

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Бојана Д. Баланч

**ЛИПОЗОМИ И СИСТЕМИ ЛИПОЗОМИ-
АЛГИНАТ ЗА КОНТРОЛИСАНО
ОТПУШТАЊЕ РЕСВЕРАТРОЛА**

Докторска дисертација

Београд, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Bojana D. Balanč

**LIPOSOMES AND LIPOSOMES-ALGINATE
SYSTEMS FOR CONTROLLED RELEASE
OF RESVERATROL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Ментор тезе:

Др Бранко Бугарски, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Чланови комисије:

Др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Рада Пјановић, доцент
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Верица Ђорђевић, виши научни сарадник
Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Виктор Недовић, редовни професор
Универзитета у Београду, Пољопривредни факултет

Кандидат:

Бојана Баланч, дипломирани инжењер технологије

Датум одбране:

Ова докторска дисертација урађена је у оквиру истраживања предложених у пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања (ИИИ 46010): „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонента хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије у периоду од 2011. до 2016. године. Део истраживања остварен је и кроз билатерални пројекат између Републике Србије и Републике Словеније под називом „Нови системи за контролисано отпуштање лекова засновани на микроносачима“ у периоду од 2010. до 2011. године., као и кроз сарадњу са колегама са Биотехничког факултета, Универзитета у Љубљани остварену у оквиру COST акције ФА1001, Европске кооперације за науку и технологију.

Експериментални део рада ове докторске дисертације је изведен у лабораторијама Технолошко-металушког факултета, Универзитета у Београду, али и у другим научно-истраживачким институцијама како у Србији тако и у Словенији и то у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду (фино сечење као припрема за SEM анализу), Институту за физику, Универзитета у Београду (SEM анализа), Институту техничких наука Српске академије наука и уметности (анализе ласерске дифракције и диференцијалне скенирајуће калориметрије), Факултету за фармацију, Универзитета у Љубљани (Диференцијална скенирајућа калориметрија, торфолошка испитивања ћелијских култура), Биотехничком факултету, Универзитета у Љубљани (Флуоресцентна спектроскопија, NANO DSC; TBARS и BODIPY анализа) и Институту Јожеф Стефан, Љубљана (EPR анализа).

Захвалница

Пре свега велику захвалност дугујем свом ментору, др Бранку Бугарском, редовном професору Технолошко-металушког факултета Универзитета у Београду који ме је усмеравао у раду и професионалном развоју. Без његових корисних сугестија са једне стране и потпуне слободе у раду са друге стране, рад на овој тези не би био тако пријатно и испуњавајуће искуство.

Др Виктору Недовићу, редовном професору Пољопривредног факултета Универзитета у Београду велико хвала за неизмерну помоћ, подршку и поверење које ми је указао, али и на прилици коју ми је пружио за сарадњу са колегама из иностранства.

Специјалну захвалност дугујем др Верици Ђорђевић, вишем научном сараднику Технолошко-металушког факултета Универзитета у Београду која је била укључена у све сегменте ове тезе. Њена стручност, безусловна подршка, изузетно стрпљење, савети и пре свега пријатељство од тренутка када сам постала члан истраживачке групе давали су ми ветар у леђа.

Др Ради Пјановић, доценту Технолошко-металушког факултета Универзитета у Београду хвала на увек инспиративним и продуктивним дискусијама и саветима о експериментима из света липозома; право је задовољство сарађивати са Вама.

Хвала и др Зорици Кнежевић-Југовић, редовном професору Технолошко-металушког факултета Универзитета у Београду за корисне сугестије и пријатељске савете при коначној изради ове тезе.

Велики део ове тезе настао је захваљујући колегама из Словеније који су ми уступили своје лабораторије, стога неизмерно хвала Проф. др Наташи Поклар-Улрих и њеним докторантима на Биотехничком факултету Универзитета у Љубљани, као и др Аленки Звонар са Фармацеутског факултета Универзитета у Љубљани. Хвала за помоћ при припреми узорака и др Наташи Лончаревић из Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, као и др Александру Матковићу из Института за физику за SEM анализу. Специјално хвала др Смиљи Марковић из Института техничких наука Српске академије наука и уметности за анализе ласерске дифракције и диференцијалне скенирајуће калориметрије, али и за друге корисне савете.

Захваљујем се свим колегама из групе којом руководи професор др Бранко Бугарски на несебичној подршци, а посебно колегиницама Кати Трифковић, Радослави Правиловић и Ивани Дрвеници за угодну радну атмосферу, дуге дискусије и размене искуства, а изнад свега за дивна пријатељства која су обележила један део мог живота и надам се остају за увек.

Свим својим пријатељима дугујем захвалност за разумевање и подршку којом су хранили мој ентузијазам за радом у науци и увек били ту да ме подрже.

Посебно се захваљујем својим родитељима, Јасни и Дејану, и брату Филипу, увек су веровали у мене, бодрили ме, радовали се мојим успесима и давали све од себе да данас будем то што јесам.

И на крају од свег срца се захваљујем супругу Андреју за безусловну љубав, разумевање и подршку чиме је умногоме олакшао мој пут ка остварењу овог циља, као и мом маленом Луки који је био покретач и мотивација да овај пројекат приведем крају. Успели смо!

ЛИПОЗОМИ И СИСТЕМИ ЛИПОЗОМИ-АЛГИНАТ ЗА КОНТРОЛИСАНО ОТПУШТАЊЕ РЕСВЕРАТРОЛА

Резиме

Ресвератрол је природни антиоксиданс који буди велика интересовања широм света због свог позитивног дејства на здравље људи. Ипак, овај антиоксиданс је изузетно подложен оксидацији, слабо растворан у води, има малу биорасположивост и слабо се апсорбује након оралне администрације. Додатак ресвератрола прехранбеним и фармацеутским производима на бази воде проблематичан је управо због ових карактеристика. Једна врста носачи која може да омогуће превазилажење недостатака које ресвератрол има су липозоми. Липозоми могу да се припреме употребом природних компоненти па је стога њихова примена знатно олакшана.

У овој докторској дисертацији упоређене су различите методе за припрему липозома са инкапсулираним ресвератролом. За припрему липозома коришћена је комерцијална липидна смеша, а од метода примењене су метода танког филма и пролипозомна метода које дају велике липозоме. Тако припремљени липозоми испитани су са становишта расподеле величина, површинског наелектрисања, степена инкапсулације, фазне трансформације и стабилности. Показано је да обе методе обезбеђују висок проценат инкапсулације ресвератрола (92,9% и 97,4%, респективно), али пролипозомна метода има предност над методом танког филма због већих могућности за увећање размера производње. Екструзија и соникација примењене су на претходно формиране велике липозоме како би се смањила њихова величина и повећала униформност. Ипак, соникацијом долази до губитка ресвератрола па је проценат инкапсулације између 44 и 56%, док је код екструзије овај проценат и даље висок (92–96%).

Поред овога испитана је и антиоксидативна активност инкапсулираног ресвератрола и резултати указују да је активност задржана након

инкапсулације у великом проценту, али и да ова компонента инхибира липидну пероксидацију, односно да постоји узајамно позитивно дејство липида и ресвератрола. Још једном је применом електронске парамагнетне резонанције потврђено да ресвератрол инхибира стварање ОН радикала за чак 87%.

Отпуштање ресвератрола из липозома такође је била тема ове дисертације и анализа је изведена употребом Францове дифузионе ћелије. Показано је да липозоми успоравају отпуштање ресвератрола и да дифузиони отпори који потичу од липозомне мембране имају вредности између $5,90 \cdot 10^5$ и $9,55 \cdot 10^5$ s/m у зависности од узорка.

Утицај ресвератрола на саму мембрану липозома као и лоцирање ресвератрола у липозомој мембрани односно липидном двослоју утврђени су методама електрон парамагнетне резонантне спектроскопије и флуоресцентне спектроскопије. Обе методе потврдиле су да је ресвератрол уграђен у унутрашњи део липозомне мембране као и да је флуидност мембране смањена у присуству ресвератрола. Додатно је утврђено методом диференцијалне скенирајуће калориметрије да постоје одређене интеракције између липозомне мембране и ресвератрола.

Међутим, системи на бази липида као што су липозоми често су нестабилни што ограничава њихову даљу примену нарочито у прехранбеној индустрији. Једно од решења за овај проблем је дисперговање липозома са инкапсулираном активном компонентом у полимерне хидрогел носаче. Комбинација ова два система (на бази полимера и на бази липида) спаја предности које би инкапсулација имала да је засебно рађена и елиминише појединачне недостатке. Поред тога овакви системи дају веће могућности за оптимизацију отпуштања активне компоненте. Стога су у овој дисертацији испитани и сложени системи липозоми-алгинат добијени методом електростатичке екструзије. Системи липозоми-алгинат испитани су у погледу реолошких карактеристика почетне смеше, величине добијених микрочестица, њихове морфологије, механичких карактеристика, а испитана је и кинетика отпуштања ресвератрола из ових система. Сви изложени резултати

представљају важне информације за конкретну примену комплексних система липозоми-хидрогел са инкапсулираном активном компонентом у функционалне прехранбене производе.

Кључне речи: *липозоми; ресвератрол; алгинат; дифузија; контролисано отпуштање; природни антиоксиданси*

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Биохемијско инжењерство и биотехнологија

УДК број: 547.915:547.458:678.048

LIPOSOMES AND LIPOSOMES-ALGINATE SYSTEMS FOR CONTROLLED RELEASE OF RESVERATROL

Summary

Resveratrol is in the limelight all over the world as a health-beneficial compound widely investigated as natural antioxidant suitable for prevention of human cardiovascular diseases and inhibition of low-density lipoproteins oxidation. Nonetheless, it is prone to oxidation, poorly soluble in water, poorly bioavailable, and characterized by weak absorption after oral administration and rapid metabolism *in vivo*. Moreover, the addition of antioxidants to aqueous-based food and pharmaceutical products can be limited due to their troublesome characteristics. Liposomes are well known carriers that may be used to overcome these disadvantages. They can be prepared using only natural components and therefore the new formulations could be quickly implemented.

In this doctoral thesis different methods were tested for design of liposomes aimed at effective encapsulation of resveratrol. Liposomes were prepared with a commercial lipid mixture of phospholipids using thin film and proliposome method and further investigated and compared from the aspect of size distribution, surface charge, entrapment efficiency, phase behaviour and stability. Both methods provided high entrapment efficiency (92.9% and 97.4%, respectively), but proliposome method is more convenient for the industrial application. Extrusion and sonication techniques were applied to obtain smaller liposomes of the average diameter between 120 and 270 nm. The sonicated liposomes incorporated resveratrol (44–56%) fewer than extruded vesicles (92–96%). Furthermore, the antioxidative activity of encapsulated resveratrol was examined. The results showed that it was retained upon encapsulation and the antioxidant activity of resveratrol was also confirmed by its 95% inhibition of lipid peroxidation, compared to liposomes without resveratrol exposed to the same conditions. Similarly, electron paramagnetic resonance spectroscopy showed an 87% reduction in the spectra intensity of the hydroxyethyl radical, which indicates the efficiency of resveratrol for inhibition of OH radical

production. The release of resveratrol from liposomes was performed in Franz diffusion cell and the studies showed that liposomes impart slow diffusion of resveratrol, where diffusion resistance derived from liposomal membrane ranged from $5.90 \cdot 10^5$ to $9.55 \cdot 10^5$ s/m, depending on the size of particles. The influence of resveratrol encapsulated into liposomes on the structural properties of the liposome membrane was investigated by electron paramagnetic resonance spectroscopy and fluorescence spectroscopy. Both methods confirmed that resveratrol is incorporated in the inner part of liposome membrane. The liposome membrane fluidity is reduced in the presence of resveratrol throughout the whole membrane. In addition, differential scanning calorimetry was performed in order to study the interaction of liposomal membranes with resveratrol, and their physical state.

However, the lipid-based systems, such as liposomes, often suffer from the problem of instability, which constrains their application, especially in food industry. A possible solution is dispersing of drug loaded liposomes in hydrogel matrices. The combination of the two (polymer-based and the lipid-based) systems integrate their advantages and avoid disadvantages. Beside that, more designable drug release kinetics could be achieved by hydrogel-microencapsulated liposomes compared to microcapsules or liposomes alone. Therefore, in this thesis more complex liposome-alginate systems were prepared by electrostatic extrusion technique as novel resveratrol delivery systems. These hybrid delivery systems were characterized in terms of the rheology, particle size, morphology, mechanical and release properties providing the information valuable when administering the complex system liposome-in-hydrogel with encapsulated bioactive compound(s) into functional food products.

Keywords: *Liposomes; resveratrol; alginate; diffusion; controlled release; natural antioxidants*

Scientific field: Technological engineering

Scientific discipline: Biochemical engineering and biotechnology

UDC number: 547.915:547.458:678.048

Садржај

Увод.....	1
1. Теоријске основе	5
1.1. Природни антиоксиданси	5
1.1.1. Ресвератрол.....	7
1.2. Инкапсулација	10
1.2.1. Системи за инкапсулацију активних компоненти	12
1.2.1.1. Системи за инкапсулацију ресвератрола	16
1.2.2. Контролисано отпуштање као циљ инкапсулације	19
1.2.3. Пренос масе у инкапсулационим системима	23
1.2.3.1. Дифузија	24
1.3. Липозоми.....	32
1.3.1. Фосфолипиди.....	32
1.3.2. Основне карактеристике липозома и класификација липозома	34
1.3.3. Припрема липозома	37
1.4. Сложени системи липозоми-полимер	42
1.4.1. Алгинат.....	43
1.4.2. Електростатичка екструзија.....	47
2. Циљеви рада	50
3. Експериментална испитивања	52
3.1. Материјали.....	52
3.2. Методе припреме и карактеризација липозома са инкапсулираним ресвератролом.....	53
3.2.1. Припрема липозома са инкапсулираним ресвератролом.....	53
3.2.1.1. Припрема великих мултиламеларних липозома	53
3.2.1.2. Метода танког филма (TF).....	53
3.2.1.3. Пролипозомна метода (PRO)	54
3.2.1.4. Смањење величине липозома.....	55
Екструзија.....	55
Соникација.....	56
3.2.2. Карактеризација липозома са инкапсулираним ресвератролом.....	57
3.2.2.1. Одређивање величине липозома и њихове стабилности	57
3.2.2.2. Одређивање степена инкапсулације.....	58
3.2.2.3. Микроскопија атомских сила.....	58

3.2.2.4.	Антиоксидативни тест.....	59
3.2.2.5.	Диференцијална скенирајућа калориметрија	60
3.2.2.6.	Испитивање кинетике отпуштања ресвератрола и одређивање коефицијента дифузије	61
3.2.2.7.	Морфолошка испитивања ћелијских култура	62
3.2.2.8.	Електронска парамагнетна резонанција	63
3.2.2.9.	Флуоресцентна спектроскопија	63
3.2.2.10.	Тиобарбитурни тест.....	64
3.2.2.11.	Праћење кинетике липидне оксидације уз употребу флуоресцентног липофилног маркера BODIPY 581/591 C11.....	65
3.2.2.12.	Одређивање антиоксидативне активности употребом EPR.....	65
3.3.	Методe припреме и карактеризације система липозоми-алгинат	66
3.3.1.	Припрема система липозоми-алгинат.....	66
3.3.2.	Карактеризација микрочестичних система липозоми-алгинат.....	68
3.3.2.1.	Одређивање степена ефикасности инкорпорације ресвератрола у системе липозоми-алгинат	68
3.3.2.2.	Реолошка мерења.....	68
3.3.2.3.	Расподела величина микрочестица	68
3.3.2.4.	Оптичка микроскопија	69
3.3.2.5.	Скенирајућа електронска микроскопија	69
3.3.2.6.	Диференцијална скенирајућа калориметрија (DSC).....	69
3.3.2.7.	Механичке карактеристике.....	70
3.3.2.8.	Испитивање кинетике отпуштања ресвератрола и одређивање коефицијента дифузије	71
3.4.	Статистичка анализа	71
4.	Резултати.....	72
4.1.	Карактеризација липозома са инкапсулираним ресвератролом.....	72
4.1.1.	Одрђивање величине липозома и њихове стабилности	72
4.1.2.	Микроскопија атомских сила.....	74
4.1.3.	Степен инкапсулације ресвератрола и његова релативна антиоксидативна активност	75
4.1.4.	Диференцијална скенирајућа калориметрија.....	76
4.1.5.	Испитивање кинетике отпуштања ресвератрола и одређивање коефицијента дифузије	80

4.1.6.	Морфолошка испитивања ћелијских култура	84
4.1.7.	Електронска парамагнетна резонанција.....	85
4.1.8.	Флуоресцентна спектрографија.....	91
4.1.9.	Тиобарбитурни тест	92
4.1.10.	Праћење кинетике липидне оксидације уз употребу флуоресцентног липофилног маркера BODIPY 581/591 C11.....	93
4.1.11.	Одређивање антиоксидативне активности употребом EPR.....	94
4.2.	Карактеризација микрочестичних система липозоми-алгинат.....	95
4.2.1.	Степен ефикасности инкорпорације ресвератрола у микрочестичним системима, средњи пречник микрочестица и проценат губитка воде при сушењу	96
4.2.2.	Оптичка микроскопија	99
4.2.3.	Скенирајућа електронска микроскопија.....	99
4.2.4.	Диференцијална скенирајућа калориметрија.....	101
4.2.5.	Механичке карактеристике	103
4.2.6.	Кинетика отпуштања ресвератрола и одређивање коефицијента дифузије.....	105
5.	Дискусија.....	108
6.	Закључци.....	130
	Литература.....	135
	Садржај слика.....	149
	Садржај табела	153
	Биографија.....	154

Увод

Ресвератрол је природни полифенол који се налази у грожђу, вину, кикирикију, бобичастом воћу, какау и чоколади (Collin и сар. 2006). Овај полифенол има снажно антиоксидативно дејство (Stojanović и сар. 2001), али и друга позитивна дејства на здравље људи. Сматра се да ресвератрол има противупално дејство, као и анелгетско, неуропротективно и хемопротективно (Gusman и сар. 2001; Baur и Sinclai 2006). Показано је и његово позитивно дејство на метаболизам липида, па се сматра да повећан унос ове компоненте умањује ризик од коронарних болести (Das и Das 2010). Управо због ових својстава употреба ресвератрола је постала атрактивна тема многих истраживања. Ипак, постоје одређени недостаци ресвератрола који његову употребу компликују и уједно чине изазов за научнике чија су истраживања усмерена ка превазилажењу ових сметњи. Наиме, ресвератрол је склон оксидацији, фотосензитиван је, слабо се раствара у води, слабо се апсорбује при оралној администрацији и има кратко време полу-живота (Lopez-Nicolas и сар. 2006).

Инкапсулација представља један од начина да се неки од недостатака ресвератрола превазиђу, да се ова компонента заштити, повећа њена растворљивост, постигне контролисано отпуштање и да се уопштено омогући њена шира употреба (Amri и сар. 2012). За инкапсулацију ресвератрола могу да се примене липозоми (Caddeo и сар. 2008). У циљу припреме липозома најчешће се користи метода танког филма која се није показала као погодна за увећање производње што је основни предуслов за индустријску примену. Липозоми се припремају од природних компоненти па је стога њихова примена могућа како у козметичким, фармацеутским тако и у прехранбеним производима (Mozafari и сар. 2008), али често је скупа. Из поменутих разлога су у овој дисертацији испитани мали (погодни за фармацеутску примену) и велики (погодни за

прехранбеној индустрији) липозоми као биокомпатибилни системи за инкапсулацију ресвератрола, припремљени различитим методама. За припрему је коришћена метода танког филма и пролипозомна метода за коју се сматра да може бити погодна за индустријску производњу (Chen и Alli 1987; Turanek и сар. 1997; Wagner и Vorauer-Uhl 2011). Липозоми су добијени од комерцијалне фосфолипидне смеше, а за смањење величине примењене су екструзија и соникација. Испитане су основне карактеристике добијених липозома (расподела величина, површинско наелектрисање, ефикасност инкапсулације, фазне карактеристике, стабилност као и кинетика отпуштања) које су показале потенцијал липозома са инкапсулираним ресвератролом за примену у прехранбеним и фармацеутским производима. Такође је испитан и утицај ресвератрола на флуидност липозомне мембране што је битно са аспекта стабилности у комплексним формулацијама, а такође има утицај и на кинетику отпуштања активне компоненте (Park и сар. 2009). Позиција ресвератрола у липозомној мембрани је утврђена различитим техникама, а показано је и инхибиторно дејство ресвератрола на липидну пероксидацију. Резултати испитивања липозома као система за инкапсулацију ресвератрола осим што ближе дефинишу овај систем, дају и уопштену слику о понашању слабо растворних антиоксиданаса инкапсулираних у липозоме који би могли да се примене у фармацеутској и прехранбеној индустрији.

Иако се сматрају за изузетно погодне и флексибилне системе за инкапсулацију, липозоми понекад могу да буду нестабилни. Тако, када је у питању медицинска и козметичка примена за циљано деловање, липозоми подлежу брзој фагоцитози (Blume и Sevc 1990). На овај начин липозоми брзо нестају из крвотока па је тако време отпуштања активне компоненте скраћено. Када је реч о примени у прехранбеним производима, иако се законске регулативе примене лако превазилазе због природног састава липозома, њихова орална администрација наилази на потешкоће услед ниске вредности рН у гастроинтестиналном тракту и

присуства ензима који дестабилишу и разарају липозоме (Ђорђевић и сар. 2015). Једно од могућих решења за превазилажење овог проблема је дисперговање липозома са инкапсулираном активном компонентом у честице на бази хидрогелова. Овакви сложени системи познати су у литератури као нове врсте завоја, инјектабилни депо системи или као формулације за трансдермалну апликацију (DiTizio и сар. 2000; Pjanović и сар. 2010; Li и сар. 2011; Lee и сар. 2012; Gao и сар. 2014; Jøraholmen и сар. 2015), али се мало зна о примени ових система у прехранбеној индустрији.

Сложени системи липозоми-хидрогел комбинују предности које имају липозоми и хидрогелови као засебни системи за инкапсулацију, а превазилазе њихове недостатке (DiTizio и сар. 2000; Liu и сар. 2012). Поред тога, кинетика отпуштања може бити унапређена у поређењу са хидрогеловима и липозомима засебно. Због тога је један од циљева ове дисертације био развој нових сложених система липозоми-хидрогел за инкапсулацију ресвератрола. Како би се припрема сложених система поједноставила, а тиме и убрзала и појефтинила, пролипозомна метода је употребљена за формирање липозома са инкапсулираним ресвератролом који су даље инкорпорирани у микрочестице хидрогела на бази алгината методом електростатичке екструзије. Алгинат је одабран обзиром да је биокомпатибилан, биодеградабилан и нетоксичан природни полисахарид чија је примена дозвољена у исхрани (George и Abraham 2006). Овај полимер се скупља при ниским вредностима рН (желудачна киселина), а раствара у цревима и на тај начин може да обезбеди отпуштање липозома у којима је ресвератрол. Дакле, овакво понашање система би могло да доведе до циљаног отпуштања ресвератрола у танком цреву. Поред тога, алгинатна мрежа у коју су смештени липозоми представља још једну баријеру коју ензими треба да прођу како би разградили липозоме па би на тај начин могао да буде смањен и степен липидне дигестије. Као и сви системи тако и алгинатни гелови имају и своје недостатке, наиме може лако доћи до губитка активне компоненте током припреме (Won и сар.

2005), али и до наглог отпуштања активне компоненте (George и Abraham 2006). Оба недостатка потичу од великих пора које се јављају код алгинатних гелова (Gombotz и Wee 2012). Као потенцијално решење за ову проблематику, у овој дисертацији примењени су сахароза као пуниоц или хитозан као додатан слој полимера. Ови компликовани системи са инкапсулираним ресвератролом испитани су са становишта реологије, величине микрочестица, морфологије, механичких карактеристика и кинетике отпуштања. На тај начин ова дисертација даје бројне корисне информације о комплексним системима липозоми-алгинат са инкапсулираним ресвератролом за потенцијалну примену у функционалним прехранбеним и другим фармацеутским производима.

1. Теоријске основе

1.1. Природни антиоксиданси

Када су истраживачи почетком деведесетих година открили да слободни радикали који настају у људском организму оштећују ћелије и изазивају неке од најчешћих болести, јавила се велика потреба за испитивањем антиоксиданаса. Слободни радикали или оксиданси настају услед излагања сунчевом зрачењу, при лошој исхрани, уносу алкохола, конзумирању дувана, услед стреса, при свакодневном излагању електромагнетном зрачењу, радијацији, али и при нормалном метаболизму ћелије. Они узрокују оштећења на молекулу ДНК, протеинима и мастима. Управо на тај начин долази до појаве обољења као што су катаракта, различити облици канцера, Алцхајмерова болест и кардиоваскуларне болести (Ames и сар. 1993). Антиоксиданси или антиоксидативни агенси су биолошки активне компоненте које умањују негативан ефекат слободних радикала везујући се за њих, а показано је и да могу да помогну у опоравку ћелија које су већ претрпеле оштећење (Vožin и сар. 2007). Поред овога откривено је да антиоксиданси имају још једну позитивну улогу. Ако се једињења са антиоксидативним својствима додају намирницама и фармацеутским препаратима, она успоравају процес липидне пероксидације, па је тако рок употребе намирница односно фармацеутских препарата знатно продужен, а њихова нутритивна вредност повећана.

Све ово је последњих година довело до потребе за проналаском нових природних извора антиоксиданаса. Истраживања су такође усмерена ка откривању нових антиоксидативних једињења биљног порекла. До недавно су најчешће коришћени синтетички антиоксиданси: бутилхидроксианизол (БХА), бутилхидрокситолуен (БХТ), пропилгалат и терц-бутилхидрохинон. Међутим, употреба БХА и БХТ у намирницама је

ограничена законским регулативама због сумње да имају токсичне и канцерогене ефекте. Због тога се јавио огроман интерес и потражња за природним, нетоксичним антиоксидансима за примену у прехранбеној, козметичкој и фармацеутској индустрији (Gülçin 2010).

Постоји велики број супстанци које имају антиоксидативна својства. Најпознатији су витамин Ц, витамин Е и каротеноиди заједно са минералима селеном и магнезијумом. Такође се у антиоксидансе убрајају и глутатион, коензим Q10, флавоноиди, феноли, полифеноли и фитоестрогени. Супероксид дизмутаза (СОД), каталаза и глутатион пероксидаза убрајају се у ензимске антиоксидансе (Huang и сар. 2005).

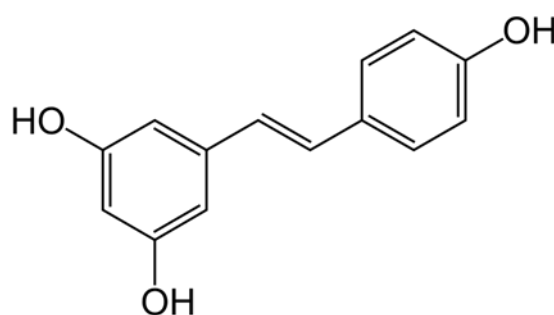
Полифеноли су најзаступљенији природни антиоксиданси у исхрани. Њихов дневни унос може да буде и више од 1 g дневно, што је 10 пута већа количина од дневног уноса витамина Ц и 100 пута већа количина од дневног уноса витамина Е и каротеноида. Главни извори полифенола у исхрани су воће и производи биљног порекла као што су воћни сокови, чај, кафа и црвено вино. Поврће, житарице, чоколада и махунарке су такође добри извор полифенола. Упркос њиховој широкој заступљености у биљкама, ефекат полифенола на здравље привукао је пажњу тек недавно. До средине деведесетих година двадесетог века највише проучавани антиоксиданси били су витамини, каротеноиди и минерали. Истраживања флавоноида и других полифенола, њихових антиоксидативних својстава и њиховог превентивног ефекта на разне болести, почела су да се одвијају тек од 1995. године. Главни разлог који је одложио овај почетак је изузетна разноликост и комплексност структуре полифенола, која је карактеристична по томе што садржи више од једног фенолног језгра (са једном или више хидроксилних група на ароматичном прстену) (Scalbert и сар. 2005).

Полифеноли настају секундарним метаболизмом биљака и учествују у хормонској регулацији раста биљака, штите их од инфекција микроорганизмима (антибиотско деловање), делују као заштитни агенси

од UV зрачења, привлаче опрашиваче и учествују у пигментацији биљака. У намирницама доприносе горчини, оштрини, боји, укусу, мирису и оксидативној стабилности.

1.1.1. Ресвератрол

Ресвератрол, *trans*-3,5,4'-трихидрокси-стилбеноид, је природан полифенол који се налази у више од 72 биљне врсте (Jang и сар. 1997) које га синтетишу као заштиту од фитопатогена (Слика 1.1.) Основне физичко-хемијске карактеристике ресвератрола дате су у табели 1.1.



Слика 1.1. Хемијска структура *trans* -ресвератрола

Табела 1.1. Основне физичко-хемијске карактеристике ресвератрола

Назив	Транс-3,5,4'-трихидрокси-стилбеноид
Хемијска формула	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Моларна маса	228,25 g mol ⁻¹
Изглед	Бели прах
Температура топљења	261 до 263°C
Растворљивост у води	0,03 g/l
Растворљивост у етанолу	50 g/l
CAS	501-36-0

Сматра се да овај природни антиоксиданс има јаче дејство од витамина Ц и Е (Stojanović и сар. 2001) и уноси се у организам најчешће кроз конзумацију кикирикија, дудиња, еукалиштуса, грожђа, црвеног вина али и какаа и чоколаде (Collin и сар. 2006). Интересантно је да црвено вино

Pinot noir произведено у северној Калифорнији садржи највећу концентрацију ресвератрола, док бела вина из исте регије (као што је *Chardonnay*) имају низак садржај ресвератрола (King и сар. 2006). Истраживања показују да одређене популације (Французи и Грци) у мањем проценту оболевају од коронарних болести иако конзумирају храну богату мастима, управо због редовне конзумације црвеног вина које је богато ресвератролом. Ова појава позната је као „Француски парадокс“ (Frankel и сар. 1994; Goldberg и сар. 1995; Корр 1998). Литература најчешће говори да образложење овог парадокса лежи у томе што ресвератрол регулише метаболизам масти и инхибира оксидацију липопротеина ниске густине као и агрегацију тромбоцита (Dalaklioglu и сар. 2012; Toliopoulos и сар. 2013; Lim и сар. 2014).

Као антиоксиданс ресвератрол може да заштити ћелије од оштећења која настају услед оксидативног стреса, па тако има превентивну улогу у настајању атеросклерозе и различитих врста канцера. Ресвератрол има и анти-инфламаторну улогу, неуро-протективну и анти-виралну, али делује и као анагетик и успорава старење (Gusman и сар. 2001; Baur и Sinclair 2006). У Азијској традиционалној медицини користи се за лечење болести јетре, коже и циркулације (King и сар. 2006; Gülçin 2010). Сви ови позитивни ефекти ресвератрола поспешили су интерес за испитивање ове активне компоненте, као и њених деривата, са циљем унапређења биолошке активности и шире примене (Shang и сар. 2009).

Ипак, употреба ресвератрола је и даље прилично ограничена због изражене фотосензитивности. Он је такође подложен оксидацији (Pineiro и сар. 2006), па је полувреме живота *trans*-ресвератрола свега 30 до 45 минута (Lopez-Nicolas и сар. 2006). Показано је да више од 80% *trans*-ресвератрола у раствору прелази у *cis*-ресвератрол ако се раствор изложи светлости током 1 h (Abert Vian и сар. 2005). Аутори, Трела и Ватерхоусе, показали су да је *trans*-ресвератрол осетљив и на UV светлост и ако се изложи светлости таласне дужине 366 nm у трајању од 1 h, чак 90,6%

прелази у *cis* облик. (Trela и Waterhouse 1996). Поред овога ресвератрол је и слабо растворан у води и слабо се апсорбује након оралне администрације, а у великим концентрацијама може да буде и цитотоксичан (Lopez-Nicolas и сар. 2006). Нека истраживања показала су да је управо *trans* облик биолошки активан, па је заиста неопходна стабилизација ресвератрола у циљу очувања његове биолошке активности и терапеутског деловања на организам. То представља велики изазов за истраживаче.

Узимајући у обзир кратко полувреме живота, нестабилност, кратак период метаболизма и елиминације, стабилизација ресвератрола инкапсулацијом се показала као адекватна метода за очување његове биолошке активности и биорасположивости (Shi и сар. 2007). Све је већи број студија које се односе на дизајн нових инкапсулационих система за стабилизацију и очување активности ресвератрола, али и за постизање његовог продуженог и контролисаног отпуштања (Amri и сар. 2012).

1.2. Инкапсулација

Инкапсулација је поступак којим се активне компоненте физичким или хемијским путем смештају унутар структуре одређеног носача (матрикса). На овај начин добија се форма у којој је активна компонента обавијена са једним или више слојева носача. У основи, поступак инкапсулације се састоји у дисперговању активне компоненте у одговарајућем носачу у циљу добијања финих сфера (капљица, честица). Активна компонента инкапсулирана у одабрани носач још се назива и инкапсулат и представља крајњи производ инкапсулације (Thies 2005; Zuidam и Shimoni 2010; Augustin и Nemar 2009).

Постоје два основна типа инкапсулата који се могу добити поступком инкапсулације: „матрикс“ и „резервоар“ (Слика 1.2.). Код инкапсулата типа „матрикс“ активна компонента налази се диспергована у самом материјалу носача тј. по целој запремини, док се код инкапсулата типа „резервоар“ носач налази око активне компоненте. Инкапсулат не мора нужно да има сферичан облик, могуће је постићи и цилиндричне облике или пак добити честице неправилног облика (Zuidam и Shimoni 2010).



Слика 1.2. Шематски приказ основних врста честица добијених инкапсулацијом

Инкапсулација може да обезбеди широк дијапазон величина честица са инкапсулираном активном компонентом од свега неколико нанометара па све до неколико милиметара. У литератури постоје различите поделе честица добијених техникама инкапсулације у зависности од њихове

величине. На пример Тиес (Thies 2005) класификује честице на макрогрануле (макрокапсуле, макрочестице) ако су веће од 1000 μm , затим на микрокапсуле (микрочестице) ако им је средњи пречник између 1 и 1000 μm , а честице мање од 1 μm ови аутори називају наночестицама.

Литература такође истиче и различите предности и мане инкапсулације, али се у основи све своде на следеће (Zuidam и Shimoni 2010):

Предности:

- Стабилизација активне компоненте;
- Заштита активне компоненте од неповољних утицаја околине (негативни утицај кисеоника, рН, светлости);
- Маскирање непријатног укуса који активна компонента може да има;
- Лакше руковање активном компонентом (конверзија из течног у чврсту форму);
- Циљано отпуштање активне компоненте;
- Контролисано отпуштање активне компоненте.

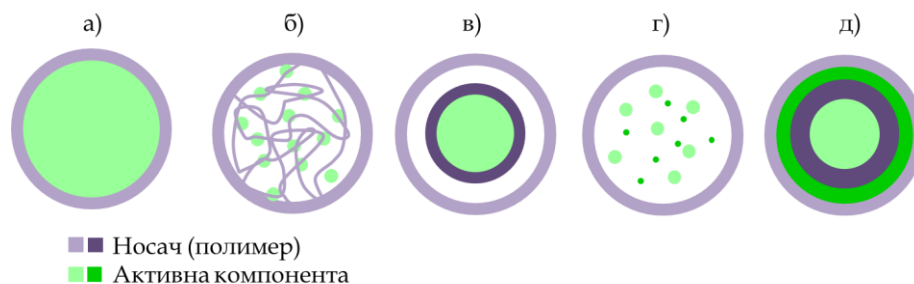
Ипак поред свих предности, примена инкапсулације и њено увођење у нове производе је ограничена релативно високим ценама инкапсулационих технологија и сложеним процесима овакве производње. Такође, строге законске регулативе успоравају процес примене инкапсулата у појединим гранама индустрије.

И поред тога инкапсулација је нашла примену у многим сферама индустрије у којима има различите циљеве. Зујдам и Шимон (Zuidam и Shimoni 2010) су описали да је једна од првих комерцијалних примена инкапсулата била у индустрији штампе. Нешто касније инкапсулација је примењена и за облагање хербицида са основним циљем да се постигне контролисано отпуштање како би се спречио раст корова (Wang и Zhao 2013). У текстилној индустрији инкапсулација се највише примењује за контролисано отпуштање парфема и омекшивача (Nelson 2002). Најшира примена инкапсулата је у гранама фармације и козметике где се користе за инкапсулацију активних компоненти и лекова са терапеутским

ефектом. У овим гранама користи се широк дијапазон носача, али и велики број различитих техника за инкапсулацију (Donbrow 1991). Слично је и у прехранбеној индустрији где се инкапсулација користи како за контролисано отпуштање активних компоненти (нпр. арома) тако и за заштиту активних компоненти (антиоксиданаса, витамина, пробиотика) од спољних фактора којима су ове компоненте изложене током процеса производње али и складиштења (високе температуре при термичкој обради, влажност, контакт са другим компонентама...) (Nedović 1999; Manojlović и сар. 2010; Lalou и сар. 2013).

1.2.1. Системи за инкапсулацију активних компоненти

Како је већ поменуто, инкапсулација различитих активних компонената (уља, арома, витамина, минерала, боја, антиоксиданаса, пробиотика и ензима) врши се у циљу побољшања или повећања нутритивне вредности производа у које се инкапсулат имплементира, или са циљем да се својства ових активних компоненти што боље очувају (Dziezak 1988; Jackson и Lee 1991; Schrooyen и сар. 2001; Madene и сар. 2006). Постоји велики број различитих система за инкапсулацију активних компоненти који се већином добијају употребом сурфактаната, липида, биополимера, или смеше ових компонената. У системе за инкапсулацију убрајају се једноставни или сложени мицеларни системи стабилизирани сурфактантима, системи честица где је језгро обавијено омотачем (капи емулзија и липозоми) или је обавијено полимерним матриксом (хидрогелови и коацервати), затим растворни комплекси биополимера и активне компоненте, или пак још софистициранији системи као што су они са више језгара или више слојева омотача (Augustin и сар. 2013) (Слика 1.3.).



Слика 1.3. Шематски приказ система за инкапсулацију: а) активна компонента обложена једним слојем полимера; б) активна компонента диспергована у полимерном гелу; в) активна компонента обложена са више слојева полимера; г) различите активне компоненте обложене једним слојем полимера; д) различите активне компоненте обложене са више слојева полимера

Јединствена подела система за инкапсулацију и даље не постоји па се тако системи могу класификовати и према основној компоненти од које су сачињени. Тако разликујемо:

Системе на бази липида који су најчешће у форми честица нано-величина и у овим системима кристалиничност липидне фазе представља битан фактор који утиче на степен инкапсулације, отпуштање активне компоненте као и на стабилност целог система. У системе на бази липида се најчешће убрајају емулзије и липозоми.

Емулзије су колоидни системи који се састоје од уља, воде и сурфактанта који има улогу да стабилише систем. Емулзије са веома малим честицама тема су многих студија у последње време због погодних карактеристика за инкапсулацију активних компонената. Липофилне активне компоненте могу да се инкапсулирају у уљану фазу емулзија, а хидрофилне у водену фазу. Ипак, постоји мањак података о емулзијама које се припремају од потпуно безопасних и у исхрани примењивих компоненти јер је само мали број сурфактаната дозвољен у прехранбеној индустрији. Такође, сама припрема емулзија употребом јестивих уља није једноставан процес због високих вредности вискозитета којег ова уља имају (Rao и McClements 2012). Постоје студије које су са друге стране потврдиле да је могуће направити емулзију погодну за прехранбену индустрију. Тако су Бергонзи

и сарадници (Bergonzi и сар. 2014) користили јестива уља и витамин Е за производњу емулзија са инкапсулираним куркумином у циљу повећања његове стабилности, растворљивости и апсорпције након оралне администрације.

Поред емулзија липозоми су атрактивни системи за инкапсулацију ензима (Mozafari и сар. 2008; Smith и сар. 2010; Jahadi и сар. 2012), протеина (Sun-Waterhouse и Wadhwa 2013), витамина (Loveday и Singh 2008; Gonnet и сар. 2010), арома (Yoshida и сар. 2010; Lević и сар. 2013), антиоксиданаса (Isailović и сар. 2013a; Kerdudo и сар. 2014; Peng и сар. 2014; Rashidinejad и сар. 2014) и других активних компоненти. Ови системи могу да буду припремљени од компонената које су дозвољене како у исхрани тако и у козметици па је њихова примена у реалним системима атрактивна. Како су ови системи коришћени у експерименталном делу дисертације више о њима биће изложено у одељку 1.3.

Припрема микрогел система се базира на механичким методама (као што су екструзија или спреј сушење) и овде је најчешће реч о системима који су погодни за инкапсулацију температурно осетљивих активних компоненти. Микрогел системи на бази биополимера показују нагло отпуштање активне компоненте па се овакви системи често модификују како би се овај ефекат избегао. Ипак, ови системи се користе за инкапсулацију биљних полифенола и других природних антиоксидативних врста (Fang и Bhandri 2010), али и различитих ћелија (бактерија или квасаца) (Özer и сар. 2009).

Када је реч о системима за инкапсулацију на бази протеина, инкапсулација се одвија везивањем активне компоненте ковалентним или нековалентним везама. Управо врста везе одређује брзину отпуштања активне компоненте из система на бази протеина. Онил и сарадници (O'Neill и сар. 2014) доказали су да протеини сурутке могу успешно да се користе за инкапсулацију активних компоненти растворних у води. Слично,

комбинација протеина соје и гуме арабик потврђена је као погодан систем за инкапсулацију слатког уља наранџе (Jun-xia и сар. 2011).

Системи за инкапсулацију на бази циклодекстрина једни су од најједноставнијих система (Marques 2010). Наиме, циклодекстрини се формирају ензимским процесом (ензим циклодекстрин глукозотрансфераза) при коме се молекули глукозе (пореклом из скроба) повезују α 1-4 везама чиме се формира циклични олигосахарид односно циклодекстрин. Циклодекстрини се деле према броју молекула глукозе које садрже на: α (6 молекула), β (7 молекула) и γ (8 молекула) циклодекстрине (Szente и Szejtli 2004; Goh и сар. 2009; Zuidam и Shimoni 2010). Ипак, молекули глукозе при формирању циклодекстрина остављају мали простора за смештање активне компоненте. Осим тога, регулативе неких земаља и организација ограничавају употребу циклодекстрина у производима, што је такође једна од препрека њиховој широј употреби (Szente и Szejtli 2004; Zuidam и Shimoni 2010). Међутим, инкапсулација есенцијалних уља у β -циклодекстрине примењена је у гастрономији за побољшање сензорних карактеристика хране (García-Segovia и сар. 2011).

