitih aktivnih materija-kozmetički aktivnih supstanci, koje poseduju farmakološko, fiziološko, hemijsko ili fizičko delovanje na kožu, odnosno materije koje treba da doprinesu njenoj zaštiti, nezi i boljem izgledu. Najčešće se upotrebljavaju kozmetički aktivne supstance iz grupe biogenih stimulanasa, odnosno materija koje pospešuju fiziološke procese u koži, u koje spadaju vitamini, proteini, i njihovi hidrolizati, med i matični mleč. Pored toga, savremeni preparati za negu kože često sadrže i ekstrakte lekovitog bilja, hijaluronsku kiselinu, UV filtere, liposome i druge aktivne materije (Petrović, 2016).

2.5.1 Ulje koštica grožđa

Tokom poslednje decenije korisnici kozmetičkih proizvoda su pokazali veliko interesovanje za prirodne proizvode, podstičući industriju i naučnu zajednicu da istražuju alternativne izvore sirovina. Jedan od glavnih razloga za ova istraživanja je pojava alergija i iritacija kože usled upotrebe sintetičkih konzervanasa, boja, stabilizatora i td., koji još uvek nisu u potpunosti ispitani. Vino i koštice grožđa su upravo takvi prirodni proizvodi za koje je industrija sve više zainteresovana (Glampedaki i Dutschk, 2014).

Arheološka istraživanja ukazuju na to da je grožđe gajeno još 4000 godina pre nove ere. Zemlje sa najvećom proizvodnjom grožđa u Evropi su: Francuska, Španija, Italija, Portugal i Švajcarska, gde plansko izdvajanje koštica grožđa i njena prerada datira od 1935. godine (Shiangava i sar., 2015). Ulje koštica grožđa je sekundarni proizvod prerade u industriji vina i dobija se postupkom hladnog ceđenja semenki grožđa. Hladno ceđenje je metoda ekstrakcije ulja koja ne uključuje toplotu i hemijske tretmane i omogućuje da se sačuvaju sve važne komponente, kao što su prirodni antioksidanti. Hladno ceđeno ulje može

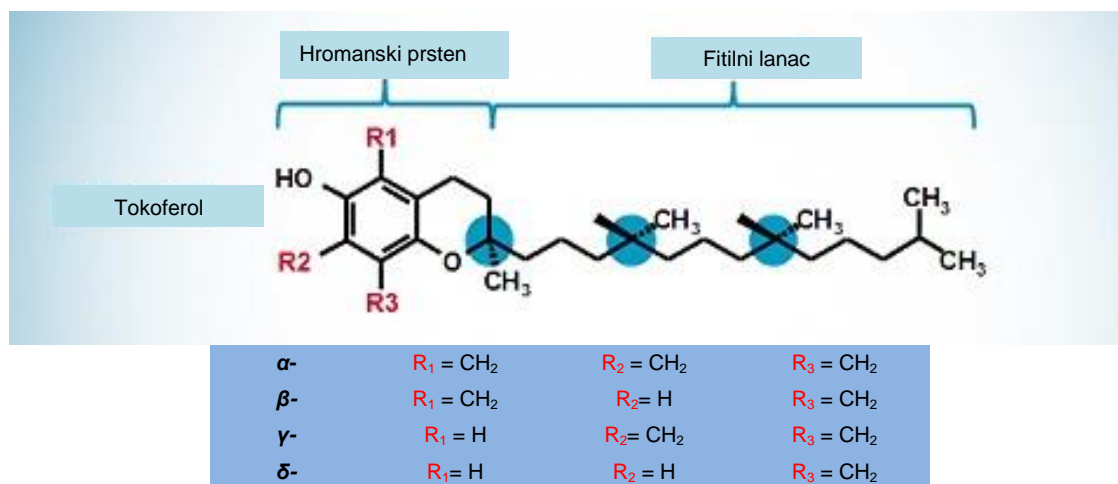
biti dobar izvor važnih komponenti kao što su antioksidativne fenolne komponente, kao i drugih lekovitih komponenti. Nakon izdvajanja ulja zaostaju samlevene koštice grožđa, kojima nije posvećeno dovoljno pažnje, ali one takođe mogu biti potencijalni bogati izvor prirodnih antioksidanata i drugih lekovitih bioaktivnih komponentata (Bail i sar., 2008; Crews i sar., 2006; Dimić, 2005; Luther i sar., 2007).

Ulje koštica grožđa ima široku primenu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Bogato je bioaktivnim komponentama, između ostalog lipofilnim antioksidantima (tokotrienol i tokoferol) i oligomernim proantocijanidima. Veliki udeo tokotrienola u ulju koštica grožđa, koji zajedno sa tokoferolom spada u grupu izomera vitamina E, čini značajnu razliku u odnosu na ostala ulja prirodnog porekla. Ono je takođe bogat izvor linolne kiseline što se povezuje sa njegovim kardioprotektivnim efektom i osobinom da smanjuje nivo LDL holesterola i povećava nivo HDL holesterola (Beveridge i sar., 2005; Fernandes i sar., 2013; Lachman i sar., 2014; Wijendran i Hayers, 2004).

Postoji sve više medicinskih dokaza koji potvrđuju pozitivno delovanje ulja koštica semenki grožđa na zdravlje. Ono može pomoći u lečenju stanja kao što su visoki holesterol, arterioskleroza, makularne degeneracije, loše cirkulacije i oštećenja nerava. Ekstrakt semenki grožđa dostupan je kao dodatak prehrani u tečnom obliku, kao tablete ili kapsule (Katalenić, 2007). Pri dijetetskoj ishrani uz malo masnoća pod uticajem ulja koštica grožđa rizik srčanih oboljenja se smanjuje za 41-55%. Upotreba ovog ulja u kozmetičkim preparatima nije ograničena, te može da se koristi kao aktivna komponenta za regeneraciju kože, uklanjanje bora i održavanje hidratacije kože.

2.5.2 Vitamin E

Naziv vitamin E je zajedničko ime za sve tokoferole koji ispoljavaju biološku aktivnost i obuhvata dve grupe jedinjenja, tokoferole i tokotrienole, koje karakteriše 6-hromanski prsten i izoprenoidni bočni lanac. Članovi svake grupe su označeni kao α , β , γ i δ -prema položaju metil grupa vezanih za hromansko jezgro. Dakle, moguće je postojanje, osam stereoizomera velike porodice vitamina E, ali samo RRR-forma se javlja u prirodi. Tokoferoli i tokotrienoli se razlikuju po njihovim fenilnim repovima, u slučaju tokoferola oni su zasićeni, dok su kod tokotrienola nezasićeni. Hemijski gledano, tokoferoli se sastoje iz hromanskog prstena sa funkcionalnom fenolnom -OH grupom u položaju 6, i bočnog fitilnog razgranatog lanca u položaju 2 (slika 13). Fenolna hidroksilna grupa daje vitaminu E izuzetnu antioksidantnu sposobnost kao i određenu dozu polarnosti, dok je bočni lanac odgovoran za lipofilne osobine molekula i omogućava prirodnom α -tokoferolu boravak u biološkim membranama (Combs, 1992; Eldin i Appelquist, 1996).



Slika 13. Konfiguracija prirodnih tokoferola

Vitamin E je liposolubilni vitamin koji egzistira u osam različitih oblika. Svaka forma ima sopstvenu biološku aktivnost i funkcionalnost u organizmu, ali je α -tokoferol najaktivniji oblik vitamina E kod ljudi, i snažan antioksidans. Deluje uglavnom u sprečavanju lipidne peroksidacije. Tokom sinergističkog delovanja sa askorbinskom kiselinom, α -tokoferol je preveden u radikal doniranjem labilnog vodonika lipidnom ili peroksilnom radikalu. Oksidovani α -tokoferol radikal je energetski stabilan i slabo je reaktivan sa okolnim molekulima u okviru membrane. Ovaj oblik može biti redukovano do svoje originalne forme pomoću askorbinske kiseline. Regeneracija redukovano α -tokoferola se verovatno odigrava na površini membrane, gde askorbinska kiselina i α -tokoferol mogu interagovati (Valko i sar., 2006). Preporučena doza vitamina E je 7-10 mg/dnevno (Hu, 2011).

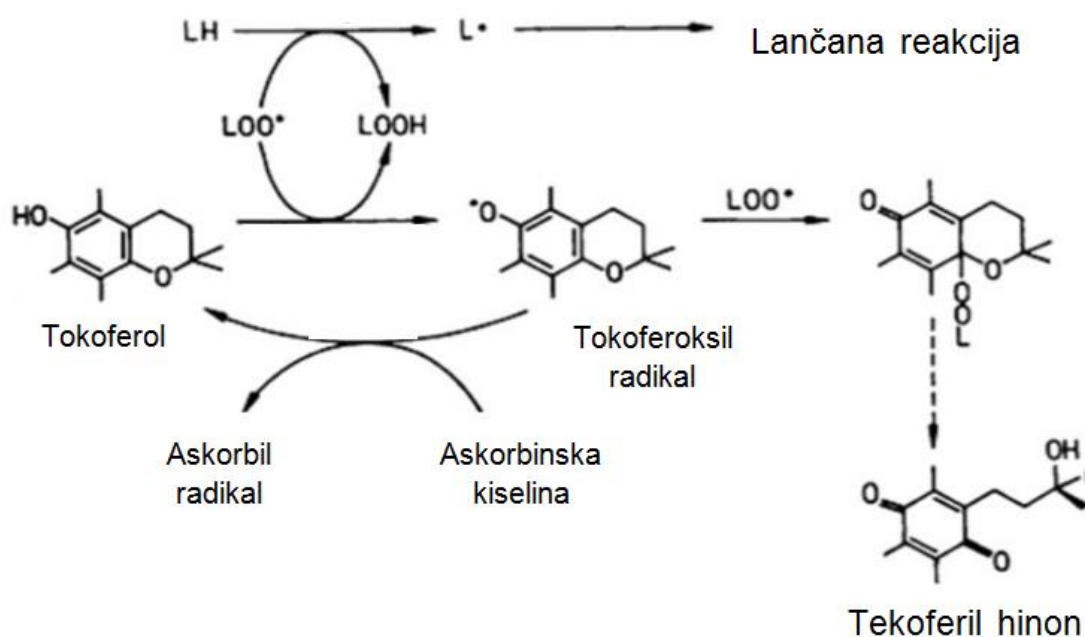
Od svih estarskih oblika, tokoferil-acetat se zbog efikasnosti, stabilnosti, dobre podnošljivosti (ne izaziva alergiju i senzibilizaciju kože) i relativno niske cene, najviše koristi u proizvodima za negu i zaštitu kože. U kozmetičkim proizvodima preporučuje se vitamin E acetat u koncentraciji od 1-10%, mada su rezultati ispitivanja nekih autora pokazali da se najbolji efekat vlaženja kože postiže sa koncentracijom od 5% (Rangarajan i Zatez, 1999).

Najvažnije uloge vitamina E u kozmetičkim proizvodima i nakon primene ovih preparata na kožu su:

- ✓ antioksidativno delovanje
- ✓ sprečavanje obrazovanja nitrozamina u kozmetičkim proizvodima (primena amina i amida kao kozmetičkih sirovina, može dovesti do stvaranja nitrozamida ili nitrozamina koji su većinom kancerogeni)
- ✓ zaštita od delovanja UV zračenja
- ✓ sposobnost vlaženja kože
- ✓ ublažavanje stvaranja bora

- ✓ poboljšavanje mikrocirkulacije (stabilizacija membrane kapilara, u tretmanu ožiljaka ili za poboljšanje rasta kose).

Kada je u pitanju antioksidativna aktivnost vitamin E (slika 14), smatra se da je njegova glavna biohemijska funkcija neutralizacija organskih peroksi radikala (LOO^\bullet). Ovi radikali se mogu stvarati od polinezasićenih masnih kiselina, fosfolipidnih membrana ili lipoproteina nakon odvajanja vodonika u procesu inicijacije. Na taj način se peroksid radikal prevodi u relativno stabilniji lipidni hidroperoksid, dok formirani tokoferoksil radikal omogućava prekidanje radikalske lančane reakcije.



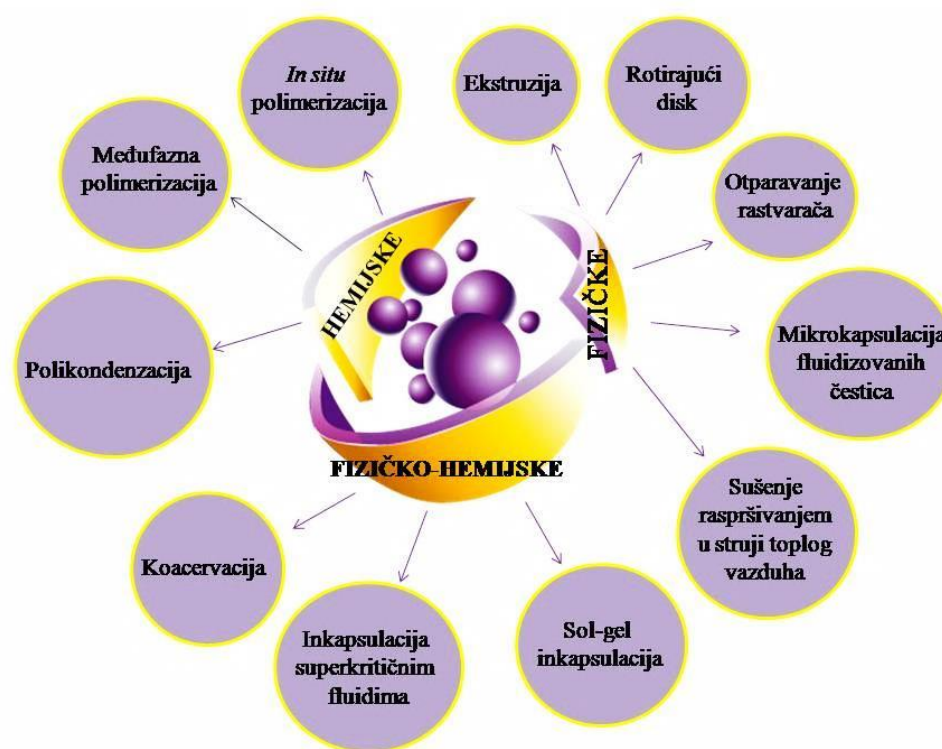
Slika 14. Aktivnost vitamina E kao antioksidanta (Sies i Stahl, 1995)

Za određivanje vitamina E u proizvodima farmaceutske i kozmetičke industrije koristi se veći broj metoda, u zavisnosti od cilja analize i prirode uzorka. U nekim slučajevima je potrebno odrediti samo α -tokoferol, dok se u drugima zahteva određivanje i tokoferola i tokotrienola. U svakom slučaju, uzorak je nepohodno prethodno tretirati, jer je vitamin E najčešće vezan za membrane, lipoproteine i lizosome, pa je potrebno eliminisati uticaj proteina i ugljenih hidrata. U tu svrhu se koriste organski rastvarači (najčešće etanol i metanol), dok se iz uzoraka koji imaju niži sadržaj lipida ekstrakcija vrši dietil-etrom. Uzorke bogate mastima potrebno je prethodno sapunifikovati. Nakon izdvajanja frakcije bogate vitaminom E za njegovo dalje određivanje se koriste razne metode kao što su kolorimetrija/spektrofotometrija, fluorimetrija, voltometrija, elektroforeza kapilarne zone, tankoslojna hromatografija, gasna hromatografija i tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC). Zbog njihove jednostavnije primene HPLC i spektrofotometrijske tehnike su najčešće korišćene (Jadoon i sar, 2013; Ubaldi i sar., 2005).

2.6 Postupci mikrokapsulacije

Mikrokapsule su jedna od najvažnijih formi za kontrolisano otpuštanje supstanci koje se najčešće primenjuju u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, tekstilnoj industriji i agroindustriji. Postupci mikrokapsulacije omogućavaju reformulaciju velikog broja prehrambenih i farmaceutskih proizvoda, poboljšavajući ih i dajući im nove osobine. Mikrokapsulacijom se omogućava i zaštita materije unutar jezgra, čime se smanjuje uticaj faktora iz spoljašnje sredine, kao i transfer materija iz jezgra (Estevinho i sar., 2013).

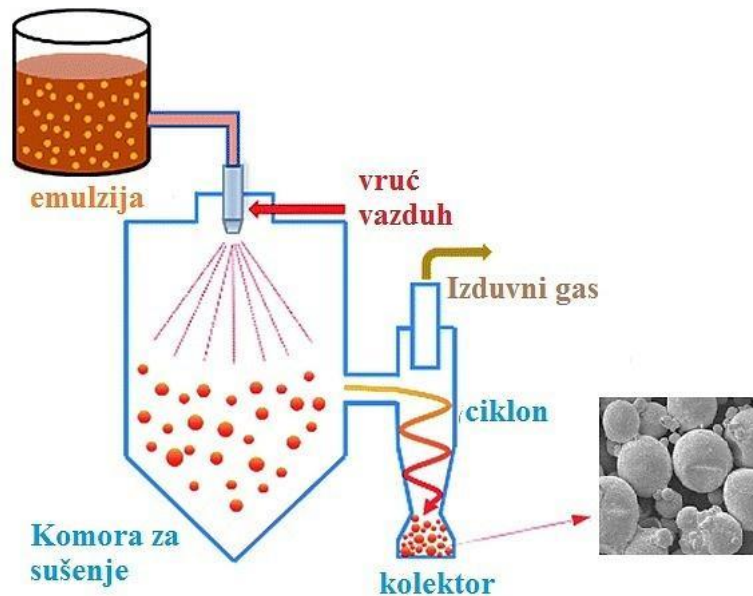
Aktivne materije se mogu inkapsulirati primenom niza različitih tehnika. Ove tehnike se mogu podeliti prema prirodi procesa formiranja mikrokapsula na hemijske, fizičko-hemijske i fizičke (slika 15) (Jyothi i sar., 2010).



Slika 15. Metode mikrokapsulacije

Uprkos ovako velikom broju razvijenih metoda mikrokapsulacije, metoda sušenja raspršivanjem je zbog niskih troškova proizvodnje sušenja, jednostavnosti metode, raspoložive opreme, reproduktivnosti i efikasnosti najviše korišćena metoda u industriji. Mikrokapsulacija metodom sušenja raspršivanjem se koristi u prehrambenoj industriji još od 50-tih godina. Na početku, ovaj proces je primenjivan za zaštitu prehrambenih aditiva od degradacije/oksidacije, ali danas se koristi za bioaktivne molekule i probiotike (Gouin, 2004;

Pu i sar., 2011; Rattes i Oliveira, 2007; Schafroth i sar., 2011; Vos i sar., 2010). Ova metoda (slika 16) predstavlja postupak raspršivanja rastvora u vrućem gasu, sa ciljem dobijanja praškastog proizvoda.



Slika 16. Priprema mikrokapsula metodom sušenja raspršivanjem (Wang i sar., 2016)

Gas koji se koristi može da bude vazduh ili neki inertan gas, najčešće azot, kada su u pitanju osetljive aktivne materije. Tečnost koja se raspršuje može biti emulzija ili suspenzija čvrstih čestica materije jezgra. Pripremljena emulzija ili suspenzija se pomoću pumpe i preko dizne raspršuje u komori za raspršavanje. Prilikom kontakta kapi sa vrućim gasom dolazi do otparavanja rastvarača sa njihove površine i do očvršćavanja omotača oko mikrokapsula. Mikrokapsule strujom gasa bivaju odnešene u ciklon gde se sakupljaju na dnu kolektorske posude. Prilikom ovog procesa mora se voditi računa o ulaznoj i izlaznoj temperaturi vazduha. Nakon sušenja dobijaju se sferne čestice, odnosno proizvod se prevodi u praškasto stanje (Gouin, 2004).

2.6.1 Mikrokapsulacija koacervacijom

Koacervacija je termin upotrebljen da opiše osnovni proces formiranja zida kapsula. Proces je razvijen od strane Barrett K. Green iz National Cash Register korporacije (Das i sar., 2011).

Koacervacija je koloidni fenomen. Javlja se u rastvoru koloida u odgovarajućem rastvaraču, a u saglasnosti sa prirodom koloida, različite promene mogu dovesti do smanjenja njegove rastvorljivosti. Kao rezultat, može doći do razdvajanja faza tj. sistem jedne faze

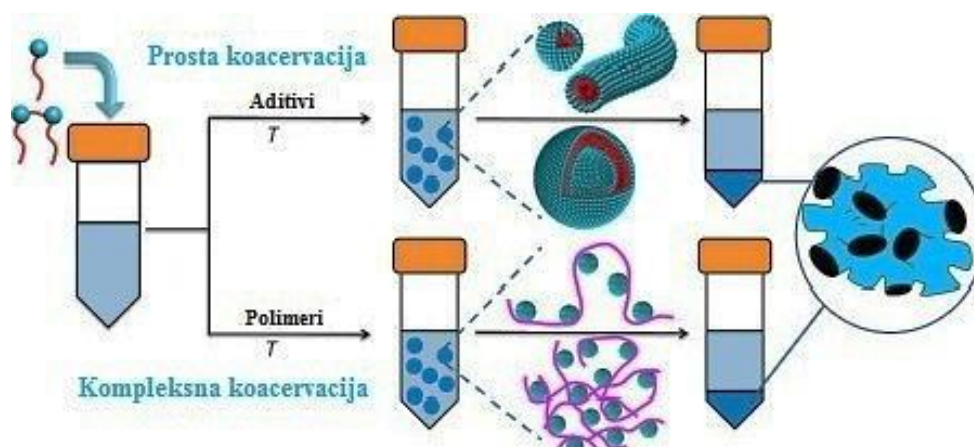
postaje sistem sa dve faze. Jedna faza ima veću koncentraciju koloida (koacervat), a druga faza sa manjom koncentracijom koloida je ravnotežni rastvor-supernatant (Kruif, 2004).

Osnovni koncept mikrokapsulacije koacervacijom podrazumeva separaciju faza jednog ili više makromolekula iz njegovog rastvora, i deponovanje nastalog koacervata oko materije jezgra koja je prethodno dispergovana u sistemu. Formirani makromolekulski omotač se prema potrebi može umrežiti odgovarajućim hemijskim ili enzimskim umreživačima (Katona, 2017).

Mikrokapsulacija koacervacijom kao i uticaj procesnih parametara na raspodelu mikrokapsula po veličini i njihovu morfologiju, su intenzivno ispitivani. Proces emulgovanja kao i brzina mešanja utiču na veličinu kapi ulja koje je inkapsulirano unutar mikrokapsula. Viskozitet koacervatne faze i koacervatnog medijuma takođe utiču na veličinu mikrosfera i mikrokapsula (Ach i sar., 2015).

Veliki broj studija pokazuju da je proces formiranja kompleksa i koacervata osetljiv na hemijske, fizičke i strukturalne parametre. pH i jonska jačina su dobro poznati faktori koji utiču na formiranje kompleksa. Oba ova faktora utiču na naelektrisanje prisutno u biopolimerima, kontrolišući intenzitet elektrostatičkih interakcija (Kruif, 2004). Drugi važni parametri koje treba uzeti u obzir su odnos molekulske mase i gustine naelektrisanja biopolimera, koji utiču na stepen elektrostatičke interakcije, molekulska masa i koncentracija biopolimera, koji doprinose niskoj entropiji mešanja. Takođe, ne treba preskočiti ni važnost fizičkih faktora, kao što su uticaj temperature, pritiska i udela biopolimera koji utiču na strukturu biopolimera kao i na formiranje i strukturu kompleksa i koacervata (Schmitt i sar., 1998).

Formiranje koacervata može da se postigne dodatkom nerastvarača, elektrolita, snižavanjem temperature, podešavanjem pH vrednosti sredine, kao i u prisustvu određenih površinski aktivnih materija ili dodavanjem druge makromolekularne materije (često se ovi faktori kombinuju). Poslednjih godina koacervacija se sve više izučava na sistemima makromolekul-PAM, s obzirom na sve veću primenu ovih sistema u mnogim proizvodima prehrambene, farmaceutske i hemijske industrije, gde usled njihove interakcije može doći do različitih promena koje utiču na kvalitet proizvoda (Sovilj i sar., 2000). U zavisnosti od načina na koji je izazvana koacervacija razlikujemo prostu i kompleksnu koacervaciju (slika 17).



