



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

Dipl. inž. Jadranka Fraj

**Primena protein-polimer interakcije za  
formiranje mikrokapsula sa kontrolisanim  
otpuštanjem aktivne supstance**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Dr Lidija Petrović, vanredni profesor

Novi Sad, 2016

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

---

Redni broj:  
RBR

Identifikacioni broj:  
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija  
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal  
TZ

Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): Doktorska disertacija  
VR

Ime i prezime autora: Jadranka Fraj, dipl. inž.  
AU

Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): Dr Lidija Petrović, vanredni profesor  
MN

Naslov rada: Primena protein-polimer interakcije za formiranje  
mikrokapsula sa kontrolisanim otpuštanjem aktivne  
supstance  
NR

Jezik publikacije: Srpski, latinica  
JP

Jezik izvoda: srp. / eng.  
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija  
ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina  
UGP

Godina: 2016.  
GO

Izdavač: autorski reprint  
IZ

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

Fizički opis rada: (7 poglavlja / 137 stranica / 52 slike / 7 tabela / 254  
FO referenci / 6 priloga)

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo  
NO

Naučna disciplina: Farmaceutsko inženjerstvo  
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Protein-polimer interakcije, duple emulzije, mikrokapsulacija  
PO

UDK 678.7+577.112]:62-436(043.3)

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

Važna napomena: Nema  
VN

Izvod: Mikro kapsule, kao nosači aktivnih supstanci, imaju sve veću primenu u različitim granama industrije, naročito prehrambene i farmaceutske. Inkorporiranje biološki aktivnih supstanci unutar mikrokapsula omogućava maskiranje neprijatnih mirisa i ukusa, zaštitu osetljivih i lako isparljivih komponenata.

IZ

Cilj ove doktorske disertacije je dobijanje mikrokapsula za istovremeno inkorporiranje hidrosolubilnih i liposolubilnih aktivnih materija, radi njihove zaštite i kontrolisanog otpuštanja. Mikro kapsule su formirane iz duplih emulzija tipa voda-ulje-voda (V/U/V) metodom koacervacije, odnosno deponovanjem koacervata, koji nastaje u sistemu dva suprotno naelektrisana proteina, želatina i natrijum kazeinata (NaKN), na granicu faza ulje/voda. Kao model supstance za hidrosolubilne i liposolubilne biološki aktivne materije, korišćeni su vitamini C i E.

Najpre su detaljno ispitane interakcije u sistemu želatin/NaKN primenom različitih metoda (merenje zeta potencijala, tenziometrija, viskozimetrija, reološka ispitivanja). Na osnovu ovih rezultata definisane su promene, kako na granici faza, tako i unutar rastvora, kao i mehanizama formiranja koacervata između ova dva suprotno naelektrisana proteina. Utvrđeno je da se pri masenom odnosu želatin:NaKN od 2:1 dolazi do formiranja nerastvornog koacervata. Ispitan je uticaj interakcija u ovom sistemu na osobine duplih, V/U/V emulzija dobijenih emulgovanjem primarnih voda/ulje (V/U) emulzija u smeši želatin/NaKN, pri njihovim odabranim masenim odnosima i zaključeno je da interakcija između proteina u kontinualnoj fazi utiče na

osobine emulzija.

S obzirom da je prvi korak ka dobijanju stabilne V/U/V emulzije, dobijanje stabilne primarne V/U emulzije, ispitana je mogućnost primene lipofilnih emulgatora, poliglicerol poliricinoleata (PGPR) i poliglicerol estra jestivih masnih kiselina i njihovih smeša, za dobijanje 20% V/U emulzija. Ispitivanjem uticaja sastava smeše emulgatora i njegove koncentracije na formiranje adsorpcionog sloja na graničnoj površini ulje/voda i osobine formiranih V/U emulzija odabran je najpogodniji sistem za stabilizaciju primarnih emulzija. Nakon formulisanja stabilnih duplih V/U/V emulzija sa inkorporiranim vitaminima C i E, optimizovani su uslovi za dobijanje mikrokapsula umrežavanjem kompleksa proteina na kapima ulja pomoću genipina, a njihovo izdvajanje iz rastvora ostvareno je primenom *Spray drying* postupka. Karakterizacijom dobijenih mikrokapsula (ispitivanjem morfologije površine, efikasnosti inkapsulacije vitamina C i E, kinetike otpuštanja vitamina C u *in vitro* uslovima) zaključeno je da na osobine mikrokapsula utiče koncentracija umreživača, kao i interakcija između želatina i NaKN u kontinualnoj fazi emulzija V/U/V.

Datum prihvatanja teme 17.10.2012.

od strane Senata:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula /

zvanje / naziv

organizacije / status)

KO

Dr Jaroslav Katona, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, predsednik

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

Dr Marija Primorac, redovni profesor, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, član

---

**University of Novi Sad**  
**Faculty of Technology**

**Key word documentation**

---

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monograph documentation

DT

Type of record: Textual printed material

TR

Contents code: PhD thesis

CC

Author: Jadranka Fraj

AU

Mentor: Lidija Petović, PhD, Associate Professor

MN

Title: Application of the protein-polymer interaction for the formation of microcapsules with controlled release of the active substance

Language of text: Serbian, Latin

LT

Language of abstract: Serbian/ English

LA

Country of publication: Republic of Serbia

CP

Locality of publication: Vojvodina

LP

Publication year: 2016

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Publication place: 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

PP

Physical description: 7 chapters, 137 pages, 52 figures, 7 tables, 254 references, 6 accessories