Без обзира на велики број различитих система за инкапсулацију активних компоненти, све је више студија о комбинацији ових система са циљем постизања оптималних формулација у погледу стабилности, степена ефикасности инкапсулације и брзине отпуштања активне компоненте. Нарочито су атрактивне методе облагања већ постојећих система за инкапсулацију додатним слојевима (Oehlke и сар. 2014).

Идеја крајње примене сваког система за инкапсулацију строго дефинише услове под којима процес инкапсулације мора да се изведе. Тако се материјал за инкапсулацију (биополимер, липид, сурфактант) разликује у зависности од крајње примене, захтева и циљева инкапсулације, а при одабиру оптималног система за инкапсулацију треба водити рачуна и о карактеристикама активне компоненте која се инкапсулира, карактеристикама носача, законским регулативама, економичности

процеса итд. Литература обилује подацима о системима за инкапсулацију и методама њихове припреме.

1.2.1.1. Системи за инкапсулацију ресвератрола

Када је реч о системима за инкапсулацију ресвератрола битно је истаћи да сви теже да повећају растворљивост ресвератрола, стабилизују ресвератрол, обезбеде контролисано и циљано отпуштање и повећају биорасположивост ове активне компоненте.

Имајући на уму особину протеина да се понашају као транспортери активних компоненти до сада су испитани комплекси ресвератрола и различитих протеина. Показано је да се ресвератрол успешно везује за говеђи серум албумин (енгл. *Bovine serum albumin*, BSA) (Xiao и сар. 2008; Bourassa и сар. 2010), колаген (Zhang и сар. 2012a), фибриноген (Zhang и сар. 2012b), β -лактоглобулин (Liang и сар. 2008) и различите протеине млека (Немар и сар. 2011). Показано је да у овим комплексима ресвератрол остаје у свом *trans* облику и да је боље заштићен него када је у слободној форми (Augustin и сар. 2013).

Поред протеина ресвератрол може да формира и комплексе са циклодекстринима. Комплекс се формира тако што се ресвератрол везује за хидрофобну унутрашњост циклодекстрина (Lopez-Nicolas и сар. 2006). На овај начин ресвератрол је заштићен од спољних утицаја, а биефикасност ресвератрола је значајно повећана. На пример, комплекс ресвератрола и 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина показао се ефективнијим у превенцији једне врсте карцинома која се јавља код хрчака него што је то био случај при примени слободног ресвератрола (Berta и сар. 2010). Недавно је показано и да комплекс ресвератрола са метилованим β -циклодекстрином повећава растворљивост ресвератрола и уједно чува његов биолошки потенцијал (Duarte и сар. 2015)

Системи на бази пектина имају то својство да место отпуштања ресвератрола може да се подешава одабиром умреживача. Ресвератрол

инкапсулиран у калцијум пектин у *in vitro* условима отпушта се у танком цреву, али ако се ови системи очврсну применом полиетилен-имина отпуштање се одвија у дебелом цреву (Das и Ng 2010). Слично су показали Дас и сарадници (Das и сар. 2011) када су ресвератрол инкапсулирали у цинк пектин микрочестице умрежене глутаралдехидом.

Поликатјонски полимер хитозан, такође је коришћен за припрему система за инкапсулацију ресвератрола. У хитозанске микросфере умрежене са ванилином (методом емулговања) инкапсулиран је ресвератрол и на тај начин припремљен је систем код кога је умреживач компонента из групе GRAS (енгл. *Generally Recognized As Safe*) компоненти (Peng и сар. 2010). У овим системима ресвератрол је остао заштићен од светлости, а постигнуто је и контролисано отпуштање. Поред хитозанских микросфера ресвератрол је инкапсулиран и у катјонске (обложене хитозаном) и анјонске (обложене алгинатом) наночестице на бази полилактида, чиме је постигнута боља контрола отпуштања ресвератрола. Недавно су Истенич и сарадници (Istenič и сар. 2015) успешно инкапсулирали ресвератрол у субмикронске алгинатне честице методом емулговања праћеном спољашњим гелирањем. Ови системи су такође били сачињени од компонената из групе GRAS па се стога могу сматрати погодним за примену у прехранбеним производима.

Наноемулзије се такође користе као системи за инкапсулацију ресвератрола. Наиме, Давидов-Пардо и Мек Клементс (Davidov-Pardo и McClements 2015) су недавно успешно припремили наноемулзију методом спонтаног емулговања где је уљана фаза била смеша уља наранџе и уља од коштице грожђа (нус производ индустрије вина), а сурфактант је био Tween 80. У овој студији аутори су показали успешност инкапсулације ресвератрола у систем припремљен хомогенизацијом са малим уносом енергије који, као такав, може наћи примену у прехранбеним производима.

Један интересантан систем за инкапсулацију ресвератрола је и систем на бази ћелија квасца. Наиме, Ши и сарадници (Shi и сар. 2008) су успешно инкапсулирали ресвератрол у ћелије квасца постижући добру стабилност овог система и повећану растворљивост, а самим тим и биорасположивост ресвератрола, као и контролисано отпуштање.

Чврсте липидне наночестице које имају чврсто липидно језгро и амфифилну љуску (облогу) коју чини сурфактант су такође ефикасне за инкапсулацију ресвератрола. Инкапсулацијом у ове системе ресвератрол остаје стабилан и не подлеже утицају светлости, а показана је још већа стабилност ресвератрола када честице садрже и тетрадецил- γ -циклодекстрин (Carlotti и сар. 2012). Обзиром да ове наночестице могу бити мање од 180 nm могућ је њихов пролазак кроз ћелијску мембрану, па су Тешкач и Кристл (Teskas и Kristl 2010) објавили да овакве честице омогућавају већу искоришћеност ресвератрола и повећану метаболичку активност ћелија које су са њима у додиру.

Поред наведених система липозомне формулације представљају најефикасније системе за инкапсулацију ресвератрола. Различитост липида који могу да се користе за припрему липозома као и разноврсност метода за припрему омогућавају варирање карактеристика ових система. Тако су се липозоми са инкапсулираним ресвератролом припремљени употребом смеше DPPC, поли(етилен-гликол)-2000-дистеароилфосфатидилхолина и холестерола показали као погодни за очување *trans* форме ресвератрола, а били су и стабилни током три месеца складиштења на 4°C (Coimbra и сар. 2011). Икапсулација у липозоме доводи такође до повећане биорасположивости (Mukherjee и сар. 2011), а показано је и да овакве формулације штите ћелије од спољашњих фактора у већој мери него слободан ресвератрол (Kristl и сар. 2009). Ипак највећи број научних радова на тему ресвератрола у липозомима говори о липозомима припремљеним употребом чистих липида који су скупи, па су управо из тог разлога у експерименталном делу ове дисертације

описани липозоми као системи за инкапсулацију ресвератрола који се базирају на комерцијалним липидним смешама. Поређења ради, цена 1g DPPC на тржишту износи око 700 долара (Sigma Aldrich), док је цена 1g фософолипона око 0,5 долара (Fisher Scientific).

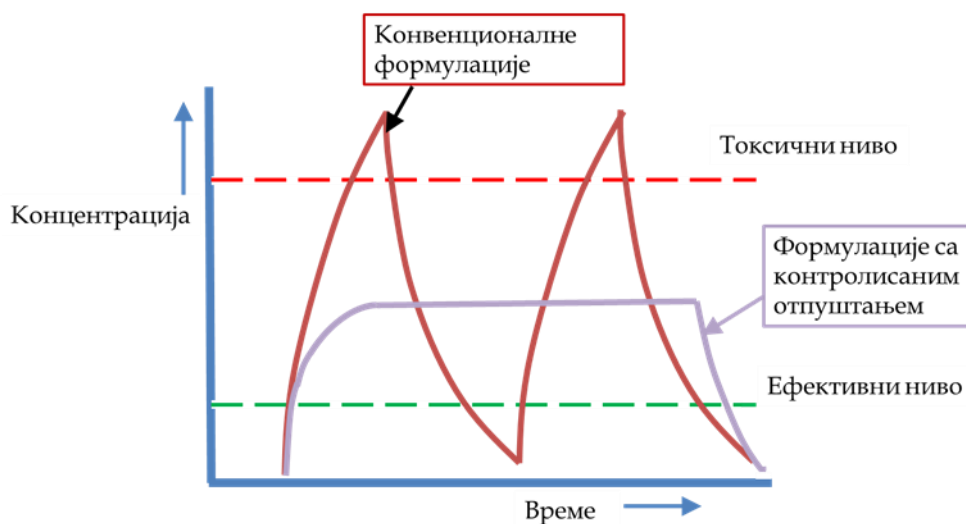
Последњих година тежи се развоју система који садрже комбинацију активних компоненти. Тако су на пример липозоми на бази DPPC-а коришћени за инкапсулацију куркумина и ресвератрола у циљу инхибиције раста канцера простате код пацова (Narayanan и сар. 2009). Слично томе, Аугустин и сарадници (Augustin и сар. 2011) показали су да микроинкапсулација три активне компоненте (рибље уље, ресвератрол и бутрин) у емулзију (стабилизовану топлом смешом протеина млека, глукозе и модификованог скроба) има предност над употребом сваке појединачне компоненте.

Поред свих ових могућности и даље постоји потреба да се успостави оптимална доза ресвератрола за постизање жељеног биолошког ефекте на људе, да се утврде оптималне локације за испоруку ресвератрола и да се контролише кинетика ослобађања ресвератрола. Када је у питању орална примена ресвератрола у будућности треба испитати и ефекте хране на отпуштање ресвератрола.

1.2.2. Контролисано отпуштање као циљ инкапсулације

Под појмом контролисано отпуштање може да се сматра отпуштање малих молекула (лекова, протеина, витамина, антиоксиданаса) у околну средину, задатом односно контролисаном брзином. Стога, контролисано отпуштање представља атрактиван метод за примену и доставу активних компонента и има велику предност над конвенционалним методама доставе које се већ деценијама примењују (таблете, капсуле, пилуле, супозиторије, креме, масти, раствори, аеросоли, инјекције). У системима који обезбеђују контролисано отпуштање активна компонента има могућност да се отпусти током дужег временског периода, а на време и место отпуштања утичу услови у околној средини. Многе активне

компоненте имају узак терапеутски индекс (разлика између ефективне терапеутске концентрације и токсичног нивоа), па је применом конвенционалних начина припреме потребно да се ове компоненте конзумирају у одређеним интервалима у тачно прецизираним дозама које се строго морају испоштовати. Тако је на слици 1.4. приказана разлика између конвенционалних система и система са контролисаним отпуштањем, где се види да контролисано отпуштање има за циљ да обезбеди ефективни ниво активне компоненте током дужег временског периода док код конвенционалног система доставе концентрација варира током времена између ефективне и токсичне. Контролисано отпуштање поред основне идеје да обезбеди максималну терапеутску корист и минималну токсичност такође поспешује и искоришћење активне компоненте.



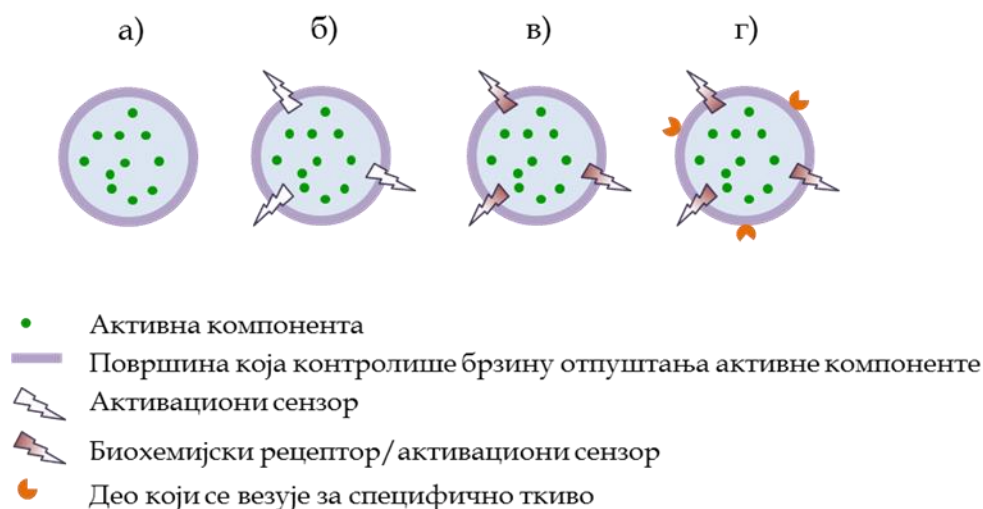
Слика 1.4. Шематски приказ профила отпуштања активних компоненти из конвенционалних формулација и формулација са контролисаним отпуштањем

Иако системи за контролисано отпуштање у одређеним формама (најчешће фармацеутским) већ постоје на тржишту, они су и даље предмет опсежних истраживања. Велико интересовање за ову област довело је до мање конфузије у терминологији и до не баш потпуно јасне разлике између термина контролисано отпуштање и продужено отпуштање. У

литератури се често ова два термина користе као синоними што није у потпуности тачно (Jantzen и Robinson 2002). Под термином „продужено дејство“ заправо се подразумевају форме које одлажу и успоравају ослобађање активне компоненте. Постепеним ослобађањем жељена концентрација се одржава дуже него у случају класичних форми односно постиже се ефекат продуженог дејства. Појам „контролисано отпуштање“ подразумева могућност предвиђања и репродуктивност кинетике ослобађања активне компоненте. Код ових система кинетика отпуштања је нултог реда, тј. концентрација активне компоненте у околном медијуму не зависи од почетне количине.

Системи за контролисано отпуштање активних компоненти могу се поделити у основне групе на:

- Системе са програмираном брзином отпуштања активне супстанце (Слика 1.5.а)
- Активационо-модулисане системе за контролисано отпуштање (Слика 1.5.б)
- Системе контролисаног отпуштања регулисане механизмом повратне спреге (Слика 1.5. в)
- Системе контролисаног отпуштања у тачно одређеним ткивима (циљаном месту) (Слика 1.5.г)



Слика 1.5. Шематски прикази различитих система за контролисано отпуштање активних компоненти

Код система са програмираном брзином отпуштања активна компонента се, избором одговарајућег система који контролише дифузију молекула у/кроз околни медијум, отпушта програмирано према одређеној брзини (Слика 1.5.а) (Langer 1983). Ови системи се обично описују Фиковим законима дифузије (енгл. *Fick's laws of diffusion*), а пренос масе је једини параметар који одређује брзину ослобађања активне компоненте (Рјановић 2010).

У ове системе убрајају се активне компоненте инкапсулиране унутар полимерних мембрана, као и инкапсулација у микро и нано честице које могу бити типа резервоара (Gregoriadis и сар. 1993; Manconi и сар. 2002) или порозног матрикса (Mehnert и Mader 2001; Muller и сар. 2002) како је то описано у одељку 1.2.1.

Код *активационо модулисаних система* активна компонента (Слика 1.5. б) се ослобађа неким физичким (притисак, механичке силе, магнетно поље, сонофореза, јонофореза, хидратација), хемијским (хидролиза, јонска активација, рН активација) или биохемијским процесом (ензимска активација, биохемијска реакција), а у неким случајевима је потребна и додатна енергија. Брзина отпуштања регулише се количином унете енергије или примењеним процесом.

Системи регулисани механизмом повратне информације функционишу тако што се ослобађање активне компоненте активира специфичним биомолекулима који представљају иницијатор (оксидач) за одређени процес, при чему је брзина отпуштања контролисана механизмом повратне информације (Слика 1.5. в). Количина активне компоненте која треба да буде отпуштена регулише се уз помоћ сензора који постоје у овим системима и који дају информације за подешавање отпуштања (Рјановић 2010).

Системи за контролисано отпуштање у жељеним ткивима (Слика 1.5. г) још увек нису у потпуности достигнута и њима тежи савремена наука.

Ослобађање активне компоненте у тачно одређеном ткиву је веома комплексан процес који се састоји од дифузије кроз различите системе и расподеле активне компоненте између њих. Код већине познатих система само први корак – дифузија може да се контролише, док путања транспорта активне компоненте од система за дозирање до жељеног ткива углавном остаје непозната и неконтролисана (Рђановић 2010).

Предности система за контролисано отпуштање огледају се у следећим карактеристикама:

- Постиге се униформна концентрација (спречава се токсични ефекат);
- Контролише се брзина и место ослобађања активне супстанце;
- Потребно је мање активне компоненте него код класичних форми.

Недостаци ових система се могу сврстати у три веће групе:

- Терапеутски опсег концентрације активне компоненте мора бити широк да би се на тај начин избегле индивидуалне реакције
- Не могу се увек предвидети сви параметри система
- Постоји опасност од предозирања (уколико дође до колапса носача, ослободиће се огромна количина активне супстанце).

Како је већ поменуто системи са програмираном брзином отпуштања активне компоненте су системи код којих је активна компонента инкапсулирана унутар полимерне мембране или је инкапсулација извршена у микро и нано честице које могу бити типа резервоара. Управо овај тип система за контролисано отпуштање коришћен је у експерименталном делу ове дисертације.

1.2.3. Пренос масе у инкапсулационим системима

Да би се боље описали и дефинисали системи за инкапсулацију активних компоненти односно системи са програмираном брзином отпуштања активне супстанце, један од најзначајнијих корака је познавање преноса масе активне компоненте. Активна компонента се у овим системима преноси кроз мембрану (матрикс), али и кроз мембрану уређаја који се користи за одређивање брзине преноса масе (отпуштања). Пренос масе

при контролисаном отпуштању остварује се молекулским механизмом тј. молекулском дифузијом. Познавање и контролисање брзине дифузије је круцијално за контролисано отпуштање, јер се тако омогућава дозирање егзактне количине активне компоненте, као и програмирање дужине ослобађања. Такође, увид у вредности коефицијента дифузије и отпора дифузији даје могућност пројектовања система за контролисано отпуштање који обезбеђују потребни, константан флукс активне компоненте (Рјановић 2010).

1.2.3.1. Дифузија

Један од најосновнијих процеса који контролишу отпуштање је дифузија. У литератури се под појмом дифузије често подразумева пренос компоненте или компонената и у непокретним системима и у флуидима који струје. Међутим, у ужем смислу дифузија је термин који би био прикладнији за пренос који се обавља на молекулском нивоу тј. молекулским механизмом, па ће стога у наставку термин дифузија заправо подразумевати молекулску дифузију. Молекулска дифузија дефинише се као пренос масе, из области веће концентрације у област мање концентрације, који се одвија кретањем молекула (Рјановић 2010).

Фиков први закон дифузије описује молекулску дифузију и по њему је флукс компоненте A у условима стационарног преноса:

$$J_A = -D \frac{\partial c_A}{\partial z} \quad (1.1.)$$

где је c_A концентрација компоненте A која дифундује, а z је растојање у правцу дифузије. Параметар D је коефицијент дифузије и карактеристика је компоненте и система у коме се дифузија одвија. Знак минус има физички смисао који показује да се дифузија одвија у смеру опадања концентрације, тј. да је смер оствареног флукса насупрот градијенту концентрације. Фиков први закон дифузије полази од претпоставке да је коефицијент дифузије константан у систему, што је тачно само када су у питању разблажени системи. Код система где је присутна велика

концентрација (посебно код течности), параметар D може значајно да зависи од концентрације, па је примена овог закона ограничена. Најчешће коришћени облици првог Фиковог закона дифузије дати су у табели 1.2. за једнодимензионални пренос у разблаженим растворима. Комбиновањем ових једначина са масеним билансом могуће је прецизније предвидети и описати процес дифузије у различитим системима (Pjanović 2010).

Табела 1.2. Облици првог Фиковог закона дифузије

Једначина	Опис
$J_A = -D \frac{\partial C_A}{\partial z}$	Једнодимензионална дифузија у правоугаоним координатама
$J_A = -D \frac{\partial C_A}{\partial r}$	Дифузија у радијалном правцу у цилиндричним координатама
$J_A = -D \frac{\partial C_A}{\partial r}$	Дифузија у радијалном правцу у сферним координатама

Диференцијални биланс у свим системима где доминира пренос масе може се описати следећом једначином:

$$\frac{DC_A}{Dt} = D\nabla^2 C_A + r_A \quad (1.2)$$

где је r_A брзина генерисања компоненте A . Диференцијални биланс примењен на нестационарни једнодимензиони пренос у непокретном систему, без генерисања компоненте своди се на облик:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2} \quad (1.3)$$

Ова једначина је позната као други Фиков закон дифузије. Дакле, према другом Фиковом закону дифузије промена концентрације са временом у посматраном систему пропорционална је градијенту концентрације, при чему је константа пропорционалности управо коефицијент дифузије D .

Стационарна дифузија

Када је у питању стационарна дифузија концентрација компоненте чији пренос се прати сматра се константном, односно погонска сила се током времена не мења. Стационарна дифузија одвија се у следећим системима:

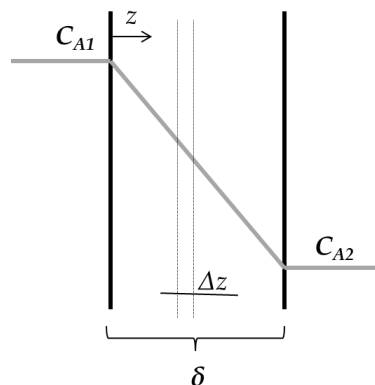
Једнодимензионална дифузија кроз филм

Код система где се дифузија одвија кроз филм (Слика 1.6.), компонента А дифундује из области више концентрације у област ниже концентрације и на путу пролази филм дебљине δ . Овде се подразумева да је флуид који се налази са обе стране мембране идеално измешан и да је концентрација у њима униформна. Концентрације компоненте А са обе стране, као и унутар филма су константне, па се други Фиков закон у овом случају своди на:

$$D \frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2} = 0 \quad (1.4.)$$

Односно:

$$\frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2} = 0 \quad (1.5.)$$



Слика 1.6. Шематски приказ једнодимензионалне дифузије кроз филм

Ако се уведу гранични услови:

$$z = 0 \quad C_A = C_{A1}$$

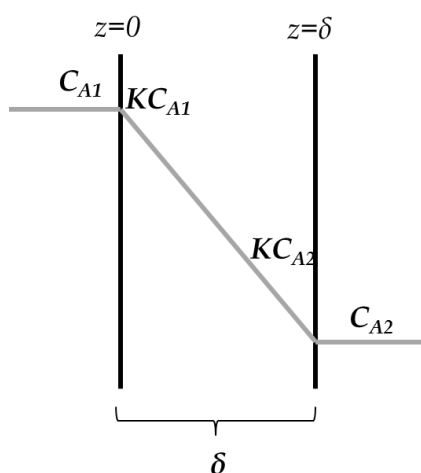
$$z = \delta \quad C_A = C_{A2}$$

Долази се до израза за профил концентрације компоненте A унутар филма:

$$C_A = C_{A1} + (C_{A2} - C_{A1}) \frac{z}{\delta} \quad (1.6.)$$

Једнодимензионална дифузија кроз мембрану

Разлика у односу на систем који се описује једнодимензионалном дифузијом кроз филм, огледа се у томе што мембрана има различите физичко-хемијске карактеристике у односу на саме растворе (Слика 1.7.).



Слика 1.7. Шематски приказ једнодимензионалне дифузије кроз мембрану

Стога, други Фиков закон има исти облик као у системима са једнодимензионалном дифузијом кроз филм али су гранични услови другачији:

$$z = 0 \quad C_{Am1} = KC_{A1}$$

$$z = \delta \quad C_{Am2} = KC_{A2}$$

где су C_{Am1} и C_{Am2} концентрације компоненте A у мембрани, а K је коефицијент расподеле који представља равнотежни однос концентрација компоненте A у мембрани и у раствору уз саму мембрану. На основу тога изводи се израз за профил концентрације компоненте A :

$$C_A = KC_{A1} + K(C_{A2} - C_{A1}) \frac{z}{\delta} \quad (1.7.)$$

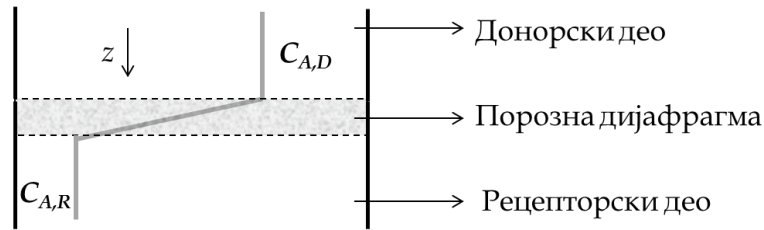
Флуks компоненте A кроз мембрану је:

$$J_A = \frac{DK}{\delta} (C_{A1} - C_{A2}) \quad (1.8.)$$

Пропустљивост мембране је заправо вредност члана DK из једначине 1.8. док се овај члан подељен са вредношћу δ назива коефицијент пермеабилности (или проводљивост мембране). У системима где се дифузија одвија кроз мембрану експериментално је лакше одредити коефицијент пермеабилности него коефицијент расподеле, коефицијент дифузије и дебљину мембране. Ипак, када се одреди коефицијент пермеабилности тешко је одредити утицај појединачних променљивих на његову вредности. Због тога се у литератури за неке системе чешће налазе коефицијенти пермеабилности него основне величине (коефицијент дифузије или коефицијент расподеле) (Yu и Amidon 2000).

Дифузија кроз ћелију са дијафрагмом

Ћелије са дијафрагмом састоје се из два дела у којима се налазе раствори који се мешају, а који су раздвојени танком порозном дијафрагмом или мембраном (Слика 1.8.). Ова два сегмента ћелије се често називају доносрски и рецепторски. Ћелије са дијафрагмом су погодне за одређивање коефицијента дифузије јер се у један део ћелије уноси раствор (донорски сегмент) који садржи познату концентрацију активне компоненте, док се у другом делу налази чист растварач (рецепторски сегмент). У временским интервалима врши се узорковање из оба сегмента ћелије и на основу концентрације компоненте одређују параметри дифузије.



Слика 1.8. Шематски приказ једнодимензионалне дифузије кроз ћелију са дијафрагмом

Обзиром да дијафрагма има неупоредиво мању запремину него раствор може се сматрати да је профил концентрација унутар дијафрагме линеаран односно да је дифузија у овом систему стационарна. Уз одређене претпоставке могуће је решавање једначине другог Фиковог закона за овај систем. Ако се претпостави да флуks кроз дијафрагму веома брзо достиже вредност флуksа при стационарним условима и да се овде дифузија може посматрати као стационарна (иако се концентрације у оба сегмента ћелије мењају са временом) добија се знатно једноставније решење. Наиме, у овом псеудо-стационарном систему флуks је исти као флуks кроз мембрану:

$$J_A = \frac{DK}{\delta}(C_{A,D} - C_{A,R}) \quad (1.9.)$$

Масени биланси дају следеће изразе:

$$V_D \frac{dC_{A,D}}{dt} = -P \cdot J_A \quad (1.10.)$$

$$V_R \frac{dC_{A,R}}{dt} = P \cdot J_A \quad (1.11.)$$

где је P површина дијафрагме, а V_D и V_R су запремине доноског и рецепторског сегмента ћелије. Комбинацијом једначина (1.9.), (1.10.) и (1.11) добија се израз:

$$\frac{d}{dt}(C_{A,D} - C_{A,R}) = D\beta(C_{A,D} - C_{A,R}) \quad (1.12)$$

Овде је β геометријска константа и карактеристика је одређене ћелије која се користи:

$$\beta = \frac{PK}{\delta} \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_R} \right) \quad (1.13.)$$

Поставља се и почетни услов за овај систем:

$$t=0 \quad C_{A,D} - C_{A,R} = C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0$$

Уколико је горњи део ћелије испуњен чистим растварачем, онда је почетна концентрација у том делу једнака нули ($C_{A,D}^0 = 0$).

Када се изведе интеграција једначине (1.13.) уз наведени почетни услов добија се једначина за одређивање коефицијента дифузије:

$$\frac{C_{A,D} - C_{A,R}}{C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0} = e^{-\beta D t} \quad (1.14.)$$

која може да се преведе у облик:

$$D = \frac{1}{\beta t} \ln \left(\frac{C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0}{C_{A,D} - C_{A,R}} \right) \quad (1.15.)$$

Дакле, на основу концентрације компоненте A у доворском и рецепторском делу ћелије током времена могуће је одредити коефицијент дифузије. Овако одређен коефицијент дифузије представља ефективни коефицијент дифузије (D_{eff}) који је везан за тачно одређену ћелију са дијафрагмом. Две апроксимације које су примењене како би се формирала једначина (1.15.) могу довести у питање тачност израчунате вредности ефективног коефицијента дифузије. Литературни подаци ипак говоре да се вредности коефицијената дифузије добијених на овај начин не разликују много од оних одређених другим методама (Liebenberg и сар. 2004, Рјановић 2010).

У експерименталном делу овог рада коришћена је **Францова дифузиона ћелија** (енгл. *Franz diffusion cell*) као ћелија са дијафрагмом. Код Францове ћелије доворски и рецепторски део раздвојени су порозном

(полупропусном) мембраном. Избор мембране зависи од карактеристика система који се испитује. Ова ћелија се најчешће употребљава за праћење дифузије из порозних чврстих или получврстих материјала или суспензија. Бочно постављена цевка омогућава континуално узорковање из рецепторског дела што је довољно за праћење промене концентрације активне компоненте. Францова дифузиона ћелија налази највећу примену у фармацеутским испитивањима отпуштања лекова (Bonferoni и сар. 1999, Ng и сар. 2010), али се користи и за праћење дифузије других активних компонента (Isailović и сар. 2013a, Isailović и сар. 2013b, Pravilović и сар. 2015)

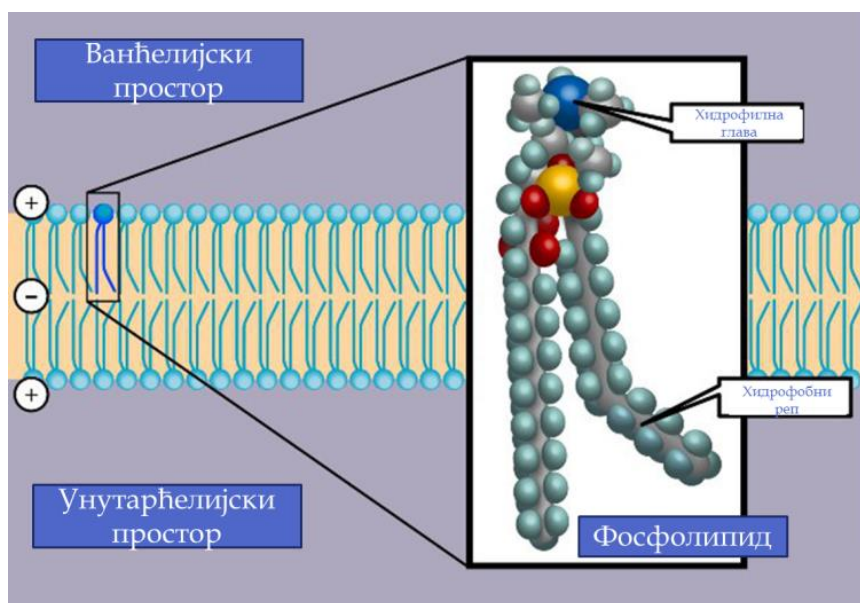
1.3. Липозоми

1.3.1. Фосфолипиди

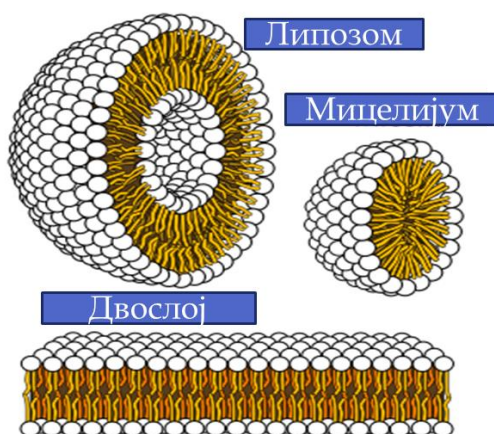
Липиди представљају комплексну групу супстанци које учествују у великом броју биохемијских процеса, имају улогу у складиштењу енергије и саставни су делови ћелијских мембрана. Као такви липиди утичу на пропустљивост ћелијске мембране, представљају енергетске резерве, штите ћелију од механичких повреда или формирају термоизолациони слој. По својој грађи липиди могу да буду прости или сложени. Прости липиди су супстанце чији се молекули састоје од остатка масних киселина и алкохола (најчешће глицерола). У просте липиде се убрајају масти и уља (триглицериди), и воскови. Сложени липиди укључују деривате фосфорне киселине (фосфолипиди) и липиде који садрже остатке угљених хидрата (гликолипиди). Први фосфолипид који је пронађен 1847. године у биолошким ткивима био је лецитин (фосфатидилхолин). Он је пронађен у жуманцету кокошијег јајета од стране Теодора Николаса Гобија, француског хемичара и фармацеута (Wikipedia).

Фосфолипиди су једињења по правилу нерастворна у води, а растворна у органским растварачима и састоје се од поларне групе или главе молекула и неполарног репа масних киселина или репа молекула (Слика 1.9.). Управо због постојања и поларног и неполарног дела, молекул фосфолипида је амфифилан и има способност да се заједно са другим молекулима фосфолипида групише на различите начине у зависности од средине у којој се налази. Када се ван ћелија нађу у воденој средини, фосфолипиди се спонтано групишу (услед хидрофобног ефекта), најчешће градећи двослој. Фосфолипидни двослој има облик плоче и дебљину колико и два молекула фосфолипида. Молекули су уређени тако да су хидрофилне фосфатне главе усмерене ка води на обе стране двослоја, а хидрофобни репови су у унутрашњости двослоја. Фосфолипиди у раствору могу да формирају и мицеле, а ако се уложи и додатна механичка енергија у виду мешања или притиска, долази до

затварања липидног двослоја у сферичну честицу која се назива *липозом* (Слика 1.10.) (Fathi и сар. 2012).



Слика 1.9. Фосфолипиди као градивне јединице ћелијске мембране



Слика 1.10. Три основне фосфолипидне структуре које се формирају у раствору

Поред специфичног облика који фосфолипиди имају битна карактеристика је и њихова температура фазне трансформације (T_m). То је температура при којој долази до преласка фосфолипида из кристалне структуре у течну односно гел структуру. Ово је битно зато што је

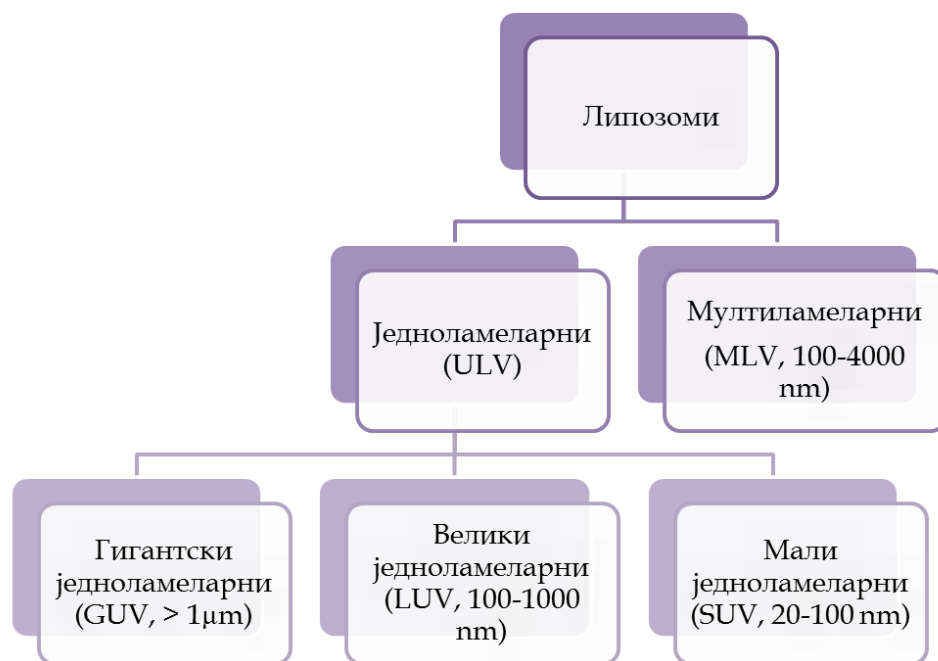
формирање липозома могуће само на температурама вишим од температуре фазне трансформације (Taylor и Morris 1995). Вредности температуре фазне трансформације варирају у зависности од броја угљеникових атома у молекулима виших масних киселина као и од броја двоструких веза у ланцу и јонске јачине (Socasiu и сар. 2000; Mozafari и сар. 2008). Управо температура фазне трансформације игра велику улогу и када је отпуштање активне компоненте у питању, па тако на пример одабир фосфолипида за припрему липозома омогућава аромама да остану инкапсулиране током складиштења, али да се отпусте у устима конзумента где је отпуштање подстакнуто телесном температуром (Singh и сар. 2012).

1.3.2. Основне карактеристике липозома и класификација липозома

Липозоми су колоидне фосфолипидне везикуле које могу спонтано да се формирају, како у природи тако и у лабораторијским условима. Први их је открио британски хематолог др Алек Бангхам 1965. године када је са сарадницима посматрао реакцију размаза лецитина из јајета и воде под електронским микроскопом (Bangham и сар. 1965). Са додатком воде и увођењем енергије замршена структура са мноштвом везикула се спонтано формирала и образовала колоидне везикуле (честице) - липозоме. Фосфолипидни двослој чини мембрану липозома (Lasic 1993), дакле, липозоми се састоје од језгра и двослојне липидне мембране код које су поларне главе окренуте ка спољашњој средини, а неполарни репови ка унутрашњости.

Овакве честице, односно везикуле, могу да буду једноламеларне или вишеламеларне у зависности од броја липидних двослоја који окружују језгро липозома (Слика 1.11.). Једноламеларне везикуле имају само један липидни двослој у омотачу. Липидне везикуле се према величини деле на мале једноламеларне везикуле (енгл. *Small Unilamellar Vesicles*, SUV), величине од 20 до 100 nm, велике једноламеларне везикуле (енгл. *Large*

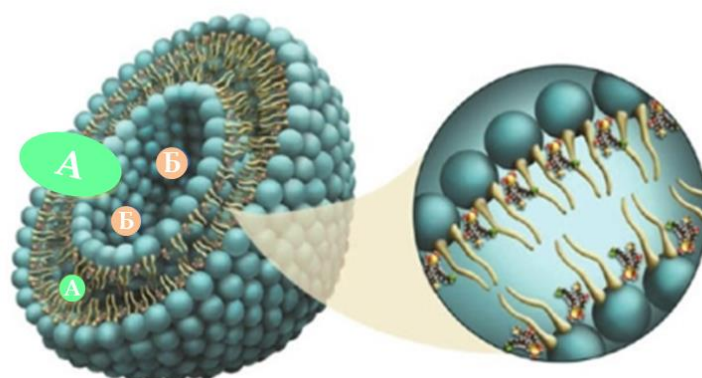
Unilamellar Vesicles, LUV), величине од 100 до 1000 nm и гигантске једноламеларне везикуле (енгл. *Giant Unilamellar Vesicles*, GUV) чији је пречник већи од једног микрона. Вишеламеларне везикуле (енгл. *Multilamellar Vesicles*, MLV) имају више липидних двослоја и њихова величина варира од 100 nm до 4 μm (Mishra и сар. 2011; Sherry и сар. 2013).



Слика 1.11. Класификација липозома према броју липидних двослоја

Липозоми су први пут синтетисани 1965. године. У почетку су се користили за проучавање биолошких мембрана, док се као системи за инкапсулацију активних компоненти проучавају од 1970-их. Оно по чему се липозоми издвајају од других система за инкапсулацију је њихова способност да инкапсулирају како хидрофобне тако и хидрофилне супстанце. Хидрофобне (неполарне) супстанце се инкапсулирају унутар мембране честице (Gaede и Gawrisch 2003), а хидрофилне (поларне) унутар језгра липозома (Слика 1.12.). Активна компонента инкапсулирана у липозоме остаје заштићена од спољашњих нежељених утицаја и биодеградације. Поред овога још једна битна предност липозома је њихова нешкодљивост за имуни систем управо због сличног састава са фосфолипидима ћелијских мембрана. Ова особина пружа могућност

примене липозома као система за дистрибуцију активне компоненте јер се липозоми спајају са ћелијским мембранама и на тај начин уводе активну компоненту у ћелију. Спајање може да се врши изменом липида (липозомални липиди се замењују са липидима ћелијских мембрана), адсорпцијом липида на ћелије, где кључну улогу играју привлачне електростатичке и Ван дер Валс-ове силе, ендоцитозом, преко лизозомалних вакуола и спајањем, где се липиди липозома спајају са плазмином мембраном па се садржај липозома доставља директно у ћелију. Липозоми су погодни системи за инкапсулацију када се узме у обзир и могућност измене њихових физичко-хемијских, као и структурних карактеристика. Модификацијом мембране липозома се чак може постићи везивање липозома за тачно одређене ћелије у људском организму (такозвани „интелигентни липозоми“) (Pjanović 2010). Могућност индустријске производње од великог је значаја за примену липозома у козметичкој и прехранбеној индустрији (Fathi и сар. 2012), а поред тога и чињеница да липозоми могу да се припреме од природних компоненти (биокомпатибилних, биодеградабилних и нетоксичних) чини ове системе атрактивним са становишта брже и једноставније имплементације у производе који подлежу законским регулативама (Malheiros и сар. 2010).



Слика 1.12. Липозом са инкапсулираном хидрофобном (А) и хидрофилном (Б) активном компонентом и увеличан фосфолипидни двослој

1.3.3. Припрема липозома

За припрему липозома користе се различити фосфолипиди или смеше липида, али у основи свака метода садржи три корака припреме:

1. *Растварање липида у органском растварачу и припрема за хидратацију*

У првом кораку, када се липиди растворе у органском растварачу добија се хомогена липидна смеша. Најчешће се у ту сврху користе хлороформ, смеша хлороформа и метанола или етанол. Однос липида и растварача је најчешће такав да на 1 ml растварача долази од 10 до 20 mg липида (Рђановић 2010). Уколико се врши инкапсулација липофилне односно хидрофобне активне компоненте она се додаје раствору липида у овом кораку. Након растварања липида врши се отпаравање растварача како би се добио липидни филм. Растварач се обично отпарава под вакуумом и на температури фазне трансформације липида. У ту сврху се често користи ротациони вакуум упаривач помоћу кога се на зидовима балона формира танак филм липида. Филм се даље суши како би се растварач потпуно уклонио.

2. *Хидратација и мешање*

Други корак припреме подразумева хидратацију формираног филма. Воденим раствором се постепено кваси липидни филм и врши се интензивно мешање односно уводи се енергија у систем. Уколико се врши инкапсулација хидрофилне активне компоненте она се раствори у воденом раствору којим се врши хидратација, односно додаје у овом кораку. Водена фаза иницира затварање фосфолипида у везикуле, па интензивније мешање обезбеђује ситније честице и униформније димензије честица. Дуже и умерено мешање и тањи липидни филм доприносе ефикаснијој инкапсулацији. Температура медијума којим се врши хидратација мора да буде изнад температуре фазне трансформације липида (Lasch и сар. 2003) и током целог процеса мешања потребно је

одржавати ову температуру. У овом кораку формирају се мултиламеларни липозоми (MLV).