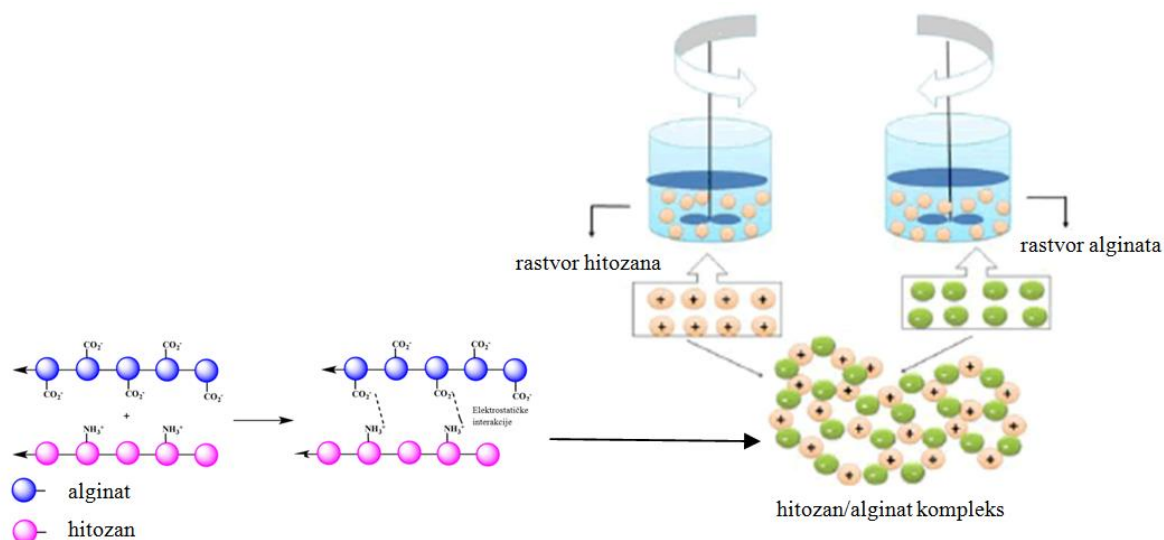
Slika 17. Prosta i kompleksna koacervacija (Zhao i Wang, 2017)

Prosta koacervacija je jedna od najstarijih i najčešće korišćenih metoda mikrokapsulacije, kod koje su aktivni agensi (bilo tečni ili čvrsti) rastvoreni u homogenom vodenom polimernom rastvoru. Formiranje koloidnih polimernih agregata (koacervata) se dešava usled promene temperature ili pH vrednosti medijuma, pri čemu se polimer postavlja na površinu aktivnog agensa formirajući mikrokapsule. Hidrofilni polimeri kao što su želatin, polivinilalkohol, metil celuloza, kao i acetat celuloze su najčešće korišćeni u ovom procesu. Izdvajanje koacervata polimera može se postići i smanjenjem njegove rastvorljivosti dodatkom aditiva. Najčešće se u vodeni rastvor makromolekula dodaje nerastvarač (obično alkohol) koji se meša sa vodom ili rastvor elektrolita (soli) pri čemu usled dehidracije ili isoljavanja dolazi do formiranja koacervata i njegovog izdvajanja iz rastvora kao posebne faze koja se obavlja oko dispergovanih čestica. Isoljavanje je metoda taloženja rastvornih polimera, najčešće proteina, tako što joni soli privlače molekule vode čime smanjuju broj slobodnih molekula vode za rastvaranje polimera (Gosh, 2006; Wische i Swendeman, 2008; Katona, 2017).

Kompleksna koacervacija je uzrokovana interakcijom dva suprotno naelektrisana koloida. Kako bi je razlikovali od obične koacervacije jednog polimera Bungenberg de Jong i Kruty nazvali su je kompleksna koacervacija.

Ukoliko između dva rastvorena makromolekula postoje izražene privlačne sile dolazi do njihove asocijacije i stvaranja kompleksa smanjene rastvorljivosti, pri čemu se kompleks izdvaja iz rastvora kao posebna faza, dok je druga faza praktično čist rastvarač, radi se o kompleksnoj koacervaciji. U najvećem broju slučajeva interakcije između dva makromolekula su elektrostatičke prirode (polikatjon-polianjon). Stvaranje kompleksa je određeno faktorima kao što su gustina naelektrisanja, vrsta aktivnih grupa kao i konformaciono naelektrisanje polielektrolita. Naime, gustina naelektrisanja na makromolekularnim lancima u velikoj meri određuje jačinu elektrostatičkih interakcija.

Kompleksna koacervacija je najčešće primenjivan metod mikrokapsulacije koacervacijom, odvija se u vodenoj sredini i upotrebljava se za kapsulaciju u vodi-nerastvornih tečnosti ili čvrstih čestica. Metoda mikrokapsulacije kompleksnom koacervacijom podrazumeva formiranje nerastvornog kompleksa dva suprotno naelektrisana polielektrolita koji se deponuje na graničnu površinu prethodno dispergovane materije i formira omotač mikrokapsula. Podešavanje uslova pri kojima će odabrani par polielektrolita izgraditi nerastvoran kompleks uglavnom podrazumeva promenu pH vrednosti sredine. Najčešće korišćen par polikatjon/polianjon je svakako želatin/arapska guma, za koji se vezuje i prva komercijalizacija tehnologije mikrokapsulacije (proizvodnja kopir papira). Najčešće upotrebljavan polikatjon je želatin, usled prihvatljive cene kao i njegove sposobnosti da formira kompleks sa nizom različitih polianjona. Tipični polianjoni su arapska guma, poliakrilna kiselina i alginat. Mikrokapsulacija kompleksnom koacervacijom se može postići i upotrebom niza drugih parova polielektrolita: želatin/heparin, želatin/natrijum-karboksimetil celuloza (NaCMC), želatin/hitozan, želatin A/želatin B, albumin/arapska guma, kazein/pektin, proteini surutke mleka/arapska guma, biljni proteini/NaCMC ili alginat ili arapska guma (Katona, 2017). Tako i mikrokapsule hitozana mogu biti pripremljene kompleksnom koacervacijom, dodavanje natrijum-alginata, natrijum-karboksimetil celuloze i natrijum-poliakrilata. Kompleksi na bazi hitozana i alginata imaju prednosti u odnosu na druge polimere zbog njihove netoksičnosti, biorazgradivosti, biokompatibilnosti i povoljnih mehaničkih svojstava. Nakon mešanja hitozana i alginata formiraće se kompleks. Potvrđeno je da karboksilni anjon alginata i katjonska amino grupa hitozana mogu da formiraju komplekse kao što je objašnjeno na slici 18. Hitozan/alginat mikročestice i/ili mikrofilmovi mogu da kontrolišu oslobađanje i fizičko-hemijske osobine lekova pa su široko korišćeni za isporuku lekova i isporuku proteina, lečenje rana, tetiva i ligamenata. Mikročestice hitozana i karboksimetilceluloze mogu da se koriste za imobilizaciju ćelijske kulture (Sinha i sar., 2004).



Slika 18. Mehanizam formiranja hitozan-alginat kompleksa (Kumbhar i Pawar, 2017)

S obzirom na činjenicu da većina polimera nema izraženu površinsku aktivnost, dobijanje stabilnih mikrokapsula veoma često nije moguće bez dodatka PAM. Pored toga što mogu formirati stabilne emulzione sisteme, PAM mogu bitno da utiču na adsorpciju polimera. Petrović i saradnici su ispitivali mogućnosti primene polimer-PAM interakcije nejonskih derivata celuloze-hidroksipropilmetil celuloze (HPMC) i anjonske PAM-SDS, za formiranje omotača mikrokapsula. Sušenjem emulzija, primenom *spray drying* postupka, dobijene su mikrokapsule uljnog sadržaja, stabilizovane kompleksom HPMC/SDS. Najbolje karakteristike mikrokapsula (mehanička otpornost, morfološke karakteristike, sposobnost redispersovanja, veličina i raspodela veličina čestica i količina inkapsuliranog ulja) su dobijene u oblasti najizraženije interakcije. Katona i sradnici su ispitivali međumolekulske interakcija u ternarnom koloidnom sistemu sastavljenog od HPMC, anjonskog derivata celuloze-natrijum karboksimetil celuloze (NaCMC) i SDS, kao i deponovanje dobijenog koacervata na granici faza i osobine dobijenih mikrokapsula. Proučavani su i drugi sistemi kao što su polietilenamin-SDS, poli-dimetil-dialil-amonijum-hlorid-SDS, poli-dimetil-dialil-amonijum-hlorid-SDS-Triton X100 (Katona i sar., 2010; Kumar i sar., 2007; Petrović i sar., 2010; Tucker i sar., 2012).

Kako je hitozan biokompatibilan, katjonski polielektrolit, dobrih filmogenih svojstava, sa velikim potencijalom primene u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, poslednjih godina se intenzivno izučavaju sistemi hitozan-suprotno naelektrisani polimer (alginat, natrijum-karboksimetil celuloza, natrijum-kazeinat, gelan i dr.), koji su naročito pogodni za dobijanje filmova različite funkcionalnosti, mikrosfera i hidrogela za različite namene (Luo i Wang, 2014; Picone i Cunha, 2013; Zinoviadou i sar., 2012). Iako se u literaturi mogu pronaći istraživanja vezana za dobijanje mikrokapsula hitozana (Estevinho i sar., 2013), s obzirom na njegovu današnju aktuelnost ova problematika je i dalje nedovoljno

ispitana. Budući da hitozan nema izraženu površinsku aktivnost, dobijanje stabilnih emulzionih sistema i mikrokapsula uljnog sadržaja nije moguće bez dodatka površinski aktivnih materija, a literatura koja se bavila ovom problematikom nije pronađena. Stoga je cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio dobiti mikrokapsule uljnog sadržaja, u koje mogu biti inkapsulirane liposolubilne aktivne materije, sa kompleksom hitozan-jonska PAM kao materijom omotača.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Materijal

U eksperimentalnom delu ove disertacije korišćene su sledeće hemikalije:

- Hitozan (Ch) male molekulske mase (broj proizvoda: 448869) (Sigma-Aldrich, Kina).
- Natrijum-lauriletar-sulfat (SLES), 70% aktivne materije (Clariant, Nemačka).
- Natrijum-dodecil-sulfat (SDS), čistoće > 99% (Merck, Nemačka).
- Trigliceridi srednje dužine ugljovodoničnih lanaca-Saboderm TCC (Comcen, Zemun).
- Ulje koštica grožđa (Olitalia, Forli, FC, Italija).
- Formaldehid, 36,5% rastvor (Sineks, Beograd).
- Glutaraldehid, 50% rastvor (Fisher Chemical, UK).
- Vitamin E (α -tokoferol), čistoće \geq 96% (Sigma-Aldrich, Nemačka).
- Koloidni silicijum dioksid, 99,8% čistoće (Sigma Aldrich, SAD).
- Etanol (C_2H_5OH), 96% rastvor (Zorka Pharma, Srbija).

U svim eksperimentima je kao rastvarač korišćena dejonizovana voda puferovana na pH 3, 4 i 5 koja je podešavana uz pomoć 0,2 M rastvora sirćetne kiseline (Zorka-Pharma, Srbija) i 0,2 M rastvora natrijum acetata (Centrohem, Srbija).

3.2 Uređaji

- pH-metar – 827 pH lab (Metrohm, Švajcarska) sa elektrodom za merenje pH vrednosti rastvora polimera i emulzija, Flushtrode (Hamilton, SAD).
- Konduktometar – InoLab (Welheim, Nemačka).
- Tenziometar – Sigma 703D (KSV Instruments, Finska).
- Kapilarni viskozimetar – Cannon 50 E599 (Cannon Instrument Company, SAD).
- Spektrofotometar – Halo DB-20S UV-VIS Spectrophotometer (Dynamica, England) sa staklenim i kvarcnim kivetama.
- Homogenizer – Digital Ultra Turrax T25 (Ika, Nemačka), sa dve radne sonde: S 25 N-10G i S 25 N-25G.
- Zetasizer – Nano ZS (Malvern Instruments, UK), sa kapilarnom ćelijom za merenje zeta potencijala i elektroforetske pokretljivosti.
- Magnetna mešalica – C-MAG HS7 (Ika, Nemačka).
- Mini *Spray Dryer* – Buchi 190 (Buchi, Švajcarska).
- Mikroskop – Bel 3000 (Bioptica, Italija) sa kamerom - BEL[®] photonics, softverom BelView7.
- Elektronski mikroskop – *Scanning electron microscope* (SEM) JOEL JSM 6460 LV.
- Termostati – ED (Julabo, Nemačka) i C25P (Thermo Scientific, Nemačka).
- Vortex mešalica – Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, SAD).

3.3 Metode ispitivanja

3.3.1 Karakterizacija uzorka hitozana

Stepen deacetilovanja hitozana male molekulske mase (50-190 kDa) određen konduktometrijskom titracijom u saglasnosti sa procedurom Yuan-a i saradnika (Yuan i sar., 2011), iznosio je 81,8% (slika P1 u Prilogu). Viskozimetrijskom metodom određena je i kritična *overlap* koncentracija koja za Ch iznosi 0,25% na 30°C (slika P2 u Prilogu). Nakon ove koncentracije dolazi do naglog povećanja viskoziteta, a polimerni lanci u rastvoru su dovoljno blizu da se njihovi hidrodinamički radijusi preklapaju.

3.3.2 Priprema rastvora

Osnovni rastvori hitozana koncentracije 0,02 i 0,2% (m/m) pripremani su rastvaranjem uzorka hitozana u puferu pH 3, 4, 5 i 6 koji su nakon pripreme i pre dalje upotrebe ostavljeni na sobnoj temperaturi 24 sata. Osnovni rastvori SLES i SDS koncentracije 0,1 i 1% (m/m) pripremani su na isti način kao i rastvori hitozana. Rastvori SLES i SDS nižih koncentracija dobijani su razblaživanjem osnovnih rastvora. Smeše hitozan-SLES i hitozan-SDS u kojima je varirana koncentracija SLES, odnosno SDS, a koncentracija hitozana je bila 0,01 i 0,1% (m/m) pripremane su mešanjem potrebnih količina osnovnih rastvora. Nakon pripreme, smeše su ostavljene 24 sata na sobnoj temperaturi, pre početka rada.

3.3.3 Merenje mutnoće

Mutnoća binarnih smeša hitozan-jonska PAM određena je merenjem apsorbanse uzoraka na 600 nm pomoću Halo DB-20S UV-VIS spektrofotometra u staklenim kivetama od 1 cm. Kao slepa proba korišćena je dejonizovana voda. Pre merenja, uzorci su mešani tokom dva minuta na magnetnoj mešalici. Zbog kompaktnog kaocervata kod sistema hitozan-SDS uzimana je supernatantna faza. Sva merenja su vršena sa tri ponavljanja, a prikazani rezultati predstavljaju njihovu srednju vrednost.

3.3.4 Tenziometrijska merenja

Tenziometrijska merenja rađena su pomoću tenziometra Sigma 703D na 30°C, metodom prstena po Du Noüy-u. Pre merenja površinskog napona prsten je uronjen u rastvor (ispod površine rastvor/vazduh) i ostavljen 15 min radi stabilizacije adsorpcionog sloja. Merenja su izvođena u laboratorijskim čašama od 50 ml, a zapremina uzoraka je bila 20 ml. Merenja međupovršinskog napona su izvođena tako što je čaša sa 20 ml vodene faze

postavljena u oblogu za termostatiranje i u nju uronjen prsten, nekoliko milimetara ispod površine. Zatim je, pažljivo, uz zid čaše dodato 20 ml uljne faze i nakon 10 min stabilizacije granične površine vršeno je merenje izvlačenjem prstena iz teže, vodene u lakšu, uljnu fazu.

Površinski napon dejonizovane vode korišćene za pripremu rastvora iznosio je 71,56 mN/m na 30°C. Prikazane vrednosti površinskog i međupovršinskog napona su srednje vrednosti od najmanje tri merenja.

3.3.5 Viskozimetrijska merenja

Viskozimetrijska merenja izvođena su pomoću Cannon-ovog kapilarnog viskozimetra. Vreme isticanja pufera na 30°C, iznosilo je 198,71 s na pH 4, a na pH 5 202,85 s. Za binarne smeše Ch-SDS i Ch-SLES rezultati su iskazani kao relativni viskoziteti (η_{rel}) smeša u zavisnosti od koncentracije SDS odnosno SLES:

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0}$$

gde su t i t_0 vremena isticanja za rastvor i rastvarač.

U smešama kod kojih je došlo do razdvajanja faza meren je viskozitet supernantanta.

Za svaki ispitivani sistem merenje viskoziteta je ponavljano tri puta, a prikazane vrednosti su srednje vrednosti ova tri merenja.

3.3.6 Merenje elektroforetske pokretljivosti i zeta potencijala

Elektroforetska pokretljivost i zeta potencijal Ch, SDS, SLES, smeša Ch-SDS i Ch-SLES kao i naelektrisanje emulzija određivano je na Zetasizer Nano ZS sa odgovarajućom kapilarnom ćelijom. Pre merenja uzorci su razblaženi u odnosu 1:100 (uzorak:rastvarač (v/v)). Za svaki uzorak merenje je ponovljeno tri puta. Za analizu podataka korišćene su fizičke konstante rastvarača-vode (indeks refrakcije 1.33 i viskozitet 0,88 mPas na 25°C). Sva merenja su ponovljena tri puta.

3.3.7 Priprema emulzija U/V

Pripremane su 20% emulzije U/V pomoću homegenizera Ultra Turrax T25 na temperaturi od 30°C. Kao vodena faza emulzija korišćeni su 0,1% rastvor Ch, 0,001%, 0,2% i 1% rastvori SDS, 0,0007%, 0,2%, 0,7% rastvori SLES i smeše Ch-SDS i Ch-SLES u masenim odnosima 100:1, 1:2 i 1:10 odnosno 140:1, 1:2 i 1:7. Kao uljna faza korišćeno je ulje koštica grožđa i trigliceridi srednje dužine ugljovodoničnih lanaca sa i bez vitamina E.

Kod emulzija sa vitaminom E uljnu fazu je činio 10% (m/m) rastvor vitamina E u ulju. Pre početka emulgovanja, vodena faza je homogenizovana 5 min na 5000 o/min, nakon toga u toku prvog minuta emulgovanja postepeno je dodata uljna faza i emulgovanje je nastavljeno do 10 min pod istim uslovima.

3.3.8 Praćenje sedimentacione nestabilnosti emulzija

Emulzije su nakon pripreme prenešene u graduisane cilindre od 10 ml i ostavljene na sobnoj temperaturi u cilju praćenja njihove stabilnosti. Tokom stajanja dolazi do raslojavanja emulzija, odnosno isplivavanja dispergovanih kapljica ulja i formiranja krema u gornjem sloju i seruma u donjem sloju stuba emulzija.

Sedimentaciona nestabilnost emulzija praćena je promenom visine izdvojene kontinualne faze seruma (H_S) u odnosu na ukupnu visinu stuba emulzije (H_E), odnosno *creaming* indeks H :

$$H = \frac{H_S}{H_E} \times 100 (\%)$$

Veća vrednost *creaming* indeksa ukazuje na manju stabilnost emulzije.

3.3.9 Dobijanje mikrokapsula

Radi efikasnijeg umrežavanja i razdvajanja pojedinačnih kapi emulzije su pomešane sa 2% suspenzijom Silica, i podeljene na dva dela. Jedan deo emulzije sušen je *spray drying* postupkom odmah nakon izrade, dok je u drugi deo emulzije dodat umreživač. Količina dodatog umreživača, formaldehida odnosno glutaraldehyda, izračunata je tako da maseni odnos hitozana i umreživača bude 1:1 i 1:2 (npr. 1 g hitozana prema 2 g umreživača). Potom je rastvor mešan na magnetnoj mešalici u toku 24 h.

Mikrokapsule u suvom stanju dobijene su sušenjem raspršivanjem u struji toplog vazduha *spray drying* postupkom. Ulazna temperatura iznosila je 160°C, a izlazna 100°C, dok je protok emulzije bio 2 ml/min. Sposobnost redispergovanja mikrokapsula u vodi praćena je primenom optičkog mikroskopa.

3.3.10 Određivanje veličine i raspodele veličine kapi emulzija

Veličina i raspodela veličina kapi emulzija i suspenzija mikrokapsula u vodi određena je obradom mikrofotografija primenom BelView7 softvera. Obradom mikrofotografija određen je broj kapi i njihov ekvivalentni prečnik.

Prečnik kapi je izražen kao srednji zapreminsko-površinski prečnik (Sauterov prečnik), d_{vs} :

$$d_{vs} = \frac{\sum n_i \times d_i^3}{\sum n_i \times d_i^2} (\mu\text{m})$$

gde su d -srednji prečnik kapi, a n -broj kapi.

Standardna devijacija je:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum n_i \times (d_i - d_{vs})^2}{\sum n_i}} (\mu\text{m})$$

Na osnovu dobijenih podataka, obradom uz pomoć Excel računarskog programa, određena je površinska raspodela veličina kapi:

$$Y_p = \frac{n_i \times d_i^2}{\sum n_i \times d_i^2}$$

koja je u programu Origin fitovana krivom raspodele oblika:

$$Y_p = G \times x^m \times e^{(-ax)}$$

gde su G , m i a koeficijenti raspodele.

3.3.11 Ispitivanje morfologije površine mikrokapsula

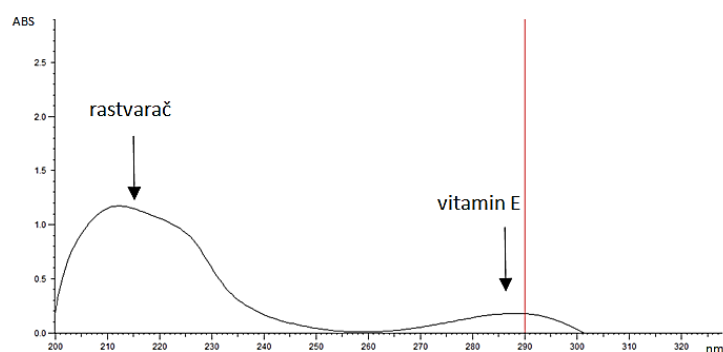
Morfologija površine mikrokapsula ispitana je pomoću elektronskog mikroskopa SEM JOEL JSM 6460 LV. Uzorci mikrokapsula su postavljeni na nosač, a zatim prevučeni slojem zlata i snimani pod različitim uvećanjima.

3.3.12 Ispitivanje sadržaja vlage mikrokapsula

Sadržaj vlage mikrokapsula određen je gravimetrijski prema Ph. Jug. IV. Uzorci mikrokapsula mase 0,5 g odmereni u vegeglase, koji su prethodno osušeni do konstantne mase, sušeni su u sušnici na $102 \pm 3^\circ\text{C}$ do konstantne mase, a zatim je izračunat procenat sadržaja vlage.

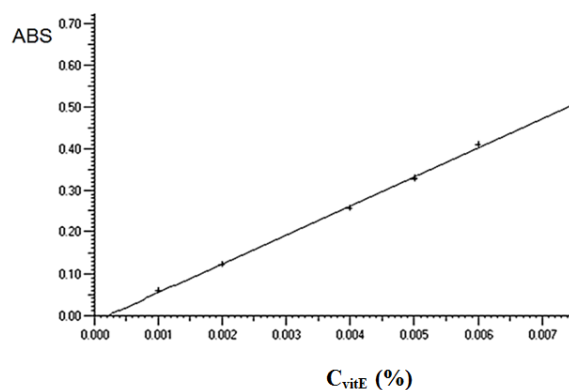
3.3.13 Ispitivanje efikasnosti mikrokapsulacije vitamina E

Ukupna količina vitamina E inkorporirana unutar mikrokapsula određivana je nakon ekstrakcije 80% etanolom. Masa mikrokapsula od 0,1 g preneti je u epruvetu i dodato je 10 ml etanola nakon čega je sadržaj intenzivno mešan na Vortex mešalici u toku 5 min. Koncentracija vitamina u rastvaraču određivana je nakon filtriranja uzorka (filter Sartorius, veličina pora 0,1 μm) spektrofotometrijski pomoću Halo DB-20S UV-VIS spektrofotometra.