PD

Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Pharmaceutical engineering
Subject, Key words SKW	Protein-polymer interactions, double emulsions, microencapsulation
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Microcapsules, as active substance carriers, have increasing application in different industries, especially in food and pharmaceutical industry. Incorporation of the biologically active substances inside the microcapsules allows masking of unpleasant taste and smell, protection of sensitive and volatile components.</p> <p>The aim of this thesis is preparation of microcapsules for parallel incorporation of water and oil soluble active substances for their protection and controlled release. Microcapsules were formed from double water-oil-water emulsions (W/O/W) by coacervation method, depositing the coacervate formed in the system of two oppositely charged proteins, gelatin and sodium caseinate (NaCN), at the water/oil interface. As a model for water and oil soluble biological active substances, vitamins C and E were used.</p> <p>First of all, interactions in the gelatin/NaCN system were investigated in detail, by using different methods (measuring of zeta potential, tensiometry, viscometry, rheological investigations). Based on these results, changes at the interface and in the bulk of the system, as well as mechanisms of coacervate formation were defined. It has been determined that at gelatin:NaCN mass ratio of 2:1 non soluble coacervate were formed.</p> <p>Influence of the interactions in this system on properties of the W/O/W double emulsions, made by emulsification of primary water/oil (W/O) emulsions in gelatin/NaCN mixtures, at desired mass ratios of proteins, was investigated. It was concluded that interactions between proteins in continuous phase of emulsions have influence on their properties.</p> <p>As the first step in formation of stable W/O/W emulsions is</p>

obtaining stable primary W/O emulsion, possibility of using lipophilic emulsifiers, polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and polyglycerol esters of edible fatty acids and their mixtures, for 20% W/O emulsions formation were investigated. Results of these investigations showed that composition of emulsifiers mixtures and their concentrations have an influence on adsorption layer, at the water/oil interface, formation, as well as on stability of W/O emulsion, and based on these results the most suitable system of emulsifiers were chosen.

After formulation of stable double W/O/W emulsions with incorporated vitamins C and E, conditions for microcapsules formation, by crosslinking of proteins complex at oil droplets with genipin, were optimized, and for their separation from dispersion spray drying method was applied. Characterization of obtained microcapsules (investigation of the surface morphology, efficiency of the vitamins C and E encapsulation, release kinetics of vitamin C under *in vitro* conditions) showed that concentration of crosslinking agent, as well as interaction between gelatin and NaCN, have an influence on microcapsules properties.

Accepted on Senate 17.10.2012.

on:

AS

Defended:

DE

Thesis Defend

Board:

DB

Jaroslav Katona, PhD, Assistant professor, Faculty of Technology Novi Sad, president

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

Marija Primorac, PhD, Full professor, University of Belgrade- Faculty of Pharmacy, member

---

*Mislim da je ovo pravo mesto i prilika da se zahvalim svima koji su dali svoj doprinos izradi ove doktorske disertacije.*

*Najpre bih želela da se zahvalim svom mentor, prof. dr Lidiji Petrović, na pomoći i stručnim sugestijama prilikom izvođenja eksperimentalnog dela rada i pisanja disertacije. Hvala joj na velikoj podršci i razumevanju.*

*Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Verici Sovilj, profesoru u penziji, od koje su potekle prve ideje vezane za temu doktorske disertacije, kao i na prenesenom znanju i iskustvu.*

*Hvala članovima komisije, dr Jaroslavu Katoni, na savetima tokom eksperimentalnog rada i konstruktivnim diskusijama tokom pisanja disertacije, i prof. dr Mariji Primorac na predanom čitanju disertacije i stručim sugestijama.*

*Veliko hvala Slobodanu Tanasinu, na uvek dostupnoj pomoći u eksperimentalno radu, kao i koleginicama Jeleni Milinković i Sandri Bučko na svakodnevnoj podršci i prijateljskom odnosu.*

*Dr Ljiljani Djekić sa Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, dr Ljiljani Popović i dr Žužani Stolić sa Odeljenja Biohemije, dugujem zahvalnost na pomoći i lepoj saradnji tokom pojedinih delova eksperimentalnog rada, koji su obavljeni u njihovim laboratorijama.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem mojim roditeljima i sestrama, na pomoći i podršci svih ovih godina.*

*I na kraju, mojima, Dejanu i Aleksi, mnogo više od zahvalnosti na ljubavi, podršci, razumevanju, i što sam tu gde jesam.*

*Jadranka*



# SADRŽAJ

1. UVOD	1
1. 1. Cilj disertacije	2
2. TEORIJSKI DEO SA PREGLEDOM LITERATURE	4
2. 1. Polimeri u rastvoru	4
2. 1. 1. Proteini u rastvoru	7
2. 2. Interakcije u rastvorima biopolimera	10
2. 2. 1. Koacervacija	11
2. 2. 2. Interakcije u rastvorima proteina	14
2. 2. 3. Primena interakcija u smešama biopolimera	14
2. 3. Nosači aktivnih materija	15
2. 3. 1. Vrste koloidnih nosača aktivnih materija	16
2. 4. Duple emulzije	17
2. 4. 1. Dobijanje duplih emulzija	19
2. 4. 2. Mehanizmi nestabilnosti duplih emulzija	20
2. 4. 3. Povećanje stabilnosti i kontrolisanje otpuštanja iz duplih emulzija	22
2. 5. Želatin	26
2. 6. Natrijum kazeinat	29
2. 7. Lipofilni emulgatori	32
2. 7. 1. Poliglicerol estri masnih kiselina	33
2. 8. Mikrokapsule	35
2. 8. 1. Mikrokapsulacija tehnikom koacervacije	38
2. 8. 2. Karakterisanje mikrokapsula	40
2. 9. Genipin	42
2. 10. Vitamini	45
2. 10. 1. Vitamin C	46
2. 10. 2. Vitamin E	47
3. EKSPERIMENTALNI DEO	49
3. 1. Materijal	49
3. 2. Uređaji	50