3. Смањење величине липозома и постизање хомогености

Трећи корак подразумева смањење величине липозома и постизање веће униформности суспензије. Наиме, постоје различите технике за смањење величине као што су соникација, екструзија, хомогенизација под високим притиском итд (Lapinski и сар. 2007). Ове технике омогућавају формирање једноламеларних липозома мањег или већег пречника (LUV, SUV), али и униформније расподеле величина липозома (Gregoriadis 2006; Budai и сар. 2004). Неке од њих примењене су у овој дисертацији како је описано у експерименталном делу.

У литератури се за припрему липозома најчешће користе метода танког филма која у потпуности следи претходно описану процедуру (Moghimiour и Handali 2012). Ова метода је ефикасна, али није погодна за припрему липозома у већим количинама односно за индустријску примену (Isailović и сар. 2013а). Поред методе танког филма за припрему липозома користе се и разне друге методе (Taylor и сар. 2005), на пример реверзно фазно упаравање (енгл. *Reversed phase evaporation*) (Lasch и сар. 2003) затим метода инјектовања растварача (Jaafar-Maalej и сар. 2011; Akbarzadeh и сар. 2013; Tan и сар. 2013) и различите методе које се заснивају на загревању узорака (Mozafari 2005; Colas и сар. 2007). Основне мане ових стандардних метода су велика димензија добијених везикула као и широка расподела величина, па је обавезна примена и трећег корака припреме липозома. Међутим, у скоријој литератури могу се срести нове и инвентивне методе припреме липозома и неке од њих превазилазе недостатке традиционалних метода.

Тако, на пример, метода мембранског контрактора представља унапређену верзију методе инјектовања растварача где одабир мембране дефинише величину липозома (Jaafar-Maalej и сар. 2011; Laouini и сар.

2011; Laouini и сар. 2013). Владисављевић и сарадници (Vladisavljević и сар. 2014) објавили су да је употреба осцилаторне мембране најпогоднија за увећање размера производње липозома овом методом.

Мале и стабилне липозоме могуће је добити и када се врши сушење замрзавањем дуплих емулзија (Huang и сар. 2014). На овај начин формирају се липозоми у сувом стању (прашкастом). Ипак, недостатак ове методе је употреба органског растварача који може да застане у траговима, али и употреба криопротектаната (угљених хидрата) па је примена у храни ограничена.

Последњих година све већу примену налази и пролипозомна метода. Ову методу су први открили Перет и сарадници 1991 (Perrett и сар. 1991) као једноставну методу за припрему липозома, а касније су је применили и Јан-ју и сарадници за припрему липозома са инкапсулираним силимарином (Yan-yu и сар. 2006), као и Морес и сарадници (Moraes и сар. 2013) за инкапсулацију β -каротена. Постоје литературни подаци и о томе да ова метода може да буде погодна за производњу липозома у великим количинама (Chen и Alli 1987; Turanek и сар. 1997; Wagner и Vorauer-Uhl 2011).

Одабир липида од којих се припремају липозоми утиче на различите крајње карактеристике липозома. Карактеризација припремљених липозома најчешће се своди на одређивање састава мембране уколико није познат, одређивање расподеле величина липозома у суспензији као и површинског зета наелектрисања, праћење стабилности липозомне суспензије током времена, одређивање температуре фазног прелаза, затим одређивање степена инкапсулације активне компоненте, као и кинетике отпуштања активне компоненте (Vemuri и Rhodes 1995; Bhalerao и Raje Harshal 2003; Kuntsche и сар. 2010). Кинетика отпуштања једне активне компоненте се драстично разликује у зависности од састава липозомне мембране односно мембране имају различиту пропустљивост и крутост (Lopez-Pinto и сар. 2005). Тако се на пример може наћи податак да

засићени фосфолипиди (дипалмитоил-фосфатидилхолин) формирају круте и непропусне двослоје док незасићени фосфатидилхолини формирају пропустљивије и мање стабилне двослоје (Akbarzadeh и сар. 2013). Имајући на уму различитост метода за припрему липозома и скоро бескрајне могућности варирања састава липозомне мембране, литература обилује примерима апликације ових система за инкапсулацију (Wagner и Vorauer-Uhl 2011).

Тако су липозоми нашли разноврсну примену као системи за инкапсулацију ензима (Mozafari и сар. 2008; Smith и сар. 2010; Jahadi и сар. 2012), протеина (Colletier и сар. 2002; Sun-Waterhouse и Wadhwa 2013), витамина (Loveday и Singh 2008; Gonnet и сар. 2010), арома (Yoshida и сар. 2010; Lević и сар. 2013), минерала (Ding и сар. 2009; Evens и сар. 2012), антиоксиданаса (Isailović и сар. 2013а; Kerdudo и сар. 2014; Peng и сар. 2014; Rashidinejad и сар. 2014) и антимикроба (Malheiros и сар. 2012; Zou и сар. 2012; Boualem и сар. 2013). Липозоми са инкапсулираним активним компонентама користе се већ дуги низ година у фармацеутској индустрији (Vemuri и Rhodes 1995, Samad и сар. 2007, Xu и сар. 2012, Allen и Cullis 2013). Основна предност липозома над другим методама инкапсулације је њихова стабилност у воденом окружењу. Поред тога и чињеница да липиди не реагују са рецепторима за укус, издваја ове системе као изузетно погодне за маскирање нежељених (најчешће горких) укуса активних компоненти као што су кинин или пропранол (Sun-Waterhouse и Wadhwa 2013). Такође липозоми се користе за инкапсулацију различитих полифенола као што су рутин, нарингенин и ресвертарол (Bonechi и сар. 2012; Kerdudo и сар. 2014) или екстракт хибискуса (Gibis и сар. 2014). Недавно је објављена и студија о инкапсулацији катехина и епигаллакатехина из екстракта зеленог чаја у липозоме (Rashidinejad и сар. 2014) који су даље успешно имплементирани у тврде сиреве са малим садржајем масноће. Бактериоцини су такође инкапсулирани у липозоме

што се показало успешно у контроли патогена који имају порекло из хране (Malheiros и сар. 2012; Zou и сар. 2012).

Ипак, главни проблем на који се наилази када је у питању примена липозома у прехранбеној индустрији је њихова орална администрација на коју утичу ниске вредности рН у гастроинтестиналном тракту као и присуство соли и ензима липаза што дестабилише и разара липозоме (Ђорђевић и сар. 2015). Новија истраживања теже ка проналажењу решења за овај проблем, па тако облагање липозома полимером или њихово смештање у капсуле може да буде корак ка постизању жељеног циља (Keller и сар. 2001; Pjanović и сар. 2010).

1.4. Сложени системи липозоми-полимер

Како је већ поменуто липозоми имају велику и разноврсну примену као системи за инкапсулацију активних компонената, међутим и они имају одређене недостатке. Тако, када је у питању медицинска и козметичка примена за циљано деловање, липозоми подлежу брзој фагоцитози (Blume и Sevc 1990). На овај начин липозоми брзо нестају из крвотока па је тако време отпуштања активне компоненте скраћено. Када је реч о примени у прехранбеним производима иако се законске регулативе примене лако превазилазе због природног састава липозома, њихова орална администрација наилази на потешкоће услед ниске вредности рН у гастроинтестиналном тракту и присуства ензима који дестабилишу и разарају липозоме (Ђорђевић и сар. 2015). Понекад је и сама стабилност липозома током складиштења проблем.

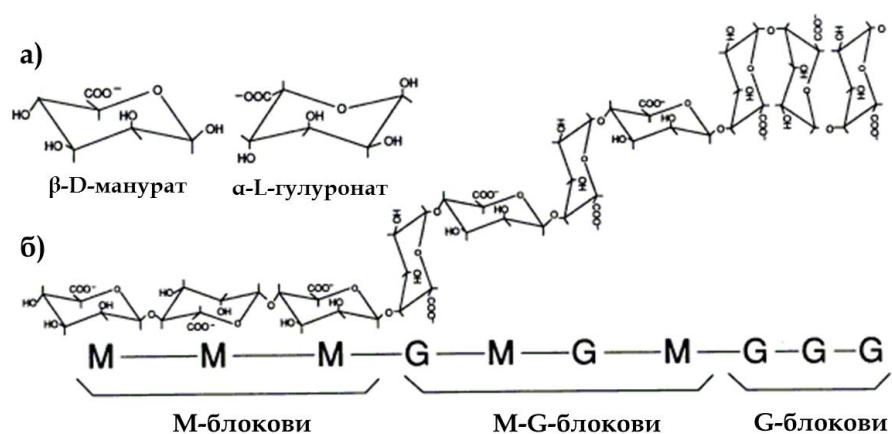
Као могуће решење за ове недостатке појавила се идеја о дисперговању липозома који садрже активну компоненту у полимерне носаче најчешће на бази хидрогелова. Овакви сложени системи предмет су интересовања и истраживања неколицине аутора (DiTizio и сар. 2000; Рјановић и сар. 2010; Li и сар. 2011; Lee и сар. 2012; Gao и сар. 2014; Јорголмен и сар. 2015). Најме, ови аутори предлажу сложене системе на бази липозома и полимера као погодне за нове врсте завоја, инјектабилне депо системе или пак као формулације за трансдермалну апликацију. Са друге стране, мало је литературе која говори о сложеним системима за оралну администрацију. Комбинација полимера и липида у сложеним системима спаја предности које би инкапсулација имала да је засебно рађена и елиминира појединачне недостатке (DiTizio и сар. 2000; Liu и сар. 2012). Овде треба нагласити да избор липозомне композиције као и полимера треба прилагодити активној компоненти односно њеним особинама (Mourtas и сар. 2007). Правилним одабиром састава сложеног система липозоми-полимер отпуштање активне компоненте може да се оптимизује, предвиди, пројектује и циља (Kibat и сар. 1990, Li и сар. 2011).

Поступак припреме сложених система липозоми-хидрогел је често приметан и скуп. Зато се предност даје брзим, једноставним и ефективним методама припреме, али и комерцијалним компонентама које су јефтине и лако доступне. Поред тога додају се и различите компоненте које треба да омогуће бољу крио и липо заштиту. Тако, на пример, додаток шећера (глукозе или сахарозе) сузбија фузију липозомне мембрана и умањује негативни ефекат који промена температуре има на структуру липозомне мембране (Stark и сар. 2010). Када је избор полимера у питању и ту се води рачуна о одабиру оног који је природан и приступачан, а уједно лако и у малим концентрацијама формира гел (Strasdat и Bunjes 2013). Често се у ту сврху користе алгинат, комбинација алгината и других полимера, акација-желатин или сам желатин (Dhoot и сар. 2003; Dai и сар. 2005; Dai и сар. 2006; Grassi и сар. 2006; Strasdat и Bunjes 2013).

1.4.1. Алгинат

У прехранбеној индустрији али и у неким медицинским апликацијама алгинат је нашао значајну улогу. Овај природни полимер је биодеградабилан, биокompatibilан и не токсичан полисахарид и припада групи такозваних GRAS (енгл. *Generally regarded as safe*) компоненти. Комерцијална продаја алгината датира још из 1929. године када га је на тржиште пласирала компанија Kelco Co. у Калифорнији, а од 1934. се користи као стабилизатор сладоледа. Најзаступљенији алгинат у природи је полисахарид у смећим морским алгама где има улогу да даје чврстину и савитљивост овим врстама. У почетку се мислило да је алгинат у основи D-манурат, али је нешто касније откривено да су алгинати блок кополимери. Потврђено је да су то линеарни полисахариди растворни у води који се састоје од остатака β -D-мануронске (M) и α -L-гулуронске киселине (G) међусобно повезане 1,4- гликозидним везама (Слика 1.13.). Тако се у структури полимера појављују блокови алтернирајућих (GMGMGM) и хомополимера (GGGGG и MMMMM) (Manojlović 2008). Геометрије области у којима су G -блокови и оних у којима су M-блокови,

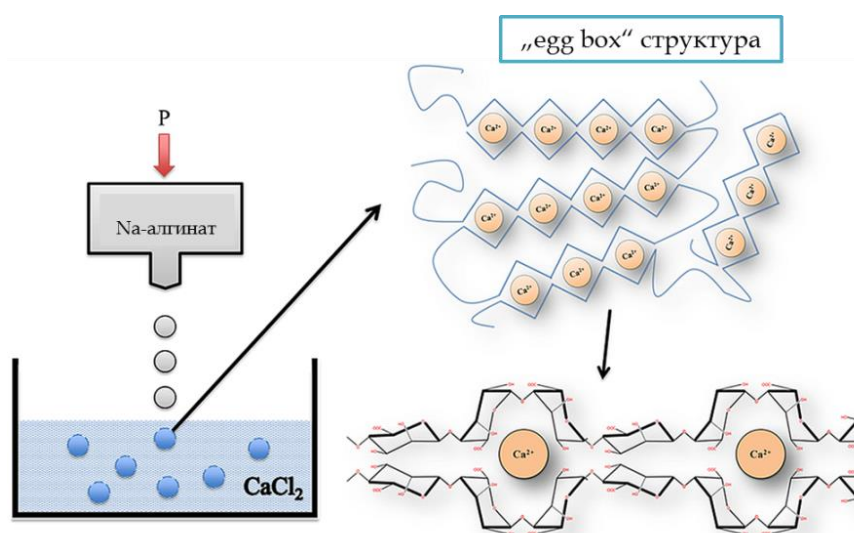
битно су различите услед специфичног облика мономера и њиховог начина везивања у полимер. Тако су G-блокови уврнути, а M-блокови имају облик истегнуте траке. Између хомополимерних M- и G-блокова налазе се области у којима се јављају алтернирајући M- и G-блокови (Слика 1.13.). Не постоји одређено правило по коме се мономерне јединице везују у алгинату. Састав и величина појединих блокова као и укупна моларна маса одређују физичка својства алгината. Структура сегмената се може одредити техником нуклеарне магнетне резонанце.



Слика 1.13. а) Конформација β -D-манурата и α -L-гулуроната б) Састав блокова код алгината

Када се алгинат раствори у води настаје вискозан раствор. Вискозност раствора зависи од дужине алгинатног ланца, односно од броја мономерних јединица (расте са његовим порастом). За молекуле алгината у раствору карактеристично је интрамолекулско електростатичко одбијање суседних негативно наелектрисаних јединица, па долази до ширења ланца. Ротација ланца је немогућа на гликозидној вези, а то доводи до делимичне нефлексибилности алгинатних молекула у раствору. Најмање су флексибилни GG сегменти, док су најфлексибилнији MG сегменти. Пошто је алгинат полиелектролит, структура ланца и вискозност раствора зависе и од јонског окружења у целости. При већим концентрацијама јона, може доћи до таложења молекула алгината и смањења вискозности.

Оно што алгинат издваја из мноштва природних полимера је могућност његовог гелирања под врло благим условима уз употребу нетоксичних реактаната. Најме, алгинати показују велики афинитет према катјонима, а калцијумови јони (Ca^{2+}) се најчешће примењују у ту сврху. Дакле, микрочестице алгината са активном компонентом могу лако да се формирају када се раствор натријум-алгината и активне компоненте меша са раствором двовалентног средства за умрежавање (нпр. CaCl_2). До умрежавања долази услед размене јона натријума и калцијума чиме се образује специфична структура између глукуронских група тзв. кутија за јаја („egg-box“). По овом моделу се два или више полиуронатних ланаца међусобно везују стварајући шупљине за смештање двовалентних катјона попут оних у кутији за јаја (Wang и сар. 2010). Међусобно повезани ланци у једној равни могу да стварају и просторне агрегате везујући ланце и у трећој димензији (Манојловић и сар. 2005). Кругови представљају Ca^{2+} јоне смештене између суседних остатака гулуронске киселине (контуре у V облику), док су суседни остаци мануронске киселине приказани као криве на крајевима „egg-box“ структуре (Слика 1.14.).



Слика 1.14. Шематски приказ размене јона натријума и калцијума при гелирању алгината, чиме се образује специфична структура тзв. кутија за јаја („egg-box“)

Алгинатни гелови су по својствима слични чврстим материјама

(задржавају облик при дејству напона), али се састоје од 99-99,5% воде. Када је количина калцијума у гелу мала, ови гелови нису трајни, односно настају врло вискозни тиксотропни раствори. У случају да се унесе више калцијума долази до образовања трајних мрежа. Испитивања су показала да катјон има велики утицај на својства гела као што су порозност, бубрење, стабилност, јачина гела, биодеградабилност и биокомпатибилност. Механичка отпорност честица гела зависи од састава алгината. Најбољу механичку отпорност су показале алгинатне честице код којих је садржај α -L -гулурунске киселине виши од 70% и код којих је средња дужина GG сегмената око 15 јединица повезаних мономера.

У погледу инкапсулације алгинат, као носач активних компоненти, има и својих недостатака. Он има смањену хемијску стабилност у присуству једињења која доводе до образовања хелатних комплекса. Са-алгинат је и хемијски нестабилан у присуству фосфата, цитрата и лактата, као и у присуству катјона Na^+ и Mg^{2+} јона. Величина пора алгинатних микрочестице и расподела пора гела битне су када се алгинат користи за инкапсулацију активних компоненти. Ова својства утичу на задржавање и кинетику отпуштања активне компоненте као и на брзину преноса молекула из спољашње средине кроз матрицу гела (дифузију). Поре алгинатних честица имају димензије од неколико нанометара па до 200 nm. Њихова величина зависи од концентрације алгината, хемијске структуре гела и кинетике формирања гела. Коефицијент дифузије молекула кроз матрицу гела опада са порастом концентрације алгината. Ако је структура алгината сачињена претежно од G сегмената молекули најбрже дифундују кроз матрицу (Manojlović 2008). Како су активне компоненте најчешће мали молекули велике димензије поре алгинатних гелова нису пожељне (Gombotz и Wee 2012). У циљу смањења величине пора, примењују се такозвани пуниоци у које се убрајају различите врсте угљених хидрата (инулин, сахароза, глукоза) (Wang и сар. 2010). Такође, побољшање карактеристика гела и успоравање дифузије активне

компоненте могуће је и облагањем већ формираних микрочестица додатним слојем органских поликатјона као што су хитозан, декстран, каргенан, пектин или желатин (Burey и сар. 2008; Belščak-Cvitanović и сар. 2011; Stojanović и сар. 2012). Дас и Нг (Das и Ng 2010) су оптимизовали припрему честица калцијум-пектин које су пуњене липозомима са ресвератролом, али ови аутори наглашавају да иако је формулацијом успешно постигнут образац продуженог ослобађања ресвератрола, потребне су додатне модификације честица (облагање, комплексација) за постизање отпуштања ресвератрола на конкретном месту у доњем делу гастроинтестиналног тракта. Тако су на пример Ксинг и сарадници (Xing и сар. 2003) липозоме са инкапсулираним пчелињим отровом инкорпорирали у Са-алгинатне честице које су накнадно обложене еудрагитом S100. Еудрагит је употребљен са идејом да честице буду заштићене од ензима и желудачних сокова, а да се при рН 6,8, овај додатни слој раствара, алгинат бубри, долази до ерозије и ослобађања активне компоненте.

Алгинатне микрочестице могу да се добију у распону величина од 100 μm до 3 mm. Величина зависи пре свега од примене инкапсулисане активне материје али и од својстава алгинатног раствора и примењене технике инкапсулације (Nedović 1999; Nedović и сар. 2001). У области биотехнологије, алгинатни гелови се најчешће користе у облику сферних честица различитих димензија. У пракси се за добијање алгинатних честица користе технике које се базирају на примени спољашње силе за дисперговање алгината у облику капи које падају у раствор за гелирање где добијају коначни облик и димнзије. Овде треба истаћи методу електростатичке екструзије која је и примењена у овој тези за припрему система (микрочестица) липозоми-алгинат.

1.4.2. Електростатичка екструзија

Оно на основу чега се електростатичка екструзија разликује од класичне екструзионе методе, методе укапавања, је примена електричног поља у

циљу добијања честица малих пречника. На смешу активне компоненте и полимера који се равномерно потискују кроз иглу делује и електрично поље и тако заједно са гравитационом силом проузрокује брже откидање капи са површине игле (Poncelet и сар. 1999; Manojlović 2008; Kostić и сар. 2012). Кап се откида када електрична и гравитациона сила надвладају силу површинског напона и тада кап пада у раствор за гелирање где се одвија очвршћавање и превођење капи у честицу. Основна предност ове методе над класичном екструзијом је контрола величине честица и добијање честица жељеног пречника. Овом методом је могуће добити честице микрометарских величина (Nedović и сар. 2001; Manojlović 2008; Kostić и сар. 2012).

Код електростатичке екструзије величина честица зависи од више фактора. Пре свега зависи од физичких карактеристика раствора полимера независно од врсте екструзије. Овде вискозитет раствора полимера који се користи као носачи представља један од најважнијих реолошких параметара који утичу на формирање честица при електростатичкој екструзији, на њихову величину и сферичност. На примеру екструзије Na-алгината и добијању Ca-алгинатних честица показано је да са повећањем концентрације алгината у раствору расте и вискозитет самих раствора, што доводи до отежавања процеса екструзије. При релативно малим концентрацијама Na-алгината (до 2%) могу се при одређеним протоцима добити униформне честице сферног облика са пречницима мањим од 100 μm . Међутим, са повећањем концентрације Na-алгината, расте и вискозитет раствора што доводи до формирања издужених тј. честица неправилног облика (Nedović и сар. 2006).

Даље, ту је проток којим се раствор потискује, затим пречник игле или капиларе, растојање између игле и раствора за гелирање (односно растојање електрода) и примењен напон (Nedović 1999; Nedović и сар. 2001, Kostić и сар. 2012).

Једначина која омогућава прорачун пречника капи (d) која ће се откинути

са врха игле под дејством електричног поља (напона) дефинишу параметри d_0 -пречник капљице у одсуству електростатичког поља, U - примењен напон (потенцијал) и U_c - критичан напон при коме долази до формирања капи.

$$d = d_0 \sqrt[3]{1 - \left(\frac{U}{U_c}\right)^2} \quad (1.16.)$$

$$U_c = \sqrt{\frac{d_c \sigma_1}{k \epsilon_0}} \quad (1.17.)$$

Где је d_c унутрашњи пречник игле, σ_1 површински напон раствора полимера, ϵ_0 диелектрична константа ваздуха, док k представља параметар који зависи од времена формирања капи и времена апсорпције полимера на површини капи.

Електростатичка екструзија, као метода за инкапсулацију широко је примењивана у различитим областима биотехнологије. Тако, може се наћи примена ове технике у инжењерству ткива, фармацији, ферментацији, инкапсулацији биолошки активних компоненти (антиоксиданаса, хелија, ензима) (Nedović и сар. 2001; Knežević и сар. 2002; Kostić и сар. 2012).

2. Циљеви рада

Ова дисертација за свој основни циљ има развој система за инкапсулацију и контролисано отпуштање ресвератрола на бази липозома. У ту сврху било је потребно прво испитати и одабрати оптималне методе припреме липозома на бази комерцијалних липидних смеша, како за припрему малих липозома погодних за фармацеутску примену (нпр. дермална апликација), тако и већих липозома погодних за примену у прехранбеним производима. Липозоми припремљени различитим методама испитани су са становишта расподеле величине, површинског наелектрисања, степена инкапсулације, стабилности и профила отпуштања ресвератрола. Ови резултати дају увид како научној јавности тако и индустријском сектору о потенцијалу за примену липозома са инкапсулираним ресвератролом, са идејом шире примене ових система као суплемената који могу да допринесу квалитету и нутритивној вредности већ постојећих производа. Поред овога, крајњи циљ дисертације је и да на основу утицаја и понашања ресвератрола инкапсулираног у липозоме пружи увид у понашање других слабо растворних активних компоненти које би могле да се примене у индустрији.

У оквиру овог дела дисертације обухваћене су следеће фазе испитивања:

-одређивање основних карактеристика липозома припремљених различитим методама

а) одређивање расподеле величине липозома, зета потенцијала и индекса полидисперзије као параметара кључних за дефинисање стабилности липозома

б) одређивање степена инкапсулације ресвератрола у липозоме припремљене различитим методама

- испитивање очуваности антиоксидативних својстава ресвератрола након инкапсулације
- праћење кинетике отпуштања ресвератрола из ових система
- испитивање утицаја инкапсулације на смањење цитотоксичности ресвератрола
- утврђивање физичког стања ресвератрола инкорпорираног у липозоме као и позиције ресвератрола инкорпорираног у липозомни двослој
- испитивање утицаја ресвератрола на липидну пероксидацију

Након дефинисања и карактерисања липозома као носача за инкапсулацију ресвератрола, у другом делу ове дисертације испитани су комплексни системи на бази алгината за инкапсулацију и даљу примену ресвератрола. Циљ ове фазе била је карактеризација сложених система липозоми-алгинат који би обезбедили још спорије отпуштање ресвератрола.

У оквиру овог дела дисертације обухваћене су следеће фазе:

- одређивање основних карактеристика система липозоми-алгинат
 - а) одређивање средњег пречника микрочестица (гел и лиофилизованих)
 - б) одређивање степена инкорпорације ресвератрола у системе липозоми-алгинат
 - в) испитивање сферичности микрочестица и њихове унутрашње структуре
- испитивање механичких карактеристика система липозоми-алгинат у циљу даље примене
- праћење кинетике отпуштања ресвератрола из ових система у циљу одабира оптималног система за даљу примену.

3. Експериментална испитивања

3.1. Материјали

Транс-ресвератрол (енгл. *Resveratrol*, RSV) је коришћен у прашкастом облику како је и добијен од произвођача ChromaDex, Irvine (САД) (> 99% чистоће). Комерцијална липидна смеша Фосфолипон 90 (енгл. *Phospholipon 90*, P90) доставила је фирма Natterman Phospholipids (Немачка) и садржи више од 90% фосфатидил-холина. 2-дипалмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидил-холин (енгл. *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho glycerol*, DPPC) купљен је од компаније Avanti Polar Lipids (САД). Холестерол (енгл. *Cholesterol*, Chol) и 2,2'-азино-бис(3-етилбензтиазолин-6-сулфонска киселина) (енгл. *2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid*, ABTS) купљени су од компаније Sigma Aldrich (St. Louis, MA, САД). Флуоро-маркери 1,6-дифенил-1,3,5-хексатриен (енгл. *1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene*, DPH) и N,N,N-триметил-4-(6-фенил-1,3,5-хексатриен-1-ил)фениламонијум-р-толуенсулфат (енгл. *N,N,N-trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phenylammonium-p-toluenesulfonate*, TMA-DPH) добијене су од произвођача Aldrich Chemical Company (САД). Индикатор масних киселина BODIPY 581/591 C11 купљен је од компаније Molecular Probes (Eugene, САД). Спински маркери 2-(4-метокси-4-оксобутил)-4,4-диметил-2-додецил-3-оксазолидинилокси радикал (енгл. *5-doxylpalmitoyl methylester; (MeFASL(10,3); 2-(4-Methoxy-4-oxobutyl)-4,4-dimethyl-2-dodecyl-3-oxazolidinyloxy, free radical*) и 2-(12-метокси-12-оксододецил)-4,4-диметил-2-етил-3-оксазолидинилокси радикал (енгл. *13-doxylpalmitoyl methylester; (MeFASL(2,11); 2-(12-Methoxy-12-oxododecyl)-4,4-dimethyl-2-ethyl-3-oxazolidinyloxy, free radical*) синтетисани су на Факултету за фармацију, Универзитет у Љубљани, Словенија. Спински макер DEPMPO (енгл. *5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide*) набављен је од компаније

Enzo Life Sciences (САД). Тиобарбитурна киселина, перхлорна киселина и трихлор-сирћетна киселина купљене су од компаније Merck (Немачка).

За припрему система липозоми-алгинат коришћен је алгинат ниске вискозности (Sigma-Aldrich, Немачка) док је за гелирање примењен калцијум-хлорид (Acros organics, САД). Хитозан примењен за облагање честица имао је молекулску масу између 100.000-300.000 Da (Acros organics, САД), док је сахароза купљена од компаније VWR (Белгија). Остали реагенси су били аналитичке чистоће.

3.2. Методе припреме и карактеризација липозома са инкапсулираним ресвератролом

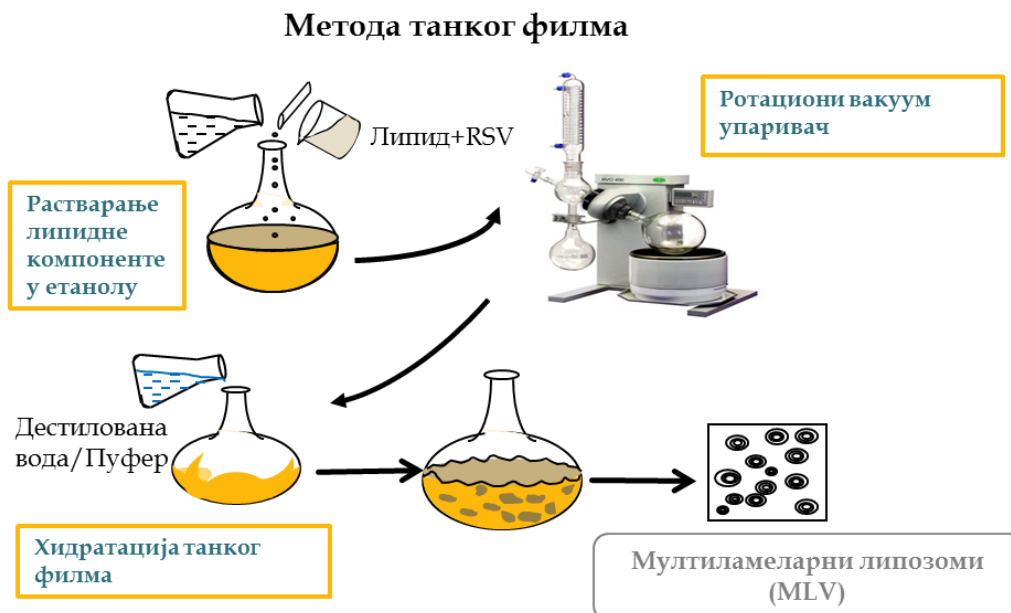
3.2.1. Припрема липозома са инкапсулираним ресвератролом

3.2.1.1. Припрема великих мултиламеларних липозома

Липиди, фосфолипиди и DPPC, коришћени су за припрему великих мултиламеларних липозома (енгл. *Multilamellar vesicles*, MLV). MLV са и без ресвератрола добијени су методом танког филма (енгл. *Thin film*, TF) или пролипозомном методом (енгл. *Proliposome*, PRO). У свим узорцима задржан је исти масени однос ресвератрола и липида 1:20.

3.2.1.2. Метода танког филма (TF)

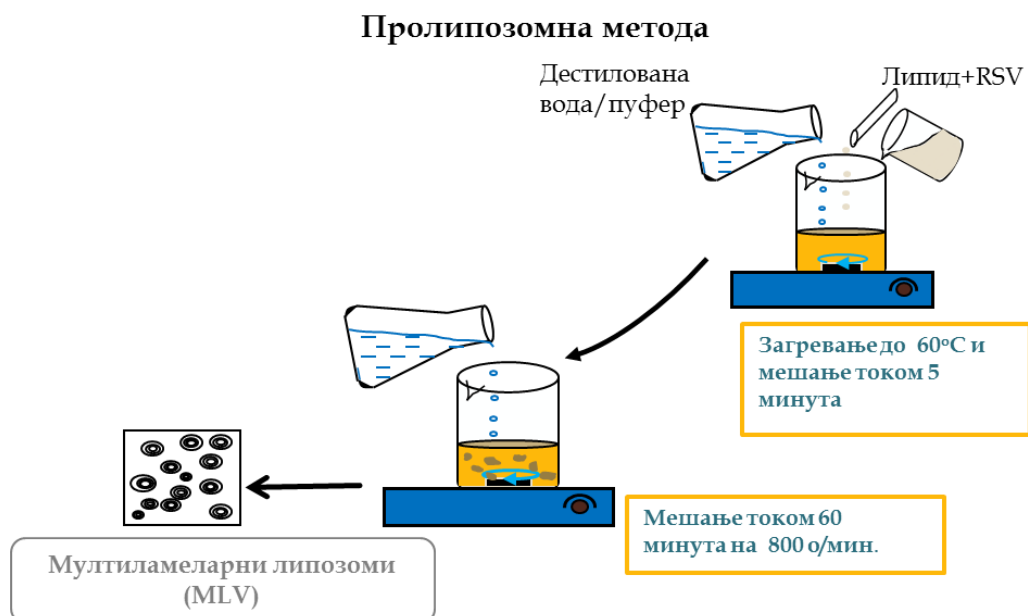
Липиди у прашкастој форми најпре су растворени у етанолу у балону са закривљеним дном. У раствор је даље додат ресвератрол у масеном односу према липидима 1:20. Растварач је комплетно уклоњен употребом ротационог вакуум упаривача (BUCHI Rotavapor R-114) на температури од 45 °C и притиску од 175 mbar. Танак филм који се образује на зидовима балона даље је сушен око 15 минута након чега је извршена хидратација липидног филма. Добијена суспензија је ручно мешана наредних 20 минута. На овај начин добијају се MLV липозоми, што је шематски приказано и на слици 3.1.



Слика 3.1. Шематски приказ методе танког филма за припрему липозома

3.2.1.3. Пролипозомна метода (PRO)

Пролипозомна метода изведена је како је описано у чланку који су објавили Перет и сарадници (Perrett и сар. 1991). Смеша која садржи 2 g фосфолипона, 0,1 g ресвератрола и етанол благо је мешана након чега је додата мала количина дестиловане воде/ пуфера и даље је грејана на 60 °C неколико минута док се није добила хомогена смеша. Након хлађења до собне температуре вршена је хидратација употребом дестиловане воде/ пуфера у малим порцијама током 30 минута. Суспензија је мешана магнетном мешалицом наредних сат времена при брзини од 800 обртаја/минути. На овај начин такође се добијају MLV што је шематски приказано на слици 3.2. .



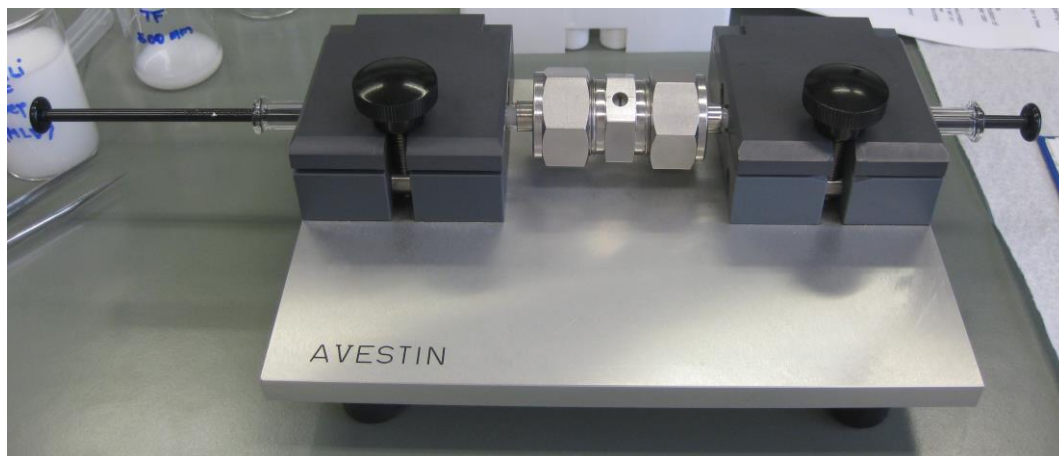
Слика 3.2. Шематски приказ пролипозомне методе за припрему липозома

3.2.1.4. Смањење величине липозома

У циљу смањења величине липозома као и ламеларности примењене су екструзија (енгл. *Extrusion*, EX) и соникација (енгл. *Sonication*, SON).

Екструзија

Свеже припремљени липозоми су третирани екструзијом кроз сет од четири поликарбонатне мембране (Whatman Maidstone, Велика Британија), како би се избегло њихово пуцање. Најпре су липозоми 21 пут потиснути кроз мембране номиналног пречника пора 800 nm, а затим исто толико пута кроз мембране чије су величине поре 400 nm, 200 nm и на крају 100 nm. Уређај за екструзију, LiposoFast Basic (Avestin, Ottawa, Канада), састојао се од два тесно спојена стаклена шприца (Hamilton, Reno, САД) кроз која се ручно потискује узорак (Слика 3.3.).



Слика 3.3. Уређај за екструзију

Соникација

Познато је да примена ултразвука високог интензитета може да доведе до формирања малих липидних везикула (Torchilin 2003). Ширење ултразвучних таласа кроз узорак резултира у спонтаном настајању и нестајању малих вртлога што доводи до повећања притиска, температуре и турбулентног струјања у самом узорку. Турбулентно струјање проузрокује велике смицајне силе које делују на мултиламеларне липозоме и доводе до формирања малих везикула (Taylor и сар. 2005). Ултразвучна сонда је директно уведена у узорак липозома запремине 10 ml. Соникација је вршена помоћу ултразвучног процесора Ultrasonic Processor VCX 500W (Cole Parmer, Vernon Hills, САД) при амплитуди од 40% и у трајању од 360 секунди. Током целог поступка узорци су константно хлађени у посуди са ледом.

Ради лакшег праћења резултата у Табели 3.1. дат је скраћени назив узорака према методи припреме и саставу.

Табела 3.1. Преглед скраћених назива узорака према методи припреме и саставу

Липидни састав	Метода добијања	Метода смањења величине	Однос ресвератрола и липида	Ознака узорка
P90+Chol	TF	-	0	TF-MLV
P90+Chol	TF	-	1:20	TF-MLV-RSV
P90+Chol	TF	Соникација	0	TF-SON
P90+Chol	TF	Соникација	1:20	TF-SON-RSV
P90+Chol	TF	Екструзија	0	TF-EX
P90+Chol	TF	Екструзија	1:20	TF-EX-RSV
P90	PRO	-	0	PRO-MLV
P90	PRO	-	1:20	PRO-MLV-RSV
P90	PRO	Соникација	0	PRO-SON
P90	PRO	Соникација	1:20	PRO-SON-RSV
P90	PRO	Екструзија	0	PRO-EX
P90	PRO	Екструзија	1:20	PRO-EX-RSV
DPPC	TF	-	0	TF-DPPC

3.2.2. Карактеризација липозома са инкапсулираним ресвератролом

3.2.2.1. Одређивање величине липозома и њихове стабилности

Величина липозома, индекс полидисперзије (енгл. *Polydispersity index*, PDI) и површинско (зета) наелектрисање испитани су методом ласерске дифракције помоћу уређаја чији рад се заснива на фотон-корелационој спектроскопији (Zetasizer Nano Series, Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Велика Британија). Узорци су разблажени деминерализованом водом и анализирани без претходног соницирања, јер би соницирање могло привидно смањити величину липозома. На основу величине честица може се закључити и каква је структура липозома: униламеларна или мултиламеларна. Мерења су вршена у трипликату на собној температури и поновљена 3., 7., 14. и 21. дана од тренутка припреме како би се дефинисала стабилност липозома. Између мерења узорци су чувани на температури од 4°C.

3.2.2.2. Одређивање степена инкапсулације

Степен инкапсулације (Е) представља процентуални однос масе ресвератрола инкапсулираног у липозоме ($m_{\text{лип}}$) и укупне масе ресвератрола која је унета у систем ($m_{\text{ук}}$).

$$E = \frac{m_{\text{лип}}}{m_{\text{ук}}} \cdot 100 \quad (3.1.)$$

Неинкапсулиран ресвератрол одвојен је од липозомне дисперзије коришћењем ултрацентрифуге (Thermo Scientific Sorval WX Ultra series ultracentrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA, САД). Липозомна дисперзија је центрифугирана 45 минута на 45000 обртаја/минути, на температури од 10°C. Након центрифугирања одвојен је супернатант и спектрофотометријски је одређена концентрација ресвератрола на 306 nm. Како је позната укупна маса ресвератрола унета у систем при припреми узорака, степен инкапсулације је одређен као:

$$E = \frac{m_{\text{ук}} - m_{\text{суп}}}{m_{\text{ук}}} \cdot 100 \quad (3.2.)$$

где је $m_{\text{ук}}$ иницијална маса ресвератрола коришћена за припрему узорака, а $m_{\text{суп}}$ маса ресвератрола измерена у супернатанту.

3.2.2.3. Микроскопија атомских сила

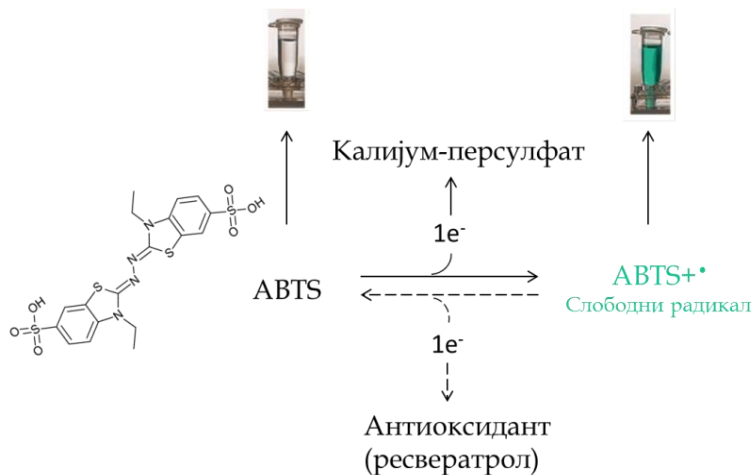
Око 4 μl разблажених липозомних дисперзија (узорак PRO-MLV и PRO-MLV-RSV) постављено је на свеже припремљене „мајка“ дискове. Дискови са узорцима остављени су 24 сата на собној температури у Петријевој шољи, заштићеној од прашине, да се осуше. Дискови су даље коришћени за мерења микроскопијом атомских сила (енгл. *Atomic Force Microscopy*, AFM) на уређају Agilent 5500 (Agilent Technologies, Санта Клара, САД) помоћу силикон-нитридне пробе (PPP-FM, Nanosensors, Немачка) у контактном моду, при брзини од 0,7 линија/s. Резолуција је подешена на 256 \times 256 px. Топографски, амплитудни и фазни подаци прикупљани су симултано. Анализа снимака извршена је кроз софтверски пакет Picoview (Agilent, САД).