Slika 19. Adsorpcioni spektar 0,001% (m/v) rastvora vitamina E u 80% etanolu

Na osnovu dijagrama sa slike 19 odabrana je talasna dužina $\lambda=290$ nm na kojoj se reproduktivno može odrediti vitamin E prisutan u uzorcima mikrokapsula. Kalibraciona prava (koeficijenta korelacije, $R^2=0,9985$) vitamina E na odabranoj talasnoj dužini prikazana je na slici 20.



Slika 20. Kalibraciona prava vitamina E u 80% etanolu na 290 nm

Efikasnost mikrokapsulacije vitamina E (E) računata je prema izrazu:

$$E = \frac{m_{mk}}{m_t} \times 100 (\%)$$

gde je m_{mk} masa vitamina E oslobođena iz 1 g mikrokapsula, izražena u mg, a m_t masa vitamina E koja je dodata prilikom procesa emulgovanja u uljnu fazu, izražena u mg/g mikrokapsula.

3.3.14 Ispitivanje oslobađanja vitamina E iz mikrokapsula

Oslobađanje vitamina E iz mikrokapsula je ispitivano u 80% etanolu kao akceptorskom medijumu za oslobađanje na sobnoj temperaturi. Erlenmajer sa šlifovanim čepom u koji je odmeren 0,1g mikrokapsula i dopunjen 80% etanolom do 100 g postavljen je na magnetnu mešalicu. U određenim vremenskim intervalima (3, 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 min) uzorkovano je po 2 ml medijuma u kome je koncentracija oslobođenog vitamina E određivana spektrofotometrijski prema već opisanom postupku. Zapremina uzetog uzorka je svaki put nadoknađena istom zapreminom svežeg 80% etanola.

3.3.15 Kinetika oslobađanja vitamina E iz mikrokapsula

U cilju ispitivanja kinetike oslobađanja vitamina E iz mikrokapsula, podaci dobijeni prilikom ispitivanja oslobađanja analizirani su model zavisnim postupkom. Eksperimentalni podaci su fitovani određenim matematičkim modelima, kojima se opisuje oslobađanje aktivnih materija iz različitih nosača. Primenjeni su sledeći matematički modeli (Singhvi i Singh, 2011):

$$\text{Higuchi kinetike: } Q_t = K_H (t)^{0,5}$$

$$\text{Kinetika nultog reda: } Q = Q_0 + K_0 \times t$$

$$\text{Kinetika prvog reda: } \text{Log}C = \text{Log}C_0 - \frac{K_1 \times t}{2,303}$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas model: } \frac{M_t}{M_\infty} = K_{KP} \times t^n$$

gde su: Q_t -količina oslobođene aktivne materije u vremenu t ; K_H -konstanta brzine oslobađanja aktivne materije za *Higuchi* model; Q -količina oslobođene aktivne materije; Q_0 -količina aktivne materije u rastvoru na početku (ova vrednost je uglavnom nula); K_0 -konstanta brzine oslobađanja aktivne materije za kinetiku nultog reda; C_0 -početna koncentracija aktivne materije u rastvoru; C -koncentracija oslobođene aktivne materije; K_1 -konstanta brzine oslobađanja aktivne materije za kinetiku prvog reda; $\frac{M_t}{M_\infty}$ -frakcija aktivne materije oslobođene u vremenu t ; K_{KP} -konstanta brzine oslobađanja aktivne materije za *Korsmeyer-Peppas* model, n -eksponent brzine oslobađanja. Vrednosti eksponenta n ($0 < n < 1$) razlikuju se kod različitih mehanizama oslobađanja aktivne materije.

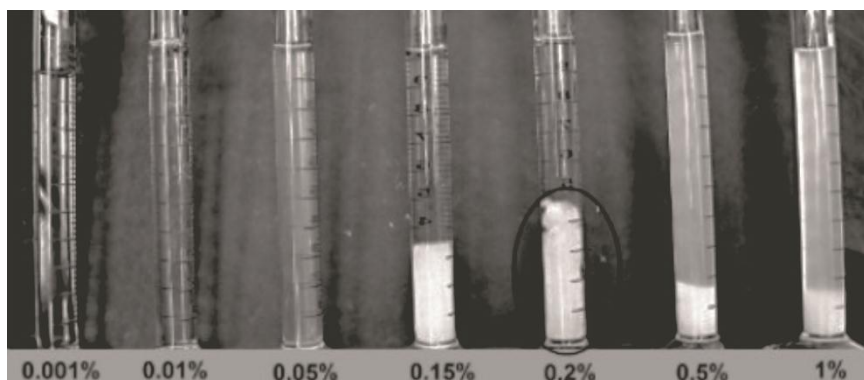
4. REZULTATI I DISKUSIJA

Krajnji cilj ove disertacije bio je dobijanje mikrokapsula uljnog sadržaja sa inkorporiranim aktivnom materijom. S obzirom da je kao omotač mikrokapsula odabran hitozan, koji ne poseduje površinsku aktivnost, ispitivanja su bila usmerena ka pronalaženju mehanizma za njegovo efikasno deponovanje na granicu faza ulje/voda. Iz ovih razloga na samom početku ispitivane su interakcije hitozana sa jonskim površinski aktivnim materijama.

Najpre je pretpostavljeno da postoje elektrostatičke interakcije između hitozana i suprotno naelektrisano natrijum-dodecil-sulfata, a zatim i između hitozana i natrijum-lauriletar-sulfata, koji za razliku od natrijum-dodecil-sulfata poseduje etilenoksidne grupe i kombinuje prednosti anjonskog i nejonskog tipa PAM. U cilju ispitivanja ovih interakcija odabrane su metode poput merenja mutnoće, elektroforetske pokretljivosti, tenziometrijskih merenja i merenja viskoziteta.

4.1 Ispitivanje interakcije između hitozana i natrijum-dodecil-sulfata

Poznato je da su međumolekulske interakcije najizraženije u sistemu koji se sastoji od polielektrolita i suprotno naelektrisanane površinski aktivne materije, kao i da su često praćene separacijom faza. S obzirom na to da Ch i SDS nose suprotno naelektrisanje u puferu, pri pH manjem od 6, naša istraživanja su započela pripremanjem smeša 0,1% Ch sa različitim koncentracijama SDS na pH 4. Ch-SDS smeše, 24 h nakon mešanja, su prikazane na slici 21.

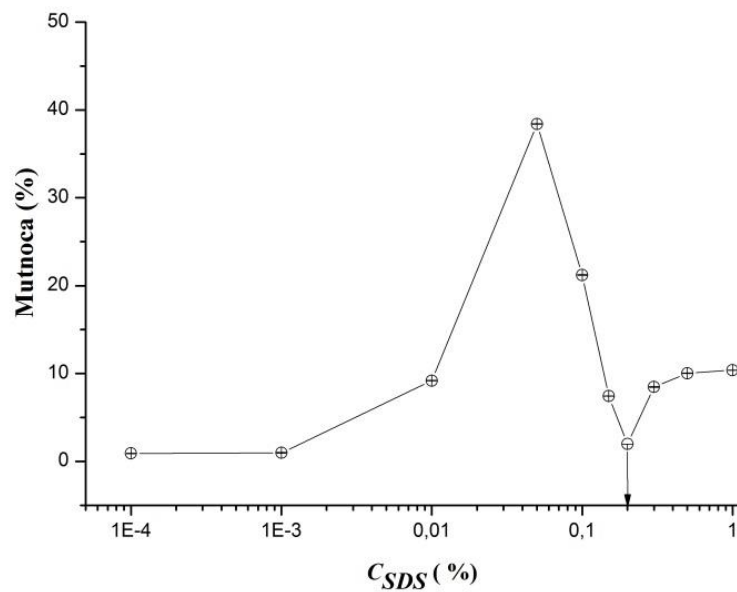


Slika 21. Separacija faza u smešama Ch-SDS pri pH 4

Primećeno je da uvođenje SDS u rastvor Ch u koncentracijama nižim od 0,01% nije izazvalo nikakve promene u izgledu smeša. Sa daljim povećanjem koncentracije SDS, smeše postaju mutne i dolazi do separacije faza pri koncentraciji SDS od 0,15% tj. nerastvorni Ch/SDS kompleksi precipitiraju na dnu kao koacervatna faza (slika 21). Formirani koacervat je čvrst, elastičan i slabo rastvoran. Povećanjem koncentracije SDS, nakon potpune precipitacije dolazi do njegovog delimičnog redispergovanja.

4.1.1 Turbidimetrijsko ispitivanje

Da bi se kvantifikovale vizuelno uočene promene, izmerena je mutnoća Ch-SDS smeša pri pH 4, a rezultati su predstavljeni na slici 22.



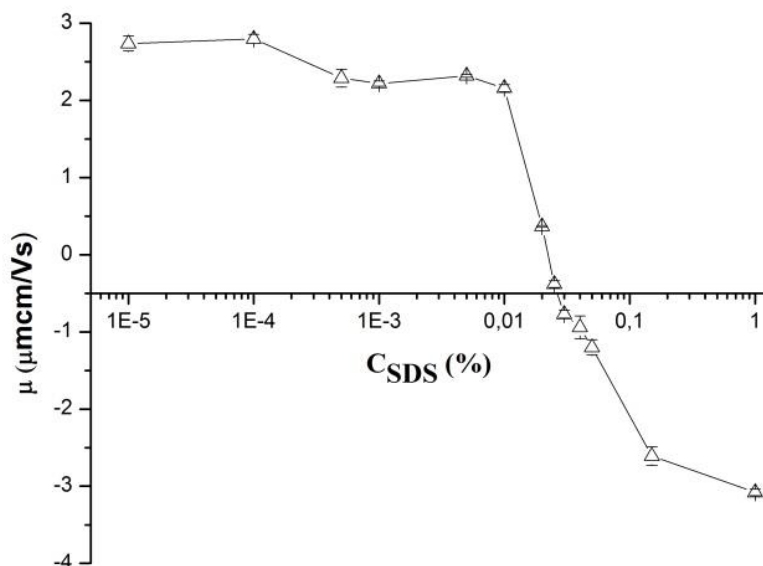
Slika 22. Turbidimetrijska merenja na 600 nm u smešama Ch-SDS pri pH 4

Kao što se sa slike 22 može videti, rastvor hitozana u vodi pri pH 4 je bio bistar (zamućenost = 0,80%), a smeše Ch-SDS koje sadrže manje od 0,005% SDS nisu pokazale promene mutnoće. Dalji dodatak SDS prouzrokovao je povećanje mutnoće. Naime, usled elektrostatičkog privlačenja, postepeno vezivanje negativno naelektrisanih polarnih glava SDS molekula za pozitivno naelektrisane amino grupe na molekulima Ch, dolazi do stvaranja kompleksa koji su slabo rastvorljivi u vodi. Mutnoća smeše je dostigla maksimum pri SDS koncentraciji od 0,05%. Nakon ove koncentracije dolazi do smanjenja mutnoće, što se može povezati sa postepenom separacijom faza i izdvajanjem koacervata na dnu cilindra (slika 21). Minimum mutnoće (obeleženo strelicom na slici 22) javlja se pri koncentraciji od 0,2% SDS (Ch:SDS maseni odnos 1:2) tj. pri potpunoj precipitaciji kompleksa. Može se pretpostaviti da su kompleksi pri ovom odnosu neutralni, odnosno pozitivno naelektrisane amino grupe Ch su potpuno zasićene molekulima SDS. Nakon ove koncentracije, dalji dodatak SDS dovodi do povećanja mutnoće supernatantne faze, najverovatnije zbog redispergovanja koacervatne faze koje može biti prouzrokovano viškom negativnog naelektrisanja kompleksa izazvanog hidrofobnim vezivanjem SDS molekula.

4.1.2 Određivanje elektroforetske pokretljivosti

Kao što je poznato, naelektrisanje čestica utiče na njihovu elektroforetsku pokretljivost. Izvedena su merenja elektroforetske pokretljivosti kako bi se potvrdila

pretpostavka da se precipitacija Ch/SDS kompleksa javlja zbog promena u njihovom naelektrisanju. Rezultati su prikazani na slici 23.



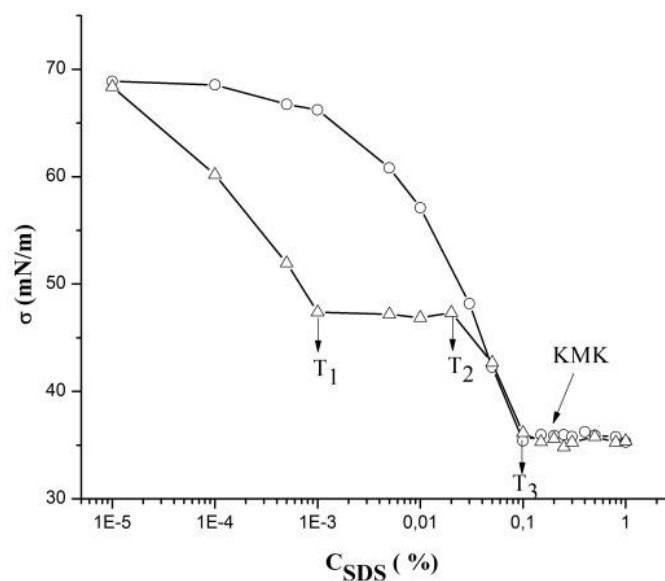
Slika 23. Elektroforetska pokretljivost smeše Ch-SDS u zavisnosti od koncentracije SDS, na 25°C i pH 4

S obzirom da je hitozan prirodni i katjonski polielektrolit, njegovi molekuli imaju ukupno pozitivno naelektrisanje u vodenom rastvoru, pri pH nižem od 6. To je potvrđeno merenjima elektroforetske pokretljivosti, tj. elektroforetska pokretljivost 0,01% rastvora Ch pri pH 4 bila 2,84 $\mu\text{mcm/Vs}$. Dodavanje suprotno naelektrisanog SDS u rastvor Ch indukuje formiranje kompleksa koji su kao takvi pozitivno naelektrisani, ali se apsolutna vrednost naelektrisanja smanjuje usled postepenog vezivanja SDS elektrostatičkim privlačenjem. Ovo postepeno smanjenje naelektrisanja prouzrokuje smanjenje rastvorljivosti Ch/SDS kompleksa, a kao posledica javlja se mutnoća u sistemu (slika 22). Posle dostizanja koncentracije SDS od 0,01%, elektroforetska pokretljivost kompleksa se naglo smanjuje i pri koncentraciji SDS od 0,022%, tj. pri masenom odnosu Ch:SDS od oko 1:2 kompleks postaje neutralan, a kao rezultat dolazi do precipitacije koacervata u smeši i mutnoća supernatantne faze pada na minimalnu vrednost. Dalji dodatak SDS dovodi do inverzije naelektrisanja pa ukupno naelektrisanje kompleksa postaje negativno. Elektrostatičko odbijanje između kompleksa prouzrokuje njihovo blago rastvaranje iz faze koacervata što dovodi do povećanja mutnoće supernatantne faze (slika 22).

S obzirom na to da tenziometrijska i viskozimetrijska merenja daju važne informacije o ponašanju sistema kako na graničnoj površini, tako i u rastvoru ove dve tehnike su korišćene za detaljno ispitivanje mehanizama interakcije Ch-SDS.

4.1.3 Tenziometrijsko ispitivanje

U smeši polielektrolita i suprotno naelektrisanih površinski aktivnih materija međumolekulske interakcije su jake i pretežno uzrokovane elektrostatičkim privlačenjem između naelektrisanih grupa prisutnih na polimernim lancima i jonizovanih polarnih glava površinski aktivnog molekula. Iz ovih razloga oni često pokazuju različite promene površinskog napona sa koncentracijom PAM u odnosu na sisteme sa slabim interakcijama, kao što su hidrofobne interakcije u sistemu nejonski polimer/površinski aktivna materija (Goddard, 2002; Petrović i sar., 2010; Sovilj i Petrović, 2006; Taylor i sar., 2007). Promene površinskog napona SDS i smeša Ch-SDS u acetatnom puferu na pH 4 i 30°C u zavisnosti od koncentracije SDS su prikazani na slici 24.



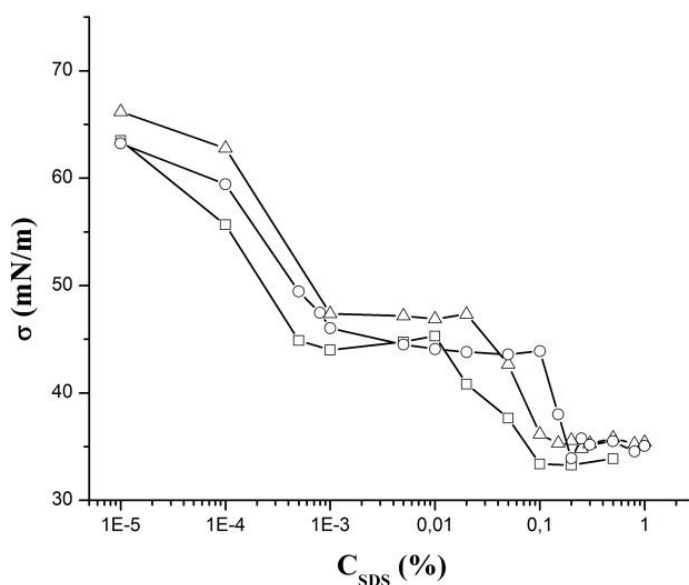
Slika 24. Površinski napon SDS i smeše Ch-SDS u zavisnosti od koncentracije SDS, na 30°C i pH 4

Površinski napon rastvora Ch u puferu bio je 69,15 mN/m što ukazuje na odsustvo površinske aktivnosti polimera. Ovakvo ponašanje karakteristično je za većinu jakih polielektrolita (Grant i sar., 2006; Onesippe i Lagerge, 2008a; Taylor i sar., 2007). U isto vreme, SDS pokazuje veoma veliko smanjenje površinskog napona pri niskim

koncentracijama sve do dostizanja kritične micelarne koncentracije (KMK), na 0,18%, nakon čega je površinski napon bio praktično konstantan. Ovo veliko smanjenje površinskog napona je posledica intenzivne adsorpcije SDS molekula na graničnoj površini voda/vazduh, tipičnom za većinu površinski aktivnih materija u vodenim rastvorima (Holmberg i sar., 2002).

Kao što se vidi sa slike 24, promene površinskog napona smeša Ch-SDS pokazuju karakteristične tačke na određenim koncentracijama SDS, koje odgovaraju promenama mutnoće rastvora i elektroforetske pokretljivosti molekula Ch. Interakcija između Ch i SDS na granici faza dešava se pri veoma niskoj koncentraciji SDS. Naime, može se pretpostaviti da pri niskim koncentracijama SDS, ispod 0,001% (m/m), u oblasti izrazitog sniženja površinskog napona u smeši Ch-SDS, dolazi do vezivanja pojedinačnih molekula SDS za amino grupe hitozana elektrostatičkim silama i formiranja površinski aktivnih hitozan/SDS kompleksa koji se nagomilavaju u graničnoj površini. Nakon dostizanja koncentracije 0,001% (m/m) (maseni odnos Ch:SDS 10:1), koja predstavlja prvu karakterističnu tačku, T_1 , dolazi do adsorpcije molekula SDS na lance hitozana prisutne u rastvoru u obliku agregata. Pri ovom masenom odnosu (maseni odnos Ch:SDS 10:1), kao što se vidi sa slika 22 i 23, pojavljuje se mutnoća u smeši, što ukazuje na to da su kompleksi manje rastvorni, pozitivno naelektrisani, ali i dalje površinski aktivni. Formiranje ovakvih kompleksa ne utiče na adsorpcioni sloj i kao rezultat površinski napon ostaje skoro nepromenjen sve dok se ne postigne druga karakteristična tačka, T_2 , na 0,02% (m/m) SDS (Ch:SDS maseni odnos 1:2). Nakon dostizanja T_2 dolazi do promena na granici faza tj. dalji porast koncentracije SDS dovodi do desorpcije površinski aktivnih kompleksa Ch/SDS sa površine i postepenog raspoređivanja molekula SDS na granicu faza, što rezultira smanjenjem površinskog napona. Pri koncentraciji SDS od 0,1% (m/m), treća karakteristična tačka, T_3 , molekuli SDS na granici faza bivaju u ravnoteži sa micelama SDS u rastvoru i dalje povećanje njegove koncentracije ne utiče na površinski napon tj. površinski napon ostaje konstantan.

Pored ispitivanja uticaja koncentracije SDS, ispitan je i uticaj koncentracije Ch na adsorpcione osobine Ch/SDS kompleksa merenjem površinskog napona smeše Ch-SDS na 30°C i pri pH 4. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na slici 25.



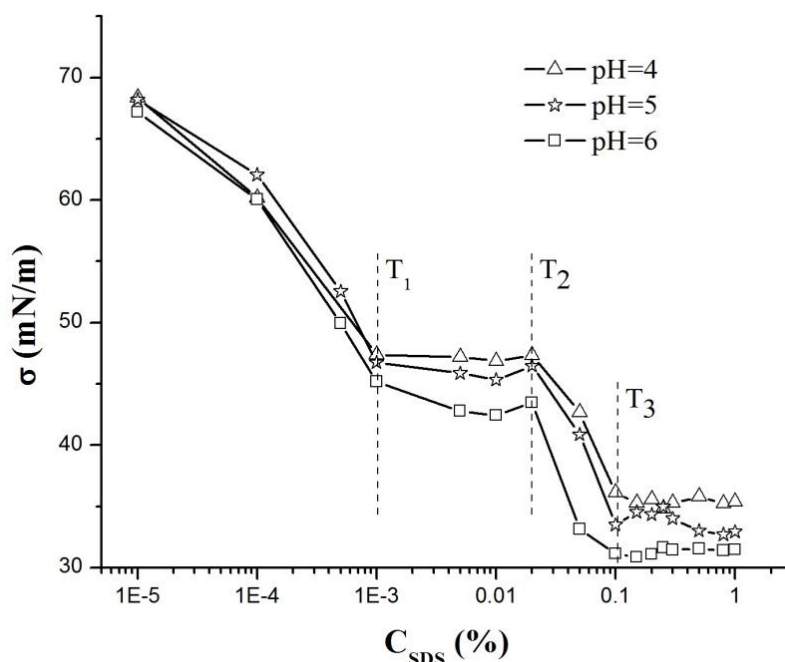
Slika 25. Promena površinskog napona 0,005% (-□-), 0,01% (-△-) i 0,05% (-○-) Ch u smeši sa SDS u zavisnosti od koncentracije SDS na 30°C i pH 4

Iako na prvi pogled krive promene površinskog napona različitih koncentracija Ch u smeši sa SDS izgledaju slično kao krive za slabo interaktivne sisteme, postoje neke značajne razlike koje možemo uočiti na slici 25. Jasno se vidi izrazito sniženje površinskog napona smeše Ch-SDS pri niskoj koncentraciji SDS sve do prve karakteristične tačke koja zavisi od koncentracije Ch, tj. T_1 . Ova karakteristična koncentracija se pomera ka većim vrednostima sa povećanjem koncentracije Ch. Takođe, T_3 , treća karakteristična tačka, za sistem Ch-SDS ima istu ili nižu vrednost nego KMK za čist rastvor SDS, za razliku od slabo interaktivnih sistema (kao što je objašnjeno u Teorijskom delu u poglavlju 2.3.2.), gde T_3 generalno ima višu vrednost od KMK čistog rastvora SDS. Takvo ponašanje se može pripisati formiranju kompleksa polimer/PAM koji se razlikuju po strukturi u zavisnosti od koncentracije PAM, što je već objašnjeno za neke sisteme polielektrolit-PAM (Penfold i sar., 2006; Taylor, 2007).

T_1 - T_2 plato se pojavljuje na karakterističnom masenom odnosu polimera i površinski aktivne matrije, između masenih odnosa Ch:SDS 10:1 i 1:2. Kao što je prikazano na slici 23 merenja elektroforetske pokretljivosti pokazuju da Ch/SDS kompleksi imaju ukupno pozitivno naelektrisanje u oblasti koncentracija SDS između T_1 i T_2 , iako je zabeležen postepeni pad njegove apsolutne vrednosti. Istovremeno, pojava mutnoće u ovom intervalu ukazuje na stvaranje koacervata koji se postepeno deponuje na graničnoj površini, a smanjenje naelektrisanja ukazuje na povećanje hidrofobnosti kompleksa Ch/SDS. Kod Ch:SDS masenog odnosa 1:2, kompleksi su skoro neutralni ($\mu = 0.37 \mu\text{mcm V}^{-1}\text{s}^{-1}$) i potpuno se talože kao koacervatna faza.