3. 3. Metode rada	51
3. 3. 1. Priprema rastvora	51
3. 3. 2. Merenje pH vrednosti	52
3. 3. 3. Merenje mutnoće	52
3. 3. 4. Viskozimetrijska merenja	53
3. 3. 5. Tenziometrijska merenja	53
3. 3. 6. Merenje zeta potencijala	53
3. 3. 7. Reološka ispitivanja	54
3. 3. 8. Priprema emulzija	54
3. 3. 9. Praćenje sedimentacione nestabilnosti emulzija	55
3. 3. 10. Određivanje veličine i raspodele veličina kapi emulzija	55
3. 3. 11. Dobijanje mikrokapsula	56
3. 3. 12. Ispitivanje morfologije površine mikrokapsula	56
3. 3. 13. Ispitivanje efikasnosti mikrokapsulacije vitamina C i E	56
3. 3. 14. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja vitamina C iz mikrokapsula	59
3. 3. 15. Kinetika oslobađanja vitamina C iz mikrokapsula	60
4. REZULTATI I DISKUSIJA	61
4. 1. Ispitivanje interakcija između želatina i NaKN	62
4. 1. 1. Turbidimetrijsko ispitivanje interakcija u smeši želatin/NaKN	62
4. 1. 2. Određivanje zeta potencijala smeša želatin/NaKN	65
4. 1. 3. Viskozimetrijsko i tenziometrijsko ispitivanje interakcije u smeši želatin/NaKN	67
4. 1. 4. Reološke karakteristke smeša želatin/NaKN	69
4. 2. Dobijanje emulzija V/U	73
4. 2. 1. Ispitivanje uticaja koncentracije lipofilnih emulgatora na međupovršinski napon na granici faza ulje/voda	73
4. 2. 2. Ispitivanje uticaja koncentracije lipofilnih emulgatora na osobine emulzija V/U	77
4. 2. 3. Ispitivanje uticaja prisustva vitamina C i E na međupovršinski napon i osobine emulzija V/U	81
4. 3. Dobijanje V/U/V emulzija	87
4. 3. 1. Ispitivanje uticaja interakcija između želatina i NaKN na veličinu i raspodelu veličina kapi V/U/V emulzija	87
4. 3. 2. Ispitivanje uticaja interakcije između želatina i NaKN na sedimentacionu stabilnost V/U/V emulzija sa vremenom	96
4. 4. Dobijanje mikrokapsula umrežavanjem kompleksa želatin/NaKN na granici faza ulje/voda	99
4. 4. 1. Ispitivaje uticaja koncentracije genipina na osobine mikrokapsula	100
4. 4. 2. Ispitivaje uticaja interakcija između želatina i NaKN na osobine mikrokapsula	104

5. ZAKLJUČCI	109
6. LITERATURA	114
7. PRILOG	133



# 1. UVOD

Mikrokapsule, kao nosači aktivnih supstanci, imaju sve veću primenu u različitim granama industrije, naročito prehrambene i farmaceutske. Inkorporiranje biološki aktivnih supstanci unutar mikrokapsula omogućava maskiranje neprijatnih mirisa i ukusa, zaštitu osjetljivih i lako isparljivih komponenata (vitamini, arome, biljni ekstrakti), kao i dobijanje farmaceutskih preparata sa produženim i ciljanim delovanjem. Poslednjih godina naročito velika pažnja se poklanja njihovoj primeni u prehrambenoj industriji za proizvodnju funkcionalne hrane, čije biološke karakteristike pozitivno utiču na ljudsko zdravlje i pojedine telesne funkcije.

Osobine mikrokapsula, kao i njihova primena, u najvećoj meri zavise od osobina formiranog omotača. Za formiranje omotača mikrokapsula najčešće se primenjuju polimerne materije, koje se različitim mehanizmima dovode na granicu faza ulje/voda, formirajući filmove određenih karakteristika. Izbor polimernih materija, koje formiraju omotače mikrokapsula, kao i interakcije u njihovim sistemima, pružaju dodatnu mogućnost za regulisanje osobina omotača. Kada su u pitanju mikrokapsule namenjene za primenu u prehrambenim i farmaceutskim proizvodima, posebno se mora voditi računa o njihovoj biokompatibilnosti. Savremene tendencije u proizvodnji složenih disperznih sistema, koji se koriste u ovim granama industrije, upućuju na ispitivanje mogućnosti zamene niskomolekularnih stabilizatora- emulgatora, polimerima prirodnog porekla-biopolimerima i njihovim derivatima. Iz ovih razloga izučavanje interakcija između biopolimera ima izuzetno veliki značaj, kako sa teorijskog, tako i sa praktičnog stanovišta.

Poseban izazov predstavlja formiranje nosača za paralelno inkorporiranje i hidrosolubilnih i liposolubilnih aktivnih materija. Jedan od sistema koji bi ovo omogućio su duple emulzije tipa voda-ulje-voda i ulje-voda-ulje, ali je njihova praktična primena još uvek ograničena, pre svega zbog njihove izrazite nestabilnosti. Iz ovih razloga se poslednjih godina vrše intenzivna istraživanja u pravcu razjašnjavanja složenih mehanizama stabilizacije duplih emulzija i kinetike

otpuštanja inkorporiranih aktivnih materija, namenjenih prvenstveno farmaceutske, kozmetičke i prehrambene industriji.

## 1. 1. Cilj disertacije

Cilj ove doktorske disertacije je dobijanje mikrokapsula za istovremeno inkorporiranje hidrosolubilnih i liposolubilnih aktivnih materija, radi njihove zaštite i kontrolisanog otpuštanja. Mikrokapsule će biti formirane iz duplih emulzija tipa voda-ulje-voda (V/U/V) metodom koacervacije, odnosno deponovanjem koacervata, koji nastaje u sistemu dva suprotno naelektrisana proteina, želatina i natrijum kazeinata (NaKN), na granicu faza ulje/voda. Prema dostupnim podacima iz literature, mikrokapsulacija metodom koacervacije u sistemu dva proteina, do sada nije ispitivana. Osobine omotača mikrokapsula će se regulisati umrežavanjem sloja koacervata, pomoću genipina. Trenuto se u oblasti mikrokapsulacije velika pažnja posvećuje ispitivanju mogućnosti zamene do sada primenjivanih umreživača supstancama prirodnog porekla, a genipin je pokazao niz prednosti. Ispitana je mogućnost umrežavanja različitih polimera, kao i njihovih smeša, ovim umreživačem, ali do sada nije primenjen za umrežavanja kompleksa dva proteina. Kao model supstance za hidrosolubilne i liposolubilne biološki aktivne materije, koristiće se vitamini C i E.