3.2.2.4. Антиоксидативни тест

Овај тест примењен је како би се утврдила релативна способност ресвератрола као природног антиоксиданта да везује слободне АВТС радикале и шематски је приказан на слици 3.4. Слободни радикали припремљени су мешањем 5 ml воденог раствора АВТС-а и 88 μ L калијум-персулфата. Пре употребе, ова смеша је инкубирана на собној температури у мраку од 12 до 16 часова. На дан анализе овај концентрован АВТС раствор разблажен је етанолом до постизања апсорбанце 0,70 ($\pm 0,02$) на 734 nm. Око 4 μ L узорка помешано је са 4,5 ml етанолног раствора АВТС -а и апсорбанца је мерена након 4 минута на истој таласној дужини. Ова метода изведена је како су је описали Ре и сарадници (Ре и сар. 1999), а прорачун се изводи према следећој једначини:

$$\% \text{инхибиције} = \frac{A_0 - (A_y - A_{\text{п}})}{A_0} \quad (3.3.)$$

Где је A_0 апсорбанца контролног раствора (само раствор АВТС-а), A_y апсорбанца узорка, а $A_{\text{п}}$ апсорбанца узорка која не садржи ресвератрол (контрола).



Слика 3.4. Шематски приказ АВТС теста

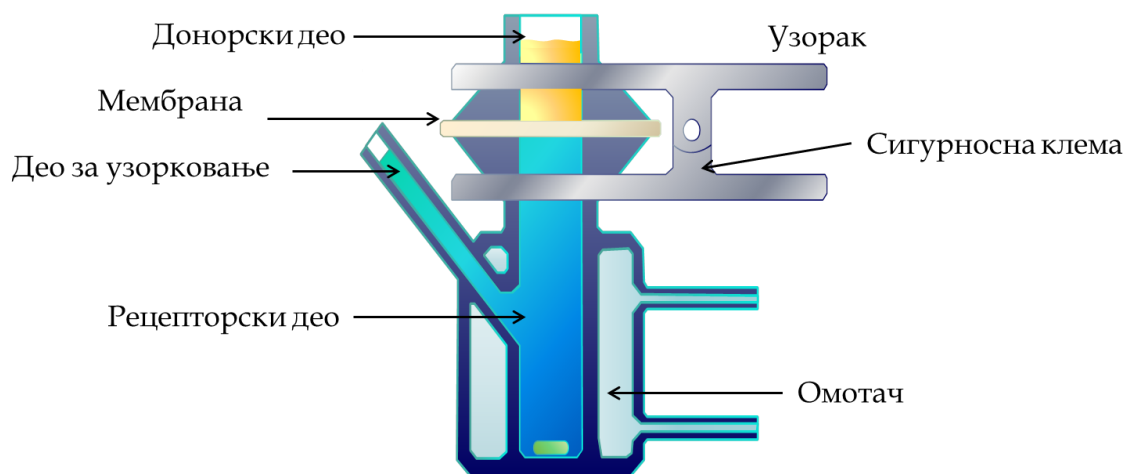
3.2.2.5. Диференцијална скенирајућа калориметрија

Диференцијална скенирајућа калориметрија (енгл. *Differential scanning calorimetry*, DSC) имала је за циљ да се: утврди физичко стање ресвератрола инкорпорираниог у липозоме, испитају физичко-хемијске особине липозомне мембране и утврди њена интеракција са ресвератролом. Пре самог мерења узорци су замрзнути на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и лиофилизовани током 24 сата при притиску од 0,01 bar и собној температури (Christ Beta 1-8 K, Немачка). Одабрани узорци подвргнути су анализи на уређају Mettler Toledo (DSC1, Stare® System, САД) тако што су постављени у алуминијумске чанчиће и загревани од 0 до $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ при брзини загревања од $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ у струји азота. Резултати су анализирани у програмском пакету StarE 9.10.

Битна карактеристика липидног двослоја је прелаз из гел у течну фазу (енгл. *Gel-to-liquid phase transitions*). Овај прелаз праћен је за липозоме припремљене употребом DPPC-а у присуству ресвератрола, а при различитим односима ресвератрола и липида ($n_{\text{rsv}}/n_{\text{lip}}=0,5$ и $n_{\text{rsv}}/n_{\text{lip}}=0,25$). Употреба комерцијалних липидних смеша при овој анализи није била могућа јер фазни прелаз није уочљив у опсегу од 0 до 100°C на калориметријском уређају NANO DSC series III system (Calorimetry Science, Provo, UT, САД). Зато су DPPC липозоми послужили као модел мембране. Узорак је прво дегазиран и такав унет у калориметријску ћелију. Програмски је подешено да се загревање и хлађење узорка одвија у температурном опсегу од 10 до 70°C при брзини од $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Први DSC термограми су употребљавани за одређивање температуре пре-транзиције (T_{pre}), температуре главног фазног прелаза липида (T_{m}), и модел-независне калориметријске енталпије (ΔH_{cal}). Наредни термограми су употребљени за одређивање реверзибилности фазног прелаза липида. За процену енталпија и температура прелаза из DSC термограма коришћен је програмски пакет OriginPro 8.1.

3.2.2.6. Испитивање кинетике отпуштања ресвератрола и одређивање коефицијента дифузије

Утицај липозомне мембране на дифузију односно на брзину отпуштања ресвератрола испитан је у стандардној Францовој дифузионој ћелији (енгл. *Franz diffusion cell*) која је шематски приказана на слици 3.5. (донација компаније PermeGear, Inc., САД).



Слика 3.5. Шематски приказ Францове дифузионе ћелије

Ћелија се састоји из два дела, донорског и рецепторског који су раздвојени ацетатно-целулозном мембраном (величина пора $0,2 \mu\text{m}$, површина $4,91 \text{ cm}^2$). Рецепторски део има фиксну запремину од 20 ml и опремљен је магнетним зрном како би се раствор у том делу константно мешао током спровођења експеримента у циљу постизања хомогености (Klimundova и сар. 2006). Пре почетка сваког експеримента Францова ћелија је термостатирана на собној температури уз употребу флуида у коме се прати отпуштање (смеша етанола и воде у односу 1:1) током 30 min . Термостатирање је вршено због мембране и раствора који се уноси у рецепторски део. Мембрана има период прилагођавања условима у којима се налази ("лаг" фаза), па се врши њено термостатирање како би се избегао овај период током експеримента.

У донорски део унешена је одређена количина (~1 ml) липозома са инкапсулираним ресвератролом (липозоми су припремљени како је претходно описано). Током експеримента 0,5 ml узорка узимано је из рецепторског дела кроз део за узорковање, у различитим временским размацама, при чему је иста количина свежег раствора враћана у рецепторски део Францове ћелије. Узорци из рецепторског дела узимани су различитом динамиком, зависно од дужине експеримента. Концентрација ресвератрола праћена је спектрофотометријским мерењем апсорбанце на 306 nm на спектрофотометру (UV-1800, Shimadzu, Јапан).

Дифузија ресвератрола из липозома у рецепторски флуид кроз ацетатно-целулозну мембрану може да се апроксимира Другим Фиковим законом дифузије (Рјановић и сар. 2010) како је то објашњено у одељку 1.2.3.

3.2.2.7. Морфолошка испитивања ћелијских култура

За испитивање утицаја липозома на морфологију ћелија, коришћени су хумани недиференцирани кератиноцити, NCTC 2544, из комерцијално доступне ћелијске линије InterlabCell (Genoa, Италија). Ћелије су гајене у медијуму за култивацију EMEM (енгл. *Eagle's Minimum Essential Medium*, Sigma, Немачка), који је садржао EBSS (енгл. *Earle's Balanced Salt Solution*, Sigma, Немачка), 1% смешу пеницилина и стрептомицина (Sigma, Немачка), 1% 2 mM L-глутамин (Sigma, Немачка), 1% не-есенцијалне аминокиселине (Sigma, Немачка) уз додатак 10% ФБС (енгл. *Fetal Bovine Serum*, Gibco, Invitrogen, САД). Инкубација је вршена у влажној атмосфери CO₂ (5%) на 37°C. Након достизања 70% конфлуентности, ћелије су одлепљене смешом трипсин/EDTA (Sigma, Немачка), засејане на стаклене плочице (при површинској густини од 1,5·10⁴ ћелија/плочици) и третиране преко ноћи липозомима са ресвератролом, или само раствором ресвератрола. Након третмана, ћелије су евалуиране квалитативно у погледу морфологије, везивања за подлогу и површинске густине раста, коришћењем инвертованог микроскопа (Olympus SKX41, Јапан).

3.2.2.8. Електронска парамагнетна резонанција

Електронска парамагнетна резонанција (EPR) примењена је на узорке PRO-MLV-RSV и TF-MLV-RSV док су узорци без ресвератрола (PRO-MLV и TF-MLV) служили као контроле. Ови узорци су пре анализе додатно обележени спинским маркерима (енгл. *Spin probes*) MeFASL(10,3) или MeFASL(2,11). Покрети спинских маркера читавају се на EPR спектру и на њихове покрете значајно утичу уређеност и динамика околних липида (Poklar Ulrich и сар. 2010). Тако, позиција нитроксилне групе MeFASL(10,3) омогућава увид у карактеристике липидне мембране у близини површине липидног двослоја, док MeFASL(2,11) омогућава увид у флуидност мембране у средини липидног двослоја.

За ову анализу 8 mL раствора одговарајућег спинског маркера у етанолу (0,1 mM) осушено је у епрувети уз употребу ротационог вакуум упаривача како би се формирао танак филм. Узорак (50 mL) је даље додат тако осушеном танком филму и интензивно мешан током 5 минута. Смеша је уведена у капилару (пречника 1 mm) која се поставља у EPR спектрометар (ELEXSYSE 500 Bruker, Немачка) где је вршено мерење при следећим параметрима: централно поље 332 mT; опсег скенирања 10 mT; снага микроталаса 20 mW, фреквенција микроталаса 9,32 GHz; модуларна фреквенција 100 KHz; модуларна амплитуда 0,1 mT, температурни опсег од 15 до 65°C, уз корак од 5°C. Детаљан извештај о флуидности липидне мембране добијен је компјутерском симулацијом EPR спектра (Štrancar и сар. 2003).

3.2.2.9. Флуоресцентна спектроскопија

За мерења флуоресцентне поларизације узорци TF-MLV и PRO-MLV су обележени флуоро-маркером DPH или TMA-DPH. У том циљу 10 mL флуорифоре (1 mM) помешано је са 2 mL узорка претходно припрељена како је описано у одељку 3.2.1. (крајња концентрација липида у узорку 0,1 mg/mL). Даље, смеси су додавани аликвоти ресвератрола (2 mM) и тако је однос ресвератрола и липида ($n_{\text{rsv}}/n_{\text{lip}}$) вариран је од 0 до 0,35, или је

употребљен 96% етанол као контрола. Флуоресцентна поларизација мерена је на флуоресцентном спектрофотометру (Cary Eclipse, Varian, Аустралија) на три различите температуре 25, 37 и 60°C. Мерења су вршена при таласној дужини ексцитације од 358 nm и емисије од 410 nm. Резултати су представљени као вредности поларизације (P) у зависности од удела ресвератрола.

3.2.2.10. Тиобарбитурни тест

Пероксидација липозома припремљених методом танког филма и пролипозомном методом са и без ресвератрола (TF-MLV, PRO-MLV, TF-MLV-RSV, PRO-MLV-RSV) испитани су тиобарбитурним тестом (енгл. *Thiobarbituric acid reacting substances*, TBARS). Узорци без ресвератрола служили су као контроле, а узорци који су садржали ресвератрол ($n_{\text{RSV}}/n_{\text{lip}} = 0,33$) изложени су ултравиолетној светлости (Universal UV Lamp, Camag, MuttENZ, Швајцарска) током 24 сата. Узорци су покривени кварцним стаклом како не би долазило до испаравања. Такође је припремљена и серија која је чувана у мраку како би резултати могли да се упореде. Током 24 часа аликвоти су узорковани у различитим временским интервалима (1, 2, 3, 6, и 24 h) за примену тиобарбитурног теста (Pelle и сар. 1990). Процедуру су чинили следећи кораци: 0,2 mL узорка помешано је са 3 mL 20% раствора тиобарбитурне киселине у стакленој епрувети са затварачем. Један милилитар шток-раствора који се састојао од једнаких запремина 2% тиобарбитурне киселине и 20% перехлорне киселине, додат је у епрувету. Садржај епрувете је интензивно промешан и загреван у воденом купатилу до 100°C током 25 min. Реакција је заустављена премештањем епрувете у хладну воду током 5 min. У циљу одвајања формираног талога, епрувете су центрифугиране током 8 min на 1015 g, а апсорбанца супернатанта мерена је на 532 nm на UV-Vis спектрофотометру (Model 8453, Hewlett-Packard GmbH; Waldronn, Немачка). Ружичаста боја супернатанта потиче од реакције између тиобарбитурне киселине и липидних хидрокси-пероксидних продуката.

3.2.2.11. Праћење кинетике липидне оксидације уз употребу флуоресцентног липофилног маркера BODIPY 581/591 C₁₁

Како би се испратила кинетика липидне пероксидације употребљен је 0,67 mM раствор флуоресцентног липофилног маркера BODIPY 581/591 C₁₁ у диметил сулфоксиду. Овај раствор помешан је са 125 mL PRO-MLV и са 20 mL раствора ресвератрола (три различита молска односа ресвератрола и липида су припремљена: $6,5 \cdot 10^4$, $6,5 \cdot 10^3$ и $6,5 \cdot 10^2$). Након 10 минута инкубације, пероксидација је изазвана додатком 10 μ L раствора бакар-хлорида (10 mM). Након оксидације флуоресценција BODIPY 581/591 C₁₁ маркера помера се од црвене ка зеленој. Кинетика ове реакције праћена је на флуоресцентном спектрофотометру (Cary Eclipse, Varian, Аустралија) током 4 сата од момента индуковања, при таласној дужини ексцитације од 500 nm и емисије од 520 nm.

3.2.2.12. Одређивање антиоксидативне активности употребом EPR

При излагању липозомне суспензије UV зрачењу формирају се слободни радикали кратког времена полу-живота. Ови радикали се везивањем за спински маркер стабилизују и детектују EPR техником. Ова техника такође омогућава одређивање врсте радикала и кинетику њиховог формирања.

У 27 mL PRO-MLV додато је 4,5 mL 1 M раствора спинског маркера (DEPMPO) и 13,5 mL 10 мас% раствора ресвератрола у етанолу (или иста количина чистог етанола као контрола). Овако се формирају стабилни хидрокси-етил радикали преко којих је могуће утврдити присуство OH радикала (Finkenstein и сар. 1980), а добијени резултати дају увид о утицају ресвератрола на формирање ових радикала. Припремљена смеша је подвргнута UV зрачењу (таласна дужина 254 nm) током 5 минута, а EPR спектри су детектовани одмах након излагања зрачењу при следећим условима: централно поље 332 mT; опсег скенирања 15 mT; снага микроталаса 20 mW, фреквенција микроталаса 9,32 GHz; модуларна фреквенција 100 KHz; модуларна амплитуда 0,1 mT. Интензитет сигнала

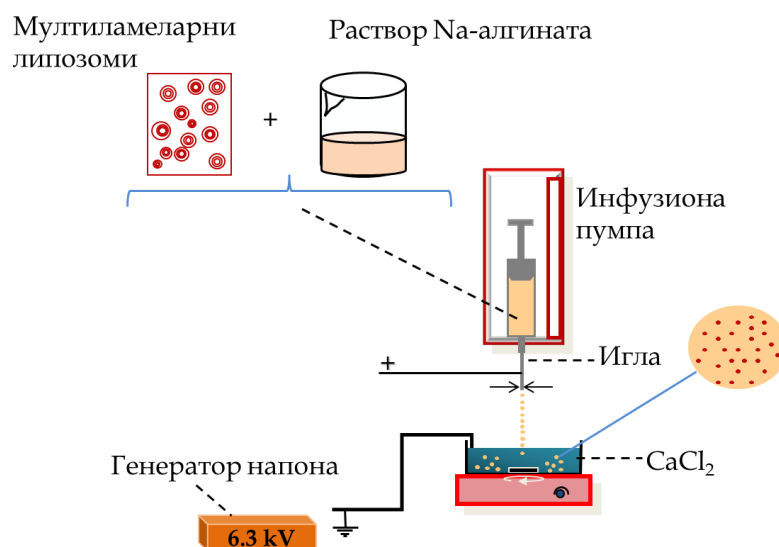
на EPR спектрима пропорционалан је количини везаних радикала па тако однос између интензитета детектованог у присуству ресвератрола (I) и интензитета у одсуству ресвератрола (I₀) даје увид у антиоксидативну способност ресвератрола. Вредности интензитета добијени су при двојној интеграцији сигнала док је врста везаних радикала добијена компјутерском симулацијом EPR спектра.

3.3. Методе припреме и карактеризације система липозоми-алгинат

3.3.1. Припрема система липозоми-алгинат

Натријум-алгинат растворен је у дестилованој води и помешан са липидном суспензијом (PRO-MLV или PRO-MLV-RSV) у запреминском односу 1:1 како би се постигла коначна концентрација натријум-алгината од 1,5 зап% (Dai и сар. 2006). Ова смеша је даље подвргнута екструзији кроз иглу са равном врхом (22 G) при константном протоку од 25,2 mL⁻¹ који је обезбедила инфузиона пумпа (Razel Scientific Instruments, Stamford, САД). Екструзија је изведена уз примену електричног поља које је уведено у систем тако што је једна електрода повезана са иглом, а уземљење је постављено у раствор за гелирање. Растојање између електроде и уземљења износило је 2,5 cm, а напон на електродама генерисала је јединица за висок напон (Model 30R; Bertan Associates, Inc., New York, САД) и он је износио 6,3 kV. Раствор калцијум-хлорида (2%) коришћен је као раствор за гелирање и у њему су формиране микрочестице са инкорпорираним липозомима (ALG-LIP/RSV), тј. систем липозоми-алгинат. Када је припреман узорак који садржи сахарозу (ALG/SUC-LIP/RSV) у раствор за гелирање додато је 15% сахарозе. Трећа врста микрочестица припремљена је када је раствор за гелирање садржао следеће компоненте: 0,5 зап% хитозана, 2 зап% аскорбинске киселине и 2 зап% калцијум-хлорида (ALG/CH-LIP/RSV). Свака формулација раствора за гелирање довела је до јонске измене и формирања сферичних хидрогел микрочестица са инкорпорираним липозомима. Микрочестице су

остављене у раствору током 15 min и онда коришћене за даље анализе (Bugarski и сар. 1994). Шематски приказ дат је на слици 3.6., док је у табели 3.2. дат опис и ознака припремљених система липозоми-алгинат.



Слика 3.6. Шематски приказ припреме микрочестица липозоми-алгинат

Табела 3.2. Формулације система липозоми-алгинат и ознаке узорка

Почетни раствор	Раствор за гелирање	Формулација микрочестица	Ознака
Na-алгинат	CaCl ₂	Ca-алгинатне микрочестице	ALG
Na-алгинат+MLV липозоми	CaCl ₂	Ca-алгинатне микрочестице са инкспулираним MLV липозомима	ALG-LIP
Na-алгинат+MLV липозоми са ресвератролом	CaCl ₂	Ca-алгинатне микрочестице са инкспулираним MLV липозомима са ресвератролом	ALG-LIP/RSV
Na-алгинат+MLV липозоми са ресвератролом и сахарозом	CaCl ₂ +Сахароза	Ca-алгинат-сахароза микрочестице са инкспулираним MLV липозомима са ресвератролом	ALG/SUC-LIP/RSV
Na-алгинат+MLV липозоми са ресвератролом	CaCl ₂ +Хитозан	Ca-алгинат-хитозан микрочестице са инкспулираним MLV липозомима са ресвератролом	ALG/CH-LIP/RSV

Мала количина микрочестица подвргнута је лиофилизацији употребом лабораторијског лиофилизатора (Christ®, model Beta 1-8 LD).

3.3.2. Карактеризација микрочестичних система липозоми-алгинат

3.3.2.1. Одређивање степена ефикасности инкорпорације ресвератрола у системе липозоми-алгинат

Раствори за гелирање испитани су спектрофотометријски на 306 nm пре и после процеса припреме микрочестица. Количина ресвератрола у раствору након гелирања сматра се оном количином која није инкорпорирана у микрочестице. Разлика између количине ресвератрола која је измерена у раствору за гелирање и количине ресвератрола употребљене за припрему микрочестица једнака је количини инкорпорираног RSV. Степен ефикасности инкорпорације (I) прерачунао је према следећој једначини:

$$I(\%) = \frac{(m_s - m_c)}{m_s} \cdot 100 \quad (3.4.)$$

Где је m_s количина ресвератрола употребљена за припрему микрочестица, а m_c количина ресвератрола детектована у раствору за гелирање након припреме честица.

3.3.2.2. Реолошка мерења

Реолошке карактеристике дисперзија које су коришћене за припрему микрочестица испитане су на реометру Discovery Hybrid Rheometer HR2 (TA Instruments, САД) употребом не-осцилаторног теста у режиму паралелних плоча (пречник 25 mm; растојање 1000 μm). Вискозност дисперзија (η) мерена је при брзинама смицања од 0,1 до 1000 s^{-1} на 25 °C.

3.3.2.3. Расподела величина микрочестица

Величина микрочестица анализирана је методом ласерске дифракције на уређају за мерење расподеле величине честица Mastersizer Hydro 2000S (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Велика Британија). При овој анализи дестилована вода је коришћена као медијум. Честице које су

лиофилизоване подвргнуте су процесу рехидрације пре ове анализе у трајању од 30 минута, такође у дестилованој води.

3.3.2.4. Оптичка микроскопија

Увид у сферичност микрочестица добијен је под оптичким микроскопом Leica DC 300 (Leica Microsystems, Wetzlar, Немачка). Честице су биле суспендоване у дестилованој води како не би дошло до скупљања приликом микроскопирања. Анализом слика помоћу софтверског пакета ImageJ одређена је сферичност честица (SF) према једначини коју су дали Чен и сарадници (Chan и сар. 2011):

$$SF = \frac{(d_{\max} - d_{\min})}{(d_{\max} + d_{\min})} \quad (3.5)$$

где је d_{\max} (μm) највећи пречник појединачне микрочестице, а d_{\min} (μm) је најмањи пречник појединачне микрочестице нормалан на d_{\max} . Резултати су дати као средња вредност 30 појединачних микрочестица.

3.3.2.5. Скенирајућа електронска микроскопија

Како би се показала морфологија унутрашњости система липозоми-алгинат, честице су помешане са носачем (CrioFix gel, blue) и тако припремљене су попречно сечене на уређају Cryo Cut Microtome (Leica CM 1850) при температури -24°C . Пресеци дебљине $20 \mu\text{m}$ постављени су на стаклене плочице (Superfrost®) и чуване на -20°C . Након тога плочице са пресецима употребљене су за скенирајућу електронску микроскопију (енгл. *Scanning Electron Microscopy*, SEM). SEM је изведен на уређају Tescan Mira 3 (Република Чешка) при напону од 5 kV . Том приликом употребљена су различита увеличања што је наглашено на микрографијама.

3.3.2.6. Диференцијална скенирајућа калориметрија (DSC)

Термална стабилност чистих компоненти и система липозоми алгинат испитана је и техником DSC. Између 2 и 6 mg сувог узорка постављено је у алуминијумске чанчиће ($30 \mu\text{l}$). Чанчићи су херметички затворени и

подвргнути анализи на уређају DSC131 Evo (SETARAM Instrumentation, Caluire, Француска) који је претходно калибрисан индијумом. Празан чанчић коришћен је као референтни узорак. Истовремено су референтни чанчић и чанчић са узорком постављени у комору уређаја, термостатирани 5 минута на 30 °C након чега је вршено загревање коморе од 30 до 300 °C константним брзином од 10 °C/минути. Струја азота имала је проток од 20 ml/min. Основна линија одређена је када су оба алуминијумска чанчића била празна и подвргнута истим условима. Одузимање базне линије изведено је употребом компјутерског програма CALISTO PROCESSING. Вредности енталпије (J/g) такође су одређене уз помоћ овог софтверског пакета

3.3.2.7. *Механичке карактеристике*

Механичке карактеристике честица одређене су на уређају за тестирање механичких карактеристика материјала AG-X plus Universal Testing Machine (Shimadzu, Japan) у режиму компресије. За ова испитивања коришћена је мерна ћелија од 100 N. Сваки тест се састојао у следећем поступку: једна честица постављена је у петријеву шољу испуњену дестилованом водом; брзина компресије је подешена на 1 mm/min. Такође је софтверски подешена пре-тест функција како би се превазишао утицај околног медијума на крајњи резултат, али такође и да би се постигли исти почетни услови за све узорке. Функција пре-теста подешена је тако да се резултати региструју када иницијална сила постане већа од 0,1 N. Тако је елиминисана грешка која се јавља при постављању почетног положаја као и грешка услед контакта између диска за компресију и саме честице. Диск за компресију који је коришћен при механичким тестовима је цилиндричног облика од нерђајућег челика са великом контактном површином (50 mm у пречнику). Компресија је вршена до постизања 30% деформације (у односу на пречник честице). Сва мерења су вршена на узорку од 30 честица на температури од 25 °C.

3.3.2.8. Испитивање кинетике отпуштања ресвератрола и одређивање коефицијента дифузије

На сличан начин како је описано у одељку 3.2.2.6. испитана је кинетика отпуштања ресвератрола из система липозоми-алгинат. Укратко, око 2 g честица постављено је у донорски део Францове ћелије док је рецепторски део испуњен медијумом (50% раствор етанола) и константно мешан магнетном мешалицом (Klimundova и сар. 2006). Узорци су узимани из дела за узорковање (Слика 3.5.) у временским интервалима током првих 6 сати, а онда и у 24. сату. Концентрација ресвератрола одређена је спектрофотометријски на 306 nm. Резултати добијени на основу кинетике отпуштања даље су анализирани како би се одредио ефективни коефицијент дифузије и отпор преносу масе ресвератрола из система липозоми – алгинат. Ефективни коефицијент дифузије је прерачунао на исти начин како је то описано у одељку 1.2.3.1.

3.4. Статистичка анализа

Статистичка анализа података извршена је помоћу програмског пакета Microsoft Office 2010 Excel (Microsoft Corporation, САД), применом Студентовог t-теста. Вредности P мање од 0,05 сматране су статистички значајним.

4. Резултати

Применом методе танког филма и пролипозомне методе припремљена су три узорка са инкапсулираним ресвератролом и три узорка без ресвератрола који су служили као контроле. По један од ових узорка је садржао велике MLV липозоме док су остала два узорка третирана ултразвучном сондом и екструзијом у циљу смањења величине и ламеларности (Табела 3.1.). Узорци су даље испитани и упоређени са аспекта величине, стабилности, зета потенцијала, степена инкапсулације, антиоксидативне активности, а испитане су и друге карактеристике ових система како је то наведено у одељку 3.2.2.

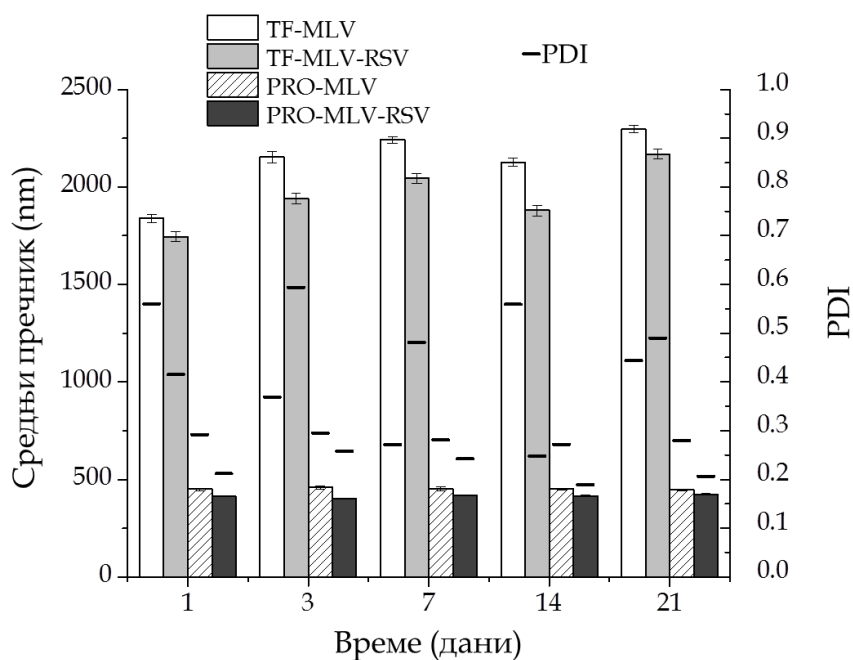
4.1. Карактеризација липозома са инкапсулираним ресвератролом

4.1.1. Одрђивање величине липозома и њихове стабилности

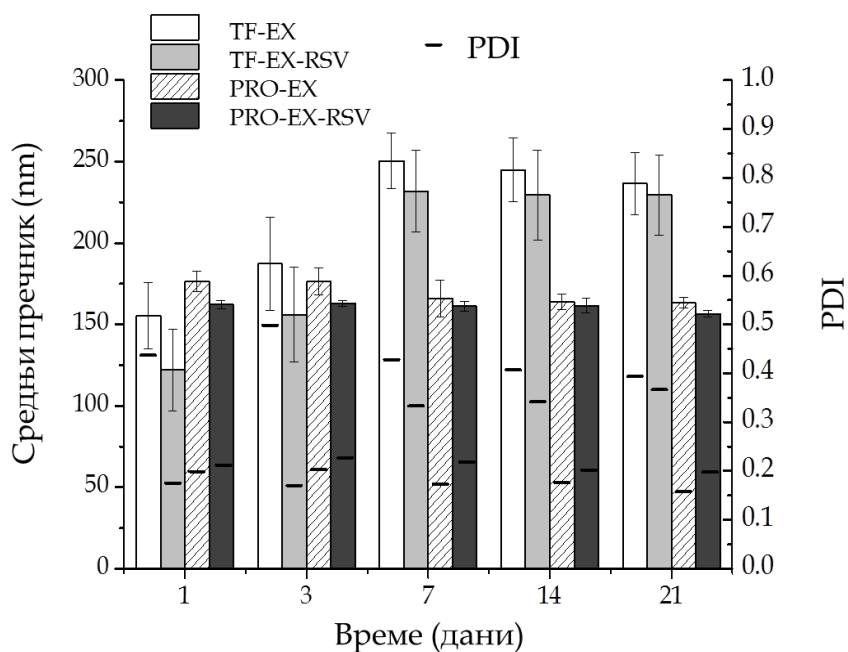
Стабилност липозома праћена је током двадесет и једног дана. Величина липозома, PDI и зета потенцијал мерени су првог, трећег, седмог, четрнаестог и двадесет првог дана након припреме узорка. Резултати су приказани на слици 4.1. и показују да су липозоми припремљени PRO методом били око четири пута мањи него липозоми припремљени методом TF. Уочено је и да су методом TF добијени липозоми хетерогене расподеле, док је метода PRO обезбедила монодисперзну суспензију липозома (вредности PDI биле су испод 0,2). Липозоми који су накнадно смањени применом сонде имали су средње пречнике између 120 и 290 nm, док су екструзијом добијени липозоми са средњим пречником између 150 и 270 nm (Слика 4.1.б и 4.1.в). Екструзиона техника дала је боље резултате у погледу хомогености липозомне суспензије (PDI вредности од 0,15 до 0,22) у поређењу са техником соникације (PDI вредности од 0,23 до 0,47). Сви узорци показали су негативну вредност површинског зета наелектрисања, конкретно липозоми добијени TF методом имали су

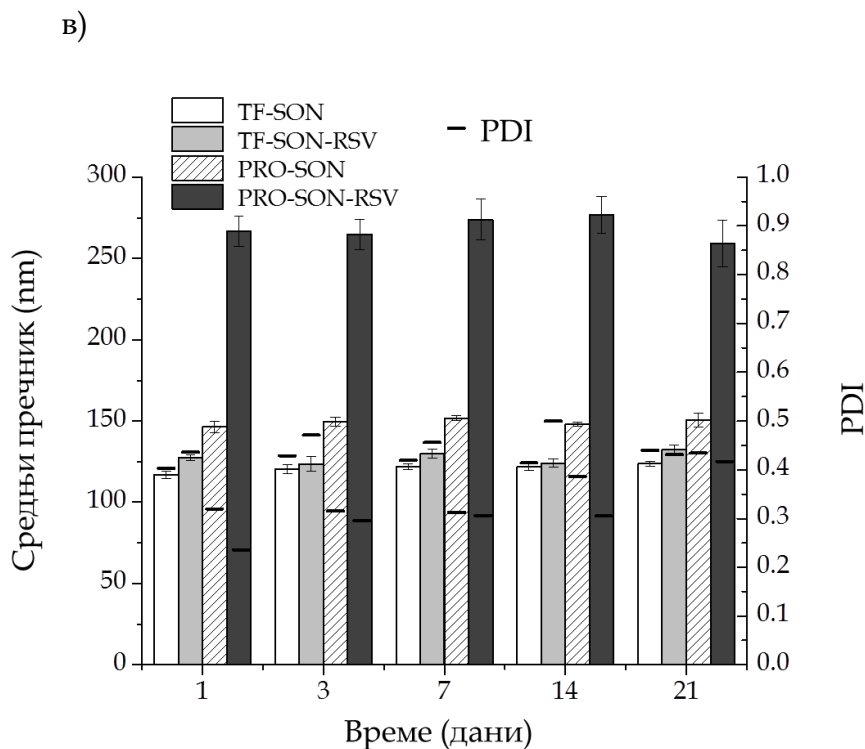
апсолутне вредности зета потенцијала од $-53,1$ до $-43,7$ mV, док су липозоми припремљени PRO методом имали вредност зета потенцијала око -25 mV. Резултати су такође показали да ресвератрол није имао утицаја на површинско наелектрисање.

а)



б)

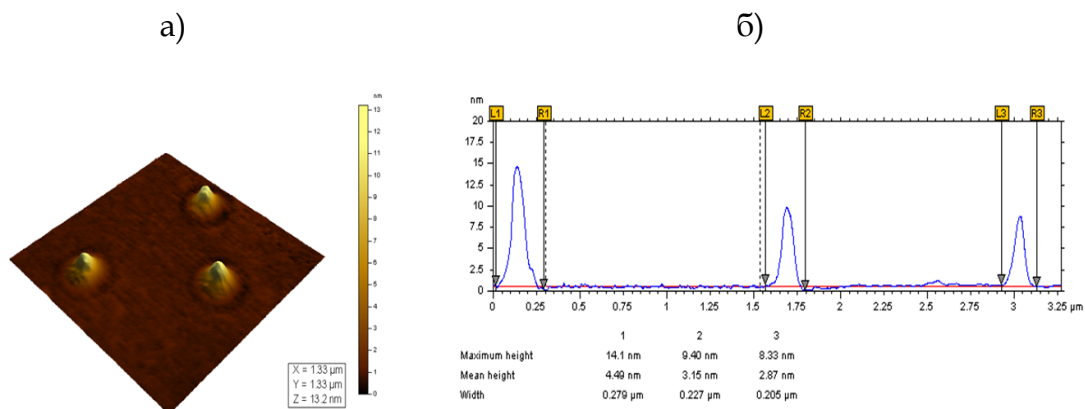




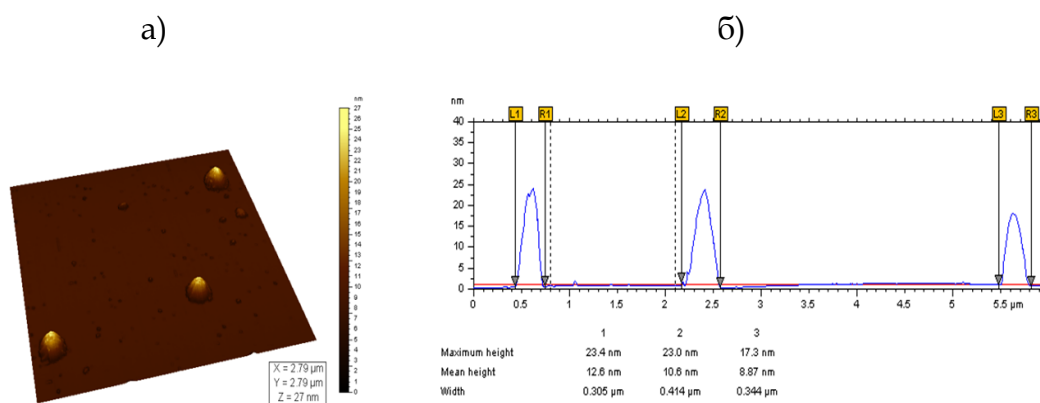
Слика 4.1. Средњи пречници и PDI вредности липозомних дисперзија током три недеље складиштења (барови представљају стандардне девијације при мерењу 3 узорка) а) MLV; б) липозоми смањени техником екструзије; в) липозоми смањени техником соникације

4.1.2. Микроскопија атомских сила

Са циљем добијања информација о топологији липозома са и без ресвератрола изведена су AFM мерења. Тродимензијоналне топографске слике (Слика 4.2.а) показују округласте структуре, липозоме без ресвератрола (PRO-MLV) са пречницима од око 270 nm док слика 4.3.а показује липозоме са инкапсулираним ресвератролом (PRO-MLV-RSV) и средњим пречником око 354 nm. Пречници честица одговарају ширини пикова на слици (Слика 4.2.б и 4.3.б). Регистровани су и подаци о висини попречних пресека липозома у овим узорцима (Слика 4.2.б и 4.3.б) где се види да је средња висина промењена за око 7,18 nm код узорака са ресвератролом. Слике такође указују на различите површинске хрпавости узорака.



Слика 4.2. AFM микрографије PRO-MLV узорка а) 3D топографија б) пречник и висина липозома



Слика 4.3. AFM микрографије PRO-MLV-RSV узорка а) 3D топографија б) пречник и висина липозома

4.1.3. Степен инкапсулације ресвератрола и његова релативна антиоксидативна активност

Степен инкапсулације ресвератрола у липозоме и његова релативна антиоксидативност приказани су у табели 4.1. Резултати указују на то да су сви припремљени липозоми имали висок степен инкапсулације (од 92 до 97%), осим липозома третираних ултразвучном сондом који су показали степен инкапсулације ресвератрола између 44 и 55%. Ови резултати показују предност технике екструзије над техником соникације са аспекта степена инкапсулације. Такође, из табеле је уочљиво да је PRO метода обезбедила већи степен инкапсулације ресвератрола него што је то случај са TF методом.

Испитивање релативне антиоксидативности ресвератрола има за циљ да покаже утицај методе припреме на очување антиоксидативних карактеристика ресвератрола. Тако је релативна антиоксидативна активност ресвератрола инкапсулираног у липозоме изражена у односу на контролни узорак и дата у табели 4.1. као %инхибиције. Контролни узорак био је раствор ресвератрола у етанолу припремљен у истој концентрацији која је коришћена као иницијална при припреми липозома. Добијени резултати приказани у табели 4.1. су у складу са резултатима добијеним за вредност степена инкапсулације. Када се резултати %инхибиције нормализују са резултатима степена инкапсулације добијају се вредности које указују да је %инхибиције очуван (око 90%), али се овај резултат не односи на липозоме третиране ултразвучном сондом где се %инхибиције драстично смањује на вредности између 13 и 30%.

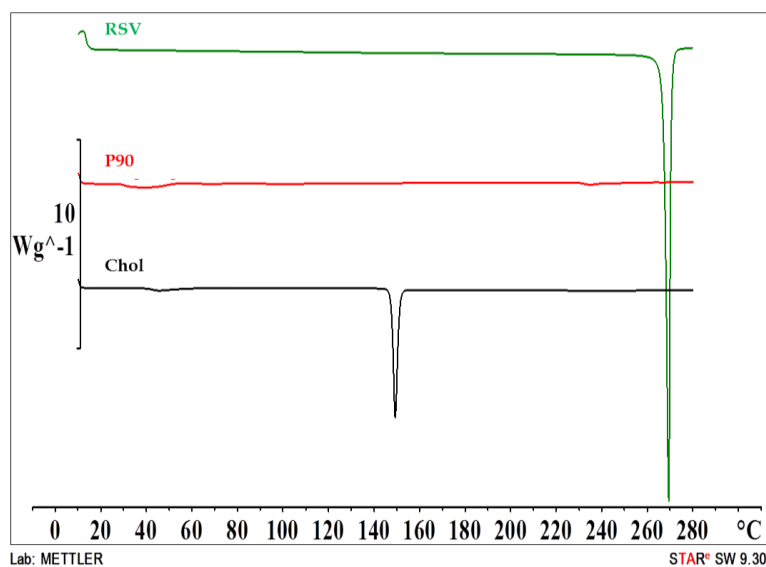
Табела 4.1. Степен инкапсулације, Е (%) ресвератрола у липозоме и релативна антиоксидативна активност ресвератрола, %инхибиције (резултати су дати као средња вредност \pm стандардна девијација (n = 3))

Узорак	Е (%)	%инхибиције
TF-MLV-RSV	92,88 \pm 0,27	88,38 \pm 5,22
TF-SON-RSV	44,22 \pm 1,26	38,86 \pm 1,46
TF-EX-RSV	92,27 \pm 0,82	90,42 \pm 1,17
PRO-MLV-RSV	97,36 \pm 2,00	90,35 \pm 1,74
PRO-SON-RSV	55,88 \pm 2,81	40,07 \pm 4,27
PRO-EX-RSV	96,08 \pm 0,62	94,66 \pm 0,57

4.1.4. Диференцијална скенирајућа калориметрија

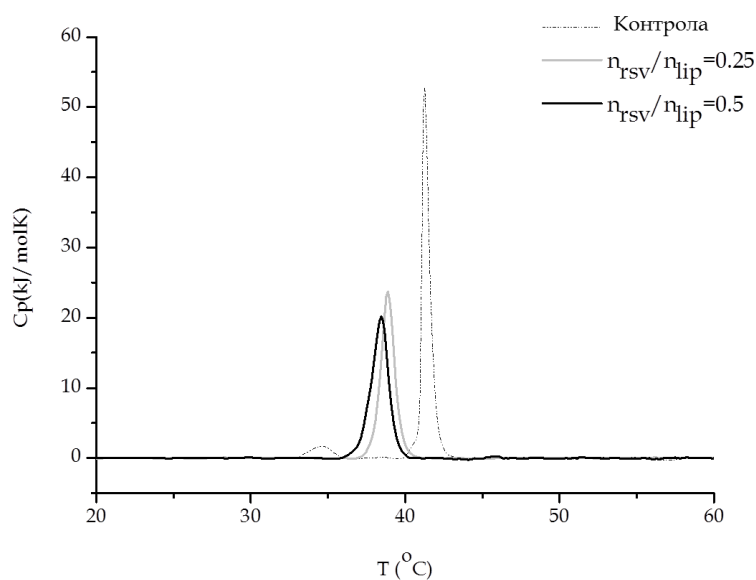
DSC термограми снимљени су за чист ресвератрол, P90 и Chol (Слика 4.4.) као компоненте липозомних суспензија, као и за липозоме са и без ресвератрола припремљене различитим методама и техникама (Слика 4.5.). Оштар ендотермни пик уочен је на термограму који одговара ресвератролу при температури од 267°C и овај пик одговара тачки топљења кристала ресвератрола. На термограму који се односи на холестерол уочен је широк ендотермни пик између 30 и 60°C, као и оштар

пик при температури од 147°C који одговара тачки топљења холестерола. Када је у питању P90 видљиве су две ендотермне промене: широк ендотермни пик при температурном опсегу од 30 до 80°C и пик који одговара деградацији P90 изнад 190°C. Када се упореде термограми који одговарају празним липозомима и липозомима са ресвератролом нису уочљиве значајне промене (Слика 4.5.б). На термограму који одговара липозомима са инкапсулираним ресвератролом приметно је одсуство пика који одговара температури топљења ресвератрола што доводи до закључка да је ресвератрол инкапсулиран унутар липозома и да постоје интеракције између ресвератрола и компоненти које чине липидни двослој у липозомима. Овакав закључак потврђује и слабије изражени пик који одговара P90, односно његово премештање ка нижим температурама, као и одсуство пика који одговара температури топљења холестерола (Слика 4.5.).