Dalje povećanje koncentracije SDS dovodi do postepenog raspoređivanja SDS molekula na međufazi što rezultira značajnim smanjenjem površinskog napona. U trećoj karakterističnoj tački, T_3 , međupovršina je zasićena molekulima SDS, a nakon ove koncentracije formirane su regularne SDS micelle u rastvoru. Istovremeno vezivanje SDS molekula u Ch/SDS komplekse nastavlja se putem hidrofobnih interakcija, a ukupno naelektrisanje kompleksa teži ka višku negativnog naelektrisanja i njegovom redispergovanju (slike 21 i 23).

S obzirom na to da pH vrednost može uticati na interakcije u sistemima polielektrolit-PAM, ispitivane su promene površinskog napona Ch-SDS smeša na različitim pH vrednostima. Rezultati su prikazani na slici 26.

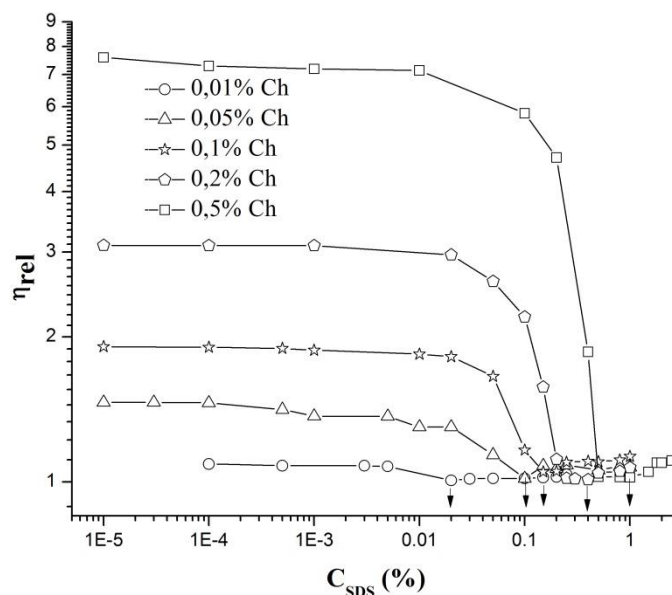


Slika 26. Površinski napon Ch-SDS smeše u zavisnosti od koncentracije SDS na različitim pH vrednostima i na 30°C. Koncentracija Ch je bila konstantna 0,01% (m/m)

Kao što se vidi sa slike 26, smeše Ch-SDS koje sadrže 0,01% Ch pokazuju karakteristične tačke, T_1 , T_2 i T_3 , na svim ispitivanim pH vrednostima. Kao i kod pH 4, izgled krivih pri pH 5 i pH 6 je veoma sličan. Naime, formiranje Ch/SDS kompleksa započelo je s vrlo niskom koncentracijom SDS što je dovelo do značajnog smanjenja površinskog napona. Pored toga, karakteristične tačke su na istim koncentracijama SDS: T_1 se javlja u 0,001%, T_2 na 0,02% i T_3 na 0,1% SDS, što ukazuje na to da u ispitivanom intervalu pH nema značajan uticaj na mehanizam formiranja elektroističkih kompleksa Ch/SDS.

4.1.4 Viskozimetrijsko ispitivanje

Viskozimetrijska metoda daje značajne informacije o promenama u rastvorima polielektrolit-suprotno naelektrisana PAM. Iz ovih razloga rađena su viskozimetrijska ispitivanja smeše Ch-SDS. Relativni viskoziteti smeša Ch-SDS pri različitim koncentracijama Ch u zavisnosti od koncentracije SDS na 30°C i pri pH 4 prikazani su na slici 27.



Slika 27. Relativni viskozitet rastvora smeša Ch-SDS pri različitim koncentracijama Ch u zavisnosti od koncentracije SDS na 30°C i pH 4

Najpre su određivani relativni viskoziteti čistih rastvora Ch u koncentracijama 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 i 0,5% (m/m) koji su pri pH 4 iznosili 1,10; 1,52; 2,02; 3,10 i 7,84, redom. Dodatak malih koncentracija SDS u rastvore Ch nije uticao na relativnu viskoznost njegovih rastvora, što ukazuje na to da se interakcije između ova dva molekula, najverovatnije odvijaju na granici faza. Sa slike 27 jasno se uočava da do promene viskoziteta dolazi pri koncentracijama SDS 0,01; 0,02; 0,05 i 0,1% u smešama Ch-SDS koje sadrže 0,05; 0,1; 0,2 i 0,5% Ch tj. pri masenom odnosu Ch:SDS 5:1. Naime pri ovom masenom odnosu započinje taloženje Ch/SDS kompleksa.

Nakon ovih koncentracija, dalji dodatak SDS izaziva smanjenje relativnog viskoziteta supernatantne faze koje dovodi do potpunog precipitovanja koacervatne faze na 0,02; 0,1; 0,2; 0,4 i 1,0% SDS. Vidi se da supernatantne faze pokazuju minimalnu viskoznost (označenu strelicom) koja se uvek pojavljuje pri masenom odnosu Ch:SDS od 1:2, što nam govori da do potpunog taloženja koacervata dolazi samo pri ovom odnosu. Jasno je da veća koncentracija Ch zahteva više SDS kako bi svi aktivni centri bili zauzeti molekulima SDS.

Dalje povećanje koncentracije SDS dovelo je do blagog povećanja relativne viskoznosti supernatantne faze, što ukazuje na povećanje rastvorljivosti formiranih Ch/SDS kompleksa usled njihovog elektrostatičkog odbijanja. Očigledno je da prikazane promene viskozimetrijskih merenja u potpunosti odgovaraju merenjima mutnoće, površinskog napona i elektroforetske pokretljivosti u smešama Ch-SDS.

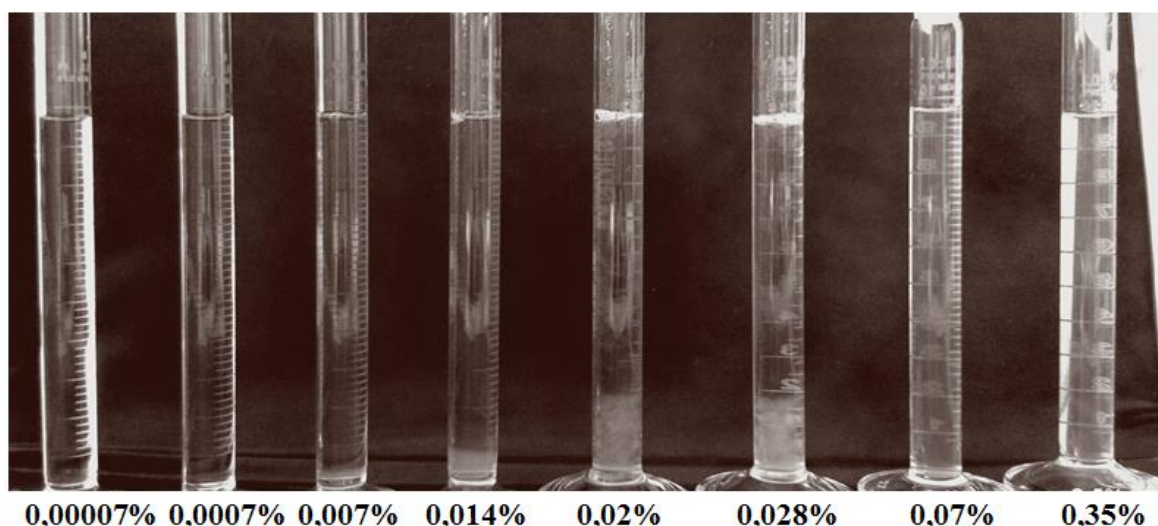
4.2 Ispitivanje interakcije između hitozana i natrijum-lauriletar-sulfata

Natrijum-lauriletar-sulfat, koji za razliku od SDS poseduje etilenoksidne grupe, pripada grupi anjonskih površinski aktivnih materija koje se široko koriste u šamponima, deterdžentima i drugim komercijalnim sredstvima za čišćenje. Ova grupa površinski aktivnih materija ima potencijal da kombinuje prednosti anjonskog i nejonskog tipa PAM. Karakteriše ih dužina alkil lanca, broj etilen oksidnih grupa (EO) kao i njihova distribucija. U molekulu PAM ove karakteristike utiču na važne fizičke osobine kao što su rastvorljivost i viskoznost, kao i osnovne funkcije poput kvašenja, penivosti, emulgujuća i disperzna svojstva (Im i Ryoo, 2009; Peretz i sar., 2013; Vleugels i sar., 2015). Iz ovih razloga bilo je interesantno ispitati uticaj prisustva EO grupa na interakciju sa Ch.

Sa ciljem detaljnog ispitivanja mehanizma interakcije Ch-SLES primenjeno je nekoliko različitih tehnika: turbidimetrija, tenziometrija, merenje elektroforetske pokretljivosti i viskozimetrija.

4.2.1 Turbidimetrijsko ispitivanje i separacija faza u sistemu hitozan-SLES

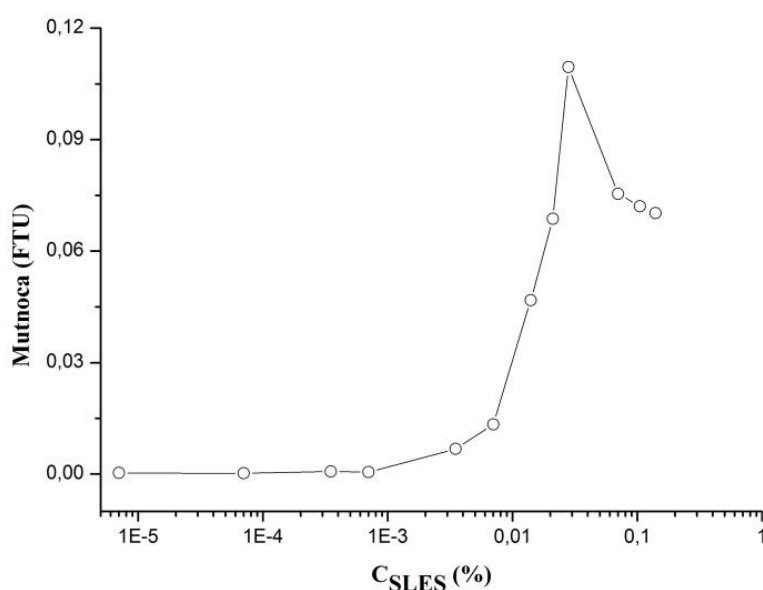
Interakcije polielektrolita i suprotno naelektrisane PAM u vodenim rastvorima, obično su uzrokovane elektrostatičkim i hidrofobnim interakcijama, koje su često praćene separacijom faza, što je već spomenuto kod prethodnog sistema Ch-SDS. Kako Ch i SLES nose suprotno naelektrisanje u puferu, pri pH nižoj od 6, istraživanja su nastavljena pripremanjem smeša od 0,01% Ch i različitih koncentracija SLES. S obzirom na to da smo iz prethodnih ispitivanja došli do zaključka da mala razlika u pH vrednosti u slučaju interakcija Ch-SDS ne utiče značajno na promene u ponašanju ovog sistema, a da je u kozmetičkoj i farmaceutskoj primeni mnogo pogodniji pH 5, odlučeno je da ispitivanja Ch-SLES sistema budu rađena na ovoj pH vrednosti. Mešanjem rastvora hitozana sa SLES dolazi do vizuelnih promena koje se razlikuju u odnosu na smeše sa SDS (slika 28).



Slika 28. Smeše 0,01% Ch i različitih koncentracija SLES nakon 24 h čuvanja na sobnoj temperaturi

Kao što se može primetiti sa slike 28, pri koncentracijama SLES nižim od 0,0007% nisu se mogle uočiti vizuelne promene u rastvoru. Posle ove koncentracije, smeša postaje zamućena i javlja se separacija faza tj. Ch/SLES kompleksi precipitiraju na dnu kao koacervatna faza koja se razlikuje u odnosu na sistem Ch-SDS. Naime dobijeni koacervat nije kompaktan, a pri većim koncentracijama SLES dolazi do njegovog rastvaranja.

Mutnoća rastvora smeša Ch-SLES merena je radi praćenja agregacije i separacije faza u sistemu, a rezultati su prikazani na slici 29.

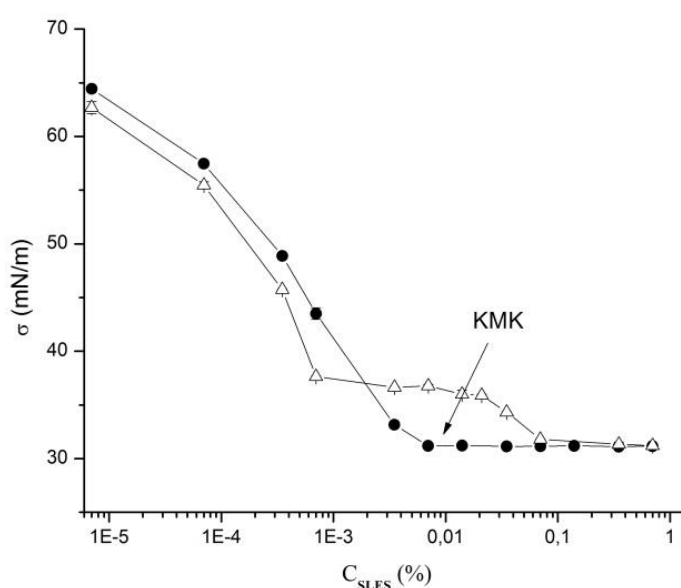


Slika 29. Mutnoća rastvora smeše 0,01% Ch i različitih koncentracija SLES merena na 600 nm

Kad je koncentracija SLES dovoljno niska, mutnoća rastvora je blizu nule, tj. formirani kompleksi Ch/SLES su rastvorljivi u vodi. Prvo povećanje mutnoće počinje sa 0,0007% (m/m) SLES, a dalji dodatak SLES povećava mutnoću sve do maksimuma, pri koncentraciji SLES od 0,028% (m/m) kada su formirani kompleksi potpuno istaloženi na dnu kao koacervatna faza (slika 28). Kako ovaj koacervat nije kompaktan, nije bilo potrebe za odvajanjem supernatantne faze. Posle dostizanja maksimuma, dalji dodatak SLES je prouzrokovao značajno smanjenje mutnoće usled postepenog rastvaranja kompleksa Ch/SLES.

4.2.2 Tenziometrijsko ispitivanje

Rezultati merenja površinskog napona rastvora SLES i rastvora Ch-SLES smeša prikazani su na slici 30.



Slika 30. Površinski napon SLES (-●-) i smeše Ch-SLES (-Δ-) u puferu pH 5 na 30°C u zavisnosti od koncentracije SLES; koncentracija Ch je 0,01%

Sa slike 30 se jasno uočava vrednost KMK SLES koja iznosi 0,007% (m/m). U poređenju sa KMK SDS, koji ne poseduje etilenoksidne grupe sa istom dužinom ugljovodoničnog lanca, KMK SLES je znatno niža (slika 24). Naime, inkorporiranje etilenoksidnih grupa između lauril ostatka i hidrofилnog dela molekula dovelo je do drastičnog smanjenja KMK sa 0,1% (SDS) na 0,007% (SLES). Smanjenje KMK se pripisuje smanjenju

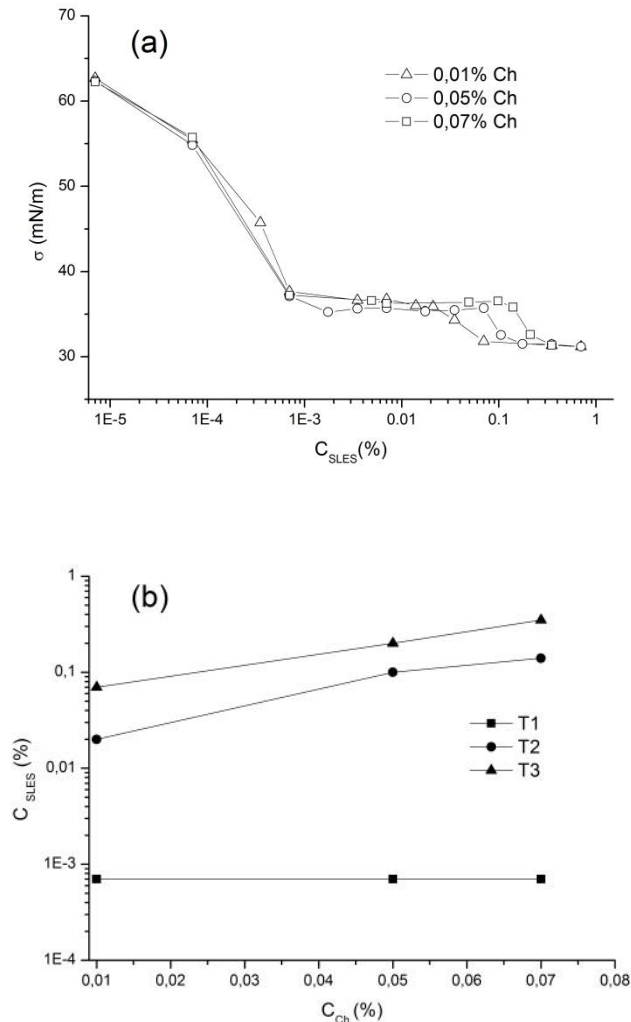
stepena hidratacije EO grupa zbog prisustva sulfatnog dela koji doprinosi povećanju ukupne hidrofobnosti molekula SLES (Mayers, 2006). Takođe, privlačna jon-dipol interakcija između sulfatne i EO grupe, koja može biti intramolekularna i intermolekularna po prirodi, što dovodi do značajnog smanjenja elektrostatičkog odbijanja i na taj način utiče na smanjenje KMK (Aoudia i sar., 2009; Vleugels i sar., 2015). Interakcija između polarnih glava SDS molekula je verovatno jača, pa KMK ima veću vrednost. Razlike u stvaranju micela ove dve PAM mogu ukazivati i na različite mehanizme njihove interakcije sa polielektrolitima.

Kao što je prikazano na slici 30, promene u površinskom naponu smeša Ch-SLES pokazuju karakteristične tačke pri određenim koncentracijama SLES. Naime, površinski napon Ch-SLES smeše se postepeno smanjuje i pažljivo prati krivu rastvora SLES, sve dok se ne dostigne prva karakteristična koncentracija (T_1) na 0,0007% SLES (Ch:SLES maseni odnos 14:1). S obzirom na to da su Ch i SLES suprotno naelektrisani, očekivano je da elektrostatičko vezivanje pojedinačnih SLES molekula započne pri niskoj koncentraciji SLES. Međutim, pošto površinski napon smeše Ch-SLES pre dostizanja T_1 pokazuje slične vrednosti kao i rastvori odgovarajuće koncentracije SLES, jasno je da su elektrostatičke interakcije komponenti, kao i njihov sinergistički efekat na površinski napon, slabo izraženi.

Nakon dostizanja T_1 , površinski napon ostaje nepromenjen sve do T_2 (SLES koncentracija od 0,02%). U toj oblasti se odvija interakcija i SLES molekuli se vezuju u vidu agregata na lanac polimera zahvaljujući hidrofobnoj interakciji (Holmberg i sar., 2002; Taylor i sar., 2007). Koncentracija PAM u T_1 bila je približno ista kao i za smešu Ch-SDS. Istovremeno, T_2 je pomerena prema višoj koncentraciji PAM (0,02%), iznad KMK SLES. Izgled krive zavisnosti površinskog napona od koncentracije SLES sličan je krivama koje opisuju slabe interakcije u sistemu polimer-PAM, najčešće izazvane *Van der Waals*-ovim privlačnim silama (slika 6, poglavlje 2.3.2. u Teorijskom delu). Interval hidrofobnih interakcija u sistemu Ch-SLES je širi nego za Ch-SDS. Naime, T_2 za Ch-SDS sistem je bio niži od KMK (dok se T_3 nije značajno razlikovala od KMK), što je detaljno opisano u prethodnom poglavlju kod interakcije Ch-SDS. Ove razlike se mogu pripisati prisustvu EO grupa, tj. jon-dipol interakcijama koje dovode do smanjenog odbijanja između polarnih glava molekula SLES i povećanja hidrofobnosti molekula. Zbog toga su hidrofobne interakcije bile izraženije u ovom sistemu.

Dalje dodavanje SLES, nakon T_2 , uzrokuje značajno smanjenje površinskog napona dok se ne dostigne T_3 pri 0,07% SLES, što je veća vrednost od KMK za čisti surfaktant. U regionu T_2 - T_3 , Ch/SLES kompleksi sa granične površine bivaju postepeno zamenjeni sa molekulima SLES. Nakon čega se u rastvoru nalaze slobodne micelle SLES i površinski napon postaje jednak površinskom naponu rastvora SLES (Goddard, 1993).

Ispitan je i uticaj koncentracije Ch na površinski napon smeše Ch-SLES, a dobjeni rezultati prikazani su na slici 31.



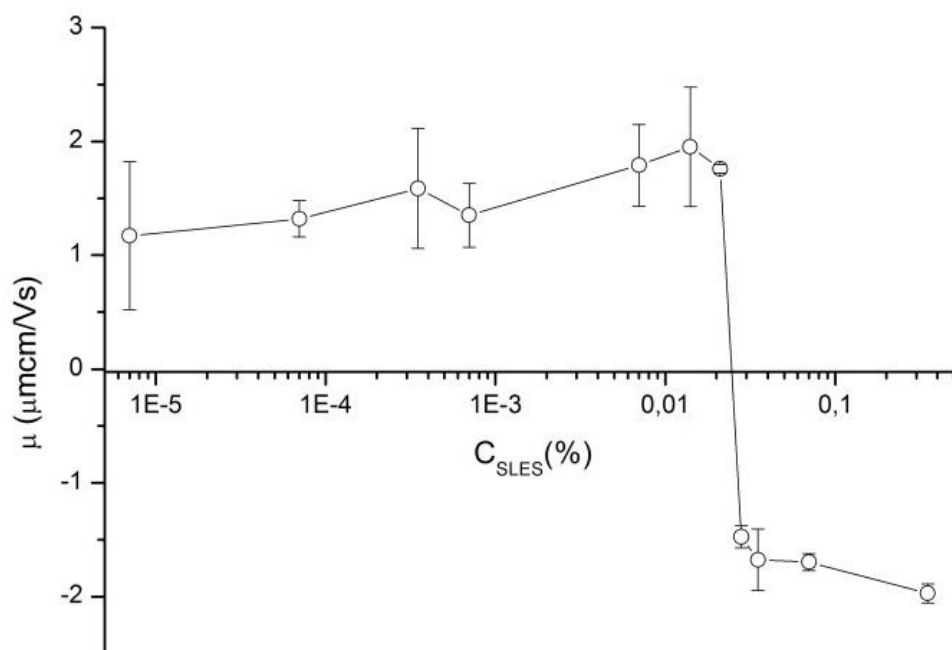
Slika 31. a) Površinski napon Ch-SLES smeše u puferu pH 5, u zavisnosti od koncentracije SLES, za različite koncentracije Ch i b) promena karakterističnih tačaka sa promenom koncentracije Ch

Jasno je da početno smanjenje površinskog napona, pri niskoj koncentraciji SLES, ne zavisi od koncentracije Ch, tj. za sve ispitivane koncentracije T_1 je 0,0007% SLES (slika 31b). Druga karakteristična tačka, T_2 , za koncentracije Ch 0,01; 0,05 i 0,07%, bila je 0,02; 0,07 i 0,14% SLES, redom. Naime, T_2 se uvek pojavi pri Ch:SLES masenom odnosu od 1:2 i linearno povećava sa povećanjem koncentracije Ch, tj. potrebno je više SLES za zasićenje polimera. T_3 se takođe povećava sa povećanjem koncentracije Ch i to se dešava na koncentracijama SLES od 0,07; 0,2 i 0,35% u rastvorima Ch 0,01; 0,05 i 0,07%, redom. Dobijeni rezultati razlikuju se od rezultata tenziometrijskih merenja za sistem Ch-SDS, kod

kojih položaj T_1 zavisi od koncentracije Ch i nema linearne zavisnosti T_2 od koncentracije SDS.