U tom cilju, biće detaljno ispitane interakcije u sistemu želatin/NaKN primenom različitih metoda (merenje zeta potencijala, tenziometrija, viskozimetrija, reološka ispitivanja), koje obuhvataju definisanje promena, kako na granici faza, tako i unutar rastvora, kao i mehanizama formiranja koacervata između ova dva suprotno naelektrisana proteina. Ispitaće se uticaj interakcija u ovom sistemu na osobine duplih, V/U/V emulzija dobijenih emulgovanjem primarnih voda/ulje (V/U) emulzija u smeši želatin/NaKN, pri njihovim odabranim masenim odnosima.

S obzirom da je prvi korak ka dobijanju stabilne V/U/V emulzije, dobijanje stabilne primarne V/U emulzije, ispitaće se mogućnost primene lipofilnih emulgatora, poliglicerol poliricinolata (PGPR) i poliglicerol estra jestivih masnih kiselina i njihovih smeša, za dobijanja 20% V/U emulzija. Ispitivanje uticaja sastava smeše emulgatora i njegove koncentracije na formiranje adsorpcionog sloja na graničnoj površini ulje/voda i osobina formiranih V/U emulzija (veličina i raspodela veličina kapi, stabilnost sa vremenom) omogućiće odabir najpogodnijeg sistema za stabilizaciju primarnih emulzija.

Nakon formulisanja stabilnih duplih V/U/V emulzija sa inkorporiranim vitaminima C i E, optimizovaće se uslovi za dobijanje mikrokapsula umrežavanjem kompleksa proteina na kapima ulja, a njihovo izdvajanje iz

rastvora ostvariće se sušenjem u struji toplog vazduha, primenom *Spray drying* postupka. Izvršiće se karakterizacija dobijenih mikrokapsula ispitivanjem morfologije njihove površine, određivanjem efikasnosti inkapsulacije i kinetike otpuštanja odabranih aktivnih materija.

## 2. TEORIJSKI DEO SA PREGLEDOM LITERATURE

### 2. 1. Polimeri u rastvoru

Polimeri u različitim rastvaračima, uključujući i vodene rastvore, jedni su od osnovnih komponenata u mnogim sistemima. Prehrambeni i kozmetički proizvodi, lubrikanti, boje i biološki sistemi samo su neki od primera gde osnovne osobine proizvoda zavise upravo od ponašanja polimera u rastvoru.

Polimeri imaju sposobnost da intenzivno bubre i grade gele, daju viskozne rastvore, ne destilišu, kao i niz drugih fizičkih i hemijskih osobina, koje su direktna posledica velikih dimenzija molekula, zahvaljujući kojima imaju široku primenu (Tirrell, 1993; Sovilj, 1996; Holmberg i sar., 2002; Dobrynin i Rubinstein, 2005).

Zahvaljujući sposobnosti rotacije oko C-C veze, polimeri poseduju još jednu specifičnu osobinu, a to je promenljivost konfiguracije molekula. Pored navedenih osobina, polimeri, naročito oni prirodnog porekla, sadrže različite aktivne grupe, koje nisu reagovala prilikom povezivanja monomera. Pošto su ove grupe bočno orijentisane u odnosu na polimerni lanac, nazivaju se bočne grupe. Zahvaljujući pokretljivosti delova lanaca polimera, prisustvu bočnih grupa i njihovom uzajamnom međudejstvu, polimeri mogu da ostvaruju različite veze unutar istog molekula (intramolekularne) ili između različitih molekula (intermolekularne) i da formiraju složenije strukture (Đaković, 1990).

Molekuli intra- i intermolekularno mogu da se povezuju kako primarnim tako i sekundarnim vezama.

Primarne veze mogu biti:

- primarne homopolarne ili kovalentne veze,



- heteropolarne ili jonske primarne veze.

Sekundarne veze nastaju kao rezultat privlačenja stalnih ili indukovanih dipola, a razlikuje se više tipova sekundarnih veza:

- međudejstvo dipol – dipol,
- međudejstvo dipol – indukovani dipol,
- disperzione ili Londonove sile (*Van der Waals-ove*).

Vodonična veza je posebna vrsta veze koja se veoma često javlja između makromolekula kada polarna grupa sadrži atom vodonika.

Primarne i sekundarne veze se međusobno razlikuju ne samo po energiji veze, već i po postojanosti u prisustvu drugih molekula ili jona. Ovo se odnosi i na dejstvo molekula rastvarača, te tako molekuli rastvarača ne deluju na primarne veze, dok sekundarne veze rastvarač može da raskida. Upravo međudejstvo molekula rastvarača i segmenata lanaca polimera utiče na dimenzije molekula u rastvoru, koje se definišu pomoću dve veličine i to:

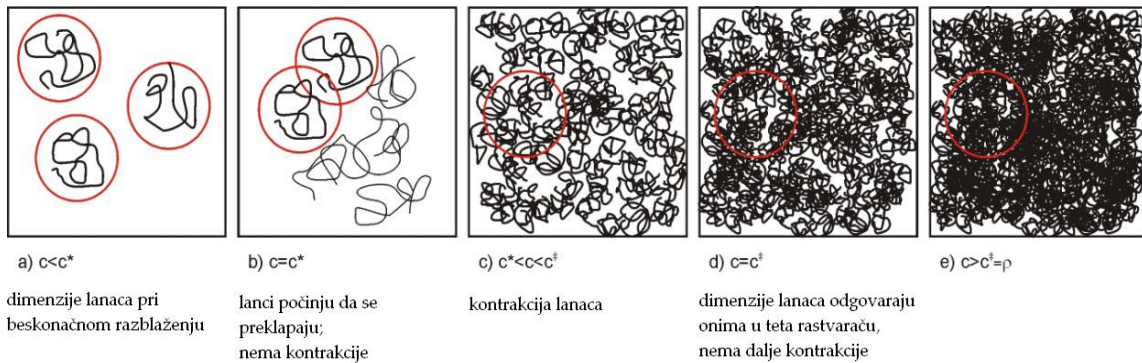
- korena srednjeg kvadrata rastojanja krajeva lanaca polimera  $(\overline{r^2})^{1/2}$  i
- korena srednjeg kvadrata rastojanja elemenata lančastog niza od težišta makromolekula, odnosno poluprečnikom inercije  $(s^2)^{1/2}$ .