Слика 4.4. DSC термограми чистог ресвератрола, фодфолипона 90 и холестерола

ресвератрола. Резултати су приказани у виду термограма на слици 4.6. док су у табели 4.2. дати термодинамички параметри фазне трансформације за DPPC липозоме (TF-DPPC) којима је додат ресвератрол у различитим моларним односима. Када TF-DPPC липозоми нису под утицајем ресвератрола (Слика 4.6, контрола), T_m се детектује као интензиван и оштар пик, док се температура пре-транзиције (T_{pre}) читава као слаб и широк пик на нижим температурама. Додатак ресвератрола доводи до смањења температуре фазне трансформације (гел-течно) у зависности од концентрације ресвератрола, па тако без ресвератрола ова температура износи $41,3^{\circ}\text{C}$ док при односу ресвератрола према липидима $n_{rsv}/n_{lip} = 0,5$ има вредност $38,3^{\circ}\text{C}$. Повећање удела ресвератрола доводи и до ишчезавања пика који се односи на T_{pre} . Енталпија преласка из гел у течност кристалинично стање смањује се са додатком ресвератрола и за узорак где је однос ресвератрола и липида (n_{rsv}/n_{lip}) $0,5$ ово смањење износи $5,73 \pm 0,21$ kJ/mol.



Слика 4.6. DSC термограми TF-DPPC липозома без ресвератрола (контрола) и у присуству ресвератрола у два молска односа

Табела 4.2. Термодинамички параметри TF-DPPC липозома без ресвератрола и у присуству ресвератрола у два моларна удела

TF-DPPC	T_{pre}^a (°C)	T_m^b (°C)	ΔH_{pre}^b (kJ/mol)	ΔH_{cal}^c (kJ/mol)
Контрола	34,8 ±0,2	41,3 ±0,1	3,14 ±0,21	34,47 ±0,17
$n_{rsv}/n_{lip} = 0,25$	/	38,9 ±0,1	/	30,46 ±0,21
$n_{rsv}/n_{lip} = 0,5$	/	38,3 ±0,2	/	28,74 ±0,21

^a Температура пре-транзиције

^b Температура главног фазног прелаза липида из гел у течно стање

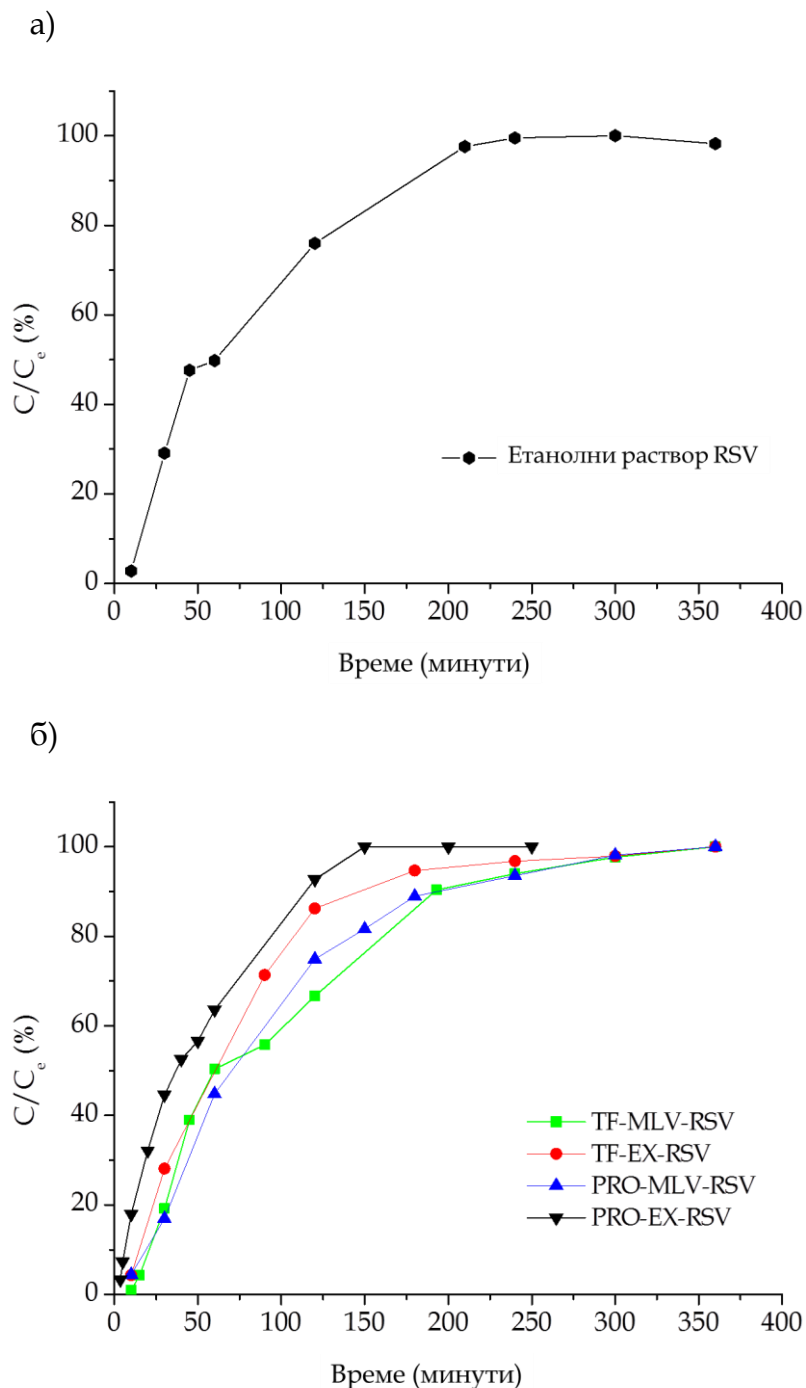
^c Енталпија пре-транзиције

^e Енталпија главног фазног прелаза липида из гел у течно стање

4.1.5. Испитивање кинетике отпуштања ресвератрола и одређивање коефицијента дифузије

Експерименти који се односе на кинетику отпушта ресвератрола из липозома изведени су током 6 h уз употребу Францове дифузионе ћелије. Резултати су приказани на слици 4.7. где је представљена зависност C/C_e од времена (где је C концентрација ресвератрола у тренутку мерења, а C_e равнотежна концентрација ресвератрола). Резултати отпуштања ресвератрола из липозома упоређени су са отпуштањем ресвератрола из етанолног раствора који је служио и као контрола (иста почетна концентрација ресвератрола). Четири репрезентативна узорка су одабрана за праћење отпуштања ресвератрола (TF-MLV-RSV, PRO-MLV-RSV, TF-EX-RSV и PRO-EX-RSV) због високог степена инкапсулације који је постигнут при припреми ових узорака.

Према добијеним резултатима (Слика 4.7.а) дифузија ресвератрола из контролног раствора одвија се брзо и концентрација ресвератрола у акцепторском делу достиже максимум већ после 100 min. Дифузија ресвератрола је очекивано спорија из липозома и у овим узорцима се максимална концентрација ресвератрола у акцепторском делу достиже након двоструко више времена, 200 min. Са слике 4.7.б је такође уочљиво да су MLV липозоми током првих 100 min експеримента отпустили око 50% ресвератрола док су липозоми третирани екструзијом отпустили око 80% ресвератрола у истом временском интервалу.



Слика 4.7. Кинетика отпуштања ресвератрола а) из етанолног раствора; б) из липозомних дисперзија

Као што је већ објашњено у одељку 1.2.3.1. ефективни дифузиони коефицијенти одређени су из нагиба линеарног дела кривих формираних из зависности $\ln\left(\frac{C_D^0 - C_R^0}{C_D - C_R}\right)$ од времена (Слика 4.8.) и приказани у

табели 4.3., колона 3. Даље, укупни отпор преносу масе кроз мембрану може се израчунати када је позната дебљина слоја кроз који се дифузија одвија као и коефицијент дифузије према једначини:

$$R = \frac{\delta}{D} \quad (4.1.)$$

где је δ дебљина слоја у коме се одвија дифузија, а D коефицијент дифузије. У случају дифузије из липозома отпор се може третирати као збир појединачних дифузионих отпора мембране и липозома (редно везани отпори):

$$R = \frac{\delta_0}{D_{eff}} = R_M + R_{lip} \quad (4.2.)$$

где је δ_0 укупна дебљина узорка (мембрана и липозоми), D_{eff} ефективни коефицијент дифузије добијен из једначина 1.15., а R_M , R_{lip} , дифузиони отпори мембране и липозома.

Отпор мембране може се одредити на основу коефицијента дифузије ресвератрола из етанолног раствора и измерене дебљине мембране δ_M . У овим експериментима ресвератрол дифундује кроз раствор и кроз мембрану. Реално је било закључити да је главни отпор дифузији у овом систему сама мембрана. Дебљина мембране износила је 0,21 mm. Отпор мембране је:

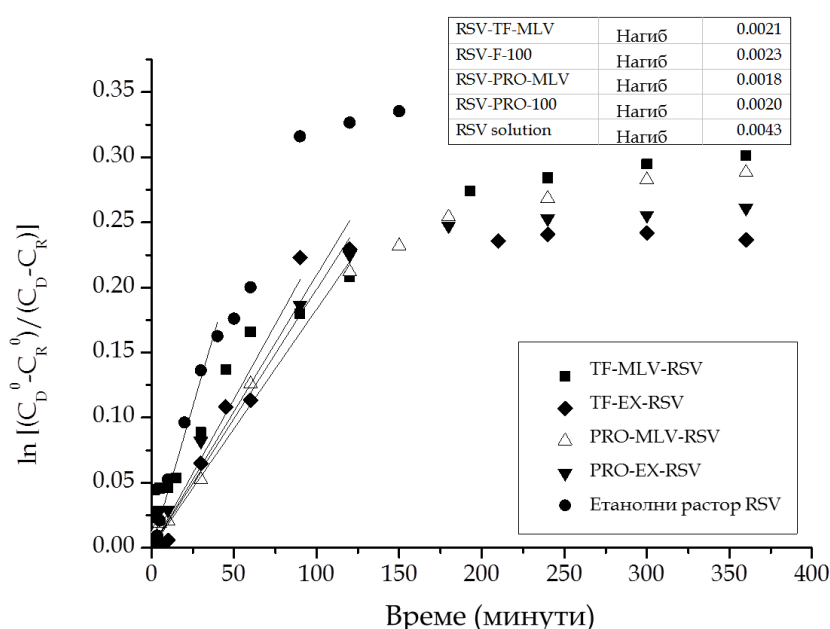
$$R_M = \frac{\delta_M}{D} \quad (4.3.)$$

Са друге стране дифузија ресвератрола из липозома нешто је мало другачија. Ресвератрол дифундује кроз липозоме много спорије него кроз раствор и кроз мембрану, тако да се на основу добијеног ефективног коефицијента дифузије може израчунати и отпор само липозома:

$$R_{lip} = \left(\frac{\delta_0}{D_{eff}} \right) - \frac{\delta_M}{D} \quad (4.4.)$$

Вредности тако израчунатих отпора дати су у табели 4.3. Укупни отпори дифузији који потичу од синтетичке мембране и липидне мембране дати су у табели 4.3., колона 4. Отпор који потиче само од синтетичке мембране одређен је на основу дифузије ресвератрола из раствора (табела 4.3., колона 4, ред 1). Отпор преносу масе који потиче само од липидне

мембране добијен је одузимањем вредности отпора синтетичке мембране од укупног отпора, па су ове вредности дате у табели 4.3, колона 5. Резултати указују на то да MLV липозоми имају већи отпор преносу масе за око 75% у поређењу са мањим липозомима. Анализирајући све резултате уочљиво је да липозоми обезбеђују већи отпор дифузији ресвератрола за цео ред величине у поређењу са отпором који даје синтетичка мембрана.



Слика 4.8. Дифузија ресвератрола из липозома апроксимирана другим Фиковим законом дифузије

Табела 4.3. Ефективни коефицијенти дифузије ресвератрола и дифузиони отпори код липозома са инкапсулираним ресвератролом

Узорак	δ_0 , mm	D_{eff} , m ² /s	R, s/m	R_{lip} , s/m
Етанолни раствор RSV	2,02	$2,87 \cdot 10^{-9}$ *	$7,04 \cdot 10^5$ §	/
PRO-MLV-RSV	2,06	$1,20 \cdot 10^{-9}$	$1,72 \cdot 10^6$	$9,55 \cdot 10^5$
PRO-EX-RSV	2,08	$1,34 \cdot 10^{-9}$	$1,55 \cdot 10^6$	$6,58 \cdot 10^5$
TF-MLV-RSV	2,08	$1,81 \cdot 10^{-9}$	$1,17 \cdot 10^6$	$7,25 \cdot 10^5$
TF-EX-RSV	2,07	$1,54 \cdot 10^{-9}$	$1,34 \cdot 10^6$	$5,90 \cdot 10^5$

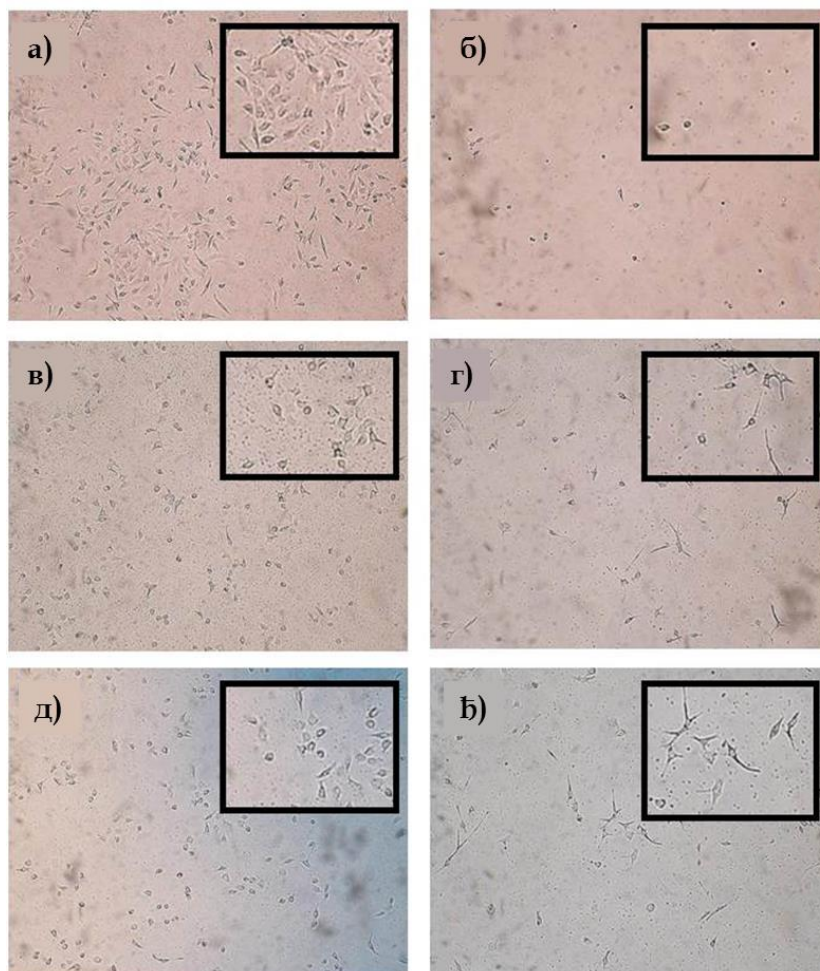
*Коефицијент дифузије кроз мембрану

§ Отпор дифузији који даје мембрана (Rm)

4.1.6. Морфолошка испитивања ћелијских култура

Липозоми припремљени PRO методом коришћени су као модел-носачи с обзиром да су показали добре карактеристике, али и веће степене инкапсулације па самим тим могу да буду и потенцијално токсичнији од узорака припремљених методом TF. Морфолошке карактеристике кератиноцита упоређене су за оне ћелије које су изложене утицају празних липозома, утицају липозома са инкапсулираним ресвератролом, фосфатном пуферу (као негативна контрола) и утицају раствора ресвератрола (као позитивна контрола). Како је приказано на слици цитотоксичност ресвератрола је значајно смањена његовом инкапсулацијом у липозоме. Морфологији ћелија третираних липозомима са инкапсулираним ресвератролом остаје очувана што је уочено и код ћелија третираних празним липозомима, а све у поређењу са негативном контролом (Слика 4.9.а).

Ипак, излагање ћелија празним липозомима индуковало је промене у смислу измењеног облика ћелија (ћелије су сферичније), а ова појава је још израженија код излагања ћелија раствору ресвератрола. Ћелије осим што постају кружног облика, постепено се одвајају и постају ређе.



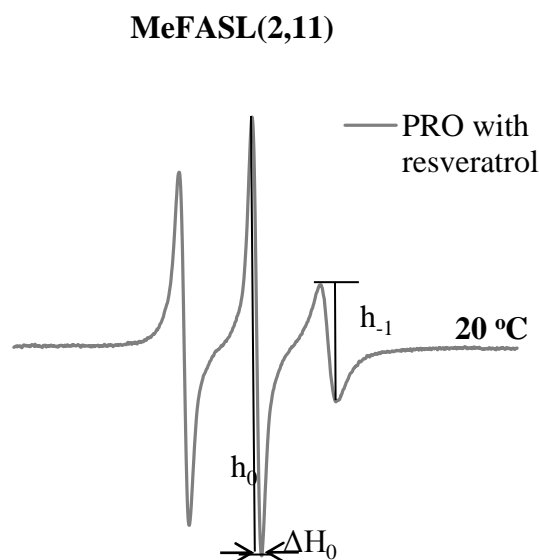
Слика 4.9. Репрезентативне трансмисионе микрографије морфологије ћелијске линије NCTC 2544 третиране: а) фосфатним пуфером (негативна контрола); б) етанолним раствором RSV (позитивна контрола); в) PRO-EX, г) PRO-EX-RSV; д) PRO-MLV; и е) PRO-MLV-RDV. Микрографије су снимљене након 48 h инкубације

4.1.7. Електронска парамагнетна резонанција

Емпиријско корелационо време (τ) је параметар употребљен за процену релативних промена у флуидности мембране и добија се према следећој једначини:

$$\tau = k \cdot \Delta H_0 \cdot \left(\frac{h_0}{h_{-1}} - 1 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.5.)$$

где су ΔH_0 , h_0 и h_{-1} параметри добијени из EPR спектра како је означено на слици 4.10., како су то описали Šentjurs и сарадници (1998), док је k константа типична за спински маркер који је коришћен.

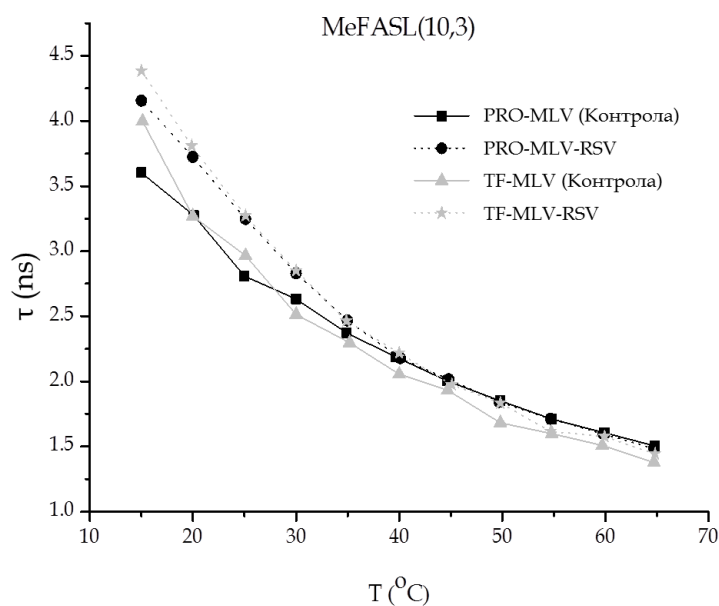


Слика 4.10. Пример EPR спектра липозома са ресвератролом припремљених PRO методом уз употребу спинског маркера MeFASL (2,11) на 20°C

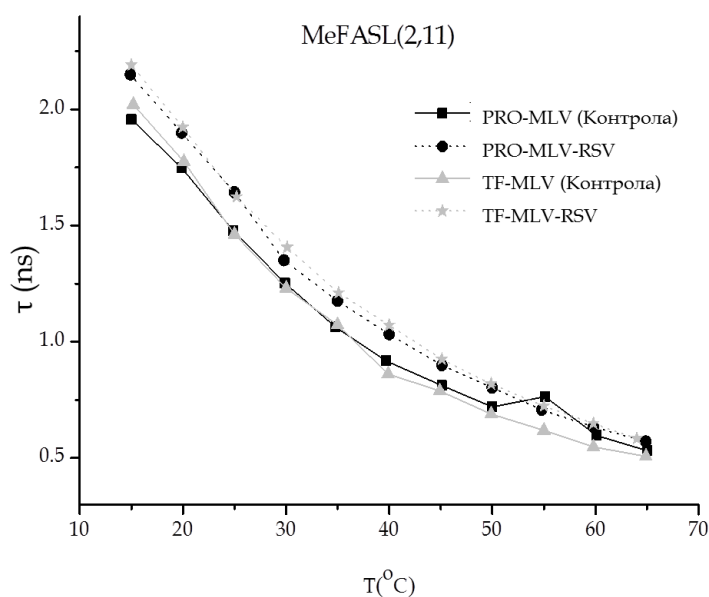
У конкретном случају оба спинска маркера и MeFASL (10,3) и MeFASL (2,11) имају исту вредност параметра k : $5,9387E^{-10} \text{ G}^{-1}$. MeFASL (10,3) дефинише флуидност липозомне мембране при површини (ближе границе липид-водени медијум), док MeFASL (2,11) даје увид у флуидност липозомне мембране ближе унутрашњости структуре. На слици 4.11. приказана је температурна зависност параметра τ при употреби спинског маркера MeFASL (10,3) односно MeFASL (2,11). У оба случаја, емпиријско корелационо време опада са порастом температуре. При вишим температурама, липозомна мембрана је мање уређена односно флуиднија. Нешто краће емпиријско корелационо време уочено је при употреби спинског маркера MeFASL (2,11) него при употреби маркера MeFASL (10,3) (Слика 4.11.б).

Са слике 4.11. је такође уочљиво да инкапсулација ресвератрола повећава емпиријско корелационо време у поређењу са контролним узорком (празни липозоми). Утицај ресвератрола на флуидност мембране изражена је преко емпиријског корелационог времена и у поређењу са контролом види се да овај параметар градуално опада са порастом температуре (посматрано у спољашњем делу липидне мембране употребом спинског маркера MeFASL (10,3)). У односу на контролу, емпиријско корелационо време је веће код узорака са ресвератролом за око 15% при температури од 15°C. На вишим температурама разлика се смањује и постаје занемарљива при температурама изнад 40°C. Када су испитивања флуидности вршена уз употребу спинског маркера MeFASL (2,11) утицај ресвератрола је уочљив у целом температурном опсегу. Вредности емпиријског корелационог времена за узорке са ресвератролом су за око 10% већи при свим испитаним температурама. Липозоми припремљени TF и PRO методом показали су исте особине, а њихова емпиријска корелациона времена су имала исти тренд.

а)



б)



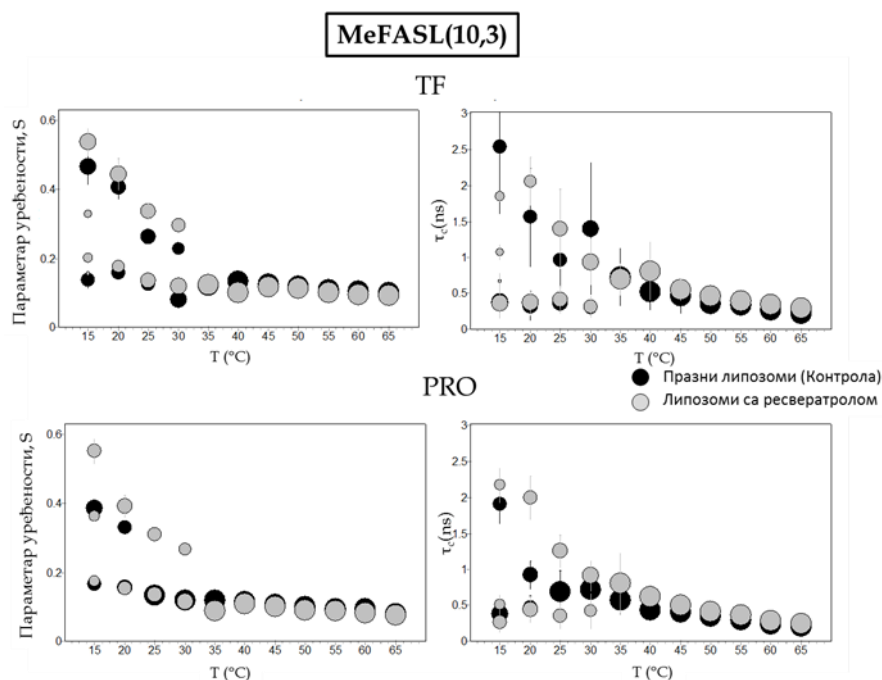
Слика 4.11. а) Температурна зависност емпиријског корелационог времена детектована употребом спинских маркера MeFASL(10,3) и б) MeFASL (2,11).

Липозоми припремљени методом TF и PRO. Стандардне девијације два независна мерења биле су испод 5%

Како се флуидност липозомне мембране мења у зависности од региона, примењена је и компјутерска симулација спектра. Симулацијом одређен је број региона са различитом флуидношћу мембране као и флуидност сваког региона. Флуидност је окарактерисана кроз параметар уређености, S (енгл. *Order parameter*) и кроз ротационо корелационо време, τ_c . Ови параметри описују ред орјентације и динамику спинског маркера у конкретном региону мембране. Температурне зависности тих параметара представљене су на слици 4.12. за спински маркер MeFASL (10,3) и на слици 4.13. за спински маркер MeFASL (2,11) како за контролне узорке тако и за липозоме са инкапсулираним ресвератролом.

Величина симбола на слици представља пропорције спинских маркера у различитим регионима мембране. Ближе површини липидног двослоја спектар добијен употребом спинског маркера MeFASL (10,3) може да се

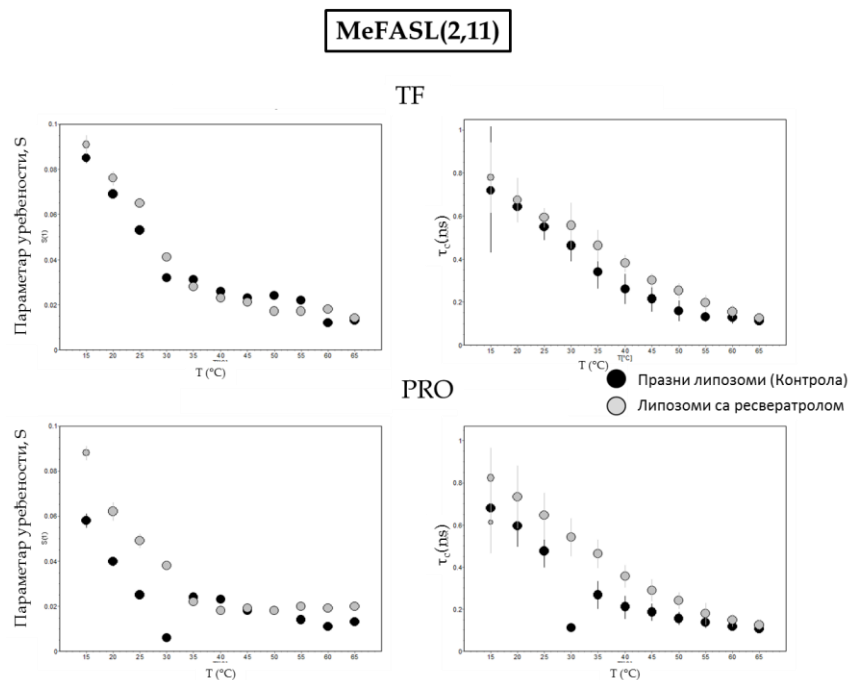
моделује са три спектралне компоненте. То указује на постојање три различита региона са различитим флуидностима при температурама нижим од 20°C (Слика 4.12.). Са порастом температуре мембрана постаје хомогенија, а број региона се смањује. Код липозома припремљених методом TF при температурама изнад 30°C EPR спектар може да се моделује са само једном спектралном компонентом (Слика 4.12.а). За липозоме припремљене PRO методом мембране постају хомогене већ при температури од 25°C (Слика 4.12.б). Ипак, у присуству ресвератрола детектовани су региони са већим вредностима параметра S све до 30°C. При вишим температурама ротационо корелационо време има веће вредности у присуству ресвератрола, како за TF тако и за PRO методу.



Слика 4.12. Температурна зависност параметра уређености (S, лево) и ротационог корелационог времена (τ_c , десно) за липозоме припремљене методом TF (горе) и методом PRO (доле) уз употребу спинског маркера MeFASL (10,3). Зависности су добијене као резултат компјутерске симулације у програму EPRSIM (<http://www.ijs.si/ijs/dept/epr/>). Величина симбола указује на пропорције сваког домена

У унутрашњем делу липидне мембране уочена је већа хомогеност (Слика 4.13.). Вредност параметра уређености је ниска (0,1 при температури 15°C)

и са порастом температуре достиже вредност 0 како за TF тако и за PRO методу. У присуству ресвератрола τ_c (при употреби спинског маркера MeFASL (2,11)) расте, док код параметра S нису уочене значајне промене.

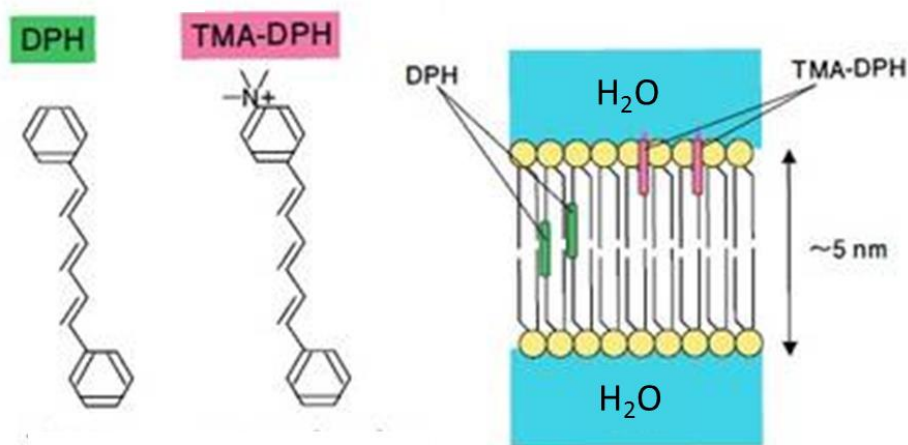


Слика 4.13. Температурна зависност параметра уређености (S, лево) и ротационог корелационог времена (τ_c , десно) за липозоме припремљене методом TF (горе) и методом PRO (доле) уз употребу спинског маркера MeFASL (2,11). Зависности су добијене као резултат компјутерске симулације у програму EPRSIM (<http://www.ijs.si/ijs/dept/epf/>). Величина симбола указује на пропорције сваког домена

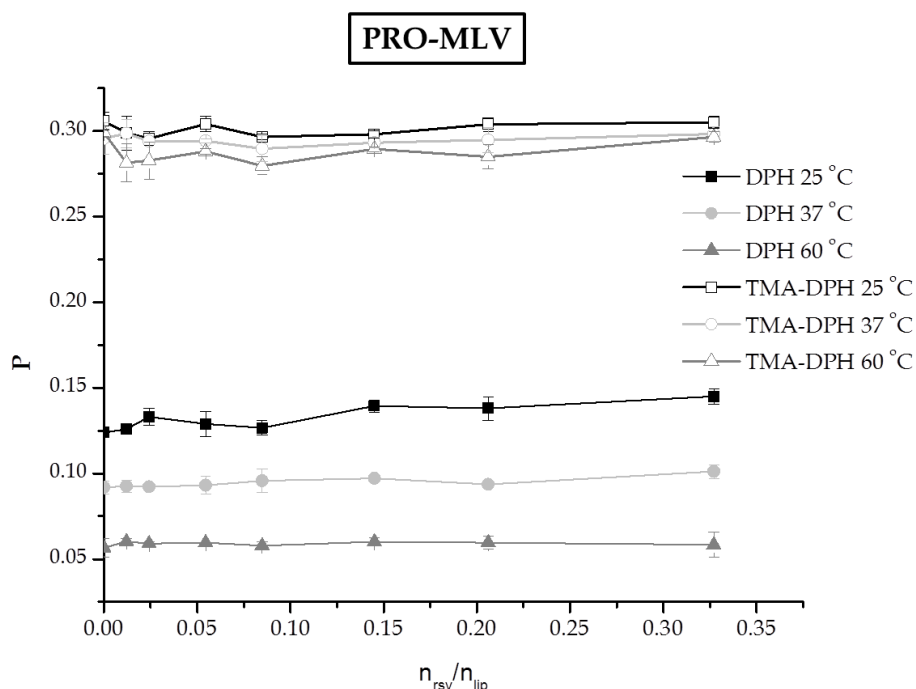
EPR примењена је и на липозоме који су припрељени на исти начин како је то описано у одењку 3.2.2.8., али су накнадно мешани са раствором ресвератрола у етанолу у одговарајућој концентрацији. Утицај ресвератрола на параметар τ био је исти као и код липозома са инкапсулираним ресвератролом (за TF и за PRO методу) кроз цео температурни опсег.

4.1.8. Флуоресцентна спектроскопија

DPH и TMA-DPH су флуоро-маркери који су употребљени за одређивање утицаја ресвератрола на флуидност липидног двослоја (липидне мембране). DPH је неполарни маркер и он се користи за детекцију промена у унутршњости липидне мембране. Са друге стране, TMA-DPH се користи за детекцију промена флуидности мембране у близини поларних делова липида (Слика 4.14.). Вредности флуоресцентне поларизације за оба флуоро-маркера која су додата липозомима припремљеним PRO методом и титрисани ресвератролом, дата су на слици 4.15.



Слика 4.14. Шематски приказ положаја флуоро-маркера у липозомној мембрани

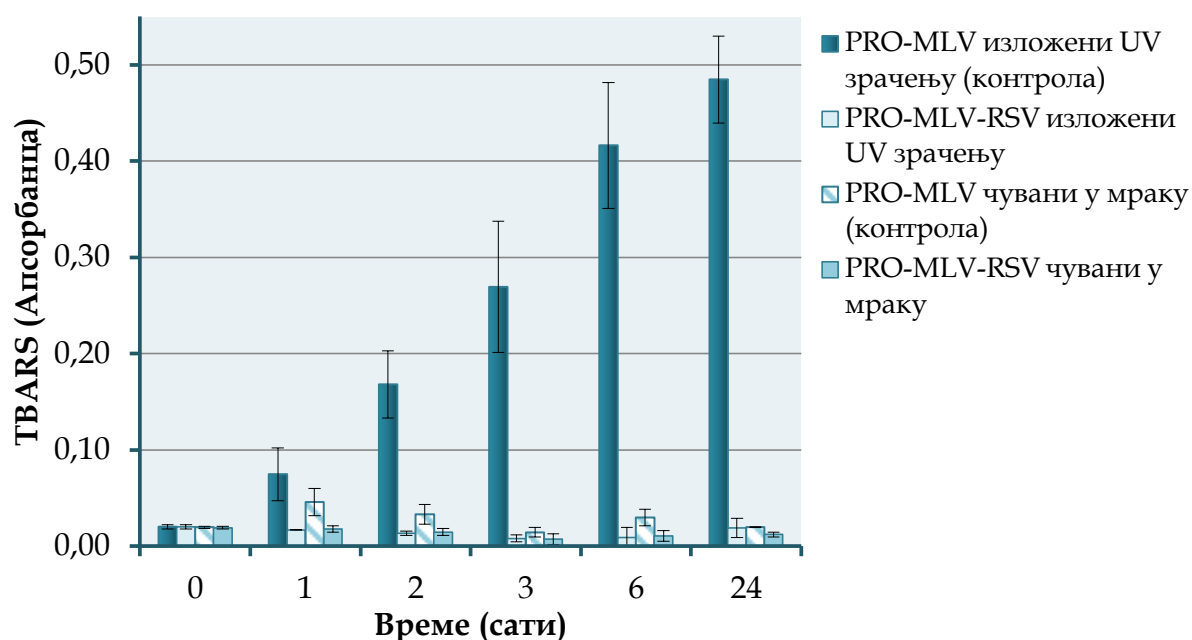


Слика 4.15. Флуоресцентна поларизација маркера DPH и TMA-DPH додатих липозомима припремљеним PRO методом и титрираних ресвератролом при различитим температурама

Утицај ресвератрола је најизраженији у унутрашњости мембране, што је детектовано употребом DPH на 25°C, где вредности P расту за 20% (Слика 4.15.). Мерења изведена при другим температурама и употребом TMA-DPH показала су пораст вредности P од највише 5%. TF метода дала је сличне резултате као и PRO метода.

4.1.9. Тиобарбитурни тест

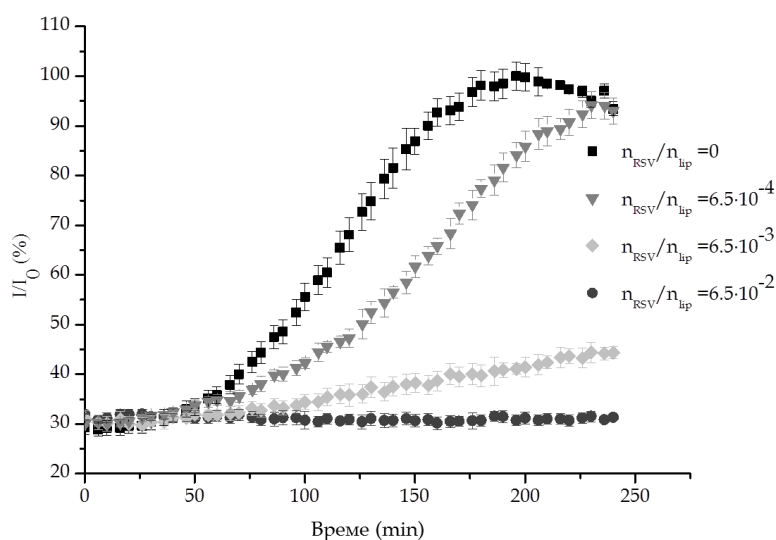
TBARS тест је коришћен за квантитативно одређивање липидне пероксидације. Резултати теста након 6h излагања PRO-MLV и PRO-MLV-RSV узорка UV зрачењу дата су на слици 4.16. Липозоми без ресвератрола који су били изложени зрачењу показали су скоро 100 пута веће вредности TBARS него исти складиштени у мраку. Са графика се види да након 3h зрачења ресвератрол инхибира пероксидацију липида око 95% у односу на узорке без ресвератрола који су изложени једнаком зрачењу. Исти резултат добијен је и за липозоме припремљене TF методом.



Слика 4.16. Ефекат ресвератрола на липидну пероксидацију за узорке изложене UV зрачењу и за узорке чуване у мраку (TBARS тест, апсорбанца на 532 nm)

4.1.10. Праћење кинетике липидне оксидације уз употребу флуоресцентног липофилног маркера BODIPY 581/591 C11

Да би се утврдио утицај ресвератрола на кинетику липидне оксидације употребљен је флуоресцентан маркер BODIPY 581/591 C₁₁. Такође, испитан је и утицај удела ресвератрола у односу на липиде на ову кинетику. На слици је приказана зависност односа I/I₀ од времена, где су I и I₀ интензитети спектра у присуству и одсуству ресвератрола, респективно. Резултати кинетике су приказани за три различита удела ресвератрола ($n_{\text{rsv}}/n_{\text{lipo}}$) почев од 0 па до $6,5 \cdot 10^{-2}$ (Слика 4.17.). Као што се може уочити са графика за све узорке постоји тренд раста липидне пероксидације са временом, осим код узорка где $n_{\text{rsv}}/n_{\text{lipo}}$ износи $6,5 \cdot 10^{-2}$, односно код узорка где је концентрација ресвератрола највећа. Криве такође указују на смањење липидне пероксидације са порастом удела расвератрола. Када је у питању узорак са највећим уделом ресвератрола липидна пероксидација је потпуно обустављена током инкубационог периода од 4h.



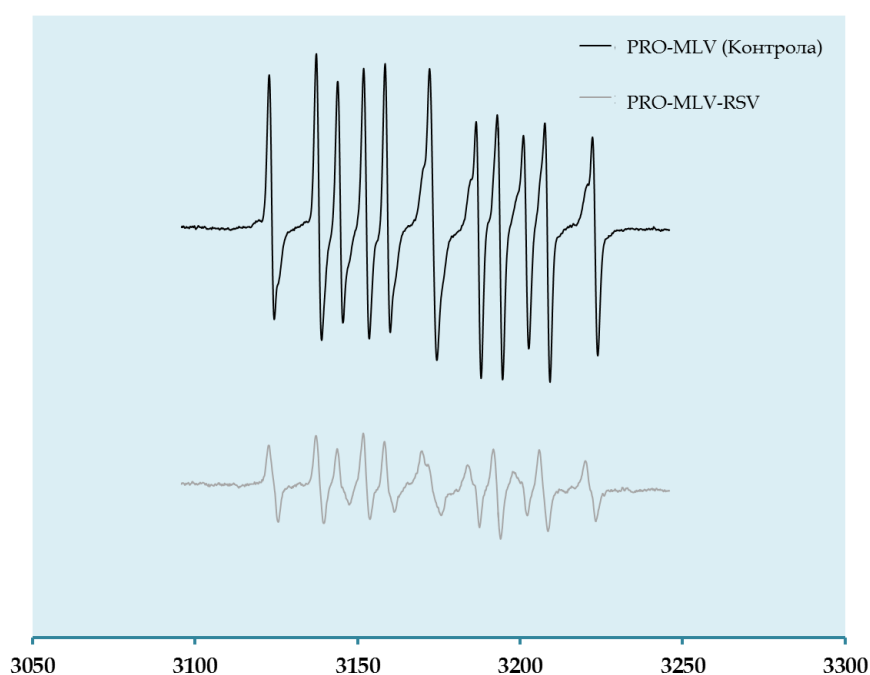
Слика 4.17. Утицај различитих моларних удела ресвератрола (назначено на слици) на кинетику липидне оксидације. Оксидација је иницирана бакар-хлоридом и праћена уз помоћ маркера. Стандардна девијација три независна мерења била је испод 5%

4.1.11. Одређивање антиоксидативне активности употребом EPR

Овом методом могуће је везати слободне радикале који имају кратко време живота и трансформисати их у стабилне радикале који могу да се уоче на EPR спектру. Интензитет EPR спектра је пропорционалан количини везаних радикала. Са слике 4.18. види се да је интензитет већи у одсуству ресвератрола (I_0) него што је то случај у узорцима у којима је присутан ресвератрол (I). Однос I/I_0 који износи 0,3 указује да ресвератрол инхибира 70% радикала насталих при излагању узорака UV зрачењу.