4.2.3 Određivanje elektroforetske pokretljivosti

Merenja elektroforetske pokretljivosti Ch/SLES kompleksa formiranih pri različitom masenom odnosu komponenti mogu dodatno pojasniti mehanizam interakcije hitozana i SLES. Rezultati merenja elektroforetske pokretljivosti prikazani su na slici 32.



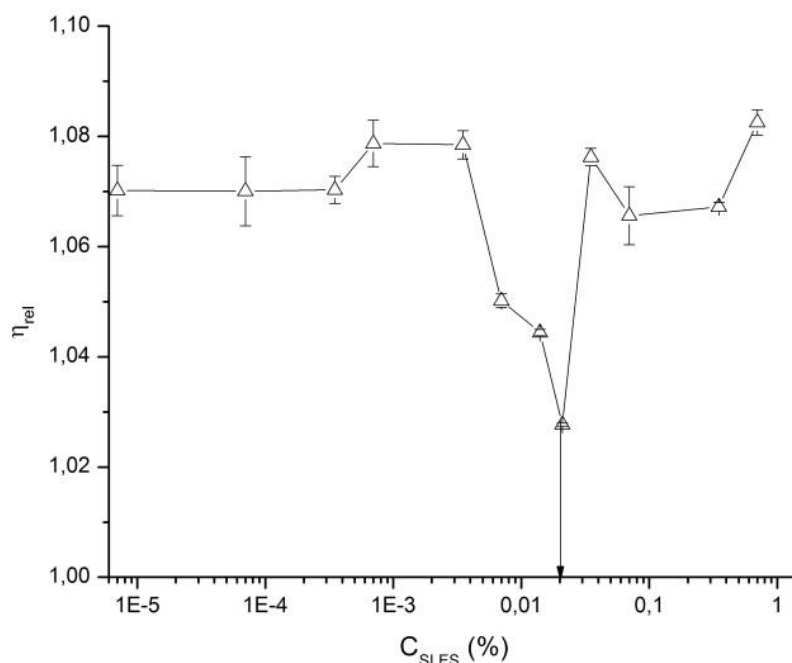
Slika 32. Promena elektroforetske pokretljivosti smeše Ch-SLES u zavisnosti od koncentracije SLES na pH 5; koncentracija Ch je 0,01%

Kao što se očekivalo, molekuli Ch imaju ukupno pozitivno naelektrisanje u vodenom rastvoru, pri pH nižem od 6 što je potvrđeno elektroforetskim merenjima pokretljivosti (μ od 0,01% (m/m) rastvora Ch na pH 5 je 1,7 $\mu\text{mcm/Vs}$). Takođe, Ch/SLES kompleksi imaju ukupno pozitivno naelektrisanje pri niskim koncentracijama SLES što je posledica postepenog vezivanja molekula SLES slabo izraženim elektrostatičkim interakcijama. Naime, molekuli SLES imaju mali uticaj na naelektrisanje formiranih kompleksa. Međutim, u regionu koncentracija SLES između 0,0007% i 0,02% (T_1 - T_2 region) kompleksi Ch/SLES su još uvek pozitivno naelektrisani, ali se javlja mutnoća i separacija faza u smešama (slike 28 i 29), što se može objasniti na sledeći način. Verovatno se prvi molekuli SLES vezuju nasumično na naelektrisane aktivne centre polielektrolitnog lanaca, što postepeno utiče na

ukupno naelektrisanje polimera. Nakon vezivanja prvih molekula PAM, naknadno vezivanje dodatnih molekula PAM se smatra kooperativnim i poželjno je na mestima pored već vezanih molekula PAM (Voisin i Vincent, 2003). U toj konfiguraciji, hidrofobni repovi se mogu poravnati na takav način da koriste *Van der Waals*-ovo privlačenje, tj. dalje vezivanje molekula SLES se odvija u nekoj vrsti agregata (Vleugels i sar., 2015). Promena naelektrisanja se javlja kod 0,025% SLES, pri čemu su Ch/SLES kompleksi neutralni i potpuno precipitiraju kao koacervatna faza (slika 28). Dalji porast koncentracije SLES dovodi do povećanja ukupnog negativnog naelektrisanja Ch/SLES kompleksa, a njihovo elektrostatičko odbijanje uzrokuje ponovno rastvaranje.

4.2.4 Viskozimetrijsko ispitivanje

Kako bi rezultati tenziometrijskih i elektroforetskih merenja u sistemu Ch-SLES bili potvrđeni, kao i radi boljeg razumevanja mehanizama interakcije u rastvoru smeša Ch-SLES primenjena su viskozimetrijska merenja. Promena relativnog viskoziteta smeše Ch-SLES sa različitim koncentracijom SLES pri pH 5 prikazana je na slici 33.



Slika 33. Relativna viskoznost smeše Ch-SLES koja sadrži 0,01% Ch u zavisnosti od koncentracije SLES na 30°C i pH 5

Relativni viskozitet 0,01% rastvora Ch pri pH 5 je iznosio 1,07. Do koncentracije SLES od 0,0007% viskozitet smeša se nije značajno menjao, što ukazuje na to da se

interakcija polimer-PAM odvija na granici faza, odnosno kako su tenziometrijska ispitivanja pokazala, radi se o slabo izraženim interakcijama. Nakon ove koncentracije, dodatak SLES uzrokuje blago povećanje relativnog viskoziteta zbog formiranja koacervata i povećanja mutnoće smeše (slika 29). U smešama sa koncentracijama SLES od 0,007%; 0,014% i 0,02%, došlo je do separacije faza i meren je viskozitet supernatantne faze. U tom regionu koncentracije relativni viskozitet supernatantne faze teži ka nižim vrednostima i dostiže minimum pri koncentraciji od 0,02% SLES (obeležen strelicom) što ukazuje na potpuno taloženje koacervatne faze. Dalji porast koncentracije SLES dovodi do progresivnog rastvaranja koacervata, pa se viskozitet smeša značajno povećava. Očigledno je da se viskozimetrijska merenja u potpunosti poklapaju sa merenjima mutnoće, površinskog napona i elektroforetske pokretljivosti.

4.3 Uticaj interakcije hitozan-jonska PAM na osobine U/V emulzija

Kako je već naglašeno, emulzije kao tečno/tečni sistemi pokazuju različite vidove nestabilnosti što u velikoj meri predstavlja ograničavajući faktor za njihovu primenu. Za stabilizaciju prehrambenih, farmaceutskih i kozmetičkih emulzija danas se ne preporučuje upotreba velike količine površinski aktivnih materija niske molekulske mase, iz ekoloških i zdravstvenih razloga. Poznato je da interakcije između polimera i površinski aktivnih materija mogu promeniti adsorpcioni sloj oko kapi ulja koji utiče na stabilnost emulzije (Goddar, 2002; Kelley i McClements, 2003; Ushikubo i Cunha, 2014; Wollenweber i sar., 2000). Naime, emulzija stabilizovana kompleksom polimer/PAM je generalno stabilnija od one koja je stabilizovana samo PAM niske molekulske mase, zbog toga što se stabilizacija vrši ne samo elektrostatičkom već i sternom interakcijom velikih suprotno naelektrisanih kompleksa polimer/PAM (Vongsetskul i sar., 2015). Stoga, nakon detaljno ispitane interakcije između hitozana i SDS i hitozana i SLES, kao i ponašanja formiranih kompleksa polimer-PAM na granici faza tečnost/gas, pristupili smo ispitivanjima njihovih osobina na granici faza ulje/voda. Ova ispitivanja ukazaće nam na mogućnost njihove primene za stabilizaciji emulzionih sistema.

4.3.1 Adsorpcija hitozana i njegovih kompleksa sa SDS i SLES na granici faza ulje/voda

Međupovršinski napon se formira između dve tečne faze koje se ne mešaju, kao posledica različitog dejstva njihovih molekula na granici faza. Prisustvo različitih materija rastvorenih u vodenoj ili uljanoj fazi može dovesti do promene međupovršinskog napona i na taj način značajno uticati na osobine sistema, prvenstveno na njegovu stabilnost.

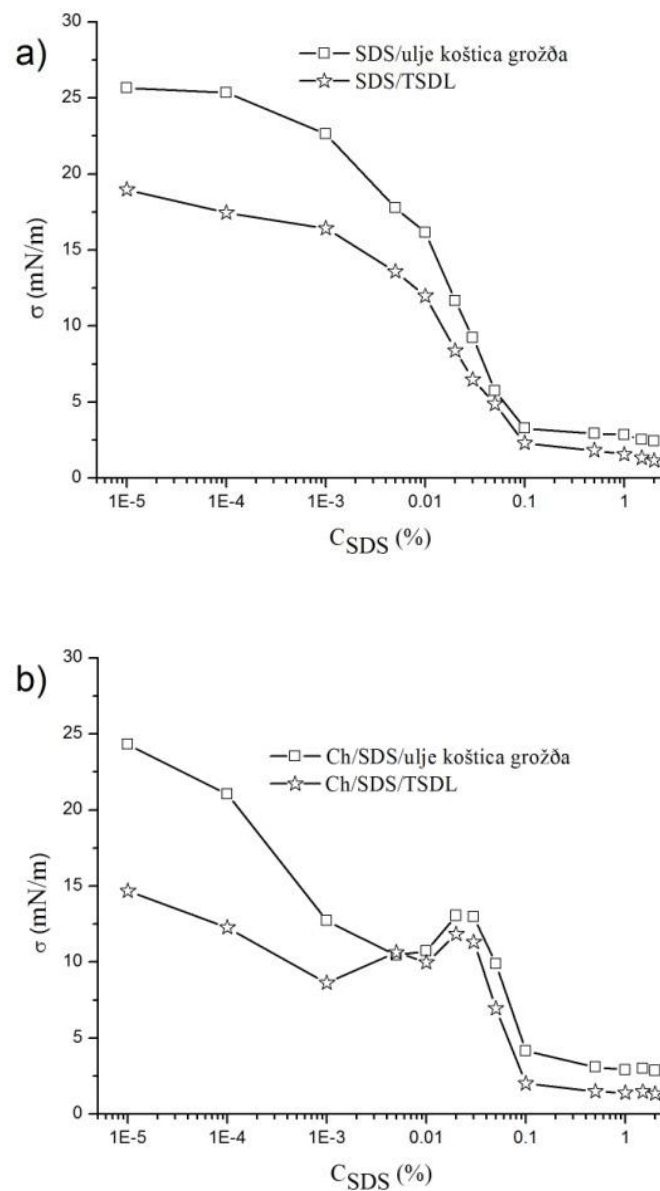
U cilju ispitivanja adsorpcionih osobina hitozana mereni su površinski naponi na granici faza ulje/voda. S obzirom da na proces adsorpcije, pored fizičko-hemijskih osobina adsorbensa, utiču i osobine uljne faze, odabrali smo dve različite vrste ulja: trigliceride srednje dužine ugljovodoničnih lanaca (TSDL), kao polusintetsko ulje i ulje koštica grožđa koje je prirodnog porekla. Kao vodena faza korišćena je puferovana voda i rastvori 0,01% i 0,1% (m/m) hitozana u puferovanoj vodi, na pH 4. Sva merenja izvedena su na 30°C, a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Površinski napon na granici faza ulje/voda na 30°C i pH 4

Površinski napon (mN/m)		
Ulje	TSDL	Ulje koštica grožđa
Puferovana voda	17,89	24,24
0,01% Ch	13,45	24,59
0,1% Ch	13,46	22,10

Prikazani rezultati ukazuju da veću vrednost površinskog napona pokazuje sistem ulje koštica grožđa/voda (24,24 mN/m), a manju TSDL/voda (17,89 mN/m), što je posledica njihove različite polarnosti. Dodatak hitozana u puferovanu vodu neznatno smanjuje vrednost međupovršinskog napona TSDL (oko 4 mN/m), dok praktično ne utiče na vrednost površinskog napona sistema ulje koštica grožđa/voda. Ovakvi rezultati pokazuju slabu površinsku aktivnost ovog biopolimera.

Uvođenje molekula PAM u sistem ulje/voda dovodi do njihove adsorpcije na graničnoj površini, što ima za posledicu sniženje međupovršinskog napona. U kojoj meri će prisustvo PAM uticati na promenu vrednosti međupovršinskog napona zavisi, prvenstveno od osobina molekula PAM, kao i od osobina uljne i vodene faze. Međutim, kada su u sistemu, pored molekula PAM, prisutni i molekuli polimera, moguće je očekivati različite fenomene uslovljene njihovim fizičko-hemijskim osobinama, interakcijama sa rastvaračem i prisutnim molekulima PAM. S obzirom na to pretpostavljamo da će adsorpcija, kako molekula SDS i SLES, tako i njihovih kompleksa sa hitozanom, na granici faza zavisiti od vrste ulja. Dobijene zavisnosti međupovršinskog napona SDS i smeše Ch-SDS na granici faza ulje/voda u funkciji koncentracije SDS su prikazane na slici 34.



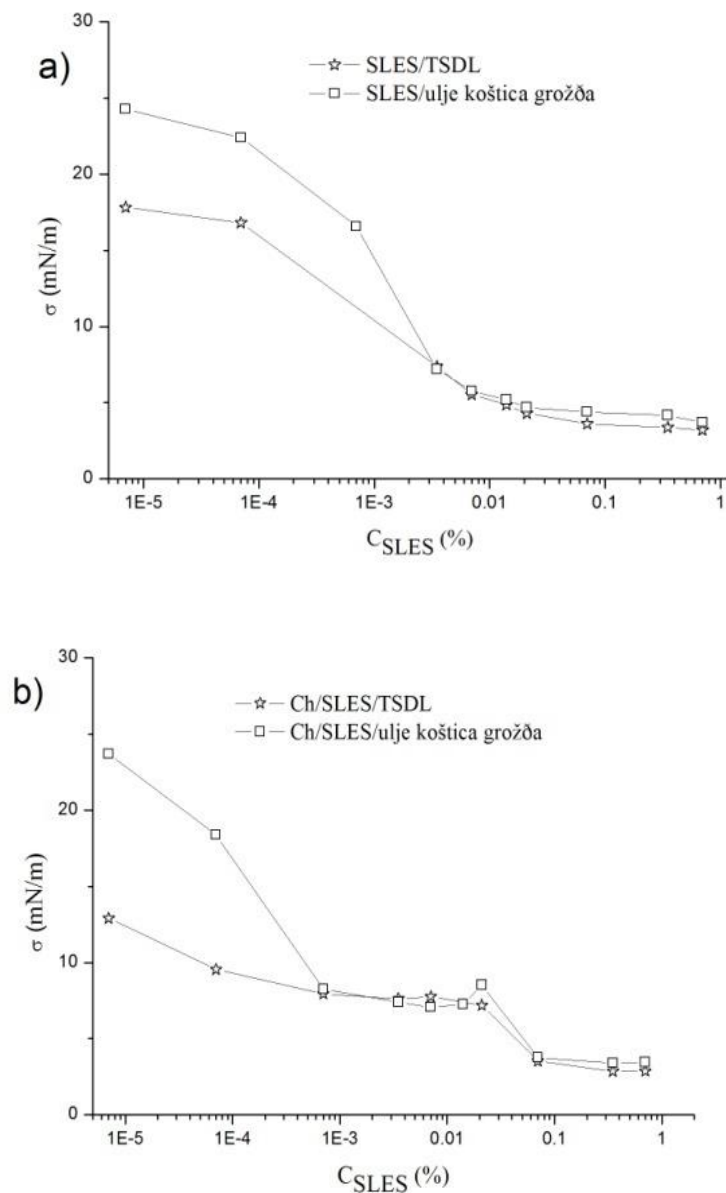
Slika 34. Međupovršinski napon a) SDS i b) smeše Ch-SDS na granici faza ulje/voda u funkciji koncentracije SDS, na temperaturi od 30°C i pH 4

Na osnovu dobijenih zavisnosti (slika 34a) vidi se da sa povećanjem koncentracije SDS međupovršinski napon naglo opada do koncentracije 0,1% (m/m), pri kojoj vrednost međupovršinskog napona iznosi 2,29 mN/m za TSDL i 3,27 mN/m za ulje koštica grožđa. Dalje povećanje koncentracije dovodi do neznatnih promena vrednosti međupovršinskog napona. Može se smatrati da je pri koncentraciji 0,1% (m/m) SDS granična površina potpuno zasićena njegovim molekulima i da dalje povećanje koncentracije dovodi do formiranja micela SDS koje nemaju sposobnost adsorpcije na granici faza. Takođe, niska vrednost

površinskog napona na granici faza ulje/voda za oba ispitivana ulja ukazuje da je SDS pogodan za njihovo emulgovanje.

Sa slike 34b se jasno vidi da nakon koncentracije 0,001% SDS u sitemu TSDL/voda i nakon 0,005% SDS u sitemu ulje koštica grožđa/voda međupovršinski napon kompleksa hitozan/SDS postepeno raste sve do 0,02% (m/m) SDS (maseni odnos Ch:SDS 1:2), kada se vizuelno može uočiti potpuno taloženje koacervata (slika 20). Nakon ove koncentracije dolazi do naglog pada međupovršinskog napona do 0,1% (m/m) SDS, nakon čega više nema značajne promene međupovršinskog napona. Ovakve promene međupovršinskog napona ukazuju na reorganizaciju adsorpcionog sloja tj. u intervalu koncentracija koji odgovara T_1 - T_2 regionu (slika 24) kompleksi Ch/SDS se postepeno desorbuju sa granične površine i bivaju zamenjeni slobodnim molekulima SDS.

Na slici 35 prikazan je uticaj koncentracije SLES na međupovršinski napon SLES i smeše Ch-SLES na granici faza ulje/voda.



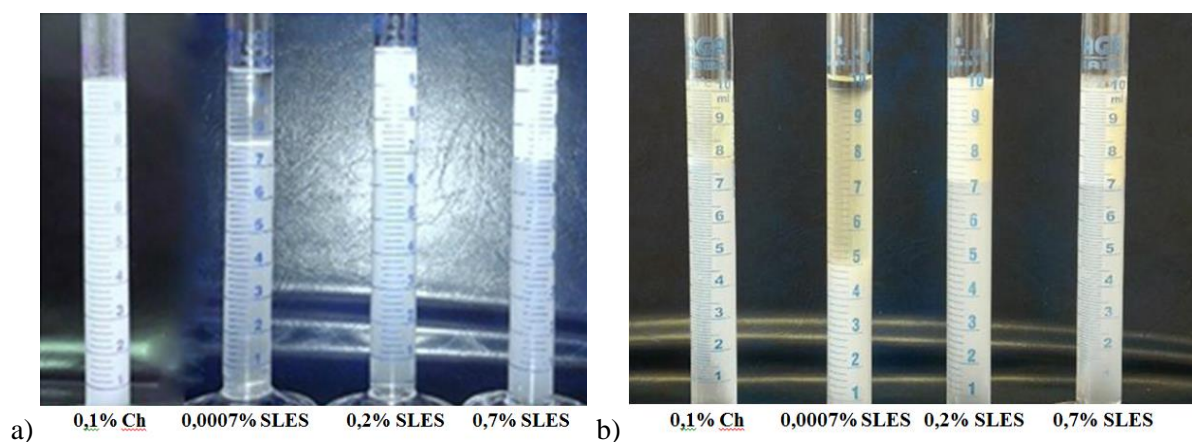
Slika 35. Međupovršinski napon a) SLES i b) smeše Ch-SLES na granici faza ulje/voda u funkciji koncentracije SLES, na temperaturi od 30°C i pH 4

Kao što se sa slike 35a može uočiti međupovršinski napon u sistemu ulje/voda, za oba ispitivana ulja, se naglo smanjuje do koncentracije 0,02% (m/m), koja za trigliceride srednje dužine lanca i ulje koštica grožđa iznosi 4,29 mN/m i 4,67 mN/m, redom. Iznad ovih koncentracija nema promena međupovršinskog napona, što ukazuje da je granična površina potpuno zasićena njegovim molekulima i da dalje povećanje koncentracije dovodi do formiranja micela SLES u vodenoj fazi.

Promene međupovršinskog napona smeše Ch-SLES na graničnoj površini sa oba ispitivana ulja (slika 35b) ukazuju da se u intervalu SLES koncentracija od 0,0007% (m/m) do 0,02% (m/m) takođe dešavaju promene u graničnom sloju. Međutim, površinski napon u ovom intervalu (T_1-T_2) od 7,8 mN/m je bliži minimalnoj vrednosti postignutoj za ovaj sistem (3,75 mN/m nakon dostizanja SLES koncentracije od 0,07% (m/m)). Takođe, porast površinskog napona koji se dešava pri SLES koncentraciji od 0,02% usled reorganizacije adsorbovanog sloja je manje izražen u odnosu na Ch-SDS sistem. Iz ovih razloga dalja ispitivanja u okviru ove disertacije rađena su sa sistemom Ch-SLES.

4.3.2 Dobijanje i osobine emulzija ulja u vodi stabilizovanih hitozan-SLES kompleksima

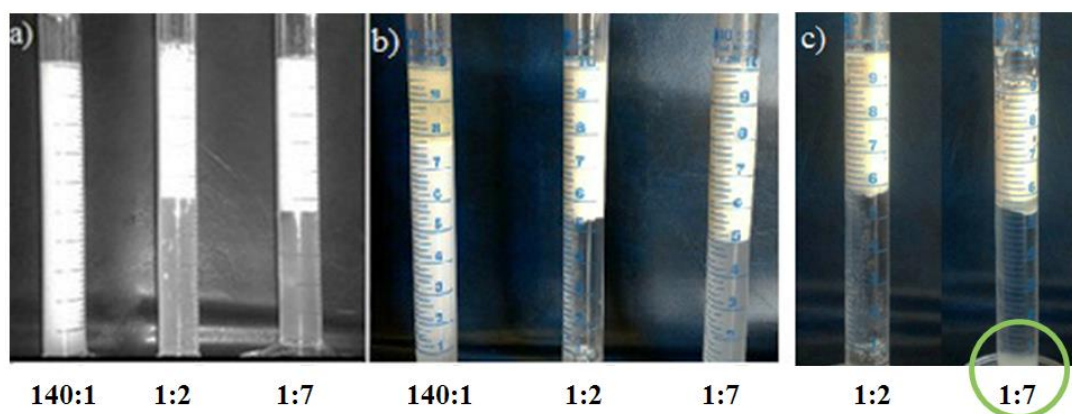
Za uporednu analizu emulzija stabilizovanih Ch, SLES i kompleksima Ch/SLES, prvo su pripremane 20% emulzije ulja u vodi, koje su stabilizovane rastvorom hitozana (0,1%) i rastvorima SLES (slika 36). Koncentracije SLES su odabrane tako da odgovaraju onima u smešama Ch-SLES masenih odnosa 140:1 (0,0007% SLES), 1:2 (0,2% SLES) i 1:7 (0,7% SLES).



Slika 36. Izgled 20% emulzija a) TSDL u vodi b) ulje koštica grožđa u vodi stabilizovanih Ch koncentracije 0,1% i SLES koncentracije 0,0007%, 0,2% i 0,7%, 5h nakon izrade

Kao što se sa slike 36 vidi, emulgujuća svojstva hitozana su loša, što se moglo i pretpostaviti na osnovu prethodnih ispitivanja njegovih adsorpcionih osobina (tabela 2). Neposredno nakon izrade došlo je do separacije faza u cilindrima, što se jasno može uočiti kod emulzija sa uljem koštica grožđa (slika 36b). Kod obe vrste ulja, nije bilo moguće dobiti emulzije sa 0,0007% koncentracije SLES, odnosno nakon vrlo kratkog vremenskog perioda došlo je do njihovog potpunog razrušavanja. Emulzije dobijene sa koncentracijama SLES od 0,2% i 0,7% pokazale su nešto bolju sedimentacionu stabilnost.