Ukoliko postoji veliki afinitet između molekula rastvarača i segmenata lanaca makromolekula, odnosno ako se radi o dobrim rastvaračima, dolazi do solvatacije delova lanca polimera i ekspanzije sklupčanog lanca, za razliku od loših rastvarača u kojima je polimer maksimalno zbijen i ima dimenzije koje bi imao u odsustvu rastvarača. Najmanje dimenzije polimeri imaju u teta rastvaraču u kome ne postoji interakcija sa molekulima rastvarača, odnosno dimenzije polimera su isključivo određene međudejstvom delova lanca.

Prisustvo naelektrisanja na lancu polimera znatno utiče na dimenzije njegovih molekula. Naime, usled elektrostatičkog odbijanja istoimeno naelektrisanih grupa, lanci polielektrolita su krući i zauzimaju veću zapreminu u odnosu na lance nanaelektrisanih polimera iste molekulске mase. Međutim, ekspanzija lanca, kao posledica jonizacije prisutnih grupa, se dešava do određene vrednosti stepena jonizacije. Daljom jonizacijom dimenzije molekula polimera, izražene preko poluprečnika inercije, se ne menjaju značajno. Prisustvo elektrolita znatno utiče na konformaciju molekula polielektrolita i njihove dimenzije, jer prisustvo jona oko naelektrisanih grupa suzbija njihovu disocijaciju, a samim tim i elektrostatičko odbijanje (Hara, 1992; Forster i Schmidt, 1995; Dobrynin i Rubinstein, 2005).

Pored naelektrisanja, na dimenzije molekula polimera utiče i njegova koncentracija. Pri određenoj koncentraciji lanci polimera dolaze u kontakt i delimično se preklapaju. Ova koncentracija se označava kao *overlap* koncentracija

( $c^*$ ) i predstavlja gornju granicu razblaženog režima (Boyd i Phillips, 1996; Lazaridou i sar., 2003,). Uticaj koncentracije polimera na dimenzije njegovih molekula u rastvoru prikazan je na slici 1.



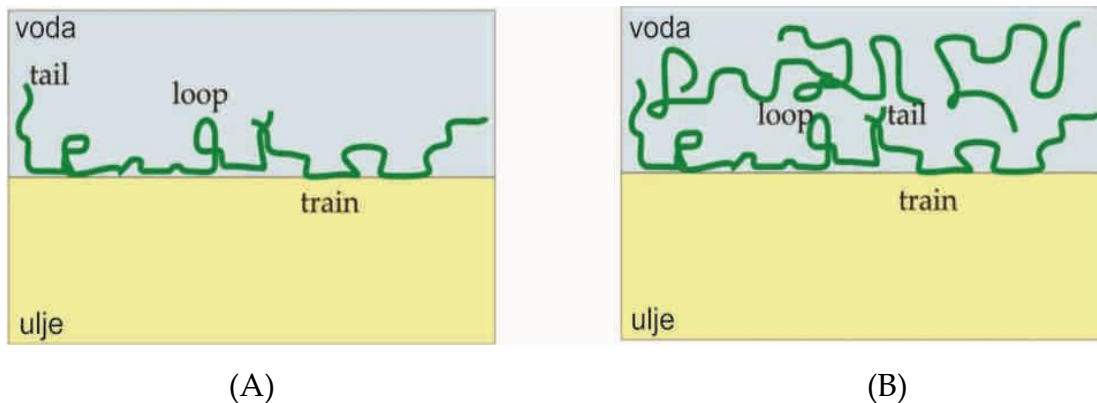
Slika 1. Uticaj koncentracije polimera na dimenzije molekula u rastvoru (Katona, 2010)

Adsorpcija polimera iz rastvora i njegovo ponašanje na granici faza su takođe veoma značajne karakteristike sa aspekta njihove primene. Naime, adsorpcija polimera i molekula površinski aktivnih materija na granici faza tečno/tečno i tečno/gas je osnovni mehanizam stabilizacije disperznih sistema (emulzija i pena), pri čijem formiranju dolazi do značajnog povećanja granične površine. Adsorpcija polimera iz rastvora se u mnogome razlikuje od adsorpcije malih molekula površinski aktivnih materija (PAM). Formiranje stabilnog adsorpcionog sloja zahteva, prvo, difuziju polimera iz rastvora, a zatim adsorpciju na granici faza (Hill, 1998; Wollenweber i sar., 2000; Domenek i sar., 2008). U poređenju sa malim molekulima PAM, adsorpcija makromolekula je znatno sporiji proces, i nekada je potrebno i po nekoliko sati da se postigne ravnotežno stanje. Konformacija adsorpcionog sloja polimera na granici faza ulje/voda najčešće se opisuje modelom: *train – loop – tail* (slika 2 (A)). *Train* su lipofilni delovi polimera kojim se on vezuje na granicu faza, dok su *loop* i *tail* hidrofilni delovi okrenuti ka vodenoj fazi. Odnos ovih segmenata u lancu polimera određuje osobine adsorpcionog sloja, a time i stabilnost disperznih sistema.

Ispitivanjem debljine adsorbovanog sloja i njenim poređenjem sa dimenzijama samog molekula polimera može da ukaže i na formiranje višestrukog međupovršinskog sloja (slika 2 (B)). Konformacija molekula opisana *train – loop – tail* modelom važi i u ovom slučaju.

Adsorpcija polimera se može smatrati ireverzibilnim procesom. Međutim, ono što može izazvati desorpciju polimera jeste njegovo istiskivanje sa granice faza malim molekulima površinski aktivnih materija ili molekulima drugih polimera (Bos & Vilet, 2001). Ovo uzajamno istiskivanje polimera sa

granice faza je povezano sa njihovom sposobnošću promene konformacije u adsorpcionom sloju.