Детаљнија анализа EPR спектра добијена је компјутерском анализом и показује да се у спектру налазе две врсте радикала. Хидрокси-етил радикал има типичне параметре који указују на интеракције магнетног момента слободних електрона са фосфорним језгром $a_P = 49,12$ Gauss, азотним језгром, $a_N = 14,55$ Gauss и протоном $a_H = 21,16$ Gauss, док радикали са угљениковим језгром имају параметре: $a_P = 46,45$ Gauss; $a_N = 14,49$ Gauss; and $a_H = 21,51$ Gauss

Хидрокси-етил радикал формира се интеракцијом ОН радикала са етанолом, па се на овај начин показује да су ОН радикали формирану при излагању узоракa UV зрачењу. Друга врста радикала са угљениковим језгром формира се при распадању спинског маркера DEPMPO изазваног UV зрачењем. У присуству ресвератрола интензитет спектра који је у директној сразмери са количином хидрокси-етил радикала присутних у узорку смањен је за 87%, док је интензитет који потиче од друге врсте радикала умањен за 58%.



Слика 4.18. EPR спектар радикала насталих при излагању узоракa UV зрачењу у присуству и одсуству ресвератрола

4.2. Карактеризација микрочестичних система липозоми-алгинат

Применом методе електростатичке екструзије припремљено је пет узорка сложених система липозоми – алгинат, који су испитани и окарактерисани са аспекта величине честица, степена инкорпорације ресвератрола, морфологије, механичких карактеристика, дифузије, а испитане су и друге карактеристике ових система како је то наведено у одељку 3.3.2.

4.2.1. Степен ефикасности инкорпорације ресвератрола у микрочестичним системима, средњи пречник микрочестица и проценат губитка воде при сушењу

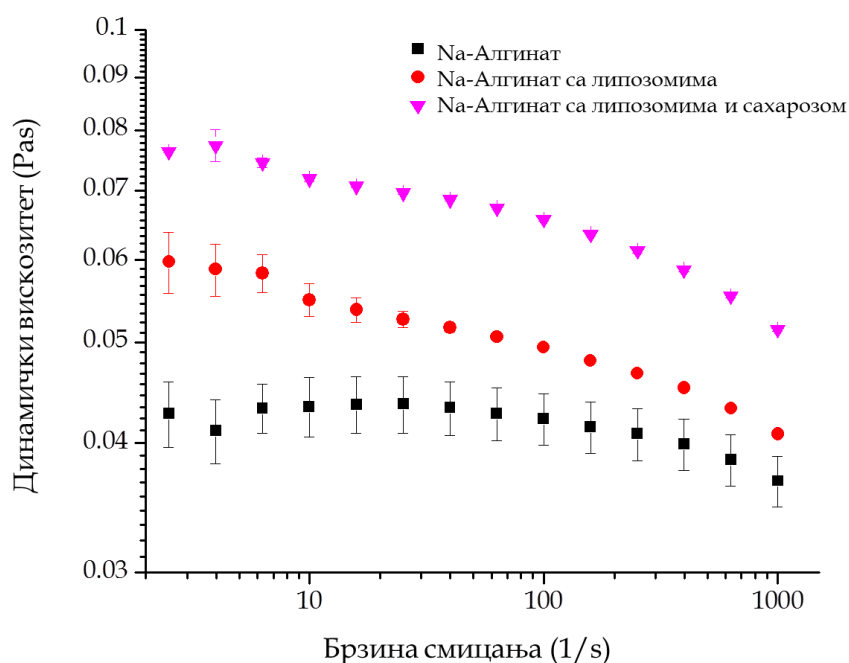
Микрочестични системи липозоми-алгинат подвргнути су лиофилизацији а након тога је вршена хидратација ових узорака током 30 минута (Lević и сар. 2015). Величина и расподела величина свежих као и хидрираних микрочестица представљена је преко запреминских пречника (d_{10} , d_{50} и d_{90}) и дата у табели 4.4.. Вредности d_{50} имају следећи тренд: ALG < ALG-LIP/RSV < ALG/SUC-LIP/RSV. Ови резултати су у корелацији са вискозношћу раствора коришћених за припрему микрочестица с обзиром да су мерења показала да динамички вискозитети почетних раствора имала следећи тренд: Na-алгинат < Na-алгинат са липозомима < Na-алгинат са липозомима и сахарозом (Слика 4.19.). Најмањи пречник се јавља код микрочестица обложених хитозаном.

Такође, из табеле 4.4. може да се уочи да вредности d_{50} хидрираних микрочестица достижу од 62 до 79% иницијалне вредности (вредности d_{50} свежих честица). Честице које су садржале и сахарозу показале су већи степен хидратације, док хитозан није показао статистички значајан утицај на вредност d_{50} након хидратације ($P > 0,5$).

Табела 4.4. Средњи пречник микрочестица са и без липозома (средња вредност ± стандардна девијација три узастопна мерења).

Узорци	$d_{10}(\mu\text{m})$		$d_{50}(\mu\text{m})$		$d_{90}(\mu\text{m})$		SPAN фактор	
	Свеже	Лиоф*	Свеже	Лиоф*	Свеже	Лиоф*	Свеже	Лиоф*
ALG	280,7±5,4	172,9±4,7	379,6±8,6	236,2±5,2	512,5±4,3	320,8±4,5	0,584±0,033	0,626±0,036
ALG-LIP/RSV	328,8±6,6	214,4±5,1	439,7±8,9	291,1±6,1	589,6±8,4	398,5±2,3	0,595±0,082	0,633±0,054
ALG/SUC-LIP/RSV	351,2±8,1	278,1±4,2	474,6±9,1	375,5±4,7	641,3±5,6	528,4±4,3	0,611±0,061	0,613±0,081
ALG/CH-LIP/RSV	288,0±5,9	196,5±4,9	387,2±5,2	267,2±3,3	523,2±5,3	363,4±3,7	0,607±0,072	0,624±0,079

*Лиофилизоване микрочестице након хидратације



Слика 4.19. Вискозност раствора коришћених за припрему микрочестица липозоми-алгинат при различитим брзинама смицања

Степен ефикасности инкорпорације ресвератрола у системе липозоми-алгинат је висок и износи од 85 до 91% у зависности од узорка (Табела 4.5.). Узорак ALG/CH-LIP/RSV је имао најнижу вредност степена ефикасности инкорпорације ресвератрола.

Процент губитка влаге микрочестица одређен је на основу разлике у маси честица пре и након процеса лиофилизације. Резултати су варирали од 88 до 95% зависно од узорка (Табела 4.5.). Највећи губитак влаге одређен је код празних алгинатних честица тј ALG (око 95%). Остали узорци су имали ниже вредности што указује на мањи проценат воде присутан у свежим (гел) микрочестицама.

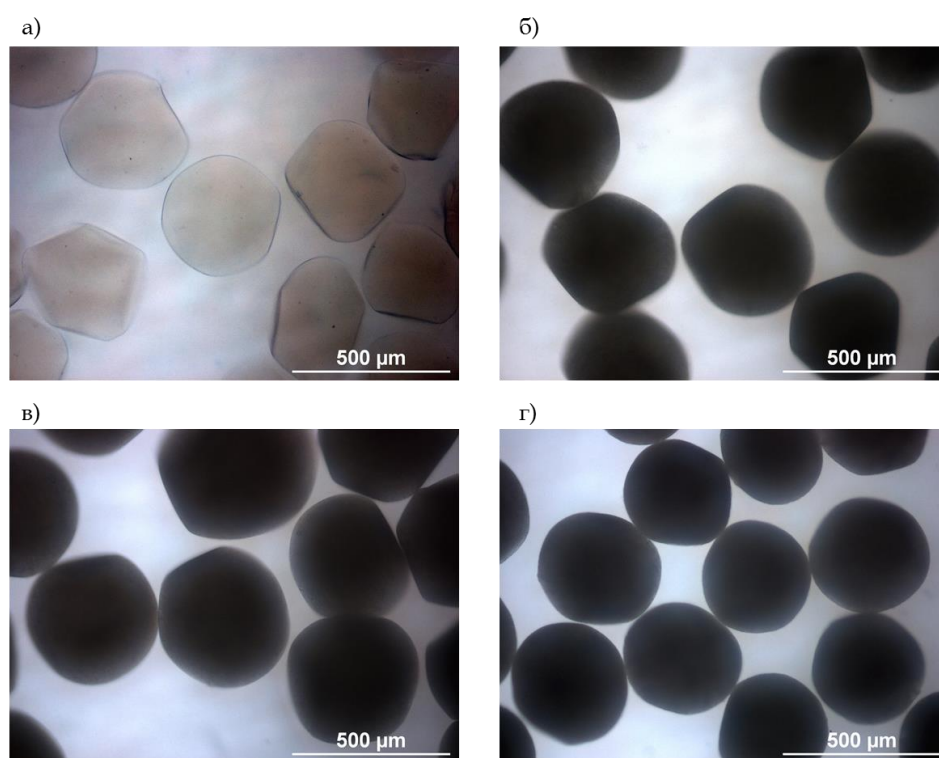
Табела 4.5. Степен ефикасности инкорпорације микрочестица и проценат губитка влаге при процесу лиофилизације

Узорак	I, %	Губитак влаге, %
ALG	нп*	94,34±0,45
ALG-LIP/RSV	90,84±0,59	94,26±0,31
ALG/SUC-LIP/RSV	89,46±0,26	88,95±1,06
ALG/CH-LIP/RSV	84,99±0,73	92,92±0,66

*нп-Није примењиво

4.2.2. Оптичка микроскопија

Микрочестице добијене поступком електростатичке екструзије анализирани су на оптичком микроскопу и одабране микрографије дате су на слици 4.20. Фактори сферичности одређени према једначини 3.5. износили су $0,080 \pm 0,06$, $0,042 \pm 0,036$, $0,020 \pm 0,029$ и $0,029 \pm 0,015$ за микрочестице ALG, ALG-LIP/RSV, ALG/SUC-LIP/RSV и ALG/CH-LIP/RSV респективно.

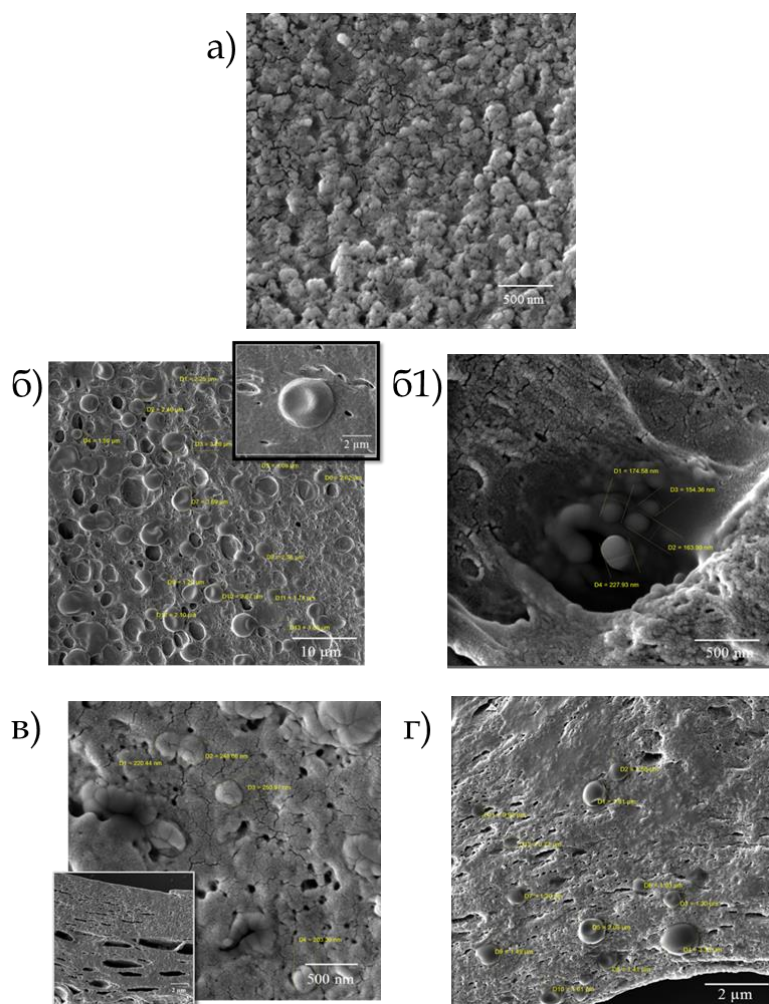


Слика 4.20. Микрочестице под оптичким микроскопом: а)ALG; б) ALG-LIP/RSV; в) ALG/SUC-LIP/RSV; г) ALG/CH-LIP/RSV

4.2.3. Скенирајућа електронска микроскопија

На слици 4.21. приказане су микрографије попречних пресека микрочестица. Уочљиво је да се наноструктура хидрогела променила при додатку липозома (Слика 4.21.а и б). Када се упореди слика где је приказан попречни пресек празних алгинатних микрочестица (Слика 4.21.а) са сликама осталих узорака уочава се да се липозоми могу детектовати као округласте творевине које су уметнуте у структуру алгинатног матрикса.

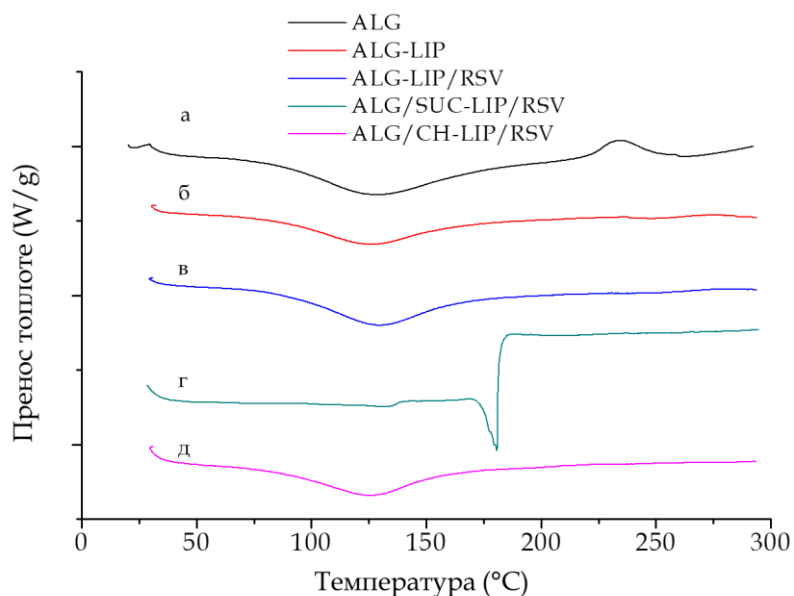
Опажа се и да липозоми нису агрегирани током припреме микрочестица. При мањим увећањима (14000-30000) у унутрашњости ALG-LIP/RSV виде се велики липозоми ($> 1 \mu\text{m}$) (Слика 4.21.б1,г), док се при великим увећањем (200000) (Слика 4.21.б2) виде и мали липозоми инкорпорирани у поре алгината. На слици 2в (увећано) приказан је површински део узорка ALG/CH-LIP/RSV и уочљив је површински слој хитозана (дебљине око $7 \mu\text{m}$) који има гушћу и мање порозну структуру у поређењу са осталим узорцима.



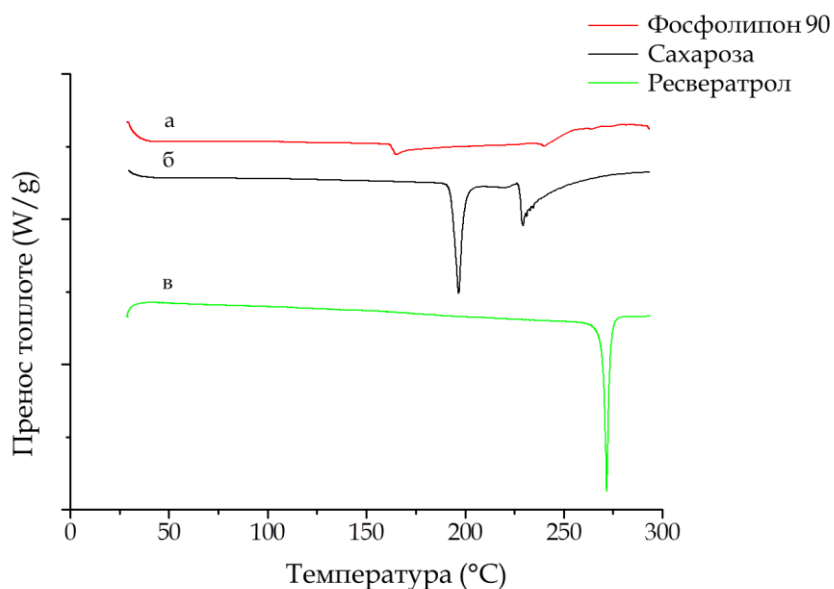
Слика 4.21. FE-SEM микрографије попречних пресека микрочестица а) ALG ($\times 231000$); б) ALG-LIP/RSV ($\times 14000$) са увећаним појединачним липозомом; б1) ALG-LIP/RSV ($\times 276000$); в) ALG/CH-LIP/RSV ($\times 231000$) са увећаним детаљем структуре површинског слоја; г) ALG/SUC-LIP/RSV ($\times 231000$)

4.2.4. Диференцијална скенирајућа калориметрија

На слици 4.22. су дати DSC термограми различитих система липозоми-алгинат. Сви узорци Са-алгината (криве а-д) имају ендотермни пик са максимумом на 125 °С осим узорка који садржи и сахарозу (крива г). При вишим температурама јасно су уочљиве разлике између узорака. На температурама између 220 и 250 °С уочава се егзотермни пик за ALG који није уочљив код узорака у које су инкорпорирани липозоми (криве б,в,г и д). Термограми алгинатних честица са липозомима (криве б и в) имају мали ендотермни пик између 230 и 270 °С. На термограму који одговара узорку ALG/SUC-LIP/RSV (крива г) уочава се изражен оштар ендотермни пик на 181 °С који одговара топљењу сахарозе што је потврђено термограмом чисте сахарозе датим на слици (крива б), али је овај прелаз померен ка нижим температурама. Термограми чистих компоненти дати су на слици 4.23., а температуре пикова и промене енталпије детектоване на DSC термограмима чистих компоненти и сложених система липозоми-алгинат дати су у табели 4.6..



Слика 4.22. DSC термограми лиофилизованих празних Са-алгинатних честица ALG (крива а), а-алгинатних честица са инкорпорираним празним липозомима ALG-LIP (крива б), Са-алгинатних честица са инкорпорираним липозомима са ресвератролом ALG-LIP/RSV (крива б), ALG-LIP/RSV (крива в), ALG/CHI-LIP/RSV (крива г) и ALG/SUC-LIP/RSV (крива д)



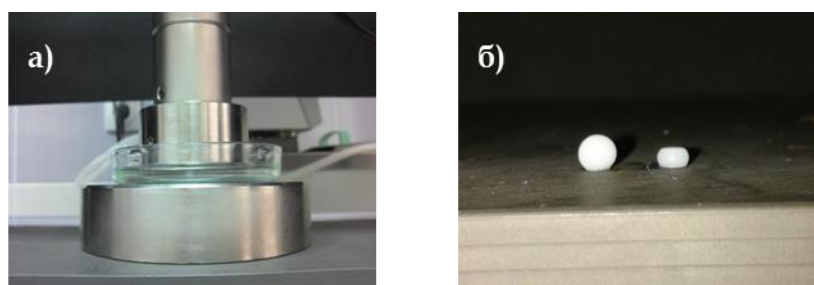
Слика 4.23. DSC термограми чистих компоненти: фосфолипон (крива а), сахароза (крива б) и ресвератрол (крива в)

Табела 4.6. Температуре пикова и промене енталпије детектоване на DSC термограмима чистих компоненти и сложених система липозоми-алгинат

Узорак	Температура (°C)			ΔH (J/g)
	Почетак пика	Пик	Крај пика	
Чисте компоненте				
Фосфолипон	161,4	165,3	234,6	55,2
	238,1	240,2	255,3	5,6
Ресвератрол	-	272	-	126,7
	-	196,8	-	130,8
Сахароза	206,7	220,0	225,2	4,8
	226,7	229,4	264,8	109,3
Сложени системи				
ALG	64,7	128,0	194,6	393,7
	193,7	234,0	255,0	-74,7
ALG-LIP	64,2	125,4	208,3	309,5
	237,8	249,0	273,6	8,5
ALG-LIP/RSV	65,8	129,2	202,6	351,5
	233,4	251,9	272,9	5,7
ALG/SUC-LIP/RSV	109,5	133,1	139,7	12,1
	170,1	180,8	185,0	107,9
ALG/CH-LIP/RSV	64,0	125,2	186,3	275,6

4.2.5. Механичке карактеристике

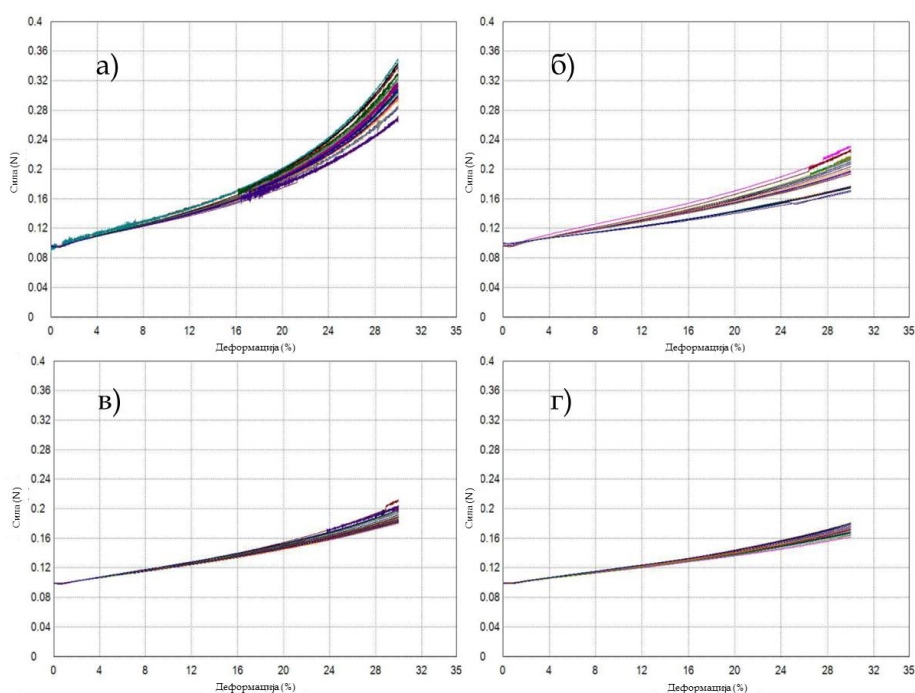
Механичке карактеристике честица испитане су при компресији у воденом медијуму до постизања 30% деформације (Слика 4.24.).



Слика 4.24. а) Процес компресије; б) честица пре и након излагања деформацији

Механичке карактеристике микрочестица приказане су као зависност силе од деформације (Слика 4.25.). Са слика се види да сви узорци показују исти тренд односно сила расте са порастом процента деформације. Ипак

узорци међу собом пружају различит отпор при компресији па су вредности представљене табеларно (Табела 4.7.) и указују да присуство липозома смањује крутост честица односно да су ниже вредности сила детектоване за постизање деформације у узорцима који су садржали липозоме. Тако, узорак ALG достиже 30% деформацији при сили од око 0,31 N, док код узорка ALG-LIP/RSV ова сила износи свега 0,19 N (Табела 4.7.). Сама сахароза није показала значајан утицај на механичке карактеристике ових система. Када је у питању узорак који је имао и слој хитозана сила потребна за достизање 30% деформације износила је око 0,17 N.



Слика 4.25. Зависност силе од деформације за узорке: а) ALG; б) ALG-LIP/RSV; в) ALG/SUC-LIP/RSV; г) ALG/CH-LIP/RSV

Табела 4.7. Механичке карактеристике честица

Узорак	Сила (N) ^{а,в}	Напон (MPa) ^{а,в}	Јунгов модул (MPa) ^{б,в}
ALG	0,312 ± 0,020	0,044 ± 0,003	0,054 ± 0,003
ALG-LIP/RSV	0,193 ± 0,018	0,027 ± 0,002	0,037 ± 0,006
ALG/SUC-LIP/RSV	0,192 ± 0,008	0,028 ± 0,001	0,037 ± 0,002
ALG/CH-LIP/RSV	0,171 ± 0,005	0,035 ± 0,001	0,042 ± 0,002

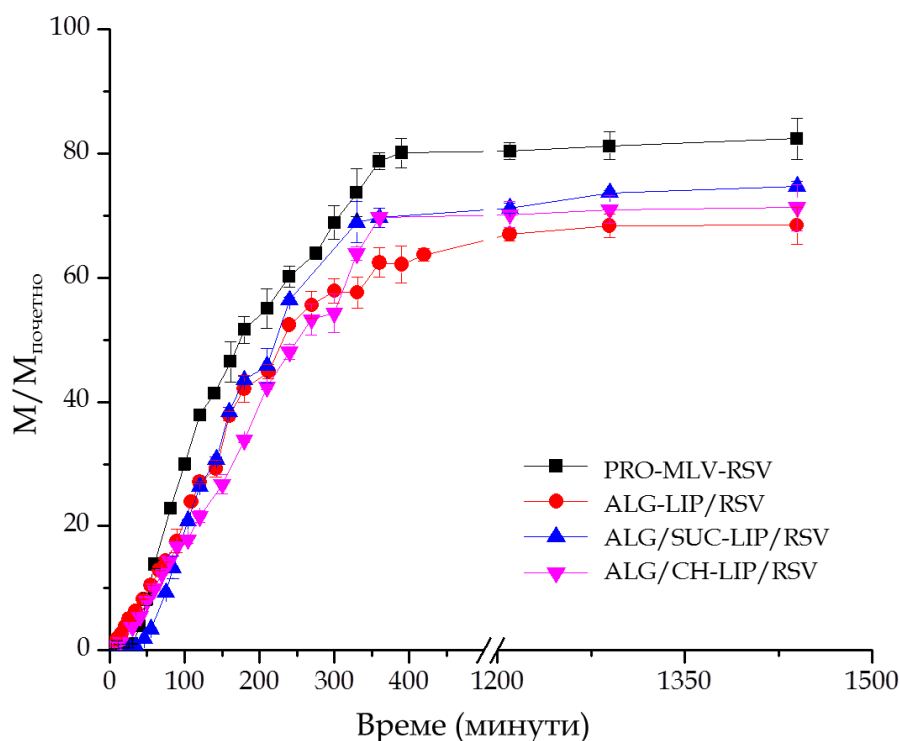
^а При деформацији од 30%

^б Одређено из нагиба линеарног дела криве

^в Средња вредност ± стандардна девијација

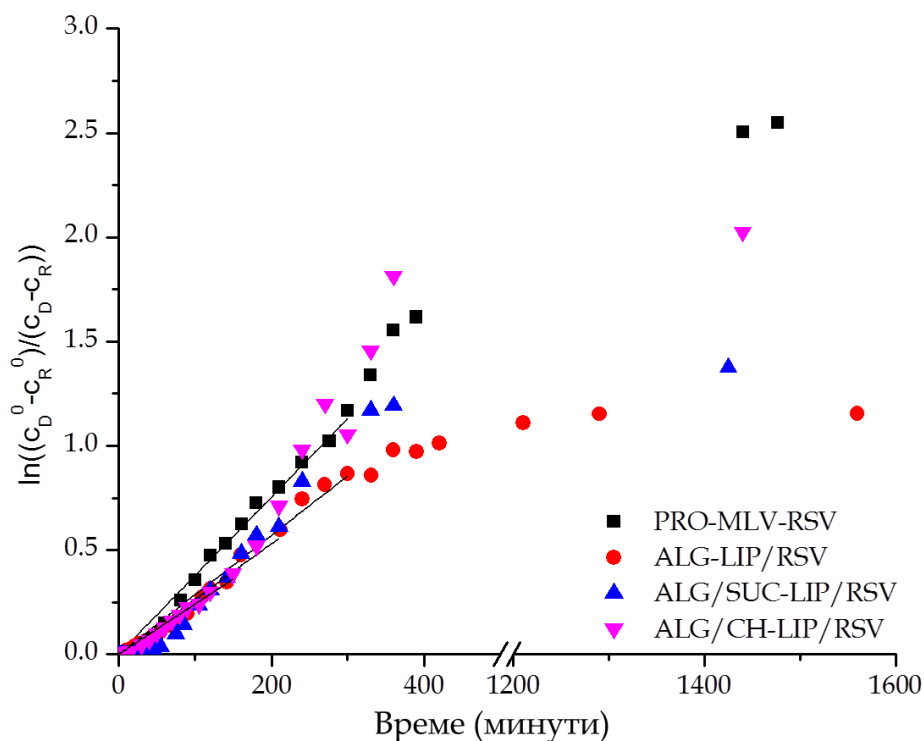
4.2.6. Кинетика отпуштања ресвератрола и одређивање коефицијента дифузије

Кинетика отпуштања ресвератрола праћена је током 24 сата уз употребу Францове дифузионе ћелије. Профили отпуштања ресвератрола из микрочестичних система на бази алгината заједно са профилем отпуштања ресвератрола из липозома као контрола (PRO-MLV-RSV) дати су на слици 4.26. Резултати указују на продужено отпуштање ресвератрола из система на бази алгината у поређењу са отпуштањем из липозома. Па се тако око 70% ресвератрола који се налазио у липозомима отпусти за око 290 минута док се из узорака ALG/SUC-LIP/RSV, ALG/CH-LIP/RSV и ALG-LIP/RSV исти проценат ресвератрола отпусти након 330, 368 и 1260 минута, респективно. Поред овога након 24 сата између 26 и 30% ресвератрола остаје и даље инкорпорирано у честице.



Слика 4.26. Профили отпуштања ресвератрола из липозома PRO-MLV-RSV и микрочестичних система липозоми-алгинат

Ефективни коефицијенти дифузије одређени су према једначини 1.15. приказивањем зависности $\ln\left(\frac{C_D^0 - C_R^0}{C_D - C_R}\right)$ од времена (Слика 4.27.) из нагиба линеарног дела криве. Вредности су дате у табели 4.8, колона 3.



Слика 4.27. Апроксимација дифузије ресвератрола из липозома PRO-MLV-RSV и микрочестичних система липозоми-алгинат помоћу Фиковог другог закона дифузије

Познате вредности дебљине слоја (или мембране) дате су у табели 4.8., колона 2 и заједно са вредностима коефицијената дифузије употребљене су за прорачун укупног отпора слично како је то описано одељку 4.1.5. Укупни отпор се може третирати као збир појединачних дифузионих отпора: мембране, липозома и полимерне мембране (редно везани отпори):

$$R = \frac{\delta_0}{D_{eff}} = R_M + R_{lip} + R_{pol} \tag{4.6.}$$

У табели 4.8., колона 5 дате су вредности отпора који потиче само од полимерне мембране (ALG, ALG/SUC или ALG/CH). Резултати показују да додатно облагање липозома полимерном мембраном повећава отпор за

69-89% (у поређењу са отпором који потиче само од липозома). Такође, може се уочити да је отпор самог алгинатног матрикса за око 30% мањи у поређењу са отпорима који потичу од комбинације алгината и сахарозе односно алгината и хитозана.

Табела 4.8. Ефективни коефицијенти дифузије ресвератрола и дифузиони отпори у системима липозоми-алгинат

Узорак	δ_0 , mm	D_{eff} , m ² /s	R, s/m	R_{POL}^* , s/m
PRO-MLV-RSV	3,34	$2,54 \cdot 10^{-9}$	$1,31 \cdot 10^6$	нп*
ALG-LIP/RSV	4,32	$1,94 \cdot 10^{-9}$	$2,22 \cdot 10^6$	$9,1 \cdot 10^5$
ALG/SUC-LIP/RSV	4,33	$1,74 \cdot 10^{-9}$	$2,48 \cdot 10^6$	$11,7 \cdot 10^5$
ALG/CH-LIP/RSV	3,95	$1,61 \cdot 10^{-9}$	$2,45 \cdot 10^6$	$11,4 \cdot 10^5$

*нп-Није примењиво

5. Дискусија

У свету је запажен све већи интерес јавности за конзумацију намирница обogaћених компонентама које имају превентивно дејство на здравље људи. Познато је да ресвератрол показује позитивна дејства као и да повећан унос намирница које садрже ову компоненту повољно утиче на здравље. Ипак, чак и чест унос ових намирница не обезбеђује увек ефективну количину ресвератрола јер је он склон оксидацији, слабо се апсорбује при оралној администрацији, а показује и цитотоксично дејство ако се нађе у великим дозама (иако је доста висока концентрација неопходна за постизање позитивног ефеката).

Једна од могућности да се ове мане ресвератрола превазиђу и да се његове позитивне стране искористе јесте инкапсулација, где је главни изазов пронаћи одговарајући раствор и материјал за инкапсулацију због слабе растворљивости ресвератрола. С обзиром да липозоми могу да се припреме користећи природне компоненте они представљају логичан и пожељан избор као носачи који лако могу да се имплементирају како у прехранбене тако и фармацеутске и козметичке производе. Ипак, липозоми до сада нису много примењивани с обзиром да је процес њихове припреме често скуп и временски захтеван. Стога је у првој фази ове докторске дисертације коришћена комерцијална липидна смеша за припрему липозома и испитане су различите методе припреме липозома које би могле лако да се прилагоде индустријској производњи, а да буду једнако ефикасне као и основне лабораторијске методе.

Метода за припрему липозома са инкапсулираним ресвератролом која је испитана у овој тези је пролипозомна метода (PRO) и заснива се на замени етанола воденим медијумом. PRO метода је поређена са најчешће коришћеном методом за лабораторијску припрему липозома, методом танког филма (TF). За смањење величине липозома испитана је техника

соникације (лако се може применити и на веће количине) и упоређена са техником мембранске екструзије (опрема за мале и велике шарже је лако доступна).

Величина липозома је параметар који је значајан за добијање података о стабилности и биорасположивости липозома као носача активне компоненте, али и о општим одликама отпуштања активне компоненте из ових система (Mozafari и сар. 2008). Поред величине липозома, индекс полидисперзије указује на униформност расподеле величине липозома у липозомној дисперзији и овај параметар има вредност 0 за потпуно монодисперзне системе и расте до вредности 1 за потпуно хетерогене системе. Како је већ показано у овом раду је стабилност липозома праћена током 21 дана. Липозоми припремљени PRO методом имали су око четири пута мањи пречник него липозоми припремљени методом TF. Методом TF добијени су липозоми хетерогене дистрибуције, док је метода PRO обезбедила монодисперзну суспензију липозома (вредности PDI биле су испод 0,2). Овакав резултат је најчешће последица разлике у методи коришћеној за хомогенизацију услед чега долази до формирања липозома. Наиме, хомогенизација при којој је уложен велики унос енергије (као што је то случај у PRO методи) омогућава формирање мањих липидних везикула. Поред овога, присуство заосталог етанола у формулацији (као што је то случај при примени PRO методе) утиче на смањење величине липозома. Постоји хипотеза да етанол проузрокује промене у наелектрисању система и у мањој мери доводи до стерне стабилизације па би то могло да доводи до смањења величине липозома (Lopez-Pinto и сар. 2005). Са друге стране, присуство холестерола у формулацији (као што је то случај при примени TF методе) може да повећа величину липозома што је и описано од стране неких аутора (Socasiu и сар. 2000). Накнадно смањење величине липозома фаворизовало је методу екструзије над методом соникације. Екструзиона техника је дала нешто веће липозоме у поређењу са литературним подацима. Кадео и сарадници (Caddeo и сар.

2008) добили су липозоме величине око 70 nm након екструзије, а за припрему су користили фосфолипон 90, дицетил-фосфат и холестерол.

Ипак, у погледу хомогености екструзиона техника се показала ефикаснијом од соникације. Сличан резултат пријавили су и аутори који су припремали липозоме од две врсте липида (ди-олеил-фосфатидилхолин и ди-палмитоил-фосфатидилхолин) са инкапсулираном натријумовом соли налидиксинске киселине (Budai и сар. 2004).

Познато је да зета потенцијал у великој мери утиче на физичку стабилност честица суспензија тако што проузрокује електростатичко одбијање између њих. Такође, зета потенцијал указује и на доминантну компоненту на површини честица. Негативна вредност зета потенцијала детектована у свим узорцима испитаним у овом раду даје потврду добре стабилности липозомних дисперзија и потврђује одсуство агрегације и фузије липозома (средњи пречник липозома није се променио за више од 12% током три недеље складиштења на 4 °C). На основу свега може да се закључи да су липозоми били физички стабилни током три недеље складиштења (вредност $P < 0,05$ сматрала се статистички значајном).

Средњи пречник липозома у узорцима PRO-MLV и PRO-MLV-RSV одређен је и микроскопијом атомских сила, међутим ова метода утврђује својства појединачних липозома која могу да варирају од средњих вредности (Teskač Plajnšek и сар. 2011). Стога, AFM је показао да липозоми који садрже ресвератрол имају већи пречник од празних, што се потврђује и код мерења висине попречног пресека. Ипак, у оба узорка, висина опада у односу на пречник, што указује на извесно равнање узорка до ког долази услед сушења при припреми, па се стога не може прецизно одредити висина у узорцима. Сlike добијене AFM анализом потврђују да липозоми имају округласт облик, али да се храпавост разликује између узорка.

Све испитане липозомне дисперзије у овом раду у основи су припрељене употребом фосфолипона 90 који садржи више од 90% фосфатидил холина. Како су овакви липозоми сачињени од неутралних монослојева, електростатичко привлачење са ресвератролом може да се одбаци. Највероватније, до уметања ресвератрола у липозоме долази због хидрофобних интеракција. Тако је и степен инкапсулације висок за све узорке осим за оне где је примењена ултразвучна сонда. Овакав резултат указује на то да се током соникације јавља значајан губитак ресвератрола, вероватно услед јаких смицајних сила које делују на MLV и које доводе до промена у структури липозома и цурења ресвератрола у околни медијум. Још једно објашњење за ниске вредности степена инкапсулације ресвератрола при примени методе соникације лежи у чињеници да су овако третиранли липозоми већином униламеларне (једнослојне) структуре (Riaz 1996) те нуде мање простора за уградњу липофилне компоненте односно ресвератрола у поређењу са липозомима третираним екструзијом који су већином олиголамеларне структуре (Caddeo и сар. 2008). Висок степен инкапсулације ресвератрола у липозоме третиране екструзијом (око 80%) пријавили су и други аутори (Caddeo и сар. 2008). Одређивање степена инкапсулације указало је и на то да је PRO метода обезбедила већи степен инкапсулације ресвератрола него што је то случај са TF методом, а при томе ова метода је и погоднија за увећање размера и индустријску производњу, па је стога у даљим истраживањима у оквиру ове тезе PRO метода фаворизована.

Антиоксидативни ефекат полифенолних компоненти *in vivo* не може директно да се упореди са ефектом које ове компоненте показују у *in vitro* условима. Ипак, *in vitro* испитивања дају корисне информације за практичну примену липозома с обзиром да сама припрема може да утиче на смањење антиоксидативне активности ресвератрола. Стога, резултати *in vitro* могу да се употребе за одређивање јачине антиоксиданса, па су тако у овом раду резултати испитивања антиоксидативне активности

ресвератрола употребљени за процену утицаја методе за припрему липозома са инкапсулираним ресвератролом на антиоксидативни капацитет ове компоненте. Обе методе припреме (TF и PRO) очувале су антиоксидативну активност ресвератрола скоро у потпуности (више од 90%), али је при смањењу величине уочено да се активност изгубила када је примењена ултразвучна сонда (не више од 30%). Оваква појава вероватно потиче од чињенице да велика количина енергије која се кроз соникацију уноси у систем изазива локално прегревање узорка и има негативан утицај на антиоксидативну активност ресвератрола.

DSC анализа вршена је са циљем да се утврде физичко-хемијске карактеристике липозомних мембрана и њихова интеракција са инкапсулираним ресвератролом. Ова метода је такође примењена како би се утврдило физичко стање ресвератрола у самим липозомима, што игра значајну улогу при испитивању кинетике отпуштања ресвератрола из ових система у *in vitro* условима. Резултати DSC анализе омогућују и боље тумачење резултата степена инкапсулације с обзиром да дају увид у то да ли је активна компонента инкорпорирана у липидни двослој или у хидрофилну унутрашњост липозома (Weiner и сар. 1989). На термограмима појединачних компоненти (Слика 4.4.) уочљиве су две ендотермне промене када је у питању P90 – широк ендотермни пик при температурном опсегу од 30 до 80 °C и пик који одговара деградацији P90 изнад 190 °C. Овакву појаву су забележили и Тајлор и Морис (Taylor и Morris 1995) који су пријавили да фосфолипиди не подлежу једноставном процесу топљења при загревању, већ постоје у виду једног или више интермедијера течно-кристалног или мезоморфног облика. С обзиром да нису уочене значајне разлике у термограмима липозома и липозома са инкапсулираним ресвератролом, одсуство пика који потиче од топљења ресвератрола допушта да се изведе закључак да је ресвератрол заробљен (инкапсулиран) у липозоме као и да постоји интеракција ресвератрола и компонентата присутних у липидном двослоју. Овакав резултат се поклапа

и са податком да је на термограму који одговара липозомима са инкапсулираним ресвератролом пик који се односи на P90 мање изражен и благо померен ка нижим температурама, а да пик који одговара температури топљења холестерола такође није уочен (Слика 4.5.). На основу резултата DSC анализе може се закључити да обе липидне компоненте интерагују међусобно формирајући липидни двослој у који се ресвератрол уграђује.