20% emulzije ulja koštica grožđa u vodi i TSDL u vodi dobijene su homogenizovanjem odgovarajućeg ulja u vodenom rastvoru smeše hitozana i SLES (slika 37). Koncentracije SLES u rastvoru, odnosno maseni odnosi Ch:SLES su odabrani tako da obuhvataju oblast pre stvaranja koacervata (140:1), oblast koacervacije (1:2), kao i oblast nakon formiranja koacervata (1:7). Koncentracija hitozana u kontinualnoj fazi svih pripremanih emulzija bila je konstantna (0,1% (m/m)).

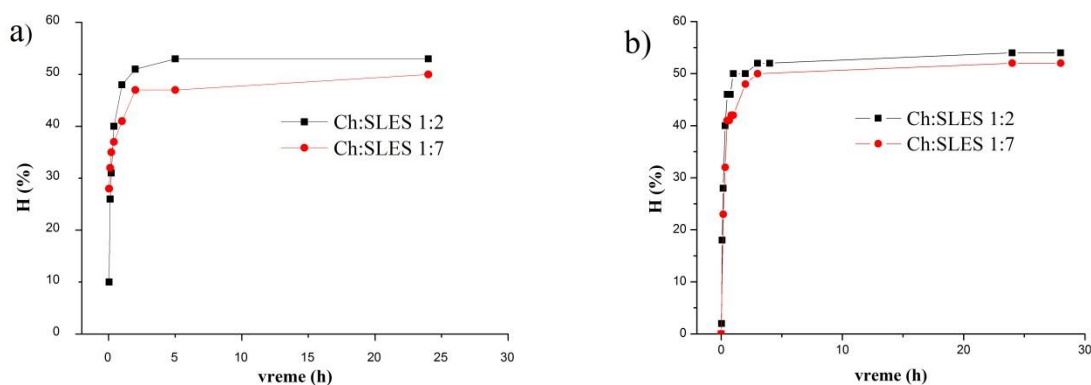


Slika 37. Izgled 20% emulzija U/V stabilizovanih kompleksom Ch/SLES različitih masenih udela SLES 5h nakon pripreme a) TSDL u vodi i b) ulje koštica grožđa u vodi c) emulzija ulja koštica grožđa u vodi, 30 dana nakon izrade

Nakon čuvanja emulzija na sobnoj temperaturi u toku 5 h jasno se uočava oštra granica između dva sloja pri svim koncentracijama SLES, što ukazuje na njihovu sedimentacionu nestabilnost.

Poredeći transparentnost slojeva seruma uočava se da emulzija stabilizovana Ch/SLES kompleksom masenog odnosa Ch:SLES 140:1 ima zamućeniji serum, što je posledica prisustva većeg udela kapi u ovom sloju, dok je serum u cilindru kod emulzija sa Ch:SLES 1:2 transparentniji. Kod emulzija stabilizovanih Ch/SLES kompleksom masenog odnosa Ch:SLES 1:7 došlo je do desorpcije koacervata i njegovog izdvajanja na dnu cilindra, što se jasno uočava kod emulzije sa uljem koštica grožđa 30 dana nakon pripreme (slika 37c).

Raslojavanje emulzija stabilizovanih kompleksom Ch/SLES u toku 24 h praćeno je preko *creaming* indeksa H, a rezultati su prikazani na slici 38.

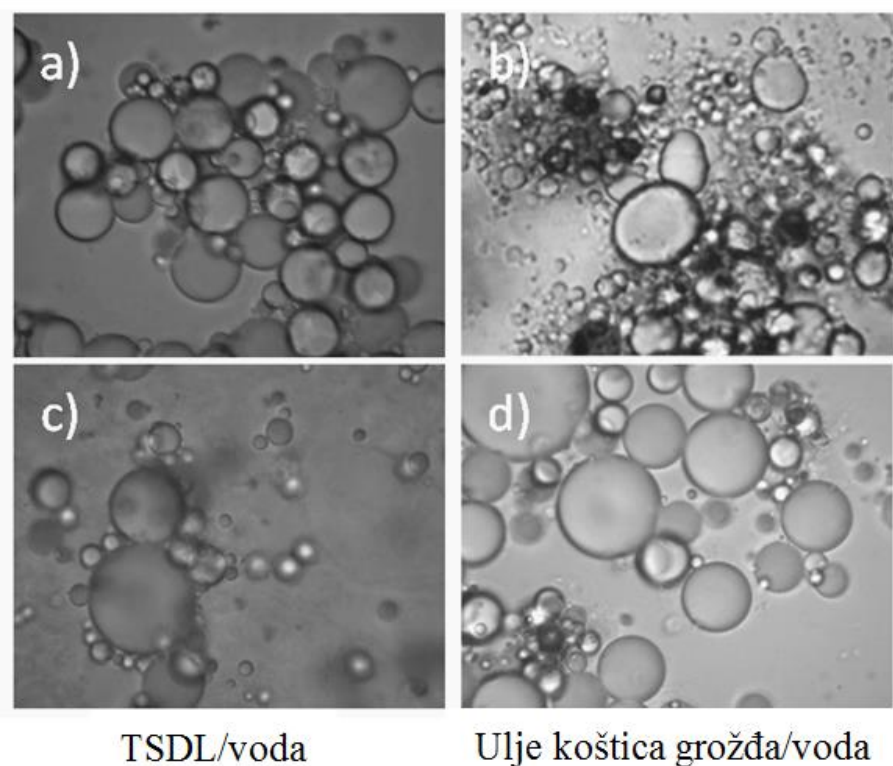


Slika 38. Promene *creaming* indeksa, H, 20% emulzija stabilizovanih kompleksom Ch/SLES a) TSDL u vodi b) ulje koštica grožđa u vodi u toku 24 h

Jasno je da je kod svih uzoraka emulzija i bez obzira na vrstu ulja došlo do raslojavanja u toku prva 2 h nakon pripreme, a da se daljim stajanjem ne menjaju značajno visine izdvojenih slojeva.

Radi boljeg karakterisanja emulzija stabilizovanih kompleksima Ch/SLES različitih masenih udela komponenata, određene su njihove disperzne karakteristike.

Posmatranjem emulzija pod mikroskopom (slika 39) uočava se prisustvo sfernih kapi različite veličine, što govori o polidisperznosti uzoraka ispitivanih emulzija. Takođe, kod emulzija stabilizovanih kompleksom Ch:SLES 1:2 (slika 39a i 39b) može se uočiti prisustvo koacervata oko formiranih kapljica ulja, koji dovodi do njegovog slepljivanja i formiranja agregata.

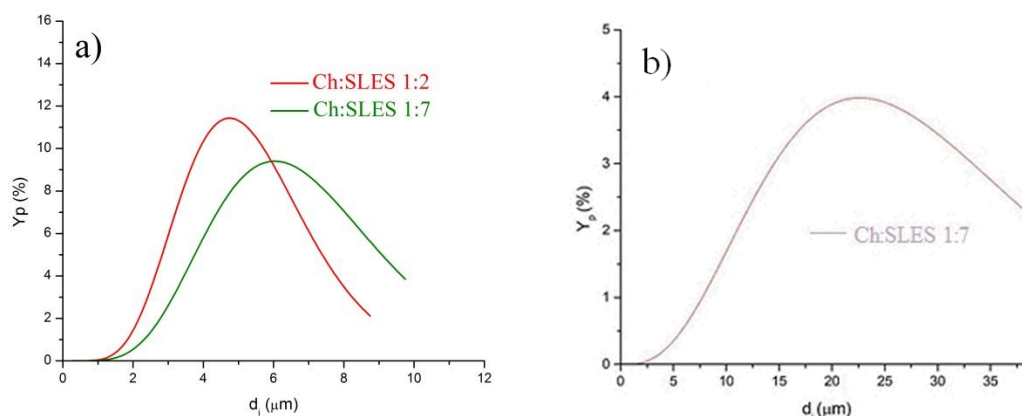


Slika 39. Mikrografije 20% emulzija TSDL u vodi i ulja koštica grožđa u vodi stabilizovanih Ch/SLES kompleksima različitog masenog udela komponenata a) i b) Ch:SLES 1:2; c) i d) Ch:SLES 1:7

Obradom mikrografija 20% emulzija stabilizovanih kompleksom hitozan/SLES određeni su srednji prečnici kapi dati u tabeli 3, a krive raspodele veličine kapi, dobijene fitovanjem eksperimentalnih podataka, prikazane su na slici 40. Zbog prisutnog koacervata oko kapi i njihovog izrazitog slepljivanja kod emulzije ulja koštica grožđa u vodi Ch:SLES 1:2, obrada mikrofotografije i određivanje srednjeg prečnika kapi nije bilo moguće.

Tabela 3. Parametri raspodele veličina kapi 20% emulzija TSDL u vodi stabilizovanih kompleksom Ch:SLES različitih masenih udela

Ulje	Ch:SLES	d_{34} (μm)	σ (μm)	X (μm)	S (m^2/cm^3)
TSDL	1:2	6,34	1,18	6,08	0,94
	1:7	5,31	1,02	4,76	1,13
Ulje koštica grožđa	1:7	23,46	1,61	22,67	0,25



Slika 40. Krive raspodele veličina kapi 20% emulzija a) TSDL u vodi sa različitim koncentracijama SLES i b) ulje koštica grožđa u vodi stabilizovanih kompleksom Ch/SLES sa 0,7% SLES

Iz tabele 3 može se uočiti da ispitivane emulzije sa TSDL imaju veličinu kapi ispod 10 μm, i to emulzija sa kompleksom Ch:SLES 1:7 ima manju vrednost najverovatnijeg i srednjeg prečnika kapi od emulzije sa kompleksom Ch:SLES 1:2. Emulzija stabilizovana kompleksom Ch:SLES 1:7 pripremljena sa uljem koštica grožđa ima znatno veći prečnik kapi, i izraženu polidisperznost (slika 40b). Upoređivanjem krivih raspodele veličina kapi (slika 40a) emulzija sa TSDL uočava se da emulzija sa kompleksom Ch:SLES 1:2 ima izraženiju polidisperznost i da se sa povećanjem udela SLES, sužava raspodela veličina kapi tj. užu raspodelu veličina kapi ima emulzija pripremljena sa kompleksom Ch:SLES 1:7. Na osnovu rezultata ispitivanja interakcija Ch-SLES prikazanih u poglavlju 4.2. može se pretpostaviti da su na graničnoj površini ove emulzije adsorbovani samo molekuli SLES. Ovu pretpostavku potvrđuju rezultati merenja zeta potencijala ispitivanih emulzija, koji su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Naelektrisanje kapi 20% emulzija dobijenih u sistemu Ch/SLES

Ch:SLES	140:1	1:2	1:7
Zeta potencijal emulzije TSDL/voda (mV)	37,3 ± 2,36	19,2 ± 1,88	-17,6 ± 0,917
Zeta potencijal emulzije ulje koštica grožđa/voda (mV)	30,6 ± 1,86	22,1 ± 1,18	-28,3 ± 1,17

Pozitivno naelektrisane kapi u emulzijama kod kojih je koncentracija SLES bila 0,0007% (Ch:SLES maseni odnos 140:1) ukazuju da su na graničnoj površini adsorbovani

Ch/SLES kompleksi nastali slabo izraženim elektrostatičkim privlačenjem polimera i PAM, koji imaju malu površinsku aktivnost (slika 30). Zbog toga ove emulzije pokazuju izrazitu nestabilnost.

U emulziji koja sadrži 0,2% SLES (Ch/SLES maseni odnos 1:2), kapi takođe poseduju pozitivno naelektrisanje ($19,2 \pm 1,88$ mV), ali manje apsolutne vrednosti. Prema rezultatima merenja elektroforetske pokretljivosti kompleksa Ch:SLES masenog odnosa 1:2 (slika 32), očekivano je da kompleksi budu neutralni i adsorbovani na granici faza u obliku koacervata. Na slici 39a primećeno je prisustvo koacervatne faze oko kapi ulja, ali naelektrisanje kapi nije neutralno. Ovaj fenomen bi se mogao objasniti reorganizacijom strukture kompleksa u toku procesa emulgovanja. Pretpostavlja se da je formirani kompleks Ch/SLES osetljiv na dejstvo sile smicanja, odnosno povećanjem brzine smicanja tokom procesa emulgovanja dolazi do razmotavanja molekula, i postepenog razrušavanja umrežene strukture (Katona i sar., 2013).

Kod emulzija stabilizovanih Ch:SLES kompleksom 1:7 kapi su negativno naelektrisane, što ukazuje da su samo molekuli SLES adsorbovani na granici faza, kako je i očekivano. Takođe, nakon 30 dana čuvanja uzoraka ovih emulzija na sobnoj temperaturi uočeno je izdvajanje koacervatne faze Ch/SLES kompleksa na dnu cilindra (slika 37c) čime je dodatno potvrđena struktura adsorpcionog sloja.

Prethodnim ispitivanjima je pokazano da Ch-SLES interakcije utiču na osobine formiranog adsorpcionog sloja na granici faza ulje/voda, kao i da se u oblasti najizraženije interakcije dobijaju emulzioni sistemi sa najsitnijom raspodelom veličina kapi i najvećom sedimentacionom stabilnosti. Osobine adsorpcionog sloja formiranog oko kapi ulja, zavise od strukture i konformacije adsorbovanog kompleksa Ch/SLES, nastalog u oblasti interakcije, što se može odraziti na mogućnost dobijanja i osobine mikrokapsula. S obzirom na to da je međupovršinski napon na granici faza TSDL/voda niži, kao i da su emulzije dobijene njegovim emulgovanjem u Ch/SLES kompleksima različitih masenih odnosa boljih karakteristika (disperzne karakteristike i stabilnost), ovo neutralno ulje je odabrano za mikrokapsulaciju liposolubilnih aktivnih materija.

4.4 Mikrokapsulacija ulja u sistemu hitozan-jonska PAM

Mikrokapsule uljnog sadržaja u obliku finog praha dobijene su sušenjem emulzija stabilizovanih Ch/SLES kompleksom u struji toplog vazduha pomoću *Spray dryer*-a. Jedan deo emulzija je tretiran formaldehidom (FA) i glutaraldehidom (GA) radi umrežavanja formiranog adsorpcionog sloja, a drugi deo je odmah nakon pripreme osušen bez dodatka umreživača. Na osnovu prethodnih ispitivanja, za pripremu mikrokapsula odabran je sistem Ch/SLES i njegov maseni odnos 1:2, a kao uljna faza trigliceridi srednje dužine ugljovodoničnih lanaca. Vitamin E je kao aktivna supstanca dodata u uljnu fazu emulzija u koncentraciji od 10%. Najpre je ispitan sadržaj vlage, a zatim morfološke karakteristike, efikasnost mikrokapsulacije i kinetika otpuštanja vitamina E iz mikrokapsula.

4.4.1 Sadržaj vlage u mikrokapsulama kompleksa hitozan-SLES

U tabeli 5 prikazane su vrednosti sadržaja vlage u mikrokapsulama, njena srednja vrednost kao i standardna devijacija.

Tabela 5. Srednja vrednost i standardna devijacija sadržaja vlage u mikrokapsulama

Uzorak mikrokapsula	Vlaga $\pm \sigma$ (%)
bez umreživača	1,27 \pm 0,081
1:1 Ch:GA	1,66 \pm 0,376
1:2 Ch:GA	1,30 \pm 0,173
1:1 Ch:FA	0,97 \pm 0,312
1:2 Ch:FA	1,76 \pm 0,451

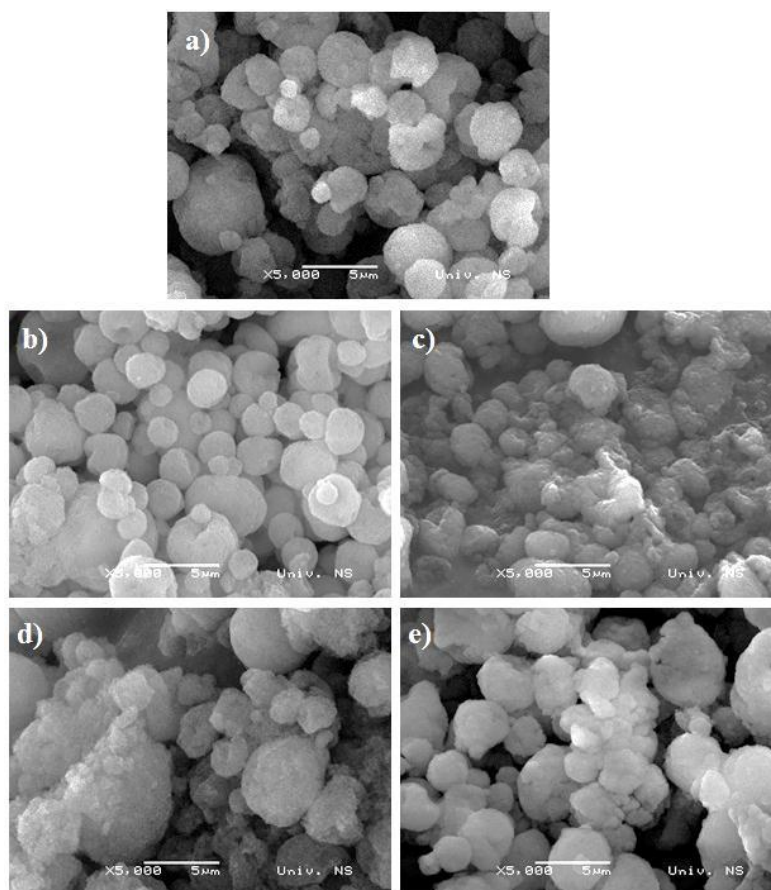
Sadržaj vlage u mikrokapsulama kompleksa Ch/SLES varira od 0,97 do 1,76%, što ne ukazuje na značajnu razliku između samih mikrokapsula i u saglasnosti je sa literaturnim podacima drugih studija, kao što su mikrokapsule sa uljem origana sušene u struji toplog vazduha upotrebom guma arabike, modifikvanog skroba i maltodekstrina kao omotača (1,3-3,65%) (Botrel i sar., 2012) i d-limonena mikrokapsuliranog u modifikovani skrob, proteinima surutke i maltodekstrinu (1,2-2,7 %) (Jafari i sar., 2007). Dokazano je da je proces sušenja raspršivanjem dobro optimizovan za dobijanje mikrokapsula sa vitaminom E.

4.4.2 Uticaj udela umreživača na osobine mikrokapsula

Poznato je da količina dodatog umreživača značajno utiče na mehaničku otpornost i poroznost zida mikrokapsula, a samim tim i na zaštitu inkapsuliranih aktivnih materija od faktora sredine kao i na kinetiku njihovog oslobađanja. Iz ovih razloga ispitan je uticaj udela umreživača na morfološke karakteristike mikrokapsula, kao i efikasnost mikrokapsulacije i kinetika oslobađanja vitamina E iz mikrokapsula. Kao umreživači korišćeni su formaldehid i glutaraldehid dodati u emulziju u masenom odnosu Ch:FA (GA) 1:1 i 1:2.

4.4.2.1 Morfološka analiza omotača mikrokapsula

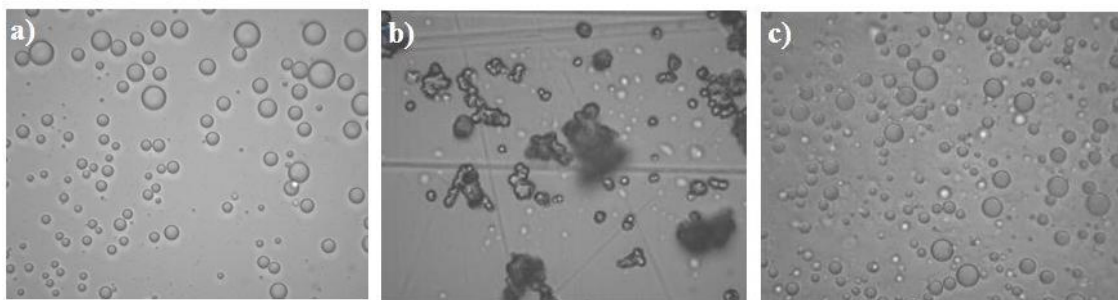
Morfologija površine mikrokapsula ispitan je analizom fotografija dobijenih primenom SEM (slika 41).



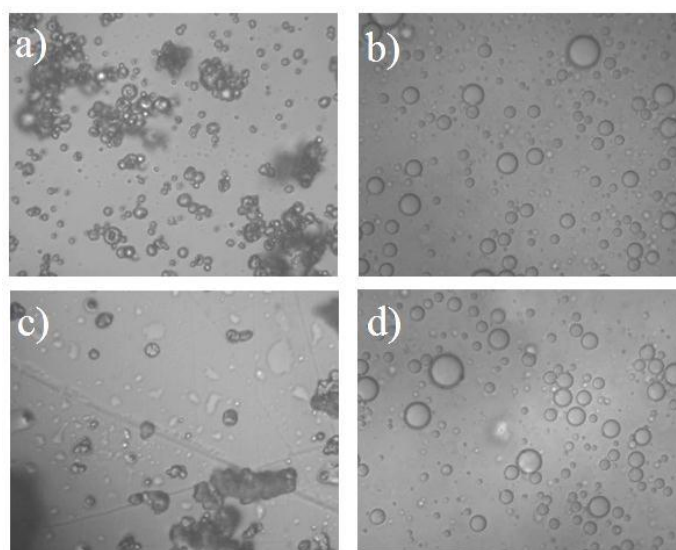
Slika 41. SEM mikrokapsula dobijenih *spray drying* postupkom iz 20% U/V emulzija sa vitaminom E stabilizovanih Ch:SLES kompleksom masenog odnosa 1:2 a) bez umrežavanja i umrežene b) Ch:GA maseni odnos 1:1 c) Ch:GA maseni odnos 1:2 d) Ch:FA maseni odnos 1:1 e) Ch:FA maseni odnos 1:2; uvećanje 5 000x

Na slikama se jasno vidi da je najveći udeo mikrokapsula sfernog oblika, sa blago naboranom površinom. Na slici 41d i 41e koje prikazuju mikrokapsule umrežene formaldehidom uočavaju se slepljene mikrokapsule. Mikrokapsule umrežene glutaraldehidom (maseni odnos Ch:GA 1:1) su pojedinačne, sfernog oblika i sa najmanje naboranom površinom (slika 41b), što je ukazivalo na njihove bolje karakteristike.

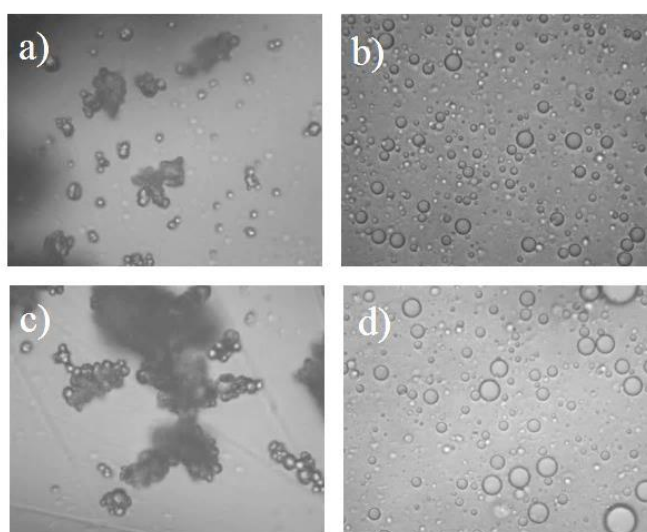
Dobijene mikrokapsule su bile stabilne i dobro su se redispergovale u vodi. Na slikama 42, 43 i 44 prikazane su mikrofotografije emulzije pre sušenja, mikrokapsula i njihovih suspenzija u vodi, dobijenih pri različitim odnosima Ch:umreživač.