Slika 2. *Train – loop – tail* model makromolekula adsorbovanih na granici faza (A); formiranje višestrukog međupovršinskog sloja (B)

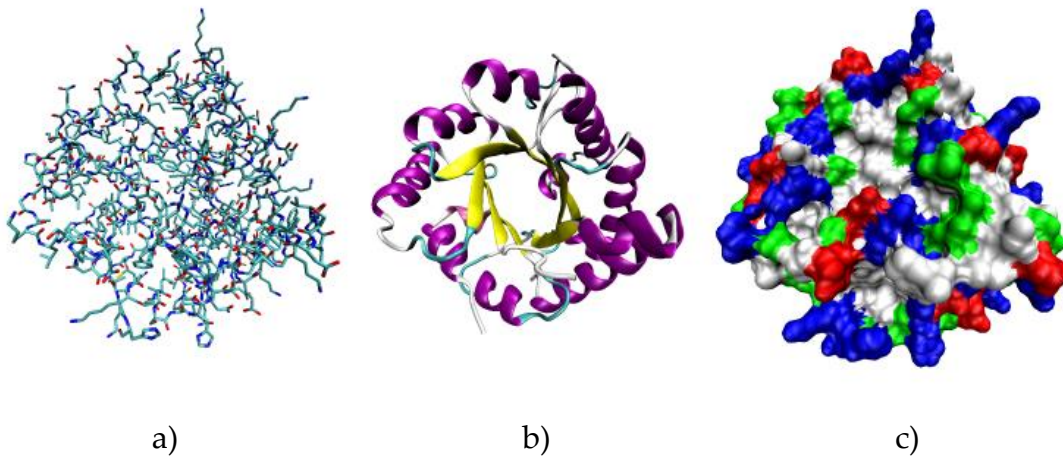
### 2. 1. 1. Proteini u rastvoru

Proteini spadaju u grupu jonskih polimera i sve prethodno rečeno o osobinama polimera u rastvoru važi i za proteine, ali ipak postoje određene specifičnosti po kojima se oni razlikuju od ostalih makromolekula.

Proteini su kopolimeri izgrađeni od amino kiselina koje sadrže polarne i nepolarne grupe. Polarne grupe mogu biti jonske i nejonske, u zavisnosti od pH rastvora. Iz ovih razloga, možemo definisati protein kao amfoterni polielektrolit sa određenim hidrofobnim grupama, ili kao amfilni polimer sa promenljivom gustinom naelektrisanja. Jedna od bitnijih razlika između proteina i ostalih polimera je što su monodisperzni i što imaju znatno manju slobodu promene konformacije (Djaković, 1990; Dickinson, 1993).

Kao što je već naglašeno, proteini su izgrađeni od monomernih jedinica (amino kiselina) povezanih peptidnom vezom, po tačno utvrđenom redosledu i taj redosled amino kiselina u lancu predstavlja primarnu strukturu proteina. Međutim, ovako dugačak lanac, nastao povezivanjem nekoliko stotina amino kiselina, može biti raspoređen u prostoru na različite načine. U tom slučaju se govori o sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina. Pod sekundarnom strukturom podrazumeva se prostorni raspored samog peptidnog lanca, tj. atoma peptidne veze, dok se pod tercijarnom strukturom podrazumeva prostorni položaj svih atoma, odnosno atoma bočnih alifatičnih i aromatičnih aminokiselinskih ostataka. Na osnovu tercijarne strukture izvedena je podela proteina na tri grupe: globularne, fibrilarne i proteine membrana.

Kvaternarna struktura podrazumeva agregaciju više peptidnih lanaca i njihovu orijentaciju u prostoru. Na slici 3 su predstavljeni različiti načini prikazivanja trodimenzionalne strukture proteina.



Slika 3. Tri moguća načina prikazivanja trodimenzionalne strukture molekula proteina triozafosfat izomeraze: a) prikaz svih atoma u molekulu obojenih u zavisnosti od vrste atoma; b) uprošćen prikaz osnovne strukture, obojen u zavisnosti od tipa veza uspostavljenih između polimernih lanaca; c) prikaz površine molekula dostupne rastvaraču obojen u zavisnosti od tipa grupa u molekulu (crvena – kiselinasti ostaci, plava – bazni, zelena – polarne grupe, bela – nepolarne grupe) ([www.wikiwand.com](http://www.wikiwand.com))

Kako je već naglašeno proteini u svojoj strukturi imaju različite aktivne grupe koje pod određenim uslovima disosuju i obrazuju veliki broj elementarnih naelektrisanja. Molekuli se pri tome ponašaju kao polielektroliti, i to amfoterni polielektroliti, jer se na istom molekulu nalaze i kisele i bazne grupe, nastale disocijacijom karboksilnih odnosno amino grupa. Vodeni rastvori proteina obično imaju pH vrednosti koje su manje od 7, što znači da su slabe kiseline. pH vrednost pri kojoj je broj pozitivno i negativno naelektrisanih grupa jednak, odnosno pri kome je ukupno naelektrisanje molekula jednako nuli, naziva se izoelektrična tačka (IET) (Stainsby, 1977; Djaković, 1990). S obzirom da naelektrisani makromolekuli imaju veće viskozitete od nenaelektrisanih, u IET proteini pokazuju minimum viskoziteta.

Molekuli proteina, kojima je znatno narušena struktura, ne mogu se lako vratiti u prvobitno stanje. S toga, razmotavanje molekulskog lanca može dovesti do njegove povratne ili nepovratne denaturacije. Denaturaciju molekula proteina u rastvoru mogu izazvati različiti fizički ili hemijski tretmani, kao što je i dodatak veće koncentracije površinski aktivne materije (Ross, 2006; Rehm, 2006).

Kao što je već naglašeno, proteini poseduju površinsku aktivnost, odnosno tendenciju ka adsorpciji na granicu faza (tečno – tečno, tečno – gas, tečno – čvrsto), te kao takvi imaju značajnu ulogu u formiranju i stabilizaciji proizvoda u formi disperzija. Za objašnjenje adsorpcije proteina na granici faza ulje/voda može se primeniti opšti model *train-loop-tail*, ali se mora naglasiti da

ovaj model nije pogodan za globularne proteine, kod kojih sekundarna i veći deo terciarne strukture ostaju sačuvani i u adsorpcionom sloju. Pored proteina, disperzni sistemi sadrže i niz drugih komponenata kao što su ugljeni hidrati, masti, niskomolekularni emulgatori, razni aditivi i dr., a osobine krajnjeg proizvoda zavise kako od odnosa samih komponenata, tako i od mogućih interakcija između njih. Sa aspekta stabilnosti disperznih sistema neophodno je poznavati kinetiku adsorpcije površinski aktivnih materija, niskomolekularnih emulgatora i polimera, na granicu faza, osobine formiranog filma, kao i njihove osobine u unutrašnjosti rastvora (Dickinson, 1992; McClements, 2005).