Имајући у виду да само засићене масне киселине чистих липида имају оштре фазне конверзије које могу да се детектују у уском температурном интервалу примењена је и DSC анализа узорака TF-DPPC изложеног дејству ресвератрола. Кроз овај експеримент праћене су промене термотропних својстава DPPC мембране као модел-мембране. Како је већ наглашено сазнања о променама при фазним прелазима имају велики значај за развој адекватног протокола за припрему липозома са инкапсулираним компонентом. Ресвератрол доводи до смањења температуре фазне трансформације (гел-течно) и ово смањење расте са порастом концентрације ресвератрола. Студије са сличном темом показале су у основи исти резултат да ресвератрол умањује пик који одговара префазној трансформацији, а да шири пик који одговара главном фазном прелазу и помера га ка нижим температурама (када је реч од липозомима сачињеним од DPPC, DSPC и DMPC) (Wesołowska и сар. 2009, Sarpietro и сар. 2007). Весоловска и сарадници (Wesołowska и сар. 2009) верују да ресвератрол интеркалира у липидну мембрану и бива лоциран у околини поларних глава липидног двослоја. На тај начин молекула ресвератрола раздваја молекуле липида што доводи до повећања флуидности и неуређености молекула у липидној мембрани (Brittes и сар. 2010). У литератури је такође показано да је овај утицај ресвератрола мање изражен када су у питању дужи и срећенији ацил ланци (као код DPPC) који имају јаче унутрашње интеракције него што је то случај рецимо код ланаца DMPC (Wesołowska и сар. 2009). Интересантно је да исти аутори

показују да енталпија фазне трансформације расте при малим односима активне компоненте и липида (од 0,04 до 0,08) док при већим односима (од 0,08 до 0,12) опада и да при односу од 0,12 износи 35 kJ/mol. У овој тези показано је да енталпија фазне трансформације (ΔH_{cal}) опада са 34,5 (контролни узорак) на 28,7 kJ/mol при односу ресвератрола и липида од 0,5.

Још један начин да се липозоми окарактеришу као носачи за инкапсулацију ресвератрола је и да се испита кинетика отпуштања ове активне компоненте из липозома. Овакви подаци имају битну улогу како за произвођаче хране тако и за фармацеутску и козметичку индустрију у којима може да се нађе погодна примена липозома са ресвератролом. Резултати кинетике отпуштања указују да је дифузија ресвератрола спорија из липозома и да се за ове узорке максимална концентрација ресвератрола достиже након двоструко више времена у поређењу са контролом. Овакав податак оправдава примену липозома као система за контролисано и продужено отпуштање ресвератрола. Из резултата приметно је да су MLV липозоми током првих 100 min експеримента отпустили око 50% ресвератрола док су липозоми третирани екструзијом отпустили око 80% ресвератрола у истом временском интервалу. Овакав резултат је директно повезан са величином липозома. Наиме, MLV липозоми су већи за цео ред величине него липозоми третирани екструзијом па стога MLV липозоми обезбеђују дужи пут за дифузију ресвератрола. Поред овога, липозоми третирани екструзијом осим што имају мањи пречник имају и већу специфичну површину, што додатно доприноси бржем отпуштању инкапсулиране компоненте. Даље, као што је и очекивано, MLV липозоми имају већи отпор преносу масе за око 75% у поређењу са мањим липозомима. Кроз овај резултат потврђене су и претпоставке о мултиламеларној структури MLV са концентричним липидним двослојима. Посматрајући све резултате уочљиво је да липозоми обезбеђују већи отпор дифузији ресвератрола за цео ред

величине у поређењу са отпором који даје синтетичка мембрана па су погодни за продужено ослобађање ресвератрола.

Потенцијална цитотоксичност ресвератрола пријављена је од стране аутора Кадео и сарадници (Caddeo и сар. 2008) као и Тескач и Кристл (Teskac и Kristl 2010) па је стога у овој тези испитан и утицај инкапсулираног ресвератрола на ћелије кератиноцита. Ове ћелије уобичајено имају полигоналан облик и током раста формирају адхерентни једнослој, док се у присуству цитотоксичних супстанци најчешће уочава смањена површинска густина раста ових ћелија чији облик постаје сферичан и оне се одвајају од површине за гајење и формирају ћелијске кластере. Како је уочљиво са слике 4.9. цитотоксичност ресвератрола је смањена инкапсулацијом у липозоме што је закључено на основу промена у морфологији ћелија и овакав резултат је у складу са закључцима других аутора (Teskac и Kristl 2010). Наиме, ћелије третиране негативном контролом имале су исте морфолошке карактеристике као и ћелије третиране липозомним формулацијама. Ипак, чак и липозоми који нису садржали ресвератрол изазвали су мање промене у ћелијским културама што највероватније потиче од локалне флуидизације мембране ћелија услед заостатка етанола у липозомној формулацији. Неинкапсулиран ресвератрол у већој мери је индуковао промене ћелијских култура. Ипак када се пореде празни липозоми и липозоми са ресвератролом уочљиво је израженије цитотоксично дејство липозома са ресвератролом што се може приписати слободном, неинкапсулираном ресвератролу, заосталом у воденој фази липозомне дисперзије.

Следећи корак у истраживањима која су тема ове дисертације односио се на испитивање потенцијалних интеракција ресвератрола са липидима који формирају липидни двослој липозома и како ове интеракције утичу на флуидност липозомне мембране. Битно је истаћи да флуидност липозомне мембране утиче на стабилност липидне дисперзије као и на

кинетику отпуштања активне компоненте из липозома (Park и сар. 2009). У ту сврху примењене су EPR анализа и флуоресцентна спектроскопија. EPR анализа је показала краће емпиријско корелационо време детектовано спинским маркером MeFASL (2,11) што је директна последица бржих покрета нитроксидне групе самог маркера у унутрашњем делу липидног двослоја него што је то случај при површини где су фосфолипиди уређенији (Abram и сар. 2013). У односу на контролу, емпиријско корелационо време је веће код узорка са ресвератролом за око 15% при температури од 15°C. На вишим температурама разлика се смањује и постаје занемарљива при температурама изнад 40°C (посматрано у спољашњем делу липидне мембране употребом спинског маркера MeFASL (10,3)). Сличне резултате уочили су и Абрам и сарадници (Abram и сар. 2013) који су испитивали утицај флавоноида на флуидност мембрана фосфатидил-холин/сфингомијелин истом методом. Ови аутори су уочили да са порастом температуре разлика између узорка и контроле бива све мања и нестаје на температурама изнад 40°C. Супротно овоме, ресвератрол ограничава покрете нитроксилне групе маркера MeFASL(2,11) кроз цео температурни опсег, па је на основу EPR анализе могуће закључити да је ресвератрол присутан у унутрашњем делу липидног двослоја кроз цео температурни опсег док при површини има ефекат само при ниским температурама. Овакав закључак подупиरे теорију коју су поставили Весоловска и сарадници (Wesołowska и сар. 2009). Весоловска и сарадници су испитивали утицај два стилбеноида, ресвератрола и пицеатанола, на мембране мултиламеларних липозома на бази 1,2-миристал-сн-глицеро-3-фосфатидилхолина (DMPC) и DPPC. На основу неколико анализа закључили су да ресвератрол пенетрира у различите дубине липидног двослоја, иако нема хемијске групе које би могле да га учврсте на конкретно место. Ипак, постоји и супротно мишљење Бриттеса и сарадника (Brittes и сар. 2010) који су користили флуориметрију да одреде утицај ресвератрола на велике униламеларне липозоме на бази DPPC. Стога, интеракција ове биолошки активне

компоненте и њој сличних, са липидним мембранама је и даље атрактивна тема за истраживање и дебату. Суштински, врста компоненте (поларност, величина молекула, геометрија молекула, површинско наелектрисање) и састав мембране (дужина ланаца, проценат засићених група) су главни фактори који утичу на флуидност мембране (Yu и сар. 2011; Abram и сар. 2013). Имајући ово у виду треба истаћи да је липозомна мембрана на бази фосфолипона 90 флуидна кроз цео температурни опсег услед присуства незасићених масних киселина, док су DPPC липозоми у гел фази на температурама испод 41°C. По свему судећи ресвератрол се у мембрани DPPC липозома понаша другачије него што је то случај код мембране припремљене употребом P90. Могуће објашњење лежи у томе да се ресвератрол другачије лоцира у DPPC липозомима и према истаживањима Весоловске и сарадника ресвератрол се уграђује ближе поларним главама липидног двослоја, док су резултати који су приказани у овој тези за липозоме припремљене од комерцијалне липидне смеше показали супротно.

Поред осталог и однос липидне компоненте и саме активне компоненте утиче на флуидност, па је тако показано да једна активна компонента може да смањи флуидност липозомне мембране када је у мањој количини, а да повећа ако се нађе у већој количини (Poklar Ulrih и сар. 2010; Ota и сар. 2011). У овој дисертацији је кроз EPR анализу потврђено и да липозоми припремљени TF и PRO методом показују исте особине, а њихова емпиријска корелациона времена су имала исти тренд, што показује да метода добијања липозома није имала утицај на пенетрацију ресвератрола на конкретно место у липидном двослоју.

Резултати добијени на основу EPR спектра дају увид само у главне промене у флуидности липозомне мембране. Ипак, липозомна мембрана је сачињена из региона који имају различиту флуидност. Стога је компјутерска симулација EPR спектра дала прецизније податке о променама флуидности по регионима, у присуству ресвератрола. При

површини липидног двослоја спектар може да се моделује са три спектралне компоненте и ово указује на присуство три различита региона са различитим флуидностима при температурама нижим од 20°C (Слика 4.12.). При порасту температуре мембрана постаје хомогенија, а број региона се смањује. Код липозома припремљених методом TF при температурама изнад 30°C EPR спектар може да се моделује са само једном спектралном компонентом (Слика 4.12.а), док липозомне мембране припремљене PRO методом постају хомогене већ при температури од 25 °C (Слика 4.12. б). Постоји могућност да је хомогенија мембрана уочена код липозома припремљених PRO методом последица присуства заосталог етанола. Овакви подаци потврђују да етанол има утицаја на липозомну мембрану и да повећава њену флуидност, што такође утиче на ниже вредности параметра уређености. Слично је показано и у студији Силбермана и сарадника (Silberman и сар. 1990).

У присуству ресвератрола детектовани су региони са већим вредностима параметра S све до 30°C. При вишим температурама ротационо корелационо време има веће вредности у присуству ресвератрола, како за TF тако и за PRO методу, што говори да су мембране са уграђеним ресвератролом мање флуидне. Посматрајући цео опсег мерења, флуидност мембрана расте са порастом температуре, што се одражава кроз ниже вредности оба параметра S и τ_c . Сходно томе, пропорције уређених делова редуковане су са временом.

При мерењима која се односе на унутрашње делове мембране утврђено је да у присуству ресвератрола τ_c расте, док код параметра S нису уочене значајне промене. Веће вредности τ_c последица су споријег покретања маркера, што указује на смањену флуидност. Колико је познато, у литератури не постоје подаци о утицају ресвератрола на флуидност и хомогеност различитих региона у липозомој мембрани. На нижим температурама када су мембране хетерогеније, ресвератрол утиче на регионе где је присутна већа уређеност ланаца, док региони са мањом

уређеношћу нису подлегли дејству ресвератрола. Резултати за PRO методу показују да ресвератрол индукује мању нехомогеност у мембранама при температурама мањим од 30°C. Ипак, на вишим температурама где је динамика фосфолипида бржа, ова мала нехомогеност није уочена. Поклар Улрих и сарадници као и Абрам и сарадници (Poklar Ulrich и сар. 2010; Abram и сар. 2013) објавили су да флавоноиди могу да повећају хомогеност мембрана на бази фосфатидилхолин/сфингомијелин (при моларном односу 2.4:1), док за неке друге компоненте овај ефекат није испитан.

Како је и експеримент са накнадним додавањем ресвератрола дао сличне резултате као и онај где је ресвератрол претходно инкапсулиран, изводи се закључак да ресвератрол може да пенетрира из спољашности у већ припремљену липидну мембрану па се истраживања интеракције ресвератрола и липозомне мембране у овој тези сматрају оправданим било да се ради о липозомима са инкапсулираним ресвератролом или липозомима где ресвератрол накнадно пенетрира кроз већ формирану мембрану.

У циљу одређивања положаја ресвератрола у липидном двослоју поред EPR анализе примењена је и флуоресцентна спектроскопија чији резултати потврђују оне добијене из EPR анализе. Наиме, како су објаснили Ксу и сарадници (Xu и London 2000) вредности поларизације (P) су ниске у течном стању неуређености система, а високе у гел стању. Ниске вредности P добијене за узорке у овој тези показује да су при температурама испитивања (25, 37, и 60°C) узорци липозома били у течном стању. Утицај ресвератрола је најизраженији у унутрашњем делу мембране, где пораст вредности P указује да је мембрана мање флуидна када је у њу уграђен ресвератрол. Резултати ове анализе подударају се са резултатима које су објавили Фабрис и сарадници (Fabris и сар. 2008). Ови аутори испитивали су липозоме на бази DPPC са инкорпорираним ресвератролом и закључили да се реактивне хидроксилне групе ресвератрола лоцирају близу двоструких веза у поли-незасићеним

ланцима масних киселина. Бритес и сарадници (Brittes и сар. 2010) такође су испитивали утицај ресвератрола на карактеристике липозомних мембрана на бази DPPC и објавили да је ресвератрол лоциран дубоко у мембрани и да нема значајног ефекта на површину мембране. Тсуђија и сарадници (Tsuchiya и сар. 2002) су потврдили да ресвератрол повећава крутост хидрофобних региона у липозомној мембрани на бази холестерола и фосфатидилхолина али не утиче на хидрофилне регионе.

Када је у питању утицај температуре на поларизацију, вредности P опадају са порастом температуре, што је било израженије код употребе DPH маркера. Овакав тренд је очекиван, с обзиром да је распоред липидних ланаца мање уређен при вишим температурама када је и липидна мембрана флуиднија.

Применом ове методе још једном је потврђено да метода припреме липозома није имала утицај на понашање флуидности липидне мембране у присуству ресвератрола.

Познато је да тиобарбитурна киселина реагује са малондиалдехидом, карбонилним производом који настаје услед хидроксипероксидне декомпозиције липида (Janero и сар. 1990). При овој реакцији ствара се комплексно једињење ружичасте боје, које може да се детектује спектрофотометријски јер има апсорпциони пик на 532 nm. Резултати испитивања у овој тези су показали да ресвератрол значајно умањује липидну пероксидацију код липозома изложених дејству UV зрака, односно да ресвератрол има антиоксидативни потенцијал да инхибира формирање малондиалдехида. Такође, резултат указује на потенцијал ресвератрола да инкапсулацијом у липозоме чува саму липозомну мембрану од пероксидације. Литературни подаци потврђују да поједини полифеноли као што су кварцетин и рутин такође показују заштитно дејство према липозомној мембрани (Cesquini и сар. 2003).

Кинетика липидне оксидације праћена је употребом флуоресцентног маркера BODIPY 581/591 C₁₁. Ово је релативно нови флуоресцентни маркер који се показао као погодан за праћење липидне пероксидације и за евалуацију антиоксидативног ефекта код система са липидним мембранама (Drummen и сар. 2002). BODIPY 581/591 C₁₁ је флуоресцентни аналог масних киселина и као липофилни молекул лако улази у липозомну мембрану и ту заузима положај. BODIPY 581/591 C₁₁ флуоресценцира светло црвено, али након оксидације, прелази у зону зелене емисије. На основу ове појаве утврђено је да ресвератрол индукује драстично смањење сигнала при анализи односно да смањује липидну пероксидацију, што потврђује резултате претходно добијене кроз TBARS тест.

Још један тест којим се утврђује утицај ресвератрола на стварање радикала при липидној пероксидацији индукованој UV зрачењем заснива се на анализи EPR спектра. У присуству ресвератрола интензитет спектра који је сразмеран количини насталих хидрокси-етил радикала у узорку смањен је за 87%, док је интензитет који потиче од друге врсте радикала умањен за 58%. На овај начин је такође потврђено да ресвератрол врло ефикасно инхибира стварање ОН радикала, док је мало мање ефикасан при инхибицији стварања других реактивних врста.

Са идејом даље примене липозома са инкапсулираним ресвератролом како у прехранбеној тако и у козметичкој и фармацеутској индустрији, у овој тези су даље припремљени и испитани сложени системи (микрочестице) на бази алгината са инкорпорираним липозомима који су садржали ресвератрол.

Липозоми често наилазе на проблем компатибилности и стабилности код примене у прехранбеним производима, па је дисперговање липозома у носаче на бази хидрогелова још једна могућа модификација у циљу примене липозома са инкапсулираним компонентом у прехранбене производе. До сада су у литератури ови сложени системи поменути од

стране неколико аутора (Рђановић и сар. 2010; Lee и сар. 2012; Gao и сар. 2014; Jøraholmen и сар. 2015), али махом са идејом за примену као облоге за ране, депои активних компоненти који могу да се инјектирају или за топикалну примену. Комбинација алгината и других материјала (који попуњавају поре (сахароза) и/или формирају још један слој (хитозан)) коришћена је са циљем да се смањи губитак форме након сушења и/или побољшају механичке карактеристике микрочестица и продужи ослобађање активне компоненте из ових система.

Карактеризација ових сложених система отпочела је одређивањем величине микрочестица и њиховом расподелом, што је изражено кроз вредности запреминских пречника d_{10} , d_{50} и d_{90} . Генерално, средњи пречник алгинатних микрочестица добијених екструзијом је комплексна функција оперативних параметара и особина самог полимера (Kostić и сар. 2012). У овој тези оперативни параметри су фиксирани за све узорке, а вискозитет почетних раствора имао је утицај како на величину тако и на облик микрочестица генерисаних у електричном пољу (Prüsse и сар. 2008). Како су вредности динамичког вискозитета почетних раствора имала следећи тренд: Na-алгинат < Na-алгинат са липозомима < Na-алгинат са липозомима и сахарозом (Слика 4.19.) очекивано су и вредности d_{50} расле по следећем редоследу ALG < ALG-LIP/RSV < ALG/SUC-LIP/RSV. Треба нагласити да су микрочестице ALG/CH-LIP/RSV припремљене употребом истог почетног раствора као и микрочестице ALG-LIP/RSV, а да је хитозан накнадно аплициран као додатни слој (поступак је описан у одељку 3.3.1). Ипак, нешто мањи пречник честица које су обложене хитозаном може да се објасни чињеницом да краћи полимерни ланци алгината лако дифундују између дугих полимерних ланаца хитозана због јаких јонских електростатичких интеракција, па ови комплекси доприносе формирању гушће полимерне мреже. Сличну појаву су уочили и Хаидар и сарадници (Haidar и сар. 2008) након додатка слоја хитозана преко

липозома који су обложени прво алгинатом. Вредности SPAN нису се значајно разликовале међу узорцима.

Бубрење микрочестица у води махом се приписује хидратацији хидрофилних група алгината. На основу вредности d_{50} измерених за микрочестице након хидратације уочљиво је да су микрочестице које су садржале сахарозу имале већи степен хидратације, док хитозан није показао статистички значајан утицај на вредност d_{50} након хидратације. У литератури постоје претпоставке да сахароза смањује агрегацију алгинатне „egg-box“ структуре и интерферира формирањем мултимерних структура (димери који прерастају у веће структуре) током сушења (вероватно кроз стерне сметње). Што су стабилније ове мултимерне структуре то се теже одвија хидратација (Vreeker и сар. 2008). Може се рећи да је сличан ефекат уочљив и када су у питању липозоми инкорпорирани унутар мреже алгината, али је овде ефекат мање изражен. Облагање микрочестица хитозаном није имало статистички значај на процес хидратације.

Када је у питању степен ефикасности инкорпорације ресвератрола добри резултати постигнути су у свим микрочестичним системима испитаним у овој тези (85-91%, Табела 4.5.). Микрочестице ALG/CH-LIP/RSV имале су најнижи степен ефикасности инкорпорације што се може приписати најмањој величини ових честица односно недостатку простора за инкорпорацију ресвератрола. Такође, мањи пречник ових микрочестица значи и краћи пут за дифузију ресвератрола из унутрашњости микрочестице ка спољашњој средини, па је стога могућ узрок мање ефикасности инкорпорације заправо израженија дифузија (губитак) ресвератрола у раствор за гелирање током саме припреме.

Садржај воде у микрочестичним системима испитаним у овој тези варира од 88 до 95% зависно од узорка што се поклапа са литературним подацима других аутора за сличне системе базиране на алгинату (Stojanović и сар.

2012). Познато је да хидрогелови на бази алгината имају висок садржај воде, за разлику од осталих узорака где је овај проценат нешто нижи.

Факор сферичности је параметар који говори о одступању облика микрочестице од идеалне сфере и његове вредности се крећу од нуле за идеалну сферу, до јединице за потпуно неправилне облике. Анализом микрографија добијених са оптичког микроскопа вредности фактора сферичности за системе липозоми-алгинат износиле су $0,080 \pm 0,06$, $0,042 \pm 0,036$, $0,020 \pm 0,029$ и $0,029 \pm 0,015$ за микрочестице ALG, ALG-LIP/RSV, ALG/SUC-LIP/RSV и ALG/CH-LIP/RSV респективно. Према овим вредностима и самим микрографијама уочљиво је да се облик микрочестица ALG/SUC-LIP/RSV највише поклапа са сфером, док ALG највише одступају од идеалне сфере. Ипак, статистичком анализом резултата сферичности утврђено је да не постоји статистички значајна разлика између узорака који садрже липозоме (ALG-LIP/RSV, ALG/SUC-LIP/RSV и ALG/CH-LIP/RSV) док се сферичност микрочестица алгината без липозома статистички значајно разликује од осталих узорака ($P < 0,05$). Испитујући утицај пунилаца на честице Са-алгината које служе као носачи за ћелије Чан и сардници (Chan и сар. 2011) приметили су да додаток пунилаца повећава сферичност честица. Ови аутори говоре да пуниоци дају потпору структури Са-алгинатне хидрогел мреже, па се може предпоставити да се у узорцима испитаним у овој тези липозомне дисперзије и сахароза понашају као пуниоци и тако обезбеђују већу сферичност микрочестица у којима се налазе. Поред овога са микрографија се може извести претпоставка да микрочестице које су садржале липозоме имају глатку површину. Овакви резултати потврђени су и SEM анализом. Наиме, на слици 4.21. а-г се види из попречних пресека микрочестица да се са додатком липозома смањила порозност структуре микрочестица у поређењу са узорцима ALG где није било липозома. Липозоми попоуњавају унутрашњи простор и формирају структуру са мање пора (Слика 4.21. а-г), што има утицај и на спорије

отпуштање ресвератрола из ових система. Најмање порозна и глатка структура микрочестица уочена је код узорака који су садржали и сахарозу што је и очекивано с обзиром да се сахароза користи као криопротектант и пунилац (Stojanović и сар. 2012). У узорку ALG/CH-LIP/RSV примећено је да површински слој има гушћу, мање порозну, структуру што је директна последица облагања хитозаном и интеракција које се јављају између алгинатне мреже и хитозана (Слика 4.21.в). Нешто гушћу спољну структуру алгинатних честица обложених хитозаном пријавили су и Нуалкаекул и сарадници (Nualkaekul и сар. 2012). SEM анализа потврдила је и успешно инкорпорирање липозома у унутрашњост микрочестица на бази алгината (слика б-г). Сличне резултате објавили су Лиу и сарадници (Liu и сар. 2012) који су липозоме инкорпорирани у микрочестице на бази поликапролактона.

На основу кривих са слике 4.22. може се закључити да сви узорци Са-алгината (криве а-д) имају ендотермни пик са максимумом на 125 °C који потиче од губитка воде која је везана за хидроксилне групе полимерних ланаца (Mimmo и сар. 2005). Ипак, овај пик који одговара дехидратацији умреженог матрикса појављује се као велики и широк пик у термограму празних честица ALG (крива а), алгинатних честица са липозомима ALG-LIP (крива б), и формулацијама са ресвератролом (ALG-LIP/RSV и ALG/CH-LIP/RSV) (криве в и д, респективно), док за узорак ALG/SUC-LIP/RSV (крива г) овај пик је узак са много већим вредностима енталпије (Табела 4.6.), што највероватније потиче од чињенице да је вода делимично замењена молекулима сахарозе. При вишим температурама јасно су уочљиве разлике између узорака. Тако, на температурама између 220 и 250 °C уочава се егзотермни пик за ALG који настаје услед деградације алгината коју прати дехидратација и деполимеризација протонованих карбоксилних група и оксидација ових макромолекула (Zohurian и сар. 2004; Sarmiento и сар. 2006). Овакав пик није детектован код узорака у које су инкорпорирани липозоми (криве б,в,г и д), могуће услед

интеракција алгината и фосфолипида (имајући у виду да овог пика нема код алгинатних честица које су садржале празне липозоме (крива б)). Термограми алгинатних честица са липозомима (криве б и в) имају мали ендотермни пик између 230 и 270 °C, што је типично за липозоме, али су вредности енталпије веће него код липозома. Међутим, овај ендотермни пик није детектован у узорцима ALG/CH-LIP/RSV и ALG/SUC-LIP/ RSV, вероватно услед малог масеног удела липозома у овим узорцима. На термограму који одговара узорку ALG/SUC-LIP/ RSV (крива г) уочава се изражен оштар ендотермни пик на 181 °C који одговара топљењу сахарозе што је потврђено термограмом чисте сахарозе датом на слици (крива б), али је овај прелаз померен ка нижим температурама. Са друге стране, други дупли ендотермни пик са центром на око 230 °C који је такође типичан за сахарозу (Bhandari и Hartel 2002; Hurtt и сар. 2004; Zeng и сар. 2001) није се појавио у термограму узорка ALG/SUC-LIP/ RSV . Овакав резултат указује да сахароза утиче на термичко понашање алгинатних честица које садрже липозоме са ресвератролом.

Механичке карактеристике микрочестичних система испитаних у овој дисертацији указују на то да присуство липозома смањује крутост алгинатних микрочестица (Табела 4.7.). Ово се уочава на основу мањих вредности сила потребних за постизање деформације од 30% него што је то случај код празних алгинатних микрочестица. То говори да након додатка липозома микрочестице постају мекше јер полимерна матрица постаје мање збијена. Исти утицај процеса инкапсулације на механичке карактеристике алгинатних микрочестица (~2 mm) које су имале висок садржај мануронске киселине детектовали су Чан и сарадници (Chan и сар. 2010), док су исти аутори објавили да микрочестице са високим садржајем гулуронске киселине у алгинату остају круте и након инкапсулације. У овој дисертацији вредности добијене за модуле еластичности опадају са инкорпорацијом липозома указујући на еластичнију мрежу у узорцима ALG-LIP/ RSV (Табела 4.7.). Сама сахароза

није показала знатан утицај на механичке карактеристике микрочестичних система, али је утицај сахарозе описан и у неким претходним истраживањима где су резултати недоследни (Nussinovitch и сар. 2001). Наиме, сахароза може да наруши формирање стабилне Са-алгинатне мреже, изазивајући смањење сила потребних за деформацију честица, док са друге стране додатак сахарозе повећава густину матрикса и са теоријске тачке гледишта доводи до потребе за применом већих сила како би се постигле исте деформације. Ови контрадикторни ефекти доводе до различитих закључака и онемогућују доношење закључка и предвиђање утицаја сахарозе на механичке карактеристике оваквих система. Допатак слоја хитозана смањено је вредности сила потребних за достизање 30% деформације. Поређења ради, у литератури је објављено да алгинатне честице обложене са два слоја хитозана имају смањену чврстину (Nualkaekul и сар. 2012). Ову појаву аутори су објаснили кроз смањену компактност полимерне мреже у присуству хитозана и слабијег умрежења калцијумових јона. Још један разлог мањих сила потребних за деформацију честица обложених хитозаном које су у овој тези детектоване може бити нешто мањи пречник који су ове честице имале у поређењу са осталим узорцима.

Резултати експеримената који се односе на кинетику отпуштања ресвератрола потврдили су продужено отпуштање ове компоненте из свих формулација на бази алгината. Како је и очекивано нешто спорије отпуштање уочено у системима липозоми-алгинат него из самих липозома. Одређивањем коефицијената дифузије у овим системима долази се до закључка да полимерна мембрана повећава отпор дифузији за 69-89% у поређењу са отпором на који ресвератрол наилази при отпуштању из липозома. Сличан тренд пријавили су и Пјановић и сарадници (Рјановић и сар. 2010) који су испитивали дифузионе отпоре на које наилазе лидокаин хидрохлорид и дихидрокварцетин при отпуштању из хидрогелова и хидрогелова са липозомима. Исти аутори утврдили су

да је отпор мембрана гела 22% већи него отпор који потиче од липозома. У овој тези, приметно је да је отпор самог Са-алгината око 30% мањи него отпор који потиче од бленде алгината са сахарозом или хитозаном. Присуство хитозана омогућава дужи период отпуштања ресвератрола из алгинатног матрикса тако што полимерну мрежу чини гушћом због интеракција које се јављају између ова два полимера (полианијонски алгинат и катјонски хитозан), док кристали сахарозе највероватније делују као физичка препрека преносу масе.

Отпуштање ресвератрола при дужим временским интервалима спорије је код узорка ALG-LIP/RSV у поређењу са осталим формулацијама, а приметно је и да ни један систем не отпусти потпуну количину ресвератрола у току периода испитивања. У литератури постоје објашњења да се јављају одређене интеракције између карбоксилних и хидроксилних група алгината са ресвератролом (Cho и сар. 2014; Istenič и сар. 2015), па се на тај начин може објаснити овај феномен.

На основу приказаних резултата испитивања липозома и система липозоми-алгинат може се претпоставити да би овакви системи могли да имају велики потенцијал за даљу примену у сектору хране, фармације или козметике. Производи са додатим липозомима у које је инкапсулиран ресвератрол или системима липозоми-алгинат имали би повећану нутритивну вредности и били атрактивни за потрошаче. Истовремено, резултати ове дисертације отварају могућност за даља истраживања у смислу одабира различитих комерцијалних смеша за припрему липозома или облагање самих липозома односно система липозоми-алгинат различитим полимерима, а све у циљу повећања ефикасности инкапсулације и постизања продуженог и контролисаног отпуштања активне компоненте на циљано место. Имајући у виду да је показано да ресвератрол може да продре из спољашњости у унутрашњост већ формиране липозомне мембране намеће се питање да ли је могуће модификовати процес инкапсулације тако да се активна компонента

убацује након завршене припреме липозома, што изискује обимна истраживања како би се утврдило у којој мери би предложени метод био ефикасан.

6. Закључци

У овој докторској дисертацији испитани су липозоми као системи за инкапсулацију, контролисано и продужено отпуштање ресвератрола. За припрему липозома коришћене су две методе, метода танког филма и пролипозомна метода, а за смањење величине липозома екструзиона техника и соникација. Липозоми припремљени различитим методама окарактерисани су са становишта расподеле величине, површинског наелектрисања, степена инкапсулације, стабилности и профила отпуштања ресвератрола. Такође је испитан и утицај самог ресвератрола на липозомну мембрану, ближе је одређена позиција на којој се ресвератрол смешта унутар липозомне мембране, али и очуваност антиоксидативних својстава ресвератрола по инкапсулацији.

Након дефинисања липозома као система за инкапсулацију, контролисано и продужено ослобађање ресвератрола, рад је проширен и на испитивање система липозоми-алгинат. Одређени су средњи пречници ових микрочестица, како у гел стању тако и сувих (лиофилизованих). Даље, дефинисан је степен инкорпорације ресвератрола у ове системе као и њихове механичке карактеристике. Системи су испитани и са становишта кинетике отпуштања ресвератрола.

На основу резултата изнетих у овој докторској дисертацији може се закључити да је пролипозомна метода у односу на методу танког филма погоднија за инкапсулацију ресвератрола јер је изузетно ефикасна (степен инкапсулације 99%), а једноставна за увећање размера процеса. Ресвератрол се у току самог процеса инкапсулације уграђује у унутрашњи део липозомне мембране и доводи до смањене флуидности мембране, а положај молекула унутар фосфолипидног двослоја је функција температуре. Такође је показано да се инкапсулацијом ресвератрола у липозоме чува антиоксидативна активност ове компоненте која уједно

успорава и липидну пероксидацију самих липозома, што значи да липозоми и ресвератрол имају међусобни стабилизујући ефекат. Са аспекта примене важна је чињеница да инкапсулација у липозоме омогућава продужено ослобађање ресвератрола. Инкорпорацију ресвератрола у сложене системе липозоми-алгинат, који су погоднији за примену у прехранбеној индустрији, могуће је постићи применом електростатичке екструзије са високим степеном ефикасности и ови системи обезбеђују још спорије отпуштање ресвератрола јер су коефицијенти дифузије ресвератрола два пута мањи у односу на дифузију кроз липозоме.

Поред главних могуће је извести и следеће закључке:

- Употребом комерцијалне липидне смеше при припреми липозома пролипозомном методом добијају се липозоми са око четири пута мањим пречником него што је то случај са липозомима припремљеним методом танког филма. Пролипозомна метода обезбеђује монодисперзну суспензију липозома, а накнадно смањење величине липозома фаворизовало је методу екструзије над методом соникације;
- Вредности зета потенцијала биле су негативе за све узорке испитане у овом раду, што потврђује добру стабилност липозомних дисперзија;
- Степен инкапсулације је висок за све узорке осим у случају када је примењена ултразвучна сонда за редукцију величине липозома, па се може рећи да су и метода танког филма и пролипозомна метода ефикасне за инкапсулацију ресвератрола, али је пролипозомна метода фаворизирана јер је степен био нешто виши а сама метода је погодна за индустријску примену;
- Обе методе припреме очувале су антиоксидативну активност ресвератрола скоро у потпуности (више од 90%), али је уочено да се активност изгубила када је примењена ултразвучна сонда за редукцију величине липозома;

- С обзиром да нису уочене значајне разлике у термограмима липозома и липозома са инкапсулираним ресвератролом изводи се закључак да је ресвератрол заробљен (инкапсулиран) у липозоме као и да постоји интеракција ресвератрола и компонената присутних у липидном двослоју;
- Резултати кинетике отпуштања указују да је дифузија ресвератрола спорија из липозома и да се максимална концентрација ресвератрола достиже након двоструко више времена у поређењу са контролом на основу чега може да се изнесе закључак да липозоми обезбеђују контролисано и продужено отпуштање ресвератрола;
- MLV липозоми имају већи отпор преносу масе за око 75% у поређењу са мањим липозомима, а сви узорци обезбеђују већи отпор дифузији ресвератрола па се могу сматрати погодним за продужено отпуштање ресвератрола;
- Цитотоксичност ресвератрола је смањена инкапсулацијом у липозоме;
- Обе анализе, EPR и флуориметрија потврђују да се ресвератрол уграђује у унутрашњи део липозомне мембране, а да се флуидност мембране смањује у присуству ресвератрола. Метода припреме липозома нема утицај на флуидност липидне мембране у присуству ресвератрола;
- Потврђено је да ресвератрол има антиоксидативни потенцијал да инхибира формирање малондиалдехида и да смањује липидну пероксидацију, као и да ефикасно инхибира стварање ОН радикала, док је мало мање ефикасан при инхибицији стварања других реактивних врста;
- Када су у питању системи липозоми-алгинат вискозност почетних раствора директно је утицала на величину микрочестица. Нешто мањи пречник честица забележен је код узорака који су обложени хитозаном;

- Сахароза повећава степен хидратације лиофилизованих честица, док хитозан нема статистички значајан утицај на вредност d_{50} након хидратације;
- Степен ефикасности инкорпорације ресвератрола је висок у свим микрочестичним системима испитаним у овој тези (85-91%). Микрочестице обложене хитозаном имале су најнижи степен ефикасности инкорпорације што се може приписати најмањој величини ових честица односно недостатку простора за инкорпорацију ресвератрола;
- Скенирајућа електронска микроскопија показала је да липозоми нису агрегирани током припреме микрочестица и да се са додатком липозома смањила порозност структуре микрочестица, а код узорка са хитозаном уочава се гушћи површински слој (дебљине око 7 μm) који има мање порозну структуру у поређењу са осталим узорцима.
- У погледу механичких својстава честица додаток сахарозе нема знатан утицај, док додаток слоја хитозана смањује вредности сила потребних за достизање 30% деформације;
- Резултати експеримената који се односе на кинетику отпуштања ресвератрола потврдили су продужено отпуштање ове компоненте из свих система липозоми-алгинат испитаних у овој тези. Отпуштање ресвератрола при дужим временским интервалима спорије је код узорка ALG-LIP/RSV у поређењу са осталим формулацијама, а приметно је и да ни један систем не отпусти потпуну количину ресвератрола у току периода испитивања.

Резултати ове дисертације дају увид како научној јавности тако и индустријском сектору о потенцијалу система са инкапсулираним ресвератролом за ширу примену, с обзиром да би њихов додаток могао значајно да допринесе квалитету и нутритивној вредности већ постојећих производа. Показано је да су липозоми погодни носачи за ресвератрол јер су физички стабилни и доприносе продуженом отпуштању ресвератрола.

Поред овога, резултати ове дисертације описују понашање ресвератрола инкапсулираног у липозоме чиме доприносе уопштеним закључцима о инкапсулацији слабо растворних активних компоненти или антиоксиданаса, који би могли да буду атрактивни за индустријску примену.

Литература

- Abert Vian M., Tomao V., Gallet S. (2005). Simple and rapid method for *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. *J. Chromatogr. A*, 1085, 224–229.
- Abram V., Berlec B., Ota A., Sentjurc M., Blatnik P., Poklar Ulrih N. (2013). Effect of flavonoid structure on the fluidity of model lipid membranes. *Food Chem.*, 139, 804–813.
- Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.*, 8, 102.
- Allen T.M., Cullis P.R. (2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 65, 36–48.
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7915–7922.
- Amri A., Chaunmeik J., Sfar S., Charrueau C. (2012). Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J. Controlled Release*, 158, 182–193.
- Augustin M.A., Abeywardena M.Y., Patten G., Head R., Lockett T., De Luca A., Sanguansri L. (2011). Effects of microencapsulation on the gastrointestinal transit and tissue distribution of a bioactive mixture of fish oil, tributyrin and resveratrol. *J. Funct. Foods*, 3, 25–37.
- Augustin M.A., Hemar Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem. Soc. Rev.*, 38, 902–912.
- Augustin M.A., Sanguansri L., Lockett T. (2013). Nano- and micro-encapsulated systems for enhancing the delivery of resveratrol. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1290, 107–112.
- Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, 13, 238–252.
- Baur A., Sinclair D. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nature Rev. Drug Discovery*, 5, 493–506.
- Belščak-Cvitanović A., Stojanović R., Manojlović V., Komes D., Juranović Cindrić I., Nedović V., Bugarski B. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.*, 44, 1094–1101.
- Bergonzi M.C., Hamdouch R., Mazzacuva F., Isacchi B., Bilia A.R. (2014). Optimization, characterization and in vitro evaluation of curcumin microemulsions. *LWT- Food Sci. Technol.*, 59, 148–155.
- Berta G.N., Salamone P., Sprio A.E. (2010). Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of resveratrol complexed with 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin. *Oral Oncol.*, 46, 42–48.
- Bhalerao S.S., Raje Harshal A. (2003). Preparation, optimization, characterization, and stability studies of salicylic acid liposomes. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 29, 451 – 467.

- Bhandari B.R., Hartel R.V. (2002). Co-crystallization of sucrose at high concentration in the presence of glucose and fructose. *J. Food Sci.*, 67, 1797–1802.
- Blume G., Cevc G. (1990). Liposomes for the sustained drug release *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1029, 91-97.
- Bonechi C., Martini S., Ciani L., Lamponi S., Rebmann H., Rossi C., Ristori S. (2012). Using liposomes as carriers for polyphenolic compounds: the case of *trans*-resveratrol. *PLoS ONE*, 7, e41438. doi:10.1371/journal.pone.0041438.
- Bonferoni M.C., Rossi S., Ferrari F., Caramella C. (1999). A modified Franz diffusion cell for simultaneous assessment of drug release and washability of mucoadhesive gels. *Pharm. Dev. Technol.*, 4, 45-53.
- Boualem K., Subirade M., Desjardins Y., Saucier L. (2013.) Development of an encapsulation system for the protection and controlled release of antimicrobial nisin at meat cooking temperature. *J. Food Res.*, 2, 36-45.
- Bourassa P., Kanakis C.D., Tarantilis P., Pollissiou M.G., Tajmir-Riahi H.A. (2010). Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin. *J. Phys. Chem. B.*, 114, 3348–3354.
- Božin B., Mimica-Đukić N., Samojlik I., Jovin E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosmery and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food. Chem.*, 55, 7879-7885.
- Brites J., Lucio M., Nunes C., Lima J., Reis S. (2010). Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: Relevance for its pharmacological effects. *Chem. Phys. Lipids*, 163, 747–754.
- Budai M., Szabó Z., Zimmer A., Szögyi M., Gróf P. (2004). Studies on molecular interactions between nalidixic acid and liposomes. *Int. J. Pharm.*, 279, 67–79.
- Bugarski B., Li Q., Goosen M.F.A., Poncet D., Neufeld R.J., Vunjak G. (1994). Electrostatic droplet generation: Mechanism of polymer droplet formation. *AIChE Journal*, 40, 1026-1031.
- Burey P., Bhandari B.R., Howes T., Gidley M.J. (2008). Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 48, 361-377.
- Caddeo C., Teskač K., Sinico C., Kristl J. (2008). Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *Int. J. Pharm.*, 363, 183–191.
- Carlotti M.E., Sapino S., Ugazio E., Gallarate M., Morel S. (2012). Resveratrol in solid lipid nanoparticles. *J. Disp. Sci. Tech.*, 39, 465-471.
- Cesquini M., Torsoni M., Stoppa G., Ogo S. (2003). t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomed. Pharmacother.*, 57, 124–129.
- Chan E.S., Yim Z.H., Phan S.H., Mansa R.F., Ravindra P. (2010). Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with calcium-alginate hydrogel beads. *Food Bioprod. Process*, 88, 195-201.
- Chan E.S., Wong S.L., Lee P.P., Lee J.S., Ti T.B. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydr. Polym.*, 83, 225-232.
- Chen C., Alli D. (1987). Use of fluidized bed in liposome manufacturing. *J. Pharm. Sci.*, 76, 419.