Slika 42. Mikrofotografije a) osnovne emulzije pre sušenja u struji toplog vazduha b) suvih mikrokapsula bez umreživača i c) mikrokapsula bez umerživača redispergovanih u vodi



Slika 43. Mikrofotografije mikrokapsula umreženih GA a) Ch:GA 1:1 b) suspenzija mikrokapsula Ch:GA 1:1 c) Ch:GA 1:2 i d) suspenzija mikrokapsula Ch:GA 1:2

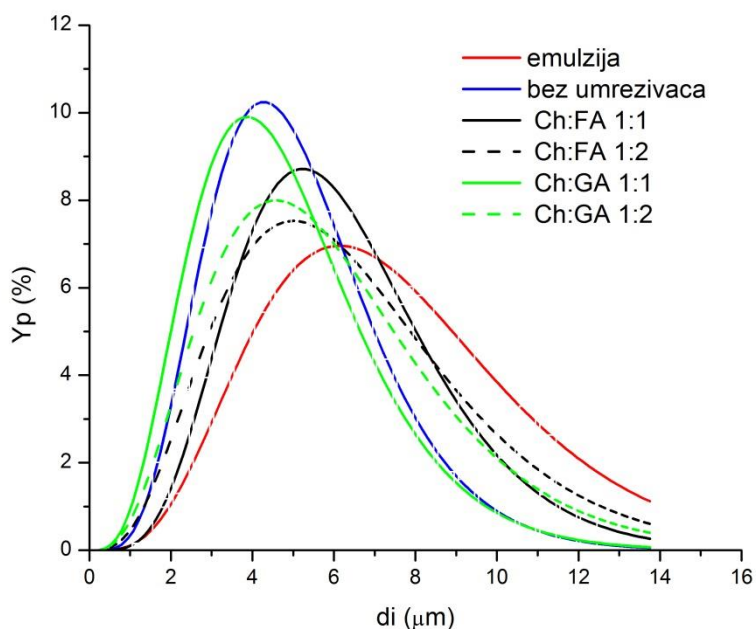


Slika 44. Mikrofotografije mikrokapsula umreženih FA a) Ch:FA 1:1 b) suspenzija mikrokapsula Ch:FA 1:1 c) Ch:FA 1:2 i d) suspenzija mikrokapsula Ch:FA 1:2

Parametri raspodele srednjeg i najverovatnijeg prečnika kako osnovne emulzije tako i redispergovanih mikrokapsula bez i sa dodatkom umreživača, dobijeni su obradom mikrofotografija njihovih suspenzija u vodi, primenom Belview7 softvera i prikazani u tabeli 6. Krive raspodele veličina čestica ispitivanih mikrokapsula, dobijene su fitovanjem eksperimentalnih podataka funkcijom krive raspodele i prikazane su na slici 45.

Tabela 6. Parametri raspodele veličina kapi emulzije i mikrokapsula suspendovanih u vodi bez i sa dodatkom umreživača: d_{vs} – srednji prečnik; σ – standardna devijacija; X – najverovatniji prečnik

Uzorak	$d_{vs} \pm \sigma$ (μm)	X (μm)
Emulzija stabilizovana kompleksom Ch/SLES sa vitaminom E	$6,85 \pm 0.213$	6,25
Suspenzija mikrokapsula bez umreživača	$5,32 \pm 0.252$	4,29
Suspenzija mikrokapsula Ch:GA 1:1	$5,04 \pm 0.331$	3,83
Suspenzija mikrokapsula Ch:GA 1:2	$5,84 \pm 0.256$	4,57
Suspenzija mikrokapsula Ch:FA 1:1	$6,25 \pm 0.224$	5,39
Suspenzija mikrokapsula Ch:FA 1:2	$6,21 \pm 0.242$	4,53



Slika 45. Krive raspodele veličina kapi emulzije i suspenzija mikrokapsula

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 6 i na slici 45 može se uočiti da proces *spray* sušenja emulzija sa vitaminom E utiče u izvesnoj meri na veličinu i raspodelu veličina mikrokapsula. Naime, suspenzije ovih mikrokapsula pokazuju nešto manje vrednosti srednjeg prečnika čestica (13-38%) i manju polidisperznost u odnosu na polaznu emulziju.

4.4.2.2 Efikasnost mikrokapsulacije i brzina oslobađanja vitamina E iz mikrokapsula

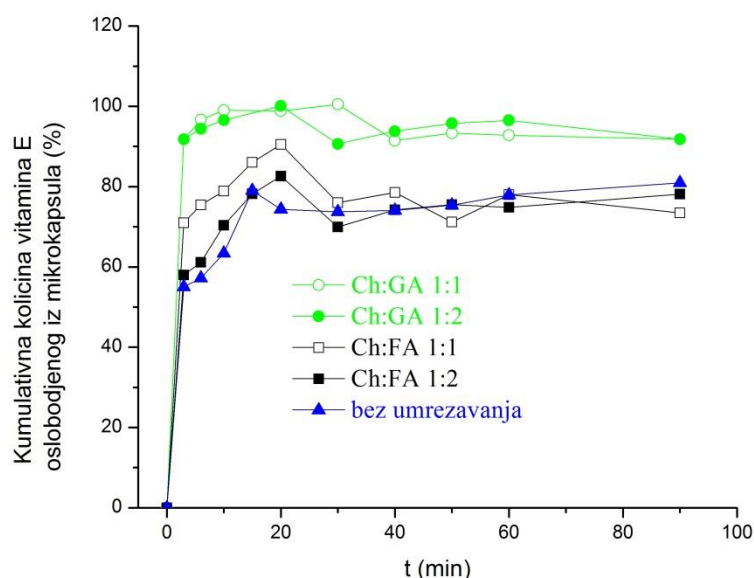
Kao akceptorski medijum za ispitivanje oslobađanja vitamina E odabran je 80% etanol. Iako je vitamin E nerastvoran u vodi dodavanje etanolnog rastvora povećava njegovu rastvorljivost, najverovatnije zbog nepolarnih privlačnih interakcija između etanola i vitamina E (Sharipova i sar., 2016). Koncentracija oslobođenog vitamina E posle 90 min iz različitih uzoraka mikrokapsula i efikasnost mikrokapsulacije određeni su i izraženi u procentima u odnosu na količine vitamina dodate u procesu pripreme emulzija. Rezultati ovih ispitivanja su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Apsorbanca (ABS), koncentracija oslobođenog vitamina E (C) i efikasnost mikrokapsulacije vitamina E (E) uzoraka mikrokapsula bez umreživača i umreženih sa formaldehidom i glutaraldehydom koji stoje u različitim masenim odnosima sa hitozanom

Uzorak mikrokapsula	ABS	C (%) g/100ml	E (%)
Ch:GA 1:1	0,6937	0,0099	100
Ch:GA 1:2	0,6732	0,0098	99,5
Ch:FA 1:1	0,6319	0,0092	93,5
Ch:FA 1:2	0,5564	0,0081	82,3
bez umreživača	0,4946	0,0072	73,17

Na osnovu date tabele 7 primećuje se da je efikasnost mikrokapsulacije najveća kod mikrokapsula umreženih sa glutaraldehydom, nešto niža kod mikrokapsula umreženih sa formaldehydom, a najniža kod neumreženih mikrokapsula. Rezultat dobijen za mikrokapsule umrežene formaldehydom koji stoji u 1:1 odnosu sa hitozanom, nije uobičajen, jer je oslobađanje 100% količine aktivne materije iz mikrokapsula vrlo redak slučaj u praksi.

Iz ovih razloga u cilju daljeg ispitivanja osobina mikrokapsula, analizirani su profili oslobađanja u cilju utvrđivanja kinetike otpuštanja vitamina E u *in vitro* uslovima, uz 80% etanol kao akceptorski medijum. Profili otpuštanja vitamina E prikazani su na slici 46.



Slika 46. Profili otpuštanja vitamina E iz mikrokapsula na sobnoj temperaturi

Kao što se sa slike 46 može videti, mikrokapsule sa neumreženim omotačem otpuštale su celu količinu inkapsuliranog vitamina E već nakon 15 min, dok je vreme trajanja otpuštanja produženo kod uzoraka umreženih mikrokapsula. To govori o činjenici da je zid neumreženih mikrokapsula manje kompaktan. Naime, primenom umreživača i uspostavljanjem veza sa molekulima hitozana koji u obliku Ch/SLES kompleksa formira zid mikrokapsula, smanjuje se poroznost omotača, a time i usporava oslobađanje aktivne materije. Vreme oslobađanja vitamina E iz umreženih mikrokapsula produženo je na 20 min, nakon kojeg se uočava plato, odnosno može se reći da je oslobađanje vitamina E praktično završeno. Izuzetak je upravo uzorak mikrokapsula odnosa Ch:GA 1:1, gde je vreme oslobađanja vitamina E kraće od neumreženih mikrokapsula i iznosi 10 min. Podaci dobijeni na osnovu *in vitro* testa analizirani su primenom matematičkih modela u cilju postavljanja pretpostavke o mehanizmu oslobađanja aktivne materije iz mikrokapsula. Vrednosti koeficijenta korelacije (r) za sve primenjene modele prikazani su u tabeli 8.

Tabela 8. Koeficijenti korelacije za *Higuchi* model, kinetiku I reda, kinetiku nultog reda i *Korsmeyer-Peppas*-ov model uzoraka mikrokapsula bez umreživača i umreženih sa formaldehidom i glutaraldehidom koji stoje u različitim masenim odnosima sa hitozanom

Uzorak	Koeficijenti korelacije			
	<i>Higuchi</i> model	Kinetika I reda	Kinetika nultog reda	<i>Korsmeyer-Peppas</i> -ov model
1:1 Ch:GA (3-10 min)	0,9627	0,9195	0,9244	0,9999
1:2 Ch:GA (3-20 min)	0,9954	0,9558	0,9612	0,9999
1:1 Ch:FA (3-20 min)	0,9812	0,9675	0,9775	0,9976
1:2 Ch:FA (3-20 min)	0,9853	0,9903	0,9935	0,9955
Bez umreživača (3-15 min)	0,8666	0,9519	0,9324	0,9767

Profili oslobađanja vitamina E analizirani su model-zavisnim postupkom, fitovanjem u odnosu na matematičke modele *Higuchi* tipa, I reda, nultog reda i *Korsmeyer-Peppas*. Za analizu su odabrani prikazani vremenski intervali (tabela 8), tokom kojih se odvija proces oslobađanja vitamina E.

Kod svih uzoraka mikrokapsula, najbolja korelacija je utvrđena za *Korsmeyer-Peppas*-ov model kinetike oslobađanja. Ovaj model je upotrebljen za razmatranje mehanizma oslobađanja inkapsulirane aktivne supstance iz ispitivanih mikrokapsula.

Tabela 9. Koeficijent korelacije (r), konstanta brzine difuzije (K) i difuzioni eksponent (n) za *Korsmeyer-Peppas*-ov model oslobađanja vitamina E iz uzoraka mikrokapsula

Uzorak	Korsmeyer-Peppas model		
	r	K	n
1:1 Ch:GA (3-10 min)	0,9999	85,84	0,063
1:2 Ch:GA (3-20 min)	0,9999	87,12	0,045
1:1 Ch:FA (3-20 min)	0,9976	60,22	0,131
1:2 Ch:FA (3-20 min)	0,9955	44,45	0,204
Bez umreživača (3-15 min)	0,9767	39,69	0,234

Na osnovu vrednosti difuzionog eksponenta (**n**), koji je prikazan u tabeli 9, moguće je postaviti pretpostavku o mehanizmu oslobađanja aktivne supstance. Vrednosti ovog parametra za ispitivane mikrokapsule bile su od 0,045 do 0,234, odnosno, kod svih ispitivanih uzoraka bile su manje od 0,43. Prema literaturnim navodima, vrednost **n** 0,43 odgovara oslobađanju aktivne supstance iz nosača procesom Fick-ove difuzije, dok vrednosti manje od 0,43 ukazuju na difuziju koja se ne odvija u potpunosti u skladu sa Fick-ovim zakonom (Kuang i sar., 2010). U jednom od novijih ispitivanja oslobađanja liposolubilnih pesticida iz mikrokapsula, u etanol/voda smeši kao akceptorskom medijumu, dato je tumačenje da je za inicijalno brzo oslobađanje aktivne supstance od značaja i oslobađanje dela supstance koji se nalazi na površini mikrokapsula (Liu i sar., 2016). Uzimajući to zapažanje u obzir, može se pretpostaviti da se kod ispitivanih mikrokapsula sa vitaminom E, oslobađanje zasniva na kombinaciji “spiranja” sa površine i difuzije iz mikrokapsule (otuda i odstupanje od idealne Fick-ove difuzije).

Uočene su razlike između mikrokapsula umreženih sa različitim umreživačima. Količina oslobođenog vitamina E i brzina oslobađanja bila je veća iz mikrokapsula umreženih sa GA, u odnosu na one umrežene sa FA i bez umreživača. Očekivano je da od izbora umreživača zavise površinska svojstva mikrokapsula i količina aktivne supstance na površini, kao i permeabilnost zida mikrokapsule za difuziju inkapsulirane aktivne supstance. U slučaju GA, difuzioni eksponent je najniži, oslobađanje je brzo i količina oslobođenog vitamina E je veća, tj. izraženiji je proces “spiranja”, u poređenju sa mikrokapsulama sa FA i bez umreživača. Difuzioni eksponent je imao najveću vrednost kod mikrokapsula bez umreživača, što je ukazivalo da je kod njih u najmanjoj meri prisutno “spiranje”, i da je oslobađanje vitamina E pretežno kontrolisano difuzijom (zbog toga su i niže ukupne količine oslobođene supstance).

5. ZAKLJUČCI

1. Interakcije hitozan (Ch) i natrijum-dodecil-sulfat (SDS) u vodenim rastvorima detaljno su ispitane primenom turbidimetrije, tenziometrije, viksozimetrije i merenjem elektroforetske pokretljivosti. Pokazano je da mehanizam interakcije zavisi od masenog udela komponenata u smeši. Pri vrlo niskim koncentracijama SDS (maseni odnos Ch:SDS 10:1) započinje elektrostatičko vezivanje pojedinačnih molekula SDS za aktivne centre polimernog lanca, pri čemu se formiraju slabo rastvorni, pozitivno naelektrisani kompleksi izražene površinske aktivnosti. Dalji porast koncentracije SDS do masenog odnosa Ch:SDS 1:2, dovodi do njegovog vezivanja u obliku agregata sličnih micelama. Naelektrisanje formiranih kompleksa se smanjuje, promene se dešavaju u rastvoru, a ne na granici faza, usled čega se izdvaja koacervat čvrste elastične konzistencije.
2. Pri izrazito visokim koncentracijama SDS dolazi do promena na granici faza, naime adsorbovani molekuli kompleksa Ch-SDS se desorbuju, a molekuli SDS zauzimaju njihovo mesto. U rastvoru se formiraju regularne micle SDS, ali se manjim delom nastavlja i njegovo vezivanje za molekule kompleksa hidrofobnim *Van der Waals*-ovim silama. Kompleksi postaju negativno naelektrisani usled čega se blago redisperguju.
3. Interakcije Ch i natrijum-lauriletar-sulfat (SLES) takođe su detaljno ispitane. Nađeno je da je, pri niskim koncentracijama SLES, elektrostatičko vezivanje njegovih molekula slabo izraženo. Pri masenom odnosu Ch:SLES 14:1 interakcije u sistemu postaju hidrofobne po svojoj prirodi, površinski napon ostaje skoro nepromenjen, povećava se mutnoća smeše, dok Ch/SLES kompleksi imaju ukupno pozitivno naelektrisanje. Oblast hidrofobnih interakcija je linerano zavisna od koncentracije polimera, tako da se završava pri masenom odnosu Ch:SLES 1:2 formiranjem neutralnih kompleksa, koji su potpuno precipitovani kao koacervatna faza. Izdvojeni koacervat je manje kompaktan i čvrst, te se može redispergovati delovanjem mehaničke sile.
4. Dalje povećanje koncentracije SLES dovodi do rastvaranja koacervata usled viška negativnog naelektrisanja i do značajnog povećanja viskoznosti smeše. Može se očekivati da pri dovoljno visokoj koncentraciji SLES dođe do skoro potpunog rastvaranja formiranih kompleksa. Ovi rezultati pokazuju da i male varijacije u strukturi anjonskog surfaktanta (SDS i SLES) mogu dovesti do značajnih razlika u mehanizmu interakcije sa katjonskim polimerom-hitozanom.
5. Ispitane su adsorpcione osobine hitozana i kompleksa Ch/SLES i Ch/SDS na granici faza ulje/voda. Za ova ispitivanja odabrana su dva različita tipa ulja: ulje koštica

grožđa i trigliceridi srednje dužine ugljovodoničnog lanca. Dobijeni rezultati potvrdili su slabu površinsku aktivnost Ch. Pokazano je da povećanje koncentracije SDS odnosno SLES u rastvoru hitozana dovodi do karakterističnih promena na granici faza. Nagli pad međupovršinskog napona nakon masenog odnosa 1:2 kod oba kompleksa ukazuje na reorganizaciju adsorpcionog sloja tj. kompleksi Ch/SDS i Ch/SLES se desorbuju sa graničnog sloja i zamenjuju slobodnim molekulima PAM. Ova reorganizacija adsorpcionog sloja bila je manje izražena kod smeše Ch-SLES, te su dalja ispitivanja nastavljena upravo sa ovom smešom. Takođe, uočeno je da vrsta ulja utiče na adsorpcione osobine ovih kompleksa. Niže vrednosti međupovršinskog napona kod oba kompleksa su postignute u sistemu TSDL/voda.

6. Ispitane su emulgjuće osobine rastvora Ch, SLES i njihovih smeša u tačno definisanim masenim odnosima odabranim na osnovu prethodnih ispitivanja. Upotrebom rastvora hitozana (0,1%) i rastvora SLES u koncentraciji 0,0007% nije moguće dobiti stabilne emulzije. Sa druge strane, dobijaju se emulzije približno jednake stabilnosti pri koncentraciji SLES od 0,2% i 0,7% koristeći oba ulja. Praćenjem *creaming* indeksa kod ovih emulzija utvrđeno je da se promene dešavaju u toku 2 h od izrade.
7. Emulgovanjem ulja u smeši Ch/SLES različitih masenih odnosa (Ch:SLES 140:1, 1:2 i 1:7) dobijene su emulzije različitih karakteristika. Posmatranjem mikrofotografija emulzija uočava se koacervat kompleksa Ch/SLES oko kapljica ulja, kada je maseni odnos Ch:SLES 1:2. Međutim, emulzije ulja koštica grožđa u vodi pokazale su lošije karakteristike, odnosno one poseduju krupnije kapi, veću polidisperznost i lošiju stabilnost. Analiza veličine i raspodele veličina kapi 20% TSDL/voda emulzija stabilizovanih smešom Ch-SLES masnih odnosa 1:2 i 1:7, pokazala je da su srednji prečnici kapi i stepen polidisperznosti manji kod emulzije stabilizovane smešom Ch-SLES koja sadrži veći udeo SLES. Na graničnoj površini kapljica ovih emulzija adsorbovani su samo molekuli SLES, što je merenjem zeta potencijala i potvrđeno (kapi nose negativno naelektrisanje). Takođe, vizuelnim praćenjem promena u stubu emulzija nakon 30 dana stajanja na sobnoj temperaturi, pored očekivanog raslojavanja, dolazi i do izdvajanja koacervatne faze kompleksa Ch/SLES, čime se potvrđuje da je on prisutan samo u kontinualnoj, vodenoj fazi emulzija.
8. Sušenjem 20% TSDL/voda emulzija u struji toplog vazduha primenom *spray drying* postupka moguće je izdvojiti mikrokapsule uljnog sadržaja obogaćene vitaminom E. Sve formirane mikrokapsule su stabilne, sadržaja vlage od 0,97-1,76%, sa dobrom sposobnošću redispergovanja u vodi. Dodatak umreživača formaldehida (FA) i glutaraldehida (GA) u manjoj meri utiče na disperzne karakteristike mikrokapsula. Analizom morfologije površine uočeno je da je najveći udeo mikrokapsula sfernog oblika, sa blago naboranom površinom, kao i da su jedino mikrokapsule umrežene GA

masenog odnosa Ch:GA 1:1 pojedinačne, dok je kod ostalih uočeno prisustvo aglomerata.

9. Generalno visoke vrednosti koeficijenta korelacije za primenjene matematičke modele ukazuje da je dizajniran sistem sa kontrolisanim oslobađanjem aktivne materije. Oslobađanje vitamina E iz mikrokapsula bilo je u skadu sa modelom *Korsmeyer-Peppas-a*, a vrednosti difuzionog eksponenta ukazivale su da se mehanizam oslobađanja najverovatnije zasniva na složenom procesu koji osim proste difuzije uključuje i direktno oslobađanje aktivne supstance sa površine mikrokapsula (spiranje). U slučaju GA, difuzioni eksponent je najniži, oslobađanje je brzo i količina oslobođenog vitamina E je veća, tj. izraženiji je proces spiranja. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da neumrežene mikrokapsule imaju najbolje karakteristike (difuzioni eksponent je imao najveću vrednost tj. oslobađanje vitamina E većim delom je kontrolisano difuzijom). Stoga, upotreba toksičnih umreživača kao što su formaldehid i glutaraldehid nije potrebna.

6. LITERATURA

Ach D., Briançon S., Broze G., Puel F., Rivoire A., Galvan J. M., Chevalier Y., Formation of Microcapsules by Complex Coacervation, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 93 (2015) 183-191.

Adams M. A., Characterization and Measurement of Flavor Compounds, Chapter 2, Substances that modify the perception of sweetness, American Chemical Society, (1985) 11-25.

Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M., Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 100 (2004) 5-28.

Ahmed T., Aljaeid B., Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery, *Drug Design, Development and Therapy*, (2016) 483-507.

Aoudia M., Maamari T., Salmi F., Intramolecular and intermolecular ion–dipole interactions in sodium lauryl ether sulfates (SLES) self-aggregation and mixed micellization with Triton X-100, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 335 (2009) 55–61.

Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Functional characterization of chitin and chitosan, *Current Chemical Biology*, 3 (2009) 203-230.

Bail S., Stuebiger G., Krist S., Unterweger H., Buchbauer G., Characteristics of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity, *Food Chemistry*, 108 (2008) 1122–1132.

Berger J., Reist M., Mayer J. M., Felt O., Peppas N. A., Gurny R., Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57 (1) (2004) 19-34.

Bernabe P., Peniche C., Argüelles-Monal W., Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes, Effect of thermal cross-linking, *Polymer Bulletin*, 55 (2005) 367–375.

Beveridge T. H. J., Girard B., Kopp, T., Drover J. C. G., Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: Varietal effects, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 1799–1804.

Bhattarai N., Edmondson D., Veiseh O., Matsen F. A., Zhang M., Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility, *Biomaterials*, 26 (31) (2005) 6176-6184.

Biswal A., Minakshi M., Chandra B. T., Probing the electrochemical properties of biopolymer modified EMD nanoflakes through electrodeposition for high performance alkaline batteries, *Dalton Transactions*, 45 (2016) 5557-5567.

Botrel D. A., Borges S. V., Fernandes R. V. B., Viana A. D., Costa J. M. G., Marques G. R., Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil, *International Journal of Food Science and Technology*, 47 (2012) 2289-2296.

Bouyer E., Mekhloufi G, Rosilio V., Grossiord J., Agnely F., Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?, *International Journal of Pharmaceutics*, 436 (2012) 359–378.

Caracciolo B. A., Cardoni M., Pescatore T., Patrolecco L., Characteristics and environmental fate of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate (SLES) used as the main component in foaming agents for mechanized tunneling, *Environmental Pollution*, 226 (2017) 94-103.

Chaturvedi V., Kumar A., Toxicity of sodium dodecyl sulfate in fishes and animals, *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*, 1 (2) (2010) 630-633.

Chen H. M., Ouyang W., Lawuyi B., Prakash S., Genipin crosslinked alginate-chitosan microcapsules: Membrane characterization and optimization of crosslinking reaction, *Biomacromolecules*, 7 (2006) 2091–2098.

Chung K., Wallace J., Kim S., Kalyanasundaram S., Andalman A. S., Davidson T. J., Mirzabekov J. J., Zalocusky K. A., Mattis J., Denisin A. K., Pak S., Bernstein H., Ramakrishnan C., Grosenick L., Gradinaru V., Deisseroth K., Structural and molecular interrogation of intact biological systems, *Nature*, 497 (2013) 332-337.

Combs G. F., *The Vitamins. Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, Academic Press, (1992) Inc. USA; 63.

Cook M., Tzortzis G., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V., Microencapsulation of a synbiotic into PLGA/alginate multiparticulate gels, *International Journal of Pharmaceutics*, 466 (1-2) (2014) 400-408.