Proteini imaju značajne uloge u biološkim sistemima, a neke od njih su: biokatalitičke (enzimi), strukturne (kolagen, keratin), hormonske (insulin, faktor rasta), transportne (serum albumin, hemoglobin), antitela (imunoglobulini), (Damodaran, 1997) i dr. Međutim, osim uloga u biološkim sistemima proteini su veoma značajni i sa aspekta tehnologije, zbog svojih funkcionalnih karakteristika kao što su sposobnost želiranja, ugušćavanja, emulgujuća svojstva, kao i sposobnost vezivanja vode. Kao takvi ulaze u sastav velikog broja proizvoda, pre svega prehrambene i farmaceutske industrije. Osim poželjnih funkcionalnih karakteristika, proteini poseduju i prednosti zbog svoje visoke nutritivne vrednosti i GRAS statusa (*Generally Recognized As Safe* – sigurni za upotrebu). Poslednjih godina sve veća pažnja se poklanja i upotrebi proteina za dobijanje tzv. jestivih filmova za oblaganje prehrambenih proizvoda (Dangaran i sar., 2009).

Iako danas postoji niz komponenata koje poseduju izrazitu površinsku aktivnost i kao takve formiraju stabilne filmove na granici faza i stabilizuju disperzne sisteme, ipak postoje ograničenja po pitanju njihove primene u proizvodima prehrambene i farmaceutske industrije jer se mora voditi računa o njihovom delovanju na ljudski organizam. Trenutno, jedna od glavnih tendencija u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji podrazumeva ispitivanje mogućnosti zamene niskomolekularnih emulgatora i sintetskih polimernih stabilizatora sa prirodnim polimerima koji poseduju izrazitu biokompatibilnost. U ovom slučaju dobar izbor predstavljaju prirodni polimeri, tzv. biopolimeri, gde spadaju proteini i ugljeni hidrati, kao i njihovi derivati (Dickinson, 2011; McClements, 2009). Istovremeno, interakcijom između ovih grupa biopolimera se može značajno uticati na stabilnost sistema, što je i osnovni razlog intenzivnih istraživanja u ovoj oblasti poslednjih godina.

## 2. 2. Interakcije u rastvorima biopolimera

Kao što je već naglašeno, proteini poseduju površinsku aktivnost i sposobnost da stabilizuju disperzne sisteme (Dickinson, 1998; McClements, 2004). S obzirom na amfoterni karakter, podešavanjem pH vrednosti rastvora može se uticati na vrstu i količinu ukupnog naelektrisanja njihovih molekula. Zahvaljujući amfoternom i amfifilnom karakteru molekula proteina mogu se javiti različiti tipovi interakcija u njihovim smešama, kao i u smešama sa drugim biopolimerima. S obzirom da interakcije mogu u velikoj meri uticati na osobine molekula proteina, kako u rastvoru tako i na granici faza, jasno je da su one od presudnog značaja za stabilnost disperznih sistema. Iz ovih razloga se poslednjih godina posvećuje velika pažnja upravo ispitivanju interakcija u rastvorima biopolimera. Interakcije između proteina i naelektrisanih polisaharida su predmet istraživanja naučnika širom sveta, i za veliki broj ovih sistema su mehanizmi interakcija detaljno objašnjeni (Burges i sar., 1991; Schmitt i sar., 1999; Antonov i Goncalves, 1999; Galazka i sar., 1999; Weinbrec i sar., 2004; Liu i sar. 2011; Ghorbani Gorji i sar., 2014; Yang i sar., 2012). U rastvorima različitih biopolimera mogu se javiti sinergističke i antagonističke interakcije između njihovih molekula. Osnovni tipovi interakcija između proteina i polisaharida mogu se svrstati u četiri grupe (McClements, 2006):

1. **Elektrostatičke interakcije** – Za pojavu ovih interakcija neophodno je da u ispitivanim uslovima (pH i jonska jačina) makromolekuli poseduju izvesno naelektrisanje. Ove interakcije mogu biti privlačne ili odbojne u zavisnosti od toga da li su molekuli istoimeno ili suprotno naelektrisani.

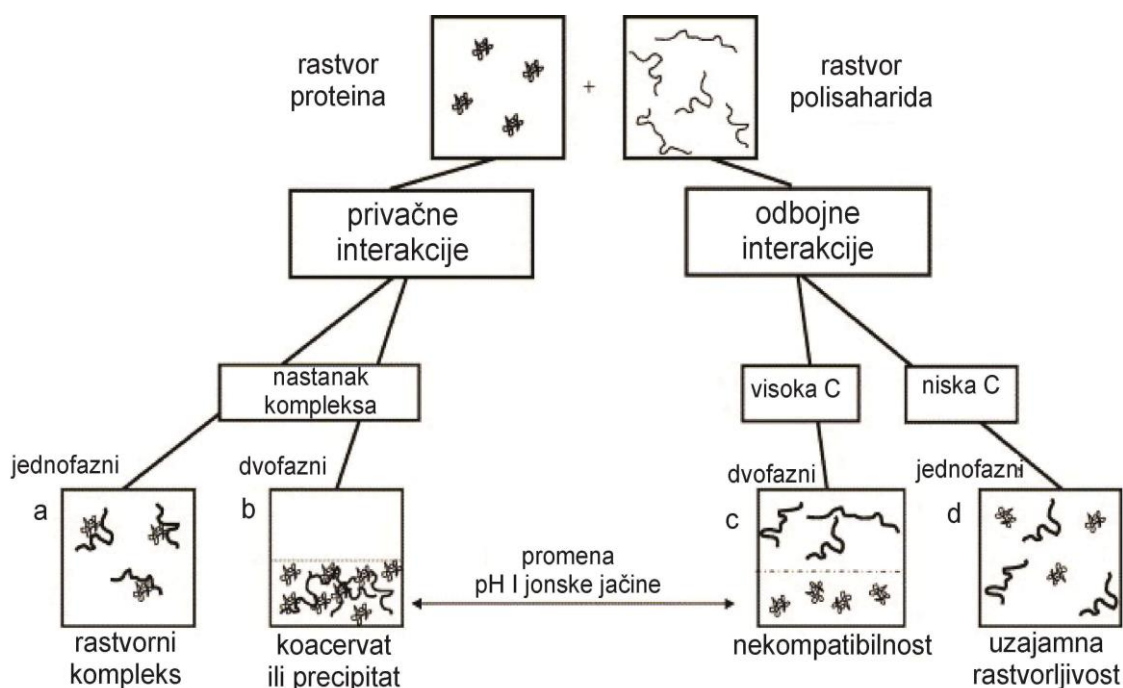
2. **Sterno istiskivanje** – Relativno velika zapremina koju zauzimaju makromolekuli u rastvoru uslovljava smanjenje entropije mešanja u sistemu usled smanjenja zapremine dostupne drugim molekulima biopolimera.