- Cho A.R., Chun Y.G., Kim B.K., Park D.J. (2014). Preparation of alginate-CaCl₂ microspheres as resveratrol carriers. *J. Mater. Sci.*, 49, 4612-4619.
- Coimbra M., Isacchi B., van Bloois L., Torano J.S., Ket A., Wu X., Broere F., Metselaar J.M., Rijcken C.J.F., Storm G., Bilia R., Schiffelers R.M. (2011). Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *Int. J. Pharm.*, 416, 433-442.
- Colas J.C., Shi W., Rao V.S.N.M., Omri A., Mozafari M.R., Singh H. (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38, 841-847.
- Colletier J.P., Chaize B., Winterhalter M., Fournier D. (2002). Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnol.*, 2, 2-9.
- Collin S., Callemien D., Counet C. (2006). Chocolate and cocoa: New sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. *Food Chem.*, 98, 649-657.
- Dai C., Wang B., Zhao H., Li B. (2005). Factors affecting protein release from microcapsule prepared by liposome in alginate. *Colloids Surf. B*, 42, 253-258.
- Dai C., Wang B., Zhao H., Li B., Wang J. (2006). Preparation and characterization of liposomes-in-alginate (LIA) for protein delivery system. *Colloids Surf. B*, 47, 205-210.
- Dalaklioglu S., Genc G.E., Aksoy N.H., Akcıt F., Gumuslu S. (2012). Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats *via* inhibition of lipid peroxidation. *Hum. Exp. Toxicol.*, 32, 662-671.
- Das M., Das D.K. (2010). Resveratrol and cardiovascular health. *Mol Aspects Med.*, 31, 503-512.
- Das S., Ng K.Y. (2010). Colon-specific delivery of resveratrol: optimization of multi-particulate calcium-pectinate carrier. *Int. J. Pharm.*, 385, 20-28.
- Das S., Ng K.Y., Ho P.C. (2011). Design of a pectinbased microparticle formulation using zinc ions as the crosslinking agent and glutaraldehyde as the hardening agent for colonic-specific delivery of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *J. Drug Targeting*, 19, 446-457.
- Davidov-Pardo G., McClements D.J. (2015). Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chem.*, 167, 205-212.
- Dhoot N.O., Wheatley M.A. (2003). Microencapsulated liposomes in controlled drug delivery: strategies to modulate drug release and eliminate the burst effect. *J. Pharm. Sci.*, 92, 679-689.
- Ding B., Xia S., Hayat K., Zhang X. (2009). Preparation and pH stability of ferrous glycinate liposomes. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2938-2944.
- DiTizio V., Karlgard C., Lilge L., Khoury A.E., Mittelman M.W., DiCosmo F. (2000). Localized drug delivery using crosslinked gelatin gels containing liposomes: Factors influencing liposome stability and drug release. *J. Biomed. Mater Res.*, 51, 96-106.
- Donbrow M. (1991). Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy. Danbrow M (Ed.). CRC Press, Boca Raton.

- Drummen G.P., Van Liebergen L.C., Op Den Kamp J.A., Post J.A. (2002). C11-Bodipy 581/591, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 473–490.
- Duarte A., Martinho A., Luís Â., Figueiras A., Oleastro M., Domingues F.C., Silva F. (2015). Resveratrol encapsulation with methyl- β -cyclodextrin for antibacterial and antioxidant delivery applications. *LWT Food Sci. Technol.*, doi: 10.1016/j.lwt.2015.04.004.
- Dziezak J.D. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol.*, 42, 136-151.
- Dorđević V., Balanč B., Belščak-Cvitanović A., Lević S., Trifković K., Kalušević A., Kostić I., Komes D., Bugarski B., Nedović V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Eng. Rev.*, 7, 452-490.
- Evens R., Schamphelaere K.A.C., Balcaen L., Wang Z., Roy K., Resano M., Flórez M., Boon N., Vanhaecke F., Janssen C.R. (2012). The use of liposomes to differentiate between the effects of nickel accumulation and altered food quality in *Daphnia magna* exposed to dietary nickel. *Aquat. Toxicol.*, 109, 80–89.
- Fabris S., Momo F., Ravagnan G., Stevanato R. (2008). Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles monolamellar liposomes. *Biophys. Chem.*, 135, 76–83.
- Fang Z., Bhandari B. (2010). Encapsulation of polyphenols – A review. *Trends Food Sci. Tec.*, 21, 510-523.
- Fathi M., Mozafari M.R., Mohebbi M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.*, 23, 13-27.
- Finkenstein E., Rosen G., Rauckman E. (1980). Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals: Practical aspects. *Arch. Biochem. Biophys.*, 200, 1–16.
- Fisher Scientific, Податак доступан на страници: <https://www.fishersci.com>, Januar 2016.
- Frankel E.N., Parks E.J., Xu R., Schneeman B.O., Davis P.A., German J.B. (1994). Effect of n-3 fatty acid-rich fish oil supplementation on the oxidation of low density lipoproteins. *Lipids*, 29, 233–236.
- Gaede H.C, Gawrisch K. (2003). Lateral diffusion rates of lipid, water, and a hydrophobic drug in a multilamellar liposome. *Biophys. J.*, 85, 1734–1740.
- Gao W., Vecchio D., Li J., Zhu J., Zhang Q., Fu V., Li J., Thamphiwatana S., Lu D., Zhang L. (2014). Hydrogel Containing nanoparticle-stabilized liposomes for topical antimicrobial delivery. *ACS Nano*, 8, 2900–2907.
- García-Segovia P., Barreto-Palacios V., Bretón J., Martínez-Monzó J. (2011). Microencapsulation of essential oils using β -cyclodextrin: Applications in gastronomy. *J. Culinary Sci. Technol.*, 9, 150–157.
- George M., Abraham T.E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *J. Controlled Release*, 114, 1–14.
- Gibis M., Zeeb B., Weiss J. (2014). Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*, 38, 28–39.

- Goh M.K., Mahadi M.N., Hassan O., Rahman A.R.Z.N.R., Ilias M.R. (2009). A predominant β -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 57, 270-277.
- Goldberg D.M., Hahn S.E., Parkes J.G. (1995). Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin. Chim. Acta*, 237, 155-187.
- Gombotz W.R., Wee S.F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 64, 194-205.
- Gonnet M., Lethuaut L., Boury F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Controlled Release*, 146, 276-290.
- Grassi G., Crevatin A., Farra R., Guarnieri G., Pascotto A., Rehimers B., Lapasin R., Grassi M. (2006). Rheological properties of aqueous Pluronic-alginate systems containing liposomes. *J. Colloid Interface Sci.*, 301, 282-290.
- Gregoriadis G., Florence A.T., Patel H.M. (Eds.) (1993). *Liposomes in Drug Delivery*. Harwood Academic Publishers, London, UK.
- Gregoriadis G. (2006). *Liposome technology, volume I: Liposome preparation and related techniques* (3rd ed.). New York: Informa Helthcare USA, Inc.
- Gülçin İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.*, 11, 210-218.
- Gusman J., Malonne H., Atassi G. (2001). A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, 22, 1111-1117.
- Haidar ZS., Hamdy RC., Tabrizian M. (2008). Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. *Biomaterials*, 29, 1207-1215.
- Hemar Y., Gerbeaud M., Oliver C.M., Augustin M.A. (2011). Investigation into the interaction between resveratrol and whey proteins using fluorescence spectroscopy. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 46, 2137-2144.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal J. Agric. Food. Chem.*, 53, 1841-1856.
- Huang Z., Li X., Zhang T., Song Y., She Z., Li J., Deng Y. (2014). Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian J. Pharm. Sci.*, 9, 176-182.
- Hurtta M., Pitkänen I., Knuutinen J. (2004). Melting behaviour of d-sucrose, d-glucose and d-fructose. *Carbohydr. Res.*, 39, 2267-2273.
- Isailović B., Đorđević V., Nedović V., Bugarski B. (2013b). Liposome-in-alginate systems for encapsulation of natural antioxidants. Inside Food symposium, April 9-12, 2013, Leuven, Belgium. http://www.insidefood.eu/INSIDEFOOD_WEB/UK/WORD/proceedings/092P.pdf
- Isailović B., Kostić I., Zvonar A., Đorđević V., Gašperlin M., Nedović V., Bugarski B. (2013a). Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.*, 19, 181-189.
- Istenič K., Balanč B.D., Djordjević V.B., Bele M., Nedović V.A., Bugarski B.M., Poklar Ulrich N. (2015). Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles. *J. Food Eng.*, 167 B, 196-203.

- Jaafar-Maalej C., Charcosset C., Fessi H. (2011). A new method for liposome preparation using a membrane contactor. *J. Liposome Res.*, 21, 213–220.
- Jackson L.S., Lee K. (1991). Microencapsulation and the food industry. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 24, 289–297.
- Jahadi M., Khosravi-Darani K., Ehsani M.R., Mozafari M.R., Saboury A.A., Seydahmadian F., Vafabakhsh Z. (2012). Evaluating the effects of process variables on protease-loaded nano-liposome production by plackett-burman design for utilizing in cheese ripening acceleration. *Asian. J. Chem.*, 24, 3891–3894.
- Janero D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity. *Free Radic. Biol. Med.*, 9, 515–540.
- Jang M., Cai L., Udeani G., Slowing K., Thomas C., Beecher C., Pezzut J. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218–220.
- Jantzen G.M., Robinson J.R. (2002). Sustained- and controlled-release drug-delivery systems. In: Banker G.S., Rhodes C.T., Dekker M. (Eds.), *Modern Pharmaceutics* (4th ed.). Inc. New York, pp. 501–527.
- Jøraholmen M.W., Škalko-Basnet N., Acharya G., Basnet P. (2015). Resveratrol-loaded liposomes for topical treatment of the vaginal inflammation and infections. *Pharm. Sci.*, 79, 112–121.
- Jun-xia X., Hai-yan Z., Jian Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chem.*, 125, 1267–1272.
- Keller B.C. (2001). Liposomes in nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, 12, 25–31.
- Kerdudo A., Dingas A., Fernandez X., Faure C. (2014). Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food Chem.*, 159, 12–19.
- Kibat P.G., Igari Y., Wheatley M.A., Eisen H.N., Langer R. (1990). Enzymatically activated microencapsulated liposomes can provide pulsatile drug release. *FASEB J.*, 4, 2533–2539.
- King R.E., Bomser J.A., Min D.B. (2006). Bioactivity of Resveratrol. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 5, 65–70.
- Klimundova J., Satinsky D., Sklenarova H., Solich P. (2006). Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell. *Talanta*, 69, 730–735.
- Knežević Z., Bobić S., Milutinović A., Obradović B., Mojović L., Bugarski B. (2002). Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. *Process Biochem.*, 38, 313–8.
- Kopp P. (1998). Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur. J. Endocrinol.*, 138, 619–620.
- Kostić I., Isailović B., Đorđević V., Lević S., Nedović V., Bugarski B. (2012). Electrostatic extrusion as a dispersion technique for encapsulation of cells and bioactive compounds. *Hem. Ind.*, 66, 503–515.

- Kristl J., Teskac K., Caddeo C., Abramovič Z., Šentjurc. M. (2009). Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 73, 253–259.
- Kuntsche J., Freisleben I., Steiniger F., Fahr A. (2010). Temoporfin-loaded liposomes: Physicochemical characterization. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 40, 305–315.
- Lalou S., Mantzouridou F., Paraskevopoulou A., Bugarski B., Levic S., Nedovic V. (2013). Bioflavour production from orange peel hydrolysate using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 9397–9407.
- Langer R.S. (1983). New drug delivery systems: what the clinician can expect. *Drug Ther.*, 13, 217.
- Laouini A., Charcosset C., Fessib H., Holdicha R.G., Vladisavljevic G.T. (2013). Preparation of liposomes: A novel application of microengineered membranes—From laboratory scale to large scale. *Colloids Surf. B*, 112, 272–278.
- Laouini A., Jaafar-Maalej C., Sfar S., Charcosset C., Fessi H. (2011). Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor – Application to spironolactone encapsulation. *Int. J. Pharm.*, 415, 53–61.
- Lapinski M.M., Castro-Forero A., Greiner A.J., Ofoli R.Y., Blanchard G.J. (2007). Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir*, 23, 11677–11683.
- Lasch J., Weissig V., Brandl M. (2003). Preparation of liposomes. In: Torchilin V.P., Weissig V. (Eds.), *Liposomes – practical approach* (2nd ed.). Oxford University Press, Oxford, pp.3–29.
- Lasic D.D. (1993). *Liposomes – from physics to applications*, Elsevier.
- Lee J.H., Oh H., Baxa U., Raghavan S.R., Blumenthal R. (2012). Biopolymer-connected liposome networks as injectable biomaterials capable of sustained local drug delivery. *Biomacromolecules*, 13, 3388–3394.
- Levic S., Pajic Lijakovic I., Đorđević V., Rac V., Rakic V., Solevic Knudsen T., Pavlović V., Bugarski B., Nedović V. (2015). Characterization of sodium alginate/d-limonene emulsions and respective calcium alginate/d-limonene beads produced by electrostatic extrusion. *Food Hydrocolloids*, 45, 111–123.
- Lević S., Djordjević V., Rajić N., Milivojević M., Bugarski B., Nedović V. (2013). Entrapment of ethyl vanillin in calcium alginate and calcium alginate/poly(vinyl alcohol) beads. *Chemical Papers*, 67, 221–228.
- Li Y., Hu M., Du Y.M., Xiao H., McClements D.J. (2011). Control of lipase digestibility of emulsified lipids by encapsulation within calcium alginate beads. *Food Hydrocolloids*, 25, 122–30.
- Liang L., Tajmir-Riahi A., Subirade M. (2008). Interaction of β -lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. *Biomacromolecules*, 9, 50–56.
- Liebenberg W., Engelbrecht E., Wessels A., Devarakonda B., Yang W., De Villiers M.M. (2004). A Comparative study of the release of active ingredients from semisolid cosmeceuticals measured with Franz, enhancer or flow-through cell diffusion apparatus. *J. Food Drug Anal.*, 12, 19–28.

- Lim K.G., Gray A.I., Anthony N.G., Mackay S.P., Pyne S., Pine N.J. (2014). Resveratrol and its oligomers: modulation of sphingolipid metabolism and signaling in disease. *Arch. Toxicol.*, 88, 2213–2232.
- Liu M., Chen L., Zhao Y., Gan L., Zhu D., Xiong W., Lv Y., Xu Z., Hao Z., Chen L. (2012). Preparation, characterization and properties of liposome-loaded polycaprolactone microspheres as a drug delivery system. *Colloid. Surf. A*, 395, 131–136.
- Lopez-Nicolas M., Nunez-Delicado E., Perez-Lopez J. (2006). Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for cyclodextrin complexes of *trans*-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1135, 158–165.
- Lopez-Pinto J.M., Gonzalez-Rodriguez M.L., Rabasco A.M. (2005). Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *Int. J. Pharm.*, 298, 1–12.
- Loveday S.M., Singh H. (2008). Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 19, 657–668.
- Madene A., Jacquot M., Scher J., Desobry S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release—a review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41, 1–21.
- Malheiros P.S., Daroit D.J., Brandelli A. (2010). Food applications of liposome encapsulated antimicrobial peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, 21, 284–292.
- Malheiros P.S., Sant'Anna V., Barbosa M.S., Brandelli A., Franco B.D.G.M. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 156, 272–277.
- Manconi M., Sinico C., Valenti D., Loy G., Fadda A.M. (2002). Niosomes as carriers for tretinoin. I. Preparation and properties. *Int. J. Pharm.*, 234, 237–248.
- Manojlović V. (2008). Imobilizacija biološki aktivnih supstanci i ćelija u mikro- i nano-čestičnim sistemima. Doktorska teza, TMF Beograd.
- Manojlović V., Đonlagić J., Obradović B., Nedović V., Bugarski B. (2005). Effects of cell addition on immobilization by electrostatic droplet generation. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, 1, 79–84.
- Manojlović V., Nedović V.A., Kailasapathy K., Zuidam J.N. (2010). Encapsulation of probiotics for use in food products. In: Zuidam N.J., Nedovic V.A (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springer, Dordrecht, pp. 269–301.
- Marques H.M.C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Frag. J.*, 25, 313–326.
- Mehnert W., Mader K. (2001). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 47, 165–196.
- Mimmo T., Marzadori C., Montecchio D., Gessa C. (2005). Characterisation of Ca- and Al-pectate gels by thermal analysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, 340, 2510–2519.
- Mishra G.P., Bagui M., Tamboli V., Mitra A.K. (2011). Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv.*, 2011, ID 863734.
- Moghimpour E., Handali S. (2012). Utilization of thin film method for preparation of celecoxib loaded liposomes. *Adv. Pharm. Bull.*, 2, 93–98.

- Moraes M., Carvalho J.M.P., Silva C.R., Cho S., Sola M.R., Pinho S.C. (2013). Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 48, 274–282.
- Mourtas S., Fotopoulou S., Duraj S., Sfika V., Tsakiroglou C., Antimisiaris S.G. (2007). Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. *Colloids Surf. B*, 55, 212–221.
- Mozafari M., Johanson C., Hatziantoniou S., Demetzos C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *J. Liposome Res.*, 18, 309–327.
- Mozafari M.R. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 10, 711–719.
- Mukherjee K., Venkatesh M., Venkatesh P., Saha B.P., Mukherjee P.K. (2011). Effect of soy phosphatidyl choline on the bioavailability and nutritional health benefits of resveratrol. *Food Res. Int.*, 44, 1088–1093.
- Muller R.H., Radtke M., Wissing S.A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetics and dermatological preparations. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 54, S131–S155.
- Narayanan N.K., Nargi D., Randolph C., Narayanan B.A. (2009). Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. *Int. J. Cancer.*, 125, 1–8.
- Nedović V. (1999). Imobilisani ćelijski sistemi u fermentaciji piva. Zadužbina Andrejević, Beograd.
- Nedović V., Manojlović V., Pruesse U., Bugarski B., Djonlagić J., Vorlop K.D. (2006). Optimization of the electrostatic droplet generation process for controlled microbead production – single nozzle system. *Chemi. Ind. Chem. Eng. Q.*, 12, 53–57.
- Nedović V.A., Obradović B., Leskošek-Čukalović I., Trifunović O., Pešić R., Bugarski B. (2001). Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast. *Process Biochem.*, 37, 17–22.
- Nelson G. (2002). Application of microencapsulation in textiles. *Int. J. Pharm.*, 242, 55–62.
- Ng S.F., Rouse J.J., Sanderson F.D., Meidan V., Eccleston G.M. (2010). Validation of a static franz diffusion cell system for in vitro permeation studies. *AAPS PharmSciTech.*, 11, 1432–41.
- Nualkaekul S., Lenton D., Cook M.T., Khutoryanskiy V.V., Charalampopoulos D. (2012). Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydr. Polym.*, 90, 1281–1287.
- Nussinovitch A., Corradini M.G., Normand M.D., Peleg M. (2001). Effect of starch, sucrose and their combinations on the mechanical and acoustic properties of freeze-dried alginate gels. *Food Res. Int.*, 34, 871–878.
- O'Neill G.J., Egan T., Jacquier J.C., O'Sullivan M., O'Riordan E.D. (2014). Whey microbeads as a matrix for the encapsulation and immobilization of riboflavin and peptides. *Food Chem.*, 160, 46–52.

- Oehlke K., Adamiuk M., Behnsilian D., Gräf V., Mayer-Miebach E., Walz E., Greiner R. (2014). Potential bioavailability enhancement of bioactive compounds using food-grade engineered nanomaterials: a review of the existing evidence. *Food Funct.*, 5, 1341-59.
- Ota A., Abramovic H., Abram V., Poklar Ulrich N. (2011). Interactions of p-coumaric, caffeic and ferulic acids and their styrenes with model lipid membranes. *Food Chem.*, 125, 1256-1261.
- Özer B., Kirmaci H.A., Senel E., Atamer M., Hayaloglu A. (2009). Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *Int. J. Dairy. Technol.*, 19, 22-29.
- Park S.H., Oh S.G., Suh K.D., Han S.H., Chung D.J., Mun J.Y., Han S.S., Kim J.W. (2009). Control over micro-fluidity of liposomal membranes by hybridizing metal nanoparticles. *Colloids Surf. B*, 70, 108-113.
- Pelle E., Maes D., Padulo G.A., Kim E.K., Smith W.P. (1990). An in-vitro model to test relative antioxidant potential: Ultraviolet-induced lipid peroxidation in liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 283, 234-240.
- Peng H., Li W., Ning F., Yao L., Luo M., Zhu X., Zhao Q., Xiong H. (2014). Amphiphilic chitosan derivatives-based liposomes: synthesis, development, and properties as a carrier for sustained release of salidroside. *J. Agric. Food. Chem.*, 62, 626-633.
- Peng H., Xiong H., Li J., Xie M., Liu Y., Bai C., Chen L. (2010). Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food Chem.*, 121, 23-28.
- Perrett S., Golding M., Williams P. (1991). A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: Characterization of liposomes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 154-161.
- Pineiro Z., Palma M., Barroso C. (2006). Determination of trans-resveratrol in grapes by pressurised liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1110, 61-65.
- Pjanović R. (2010). Prenos mase aktivne komponente u heterogenim sistemima sa mikročesticama. Doktorska disertacija, TMF Beograd.
- Pjanović R., Bošković-Vragolović N., Veljković-Giga J., Garić-Grulović R., Pejanović S., Bugarski B. (2010). Diffusion of drugs from hydrogels and liposomes as drug carriers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85, 693-698.
- Poklar Ulrich N., Ota A., Sentjurc M., Kure S., Abram V. (2010). Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chem.*, 121, 78-84.
- Poncelet D., Babak V., Neufeld R.J., Goosen M., Bugarski B. (1999). Theory of electrostatic dispersion of polymer solution in the production of microgel beds containing biocatalyst. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 79, 213-228.
- Pravilović R.N., Radunović V.S., Bošković-Vragolović N.M., Bugarski B.M., Pjanović R.V. (2015). The influence of membrane composition on the release of polyphenols from liposomes. *Hem. Ind.*, 69, 347-353.
- Prüsse U., Bilancetti L., Bučko M., Bugarski B., Bukowski J., Gemeiner P., Lewinska D., Manojlovic V., Massart B., Nastruzzi C., Nedovic V., Poncelet D., Siebenhaar S., Tobler L. (2008). Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chem. Pap.*, 62, 364-374.

- Rao J., McClements D.J. (2012). Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids*, 29, 326-334.
- Rashidinejad A., Birch E.J., Sun-Waterhouse D., Everett D.W. (2014). Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chem.*, 156, 176-183.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.*, 26, 1231-1237.
- Riaz M. (1996). Liposomes preparation methods. *Pakistan J. Pharm. Sci.*, 19, 65-77.
- Samad A., Sultana Y., Aqil M. (2007). Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr. Drug Delivery*, 4, 297-305.
- Sarmiento B., Ferreira D., Veiga .F, Ribeiro A. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydr. Polym.*, 66, 1-7.
- Sarpietro M., Spatafora C., Tringali C., Micieli D., Castelli F. (2007). Interaction of resveratrol and its trimethyl and triacetyl derivatives with biomembrane models studied by differential scanning calorimetry. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 3720-3728.
- Scalbert A., Johnson I.T., Saltmar M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 215S-217S.
- Schrooyen P.M.M., Meer R.v.d., Kruif C.G.D. (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, 60, 475-479.
- Shang Y.J., Liu X.D., Dai F., Shang X.L., Jia W.Q., Liu Q., Zhou B. (2009). Radical-scavenging activity and mechanism of resveratrol-oriented analogues: Influence of the solvent, radical, and substitution. *J. Org. Chem.*, 74, 5025-5031.
- Sherry M., Charcosset C., Fessi H., Greige-Gerges H. (2013). Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *J. Liposome Res.*, 232, 268-275.
- Shi G., Rao L, Yu H., Xiang H., Yang H., Ji R. (2008). Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *Int. J. Pharm.*, 349, 83-93.
- Shi G., Rao L., Yu H. (2007). Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *Int. J. Pharm.*, 349, 83-93.
- Sigma Aldrich, Податак доступан на страници: <http://www.sigmaaldrich.com/>, Јануар 2016.
- Silberman S., McGarvey T. W., Comrie E., Persky B. (1990). The influence of ethanol on cell membrane fluidity, migration, and invasion of murine melanoma cells. *Exp. Cell Res.*, 189, 64-68.
- Singh H., Thompson A., Liu W., Corredig M., (2012). Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems. In: Garti N., McClements D.J. (Eds.), *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge UK, pp. 287-318.
- Smith A., Jaime-Fonseca M., Grover L.M., Bakalis S. (2010). Alginate-loaded liposomes can protect encapsulated alkaline phosphatase functionality when exposed to gastric pH. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 4719-4724.

- Socaciu C., Jessel R., Dieh H. (2000). Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: Effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy. *Chem. Phys. Lipids*, 106, 79–88.
- Stark B., Pabst G., Prassl R. (2010). Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 41, 546–555.
- Stojanović R, Belščak-Cvitanović A, Manojlović V, Komes D, Nedović V, Bugarski B. (2012). Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *J. Sci. Food Agric.*, 92, 685–696.
- Stojanović S., Sprinz H., Berde O. (2001). Efficiency and mechanism of the antioxidant action of *trans*-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 391, 79–89.
- Strasdat B., Bunjes H. (2013). Incorporation of lipid nanoparticles into calcium alginate beads and characterization of the encapsulated particles by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 30, 567–575.
- Sun-Waterhouse D., Wadhwa S.S. (2013). Industry-relevant approaches for minimising the bitterness of bioactive compounds in functional foods: A review. *Food Bioprocess Technol.*, 6, 607–627.
- Szente L., Szejtli J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.*, 5, 137–142.
- Šentjurc M., Sok M., Serša G. (1998). Plasma membrane fluidity alterations in cancerous tissues. *Radiol. Oncol.*, 32, 109–117.
- Štrancar J., Koklic T., Arsov Z. (2003). Soft picture of lateral heterogeneity in biomembranes. *J. Membr. Biol.*, 196, 135–146.
- Tan C., Xia S., Xue J., Xie J., Feng B., Zhang X. (2013). Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 8175–8184.
- Taylor K.M.G., Morris R.M. (1995). Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochim. Acta*, 248, 289–301.
- Taylor T., Davidson P., Bruce D., Weiss J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, 587–605.
- Teskac K., Kristl J. (2010). The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int. J. Pharm.*, 390, 61–69.
- Teskač Plajnšek K., Pajk S., Govedarica B., Pečar S., Srčič S., Kristl J. (2011). A novel fluorescent probe for more effective monitoring of nanosized drug delivery systems within the cells. *Int. J. Pharm.*, 416, 384–393.
- Thies C. (2005). Microencapsulation. In: Seidel A. (Ed.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (4th ed.). John Wiley & Sons Inc., Hoboken, pp. 317–327.
- Toliopoulos I.K., Simos Y.V., Oikonomidis S., Spyros C.K. (2013). Resveratrol diminishes platelet aggregation and increases susceptibility of K562 tumor cells to natural killer cells. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 50, 14–18.
- Torchilin V.W. (2003). Preparation of liposomes. In: Torchilin V.A. (Ed.), *Liposomes*, New York: Oxford University Press Inc., 3–30.

- Trela B.C., Waterhouse A.L. (1996). Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 1253–1257.
- Tsuchiya H., Nagayama M., Tanaka T., Furusawa M., Kashimata M., Takeuchi H. (2002). Membrane-rigidifying effects of anti-cancer dietary factors. *BioFactors*, 16, 45–56.
- Turanek J., Zaluska D., Neca J. (1997). Linkup of a fast protein liquid chromatography system with a stirred thermostated cell for sterile of liposomes by the proliposome-liposome application to encapsulation of antibiotics peptide immunomodulators, and a photosensitizer. *Anal. Biochem.*, 249, 131–139.
- Vemuri S., Rhodes C.S. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helv.*, 70, 95–111.
- Vladislavjevic G.T., Laouini A., Charcosset C., Fessi H., Bandulasena H.C.H., Holdich R.G. (2014). Production of liposomes using microengineered membrane and co-flow microfluidic device. *Colloids Surf. A*, 458, 168–177.
- Vreeker R., Li L., Fang Y., Appelqvist I., Mendes E. (2008). Drying and rehydration of calcium alginate gels. *Food Biophys.*, 3, 361–369.
- Wagner A., Vorauer-Uhl K. (2011). Liposome technology for industrial purposes. *J. of Drug Delivery*, 2011, ID591325.
- Wang Q., Hu X., Du Y., Kennedy J.F. (2010). Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydr. Polym.*, 82, 842–847.
- Wang X., Zhao J. (2013). Encapsulation of the herbicide picloram by using polyelectrolyte biopolymers as layer-by-layer materials. *J. Agric. Food. Chem.*, 61, 3789–3796.
- Weiner M., Martin F., Riaz M. (1989). Liposomes as a drug delivery system. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 15, 1524–1554.
- Wesołowska O., Kuzdzal M., Strancar J., Michalak K. (2009). Interaction of the chemopreventive agent resveratrol and its metabolite, piceatannol with model membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788, 1851–1860.
- Wikipedia, Документ доступан на страници: <https://en.wikipedia.org/wiki/Phospholipid>, Децембар 2015.
- Won K., Kim S., Kim K.J., Park H.W., Moon S.J. (2005). Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem*, 40, 2149–2154.
- Xiao J.B., Chen X.Q., Jiang X.Y., Hilczer M., Tachiya M. (2008). Probing the interaction of Trans-resveratrol with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study with Tachiya model. *J. Fluores*, 18, 671–678.
- Xing L., Dawei C., Liping X., Rongqing Z. (2003). Oral colonspecific drug delivery for bee venom peptide: development of a coated calcium alginate gel beads-entrapped liposome. *J. Control. Release*, 93, 293–300.
- Xu X., Khan M.A., Burgess D.J. (2012). Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *Int. J. Pharm.*, 423, 410–418.
- Xu X., London E. (2000). The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry*, 39, 843–849.

- Yan-yu X., Yun-mei S., Zhi-peng C., Qi-neng P. (2006). Preparation of silymarin proliposome: A new way to increase oral bioavailability of silymarin in beagle dogs. *Int. J. Pharm.*, 319, 162–168.
- Yoshida P.A., Yokota D., Foglio M.A., Rodrigues R.A.F., Pinho S.C. (2010). Liposomes incorporating essential oil of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Characterization of aqueous dispersions and lyophilized formulations. *J. Microencapsulation*, 27, 416–425.
- Yu L.X., Amidon G.L. (2000). Analytical solutions to mass transfer. In: Amidon G.L., Lee P.I., Topp E.M. (Eds.), *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*. Inc, New York, pp. 23-54.
- Yu X., Chu S., Hagerman A.E., Lorigan G.A. (2011). Probing the interaction of polyphenols with lipid bilayers by solidstate NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 6783–6789.
- Zeng X.M., Martin G.P., Marriott C. (2001). Effects of molecular weight of polyvinylpyrrolidone on the glass transition and crystallization of co-lyophilized sucrose. *Int. J. Pharm.*, 218, 63–73.
- Zhang J., Dai X.F., Huang J.Y. (2012b). Resveratrol binding to fibrinogen and its biological implication. *Food Biophys.*, 7, 35–42.
- Zhang J., Mi Q., Shen. M. (2012a). Resveratrol binding to collagen and its biological implication. *Food Chem.*, 131, 879–884.
- Zohuriaan M. J., Shokrolahi F. (2004). Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*, 23, 575–579.
- Zou Y., Lee H.Y., Seo Y.C., Ahn J. (2012). Enhanced antimicrobial activity of nisin-loaded liposomal nanoparticles against foodborne pathogens. *J. Food Sci.*, 77, 165-170.
- Zuidam N.J., Shimoni E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In: Zuidam N.J., Nedovic V.A (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springer, Dordrecht, pp. 3-29.

Садржај слика

Слика 1.1. Хемијска структура <i>trans</i> –ресвератрола	7
Слика 1.2. Шематски приказ основних врста честица добијених инкапсулацијом	10
Слика 1.3. Шематски приказ система за инкапсулацију: а) активна компонента обложена једним слојем полимера; б) активна компонента диспергована у полимерном гелу; в) активна компонента обложена са више слојева полимера; г) различите активне компоненте обложене једним слојем полимера; д) различите активне компоненте обложене са више слојева полимера.....	13
Слика 1.4. Шематски приказ профила отпуштања активних компоненти из конвенционалних формулација и формулација са контролисаним отпуштањем.....	20
Слика 1.5. Шематски прикази различитих система за контролисано отпуштање активних компоненти.....	21
Слика 1.6. Шематски приказ једнодимензионалне дифузије кроз филм..	26
Слика 1.7. Шематски приказ једнодимензионалне дифузије кроз мембрану	27
Слика 1.8. Шематски приказ једнодимензионалне дифузије кроз ћелију са дијафрагмом	29
Слика 1.9. Фосфолипиди као градивне јединице ћелијске мембране	33
Слика 1.10. Три основне фосфолипидне структуре које се формирају у раствору	33
Слика 1.11. Класификација липозома према броју липидних двослоја	35
Слика 1.12. Липозом са инкапсулираном хидрофобном (А) и хидрофилном (Б) активном компонентом и увеличан фосфолипидни двослој.....	36
Слика 1.13. а) Конформација β -D-манурата и α -L-гулуроната б) Састав блокова код алгината.....	44
Слика 1.14. Шематски приказ размене јона натријума и калцијума при гелирању алгината, чиме се образује специфична структура тзв. кутија за јаја („egg-box“).....	45
Слика 3.1. Шематски приказ методе танког филма за припрему липозома	54
Слика 3.2. Шематски приказ пролипозомне методе за припрему липозома	55
Слика 3.3. Уређај за екструзију	56

Слика 3.4. Шематски приказ АВТS теста	59
Слика 3.5. Шематски приказ Францове дифузионе ћелије	61
Слика 3.6. Шематски приказ припреме микрочестица липозоми-алгинат	67
Слика 4.1. Средњи пречници и PDI вредности липозомних дисперзија током три недеље складиштења (барови представљају стандардне девијације при мерењу 3 узорка) а) MLV; б) липозоми смањени техником екструзије; в) липозоми смањени техником соникације	74
Слика 4.2. AFM микрографије PRO-MLV узорка а) 3D топографија б) пречник и висина липозома	75
Слика 4.3. AFM микрографије PRO-MLV-RSV узорка а) 3D топографија б) пречник и висина липозома	75
Слика 4.4. DSC термограми чистог ресвератрола, фодфополифона 90 и холестерола	77
Слика 4.5. а) DSC термограми празних липозома и липозома са ресвератролом припремљених TF методом или PRO методом. Приказани су MLV липозоми и липозоми третирани екструзијом; б) детаљ са термограма под а	78
Слика 4.6. DSC термограми TF-DPPC липозома без ресвератрола (контрола) и у присуству ресвератрола у два молска односа	79
Слика 4.7. Кинетика отпуштања ресвератрола а) из етанолног раствора; б) из липозомних дисперзија.....	81
Слика 4.8. Дифузија ресвератрола из липозома апроксимирана другим Фиковим законом дифузије.....	83
Слика 4.9. Репрезентативне трансмисионе микрографије морфологије ћелијске линије NCTC 2544 третиране: а) фосфатним пуфером (негативна контрола); б) етанолним раствором RSV (позитивна контрола); в) PRO-EX, г) PRO-EX-RSV; д) PRO-MLV; и) б) PRO-MLV-RDV. Микрографије су снимљене након 48 h инкубације	85
Слика 4.10. Пример EPR спектра липозома са ресвератролом припремљених PRO методом уз употребу спинског маркера MeFASL (2,11) на 20°C	86
Слика 4.11. а) Температурна зависност емпиријског корелационог времена детектована употребом спинских маркера MeFASL(10,3) и б) MeFASL (2,11). Липозоми припремљени методом TF и PRO. Стандардне девијације два независна мерења биле су испод 5%	88
Слика 4.12. Температурна зависност параметра уређености (S, лево) и ротационог корелационог времена (τ_c , десно) за липозоме припремљене методом TF (горе) и методом PRO (доле) уз употребу спинског маркера MeFASL (10,3). Зависности су добијене као резултат компјутерске	

- симулације у програму EPRSIM (<http://www.ijs.si/ijs/dept/epr/>). Величина симбола указује на пропорције сваког домена 89
- Слика 4.13.** Температурна зависност параметра уређености (S , лево) и ротационог корелационог времена (τ_c , десно) за липозоме припремљене методом TF (горе) и методом PRO (доле) уз употребу спинског маркера MeFASL (2,11). Зависности су добијене као резултат компјутерске симулације у програму EPRSIM (<http://www.ijs.si/ijs/dept/epr/>). Величина симбола указује на пропорције сваког домена 90
- Слика 4.14.** Шематски приказ положаја флуоро-маркера у липозомној мембрани 91
- Слика 4.15.** Флуоресцентна поларизација маркера DPH и TMA-DPH додатих липозомима припремљеним PRO методом и титрираних ресвератролом при различитим температурама 92
- Слика 4.16.** Ефекат ресвератрола на липидну пероксидацију за узорке изложене UV зрачењу и за узорке чуване у мраку (TBARS тест, апсорбанца на 532 nm) 93
- Слика 4.17.** Утицај различитих моларних удела ресвератрола (назначено на слици) на кинетику липидне оксидације. Оксидација је иницирана бакар-хлоридом и праћена уз помоћ маркера. Стандардна девијација три независна мерења била је испод 5% 94
- Слика 4.18.** EPR спектар радикала насталих при излагању узорака UV зрачењу у присуству и одсуству ресвератрола 95
- Слика 4.19.** Вискозност раствора коришћених за припрему микрочестица липозоми-алгинат при различитим брзинама смицања 98
- Слика 4.20.** Микрочестице под оптичким микроскопом: а) ALG; б) ALG-LIP/RSV; в) ALG/SUC-LIP/RSV; г) ALG/CH-LIP/RSV 99
- Слика 4.21.** FE-SEM микрографије попречних пресека микрочестица а) ALG ($\times 231000$); б) ALG-LIP/RSV ($\times 14000$) са увећаним појединачним липозомом; б1) ALG-LIP/RSV ($\times 276000$); в) ALG/CH-LIP/RSV ($\times 231000$) са увећаним детаљем структуре површинског слоја; г) ALG/SUC-LIP/RSV ($\times 231000$) 100
- Слика 4.22.** DSC термограми лиофилизованих празних Са-алгинатних честица ALG (крива а), а-алгинатних честица са инкорпорираним празним липозомима ALG-LIP (крива б), Са-алгинатних честица са инкорпорираним липозомима са ресвератролом ALG-LIP/RSV (крива б), ALG-LIP/RSV (крива в), ALG/CHI-LIP/RSV (крива г) и ALG/SUC-LIP/RSV (крива д) 102
- Слика 4.23.** DSC термограми чистих компоненти: фосфолипон (крива а), сахароза (крива б) и ресвератрол (крива в) 102
- Слика 4.24.** а) Процес компресије; б) честица пре и након излагања деформацији 103

Слика 4.25. Зависност силе од деформације за узорке: а) ALG; б) ALG-LIP/RSV; в) ALG/SUC-LIP/RSV; г) ALG/CH-LIP/RSV.....	104
Слика 4.26. Профили отпуштања ресвератрола из липозома PRO-MLV-RSV и микрочестичних система липозоми-алгинат.....	105
Слика 4.27. Апроксимација дифузије ресвератрола из липозома PRO-MLV-RSV и микрочестичних система липозоми-алгинат помоћу Фиковог другог закона дифузије	106

Садржај табела

Табела 1.1. Основне физичко-хемијске карактеристике ресвератрола.....	7
Табела 1.2. Облици првог Фиковог закона дифузије.....	25
Табела 3.1. Преглед скраћених назива узорака према методи припреме и саставу.....	57
Табела 3.2. Формулације система липозоми-алгинат и ознаке узорака.....	67
Табела 4.1. Степен инкапсулације, Е (%) ресвератрола у липозоме и релативна антиоксидативна активност ресвератрола, %инхибиције (резултати су дати као средња вредност \pm стандардна девијација ($n = 3$)).	76
Табела 4.2. Термодинамички параметри TF-DPPC липозома без ресвератрола и у присуству ресвератрола у два моларна удела.....	80
Табела 4.3. Ефективни коефицијенти дифузије ресвератрола и дифузиони отпори код липозома са инкапсулираним ресвератролом	83
Табела 4.4. Средњи пречник микрочестица са и без липозома (средња вредност \pm стандардна девијација три узастопна мерења).....	97
Табела 4.5. Степен ефикасности инкорпорације микрочестица и проценат губитка воде при процесу лиофилизације.....	98
Табела 4.6. Температуре пикова и промене енталпије детектоване на DSC термограмима чистих компоненти и сложених система липозоми-алгинат	103
Табела 4.7. Механичке карактеристике честица	104
Табела 4.8. Ефективни коефицијенти дифузије ресвератрола и дифузиони отпори у системима липозоми-алгинат	107

Биографија

Бојана Баланч (рођ. Исаиловић), дипломирани инжењер технологије, рођена је 26.09.1985. године у Београду, Република Србија, где је стекла основно и средње образовање (Гимназија, природно-математички смер). Године 2004. уписала је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. Дипломирала је 2009. године на смеру Фармацеутско инжењерство са просечном оценом 9,08 одбранивши дипломски радом на тему „Инкапсулација полифенолних једињења из екстракта чаја у алгинатне честице“.

Године 2009. уписује докторске студије на истом факултету, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија. У октобру 2011. одбранила је завршни рад под називом „Инкапсулација антиоксидативних једињења у липозоме: пролипозомна метода и метода танког филма“ са оценом 10. У оквиру докторских студија положила је све испите предвиђене студијским програмом, са просечном оценом 10.

Од фебруара 2011. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета као истраживач-приправник, а од 2013. прелази у звање истраживач-сарадник. Ангажована је на пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања из области пољопривреде и хране: „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (број пројекта ИИИ 46010). Поред овога учествовала је и на два билатерална пројекта (са Републиком Словенијом и Републиком Португал), као и на једном иновационом пројекту. Такође, члан је акције ФА1001 у оквиру COST Европске кооперације за науку и технологију. Од фебруара 2016. руководилац је билатералног пројекта са Републиком Словенијом за период 2016-2017, под називом „Липозоми обложени

биополимерима као нови системи за доставу природних фенолних компонента“.

Бојана Баланч је до сада била аутор или коаутор 20 радова штампаних у целини и то: два (2) поглавља у књизи међународног значаја (M13), осам (8) радова у међународним часописима (M20) од којих четири (4) рада публикована у врхунским међународним часописима (M21), два (2) рада публикована у истакнутом међународном часопису (M22) и два (2) рада публикована у међународним часописима (M23); девет (9) саопштења са међународних скупова штампаних у целини (M33) и једног (1) саопштења са скупа националног значаја штампаног у целини (M63). Објавила је и седам (7) радова на домаћим и међународним скуповима штампаних у изводу, од чега шест (6) радова на међународним скуповима (M34) и један (1) рад на скупу националног значаја (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Бојана (Дејан) Баланч

број индекса 4007/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Липозоми и системи липозоми-алгинат за контролисано отпуштање ресвератрола“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 24.04.2016.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Бојана (Дејан) Баланч

Број индекса 4007/2009

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада „Липозоми и системи липозоми-алгинат за контролисано
отпуштање ресвератрола“

Ментор проф. др Бранко Бугарски

Потписани/а Бојана (Дејан) Баланч

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 24. 04. 2016.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Липозоми и системи липозоми-алгинат за контролисано отпуштање ресвератрола“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 24.04.2016.

Bojana D. Balac