Cooper C. L., Dubin P. L., Kayimazer A. B., Turksen S., Polyelectrolyte-protein complexes, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10 (2005) 52-78.

Crews C., Hough P., Godward J., Brereton P., Lees M., Guet S., Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 6261–6265.

Cserháti T., Forgács E., Oros G., Biological activity and environmental impact of anionic surfactants, *Environment International*, 28 (5) (2002) 337-348.

Čalića B., Milić J., Krajišnik D., Račić A., Karakteristike i primena hitozana u farmaceutskim/biomedicinskim preparatima, *Arhiv za farmaciju*, 63 (2013) 347-364.

Das K. S., David S. R. N., Rajabalaya R., Mukhopadhyay H. K. Halder T., Palanisamy M., Khanam J., Nanda A., Microencapsulation techniques and its practice, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (2011) 1-23.

Dedinaite A., Ernstsson M., Chitosan-SDS Interactions at a Solid-Liquid Interface: Effects of Surfactant Concentration and Ionic Strength, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107 (2003) 8181-8188.

Desai K. G. H., Park H. J., Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres, *Journal of Microencapsulation*, 22 (4) (2005) 377-395.

Dimić E., Hladno ceđena ulja, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, (2005).

Dini E., Alexandridou S., Kiparissides C., Synthesis and characterization of crosslinked chitosan microspheres for drug delivery applications, *Journal of Microencapsulation*, 20 (2003) 375–385.

Dokić P., Emulzije, pene, aerosoli, WUS Austria, (2005) Novi Sad.

Dolkemeyer W., Surfactants on the eve of the third millennium, challenges and opportunities, *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*, 1 (2000) 39-55.

Đaković Lj., Koloidna hemija, Površinski napon, Tehnološki fakultet, (1990a) Novi Sad.

Đaković Lj., Dokić P., Praktikum koloidne hemije, Tehnološki fakultet, (1990b) Novi Sad.

Eldin A., Appelquist L., The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols, *Lipids*, 31 (1996) 671-693.

Elsabee M. Z., Morsi R. E., Al-Sabagh A. M., Surface active properties of chitosan and its derivatives, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 74 (2009) 1-16.

Estevinho B., Rocha F., Santos L., Alves A., Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 31 (2) (2013) 138-155.

Farmakopeja SFRJ (Ph. Jug. IV), četvrto izdanje, Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, (1984) Beograd.

Fernandes L., Casal S., Cruz R., Pereira J. A., Ramalhosa E., Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties, *Food Research International*, 50 (2013) 161-166.

Glampedaki P., Dutschk V., Stability studies of cosmetic emulsions prepared from natural products such as wine, grape seed oil and mastic resin, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 460 (2014) 306-311.

Goddard D. E., Interaction of surfactants with polymers and proteins. Application of polymer–surfactant systems. FL: CRC Press., (1993) 395–413, Boca Raton.

Goddard E. D., Polymer/Surfactant Interaction: Interfacial Aspects, *Journal of Colloid and Interface Science*, 257 (2002) 228-235.

Gosh S. P., Functional Coatings by Plimer Microencapsulation, VCH Verlag, GmbH, (2006) Weinheim.

Gouin S., Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends in Food Science and Technology*, 15 (2004) 330-347.

Grigoriev D. O., Bukreeva T., Möhwald H., Shchukin D. G., New method for fabrication of loaded micro- and nanocontainers: emulsion encapsulation by polyelectrolyte layer-by-layer deposition on the liquid core, *Langmuir* 24 (2008) 999–1004.

Grant J., Cho J., Allen C., Self-Assembly and Physicochemical and Rheological Properties of a Polysaccharide-Surfactant System Formed from the Cationic Biopolymer Chitosan and Nonionic Sorbitan Esters, *Langmuir*, 22 (2006) 4327-4335.

Guaadaoui A., Benaicha S., Elmajdoub N., Bellaoui M., Hamal A., What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus, *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3 (2014) 174-179.

Guzmán E., Llamas S., Maestro A., Fernández-Peña L., Akanno A., Miller R., Ortega F., Rubio R. G., Polymer–surfactant systems in bulk and at fluid interfaces, *Advances in Colloid and Interface Science*, 233 (2016) 38–64.

Hamman H. J., Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems, *Marine Drugs*, 8 (2010) 1305-1322.

Hein S., Wang K., Stevens W. F., Kjems J., Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives, *Materials Science and Technology*, 24 (2008) 1053–1061.

Holmberg K., Jonnson B., Lindman B., *Surfactant and Polymers in Aqueous Solution*, Chapter 21: Emulsion and Emulsifiers, John Wiley and Sons, (2002) 452-471.

Hu M. L., Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers, *Chang Gung Medical Journal*, 34 (2011) 449-457.

Huang R. Y. M., Moon G. Y., Pal R., Chitosan/anionic surfactant complex membranes for the pervaporation separation of methanol/MTBE and characterization of the polymer/surfactant system, *Journal of Membrane Science*, 184 (2001) 1–15.

Hyun I. S., Jeong R. J., Characterization of sodium laureth sulfae by reversed-phase liquid chromatography with evaporative light scattering detection and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 2339-2344.

Ilium L., Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharmaceutical Research*, 15 (9) (1998) 1326–1331.

Im S. H., Ryoo J. J., Characterization of sodium laureth sulfate by reversed-phase liquid chromatography with evaporative light scattering detection and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 2339–2344.

Jadoon S., Malik A., Qazi M. H., Aziz M., Spectrophotometric method for the determination of Vitamin A and E using Ferrozine-Fe(II) complex, *Asian Journal of Research in Chemistry*, 6 (2013) 334-340.

Jafari S. M., He Y., Bhandari B., Encapsulation of nanoparticles of d-limonene by spray drying: Role of emulsifiers and emulsifying techniques, *Drying Technology*, 25 (2007) 1079-1089.

Jocić D., Topalović T., Biopolimer hitozan: svojstva, interakcije i primena u obradi tekstilnog materijala, *Hemijska industrija*, 58 (10) (2004) 457-469.

Jyothi N. V. N., Prasanna P. M., Sakarkar S. N., Prabha K. S., Ramaiah P. S., Srawan G. Y., Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency, *Journal of Microencapsulation*, 27 (2010) 187–197.

Karnchanajindanun J., Srisard M., Srihanam P., Baimark, Y., Preparation and characterization of genipin-cross-linked chitosan microparticles by water-in-oil emulsion solvent diffusion method, *Natural Science*, 2 (10) (2010) 1061-1065.

Katalenić M., Masti i ulja u prehrani, *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 3 (2007) 9.

Katona J. M., Sovilj V. J., Petrovic L. B., Microencapsulation of oil by polymer mixture–ionic surfactant interaction induced coacervation, *Carbohydrate Polymers*, 79 (2010) 563–570.

Katona J., Njaradi S., Sovilj V., Petrović L., Marčeta B., Milanović J., Rheological properties of hydroxypropylmethyl cellulose/sodium dodecylsulfate mixtures, *Journal of Serbian Chemical Society*, 78 (4) (2013) 457–468.

Katona J., *Mikrokapsulirani sistemi*, Praktikum, Tehnološki fakultet Novi Sad, (2017), Novi Sad.

Kean T., Thanou M., Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (1) (2010) 3-11.

Kelley D., McClements D. J., Influence of Sodium Dodecyl Sulfate on the Thermal Stability of Bovine Serum Albumin Stabilized Oil-in-Water Emulsions, *Food Hydrocolloids* 17 (2003) 87-93.

Kongsri S., Techawongstein S., Chanthai S., Effect of sodium dodecyl sulfate on the supramolecular complexation between chitosan and β -carotene, *Asian Journal of Chemistry*, 24 (12) (2012) 5457-5459.

Koroleva M. Y., Nagovitsina T. Y., Bidanov D. A., Gorbachevski O. S., Yurtov E. V., Nano- and microcapsules as drug-delivery systems, *Resource-Efficient Technologies*, 2 (2016) 233-239.

Kuang S. S., Oliveira J. C., Crean A. M., Microencapsulation as a Tool for Incorporating Bioactive Ingredients into Food, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50 (10) (2010) 951-968.

Kumar A., Dubin P. L., Hernon M. J., Li Y., Jaeger W., Temperature-Dependent Phase Behavior of Polyelectrolyte-Mixed Micelle Systems, *Journal Physical Chemistry B*, 111 (2007) 8468-8476.

Kumbhar S. G., Pawar S. H., Self-Functionalized, Oppositely Charged Chitosan-Alginate Scaffolds for Biomedical Applications, *BioTechnology: An Indian Journal*, 13 (2) (2017) 1-15.

Kume G., Gallotti M., Nunes G., Review on Anionic/Cationic Surfactant Mixtures, *Journal of Surfactants and Detergents*, 11 (2008) 1–11.

Kralchevsky P. A., Danov K. D., Kolev V. L., Broze G., Mehreteab A., Effect of Nonionic Admixtures on the Adsorption of Ionic Surfactants at Fluid Interfaces. 1. Sodium Dodecyl Sulfate and Dodecanol, *Langmuir*, 19 (2003) 5004-5018.

Kruif C. G., Weinbreck F., Vries R., Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9 (2004) 340–349.

Lachman J., Hejtmankova A., Kotikova Z., Dedina M., Stralkova R., Honig V., Stability of grape seed oil and its antioxidant tocotrienols, *Advanced Materials Research*, 1030-1032 (2014) 370-373.

Li Q., Cai T., Huang Y., Xia X., Cole S. P. C., Cai Y., A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs, *Nanomaterials*, 7 (2017) 122-147.

Liu B., Wang Y., Yanga F., Wang X., Shena H., Cuib H., Wu D., Construction of a controlled-release delivery system for pesticides using biodegradable PLA-based microcapsules, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 144 (2016) 38–45.

Lopetinsky R. G., Masliyah J. H., Xu Z., *Colloidal Particles at Liquid Interfaces*, Cambridge University Press, (2006) Cambridge.

Lundin M., Macakova L., Dedinaite A., Claesson P., Interactions between chitosan and SDS at a low-charged silica substrate compared to interactions in the bulk - the effect of ionic strength, *Langmuir*, 24 (2008) 3814-3827.

Luo Y., Wang Q., Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery, *International Journal of Biological Macromolecules*, 64 (2014) 353-367.

Luther M., Parry J., Moore J., Meng J., Zhang Y., Cheng Z., Inhibitory effect of chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their potential radical scavenging and antimicrobial properties, *Food Chemistry*, 104 (2007) 1065–1073.

Magdassi S., Bach U., Mumcuoglu K. Y., Formation of positively charged microcapsules based on chitosan-lecithin interactions, *Journal of Microencapsulation*, 14 (2009) 189-195.

Majeti N. V., Kumar R., A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*, 46 (2000) 1–27.

Mao S., Sun W., Kissel T., Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (1) (2010) 12-27.

Marrakchi S., Maibach H. I., Sodium lauryl sulfate-induced irritation in the human face: regional and age-related differences, *Skin Pharmacology and Physiology*, 19 (2006) 177-180.

Martinho N., Damgé C., Reis C. P., Recent Advances in Drug Delivery Systems, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2 (2011) 510-526.

Martínez-Huitle C. A., Jara C. C., Cerro-Lopez M., Quiroz M. A., Chitosan-modified glassy carbon electrodes: Electrochemical behaviour as a function of the preparation method and pH, *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 54 (2009) 53-62.

McClements D. J., Non-covalent interactions between protein and polysaccharides, *Biotechnology Advances*, 24 (2006) 621 – 625.

McClements D. J., Jafari S. M., Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review, *Advances in Colloid and Interface Science* 251 (2018) 55–79.

Mi F. L., Tan Y. C., Liang H. F., Sung H. W., In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable chitosan-based implant, *Biomaterials*, 23 (2002) 181–191.

Mishra M., Muthuprasanna P., Prabha K. S., Rani P. S., Satish I. A., Chandiran I. S., Arunachalam G., Shalini S., Basics and potential applications of surfactants: A review, *International Journal of Chemistry Technology Research*, 1 (2009) 1354–1365.

Muzzarelli R., Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids, *Carbohydrate Polymers*, 77 (1) (2009) 1-9.

Myers D., *Surfactants science and Technology*, 4th editon, Chapter 9: Emulsion, J. Wiley and Sons, Inc., (2006) 280-322 New York.

Onésippe C., Lagerge S., Studies of the association of the chitosan and alkylated chitosan with oppositely charged sodium dodecyl sulfate, *Colloids and Surfaces A: Physiochemical Engineering Aspects*, 330 (2008a) 201-206.

Onésippe C., Lagerge S., Study of the complex formation between sodium dodecyl sulfate and chitosan, *Colloids and Surfaces A: Physiochemical Engineering Aspects*, 317 (2008b) 100-108.

Penfold J., Thomas R. K., Taylor D. J. F., Polyelectrolyte/surfactant mixtures at the air-solution interface, *Current opinion in colloid and interface science*, 11 (6) (2006) 337-344.

Peretz S., Florea-Spiroiu M., Anghel D. F., Stoian C., Zgherea G., Chitosan microparticulate systems prepared by polymer-surfactant interaction, *Revue Roumaine de Chimie*, 58 (2-3) (2013) 275-281.

Petrovic L., Sovilj V., Katona J., Milanovic J., Influence of polymer–surfactant interactions on o/w emulsion properties and microcapsule formation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 342 (2) (2010) 333-339.

Petrović B. L., *Tehnologija kozmetičkih proizvoda, praktikum*, Tehnološki fakultet Novi Sad, (2016) Novi Sad.

Picone C. S., Cunha R. L., Chitosan-gellan electrostatic complexes: influence of preparation conditions and surfactant presence, *Carbohydrate Polymers*, 94, 2013, 695-703.

Piret J., Lamontagne J., Bestman-Smith J., Roy S., Gourde P., Désormeaux A., Omar F. R., Juhász J., Bergeron G. M., In vitro and in vivo evaluations of sodium lauryl sulfate and

dextran sulfate as microbicides against herpes simplex and human immunodeficiency viruses, *Journal of clinical microbiology*, 38 (1) (2000) 110–119.

Pradhan M., Singh D., Singh M. R., Novel colloidal carriers for psoriasis: Current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches, *Journal of Controlled Release*, 170 (2013) 380–395.

Pu J., Bankston J. D., Sathivel S., Developing microencapsulated flaxseed oil containing shrimp (*Litopenaeus setiferus*) astaxanthin using a pilot scale spray dryer, *Biosystems Engineering*, 108 (2) (2011) 121-132.

Rangarajan M., Zatez J., Skin delivery of vitamin E, *Journal of Cosmetic Science*, 50 (1999) 249-279.

Rattes A. L. R., Oliveira W. P., Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles, *Powder Technology*, 171 (1) (2007) 7-14.

Rosca C., Popa M. I., Lisa G., Chitanu G. C., Interaction of chitosan with natural or synthetic anionic polyelectrolytes. 1. The chitosan-carboxymethylcellulose complex, *Carbohydrate Polymers*, 62 (2005) 35-41.

Roy V. K., Kumar N. S., Gurusubramanian G., Proteins – structure, properties and their separation by SDS polyacrylamide gel electrophoresis, *Journal of Mizo Academy of Sciences*, 12 (2012) 170-181.

Saikia P. M., Boruah B., Kakoty B., Hazarika P., Effect of Association of Curcumin with Chitosan in Presence of TX 100 on Its Degradation, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 35 (2014) 997-1002.

Sharipova A. A., Aidarova S. B., Grigoriev D., Mutaliev B., Madibekova G., Tleuova A., Miller R., Polymer–surfactant complexes for microencapsulation of vitamin E and its release, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 137 (2016) 152-157.

Schafroth N., Arpagaus C., Jadhav U. Y., Makne S., Douroumis D., Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel Spray Drying process, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90 (2011) 8-15.

Schmitt C., Sanchez C., Desobry-Banon S., Hardy J., Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review, *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 38 (1998) 689–753.

Schulz P. C., Rodríguez M. S., Del B. L. F., Pistonesi M., Agullo E., Emulsification properties of chitosan, *Colloid Polymer Science*, 276 (1998) 1159-1165.

Seather H. V., Holme H. K., Maurstad G., Smidsrod O., Stokke B. T., Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 74 (2008) 813–821.

Shiangava F. B., Santana F. C., Torres L. R.O., Mancini-Filho J., Grape seed oil: a potential functional food?, *Food Science and Technology*, 35 (2015) 399-406.

Shumilina E. V., Shchipunov Y. A., Chitosan-carrageenan gels, *Colloid Journal*, 64 (2002) 372–378.

Sies H., Stahl W., Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62 (1995) 1315-1321.

Singhvi G., Singh M., Review: In vitro drug release characterization models, *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 2 (2011) 77 – 84.

Sinha V. R., Singla A. K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S., Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 274 (2004) 1–33.

Sovilj V., Dokić P., Mešinovska D., Formiranje mikrokapsula koacervacijom u sisitemu anjonski polielektrolit-katjonska površinski aktivna materija, *Acta Periodica Technologica*, 31 (2000) 453-459.

Sovilj V., Petrović L., Influence of hydroxypropylmethyl cellulose-sodium dodecylsulfate interaction on the solution conductivity and viscosity and emulsion stability, *Carbohydrate Polymers*, 64 (2006) 41-49.

Srikanth K., Gupta V. R. M., Manavi S. R., Devanna N., Particulate Carrier Systems: A Review, *International Research Journal of Pharmacy*, 3 (2012) 22-26.

Sunintaboon P., Pumduang K., Vongsetskul T., Pittayanurak P., Anantachoke N., Tuchinda P., Durand A. One-step preparation of chitosan/sodium dodecyl sulfate-stabilized oil-in-water emulsion of *Zingiber cassumunar* Roxb. oil extract, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 414 (2012) 151–159.

Tamilvanan S., Kumar B. A., Senthilkumar S. R., Baskar R., Sekharan T. R., Stability Assessment of Injectable Castor Oil-Based Nano-sized Emulsion Containing Cationic Droplets Stabilized by Poloxamer–Chitosan Emulsifier Films, *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 11 (2010) 904-909.

Taravel M. N., Domard A., Collagen and its interactions with chitosan, III some biological and mechanical properties, *Biomaterials*, 17 (1996) 451–455.

Taylor D. J. F., Thomas R. K., Penfold J., Polymer/surfactant interactions at the air/water interface, *Advances in Colloid and Interface Science*, 132 (2007) 69-110.

Thongngam M., McClements D. J., Influence of pH, ionic strength, and temperature on self-association and interactions of sodium dodecyl sulfate in the absence and presence of chitosan, *Langmuir*, 21 (2005) 79-86.

Tucker I. M., Petkov J. T., Jones C., Penfold J., Thomas R. K., Rogers S. E., Terry A. E., Heenan R. K., Grillo I., Adsorption of Polymer–Surfactant Mixtures at the Oil–Water Interface, *Langmuir*, 28 (2012) 14974–14982.

Ubaldi A., Delbono G., Fusari A., Serventi P., Quick HPLC method to determine vitamin E concentration in cow's milk, *Annals Facultatis Medicae Veterinaria di Parma*, 25 (2005) 101-110.

Ushikubo F. Y., Cunha R. L., Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions, *Food Hydrocolloids*, 34 (2014) 145-153.

Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-biological interactions*, 160 (2006) 1-40.

Vleugels L., Pollet J., Tuinier R., Polycation–Sodium Lauryl Ether Sulfate-Type Surfactant Complexes: Influence of Ethylene Oxide Length, *The Journal of Physical Chemistry B*, 119 (20) (2015) 6338-6347.

Voisin D., Vincent B., Flocculation in mixtures of cationic polyelectrolytes and anionic surfactants, *Advances in Colloid and Interface Science*, 106 (2003) 1–22.

Vongsetskul T., Phaenthong K., Chanthateyanonth R., Sunintaboon P., Tangboriboonrat P., Emulsions Stabilized by Chitosan/lithium Dodecyl Sulfate Complexes, *Chiang Mai Journal of Science*, 42 (2015) 393-400.

Vos P., Faas M. M., Spasojevic M., Sikkema J., Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20 (4) (2010) 292-302.

Vasiljević D., Đekić Lj., Krajišnik D., Pantelić I., Priručnik za praktičnu nastavu iz Farmaceutске tehnologije 1, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, (2019) Beograd.

Vuleta G., Milić J., Primorac M., Savić S., Farmaceutska tehnologija I, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, (2017) Beograd.

Wang Y., Li P., Tran T. T. D., Zhang J., Kong L., Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer, *Nanomaterials*, 6 (2) (2016) 26-44.

Wijendran V., Hayes K. C., Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health, *Annual Reviews in Nutrition*, 24 (2004) 597–615.

Wische C., Swendeman S., Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microcapsules, *International Journal of Pharmaceutics*, 364 (2008) 298-327.

Wollenweber C., Makievski A. V., Miller R., Daniels R., Adsorption of Hydroxypropylmethylcellulose at the Liquid/Liquid Interface and Effect on Emulsion Stability, *Colloids and Interface A*, 172 (2000) 91-101.

Wong T. W., Chitosan and Its Use in Design of Insulin Delivery System, *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, (2009) 8-25.

Yang C., Wang L., Chen S., Huang M., Li Y., Lin Y., Chen P., Shaw J., Huang K., Microfluidic assisted synthesis of silver nanoparticle–chitosan composite microparticles for antibacterial applications, *International Journal of Pharmaceutics*, 510 (2) (2016) 493-500.

Yin Y., Li Z., Sun Y., Yao K., A preliminary study on chitosan/gelatine polyelectrolyte complex formation, *Journal of Materials Science Letters*, 40 (2005) 4649–4652.

Yuan Y., Chesnutt B. M., Haggend W. O., Bumgardner J. D., Deacetylation of chitosan: material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures, *Materials*, 4 (2011) 1399-1416.

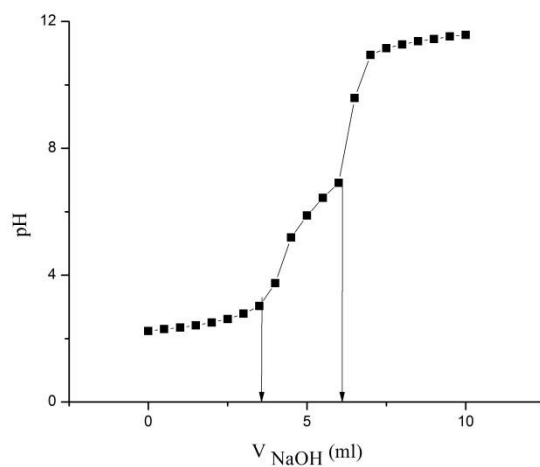
Zhao W., Wang Y., Coacervation with surfactants: From single-chain surfactants to gemini surfactants, *Advances in Colloid and Interface Science*, 239 (2017) 199–212.

Zheng B., Zhang Z., Chen F., Luo X., McClements D., Impact of delivery system type on curcumin stability: Comparison of curcumin degradation in aqueous solutions, emulsions, and hydrogel beads, *Food Hydrocolloids*, 71 (2017) 187-197.

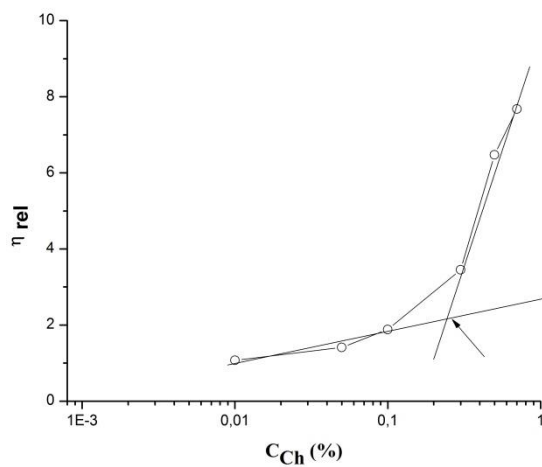
Zinoviadou K. G., Scholten E., Moschakis T., Biliaderis C. G., Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate-chitosan complex, *International Dairy Journal*, 2012, 1-8.

<http://www.sepawa.com/index/sepawa-congress/de-2012-abstracts-poster.html#p2>

7. PRILOG



Slika P1. Određivanje stepena deacetilovanja hitozana



Slika P2. Kritična *overlap* koncentracija hitozana