3. **Hidrofobna interakcija** – Ovaj tip interakcije je značajan kod vodenih rastvora biopolimera koji poseduju nepolarne grupe, i ispoljava se kroz tendenciju nepolarnih grupa ka asocijaciji.

4. **Vodonične veze** – Ovaj tip interakcije je dominantan kod biopolimera koji duž lanca imaju segmente, ili bočne grupe, koji mogu da formiraju jake vodonične veze sa segmentima na molekulima drugih biopolimera, a kao rezultat nastaju spiralne ili lamelarne strukture.

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

Kao rezultat interakcija između dva makromolekula može nastati jednofazni ili dvofazni sistem u zavisnosti od vrste makromolekula, osobina rastvora i uslova sredine (slika 4).



Slika 4. Šematski prikaz strukturalnih organizacija molekula u smešama proteina i polisaharida (McClements, 2006)

U jednofaznim sistemima makromolekuli mogu biti u obliku pojedinačnih molekula ili u obliku rastvornih kompleksa, dok kod dvofaznih sistema dolazi do separacije faza na dve faze različitog sastava u odnosu na sadržaj makromolekula. Ova pojava naziva se koacervacija.

### 2. 2. 1. Koacervacija

Koacervacija predstavlja separaciju rastvora makromolekula na dve tečne faze: koacervat i ravnotežni rastvor (supernatant). Pojava koacervacije zapaža se uglavnom kod rastvora linearnih makromolekula, kada im se na neki način poremeti ravnoteža u rastvoru, odnosno smanji solvatacija i rastvorljivost.

**Prosta koacervacija.** Ukoliko dolazi do separacije faza u rastvoru jednog makromolekula u pitanju je prosta koacervacija (ovaj slučaj nije prikazan na slici 4) (*simple coacervation*) (Baken i Anderson, 1976; Weib i sar., 1995). U ovom slučaju dolazi do smanjenja solvatacije makromolekula, a usled smanjene rastvorljivosti dolazi do asocijacije molekula i izdvajanja iz rastvora kao posebne tečne faze – koacervata. Smanjenje rastvorljivosti se u praksi najčešće postiže promenom

temperature, dodatkom nerastvarača, dodatkom neorganskih soli, ali tako da ne dođe do precipitacije tj. potpunog narušavanja stabilnosti sistema.

Ukoliko je separacija faza izazvana dodatkom drugog makromolekula ona, u zavisnosti od prirode interakcije, može biti asocijativnog tipa i tada je reč o **kompleksnoj koacervaciji** (*complex coacervation*) ili segregativnog tipa, kada govorimo o **termodinamičkoj nekompatibilnosti** (*thermodynamic incompatibility*).

**Kompleksna koacervacija** (slika 4a i b) predstavlja separaciju faza u rastvoru dva suprotno naelektrisana makromolekula. Uglavnom se javlja kao posledica jake elektrostatičke interakcije između naelektrisanih grupa usled koje nastaju kompleksi smanjene rastvorljivosti, koji se izdvajaju kao posebna faza (de Kruiff i sar., 2004; Kizilay i sar., 2011). Stvaranje kompleksa nekada može biti i posledica uspostavljanja vodoničnih veza između lanaca makromolekula (Borrega i sar., 1999; Porcar i sar., 1999).

Pojavu kompleksne koacervacije između molekula suprotno naelektrisanih proteina i polisaharida prvi je uočio Tiebackx (Tiebackx, 1911). On je, mešajući želatin i arapsku gumu u rastvoru sirćetne kiseline, zapazio pojavu opalescencije i precipitacije. Ovu pojavu su, u istom sistemu, kasnije detaljno ispitali Bungenberg de Jong i Kruyt 20-ih i 40-ih godina prošlog veka (Bungenberg de Jong i Kruyt, 1929; Bungenberg de Jong 1949a; 1949b; 1949c), a većina današnjih saznanja o toj pojavi dolazi upravo iz tih istraživanja. Ovi naučnici su uveli pojam koacervacije, koji su izveli od latinske reči *acervus* što znači agregacija i prefiksa *ko* što znači zajedno, kao i pojam kompleksne koacervacije. Zahvaljujući velikom broju podataka, dobijenih iz njihovih istraživanja, razvijen je prvi teorijski model kompleksne koacervacije (Overbeek i Voorn, 1957). Oni su pojavu koacervacije objasnili kao nadmetanje između elektrostatičkih sila koje teže da spoje naelektrisane molekule i entropijskog efekta koji teži da ih održi u dispergovanom stanju. Suprotno naelektrisani molekuli asociiraju formirajući kompleks, koji se izdvaja kao koacervat, a unutar koga su uklopljeni i molekuli rastvarača. Prisustvo molekula rastvarača u koacervatu dovodi do povećanja entropije sistema. Iz ovih razloga koacervat je tečan, a proces koacervacije je reverzibilan. Danas postoji veliki broj preglednih radova kojima su obuhvaćena istraživanja u ovoj oblasti (Dickinson, 1998; Doublier i sar., 2000; de Kruif i Tuinier, 2001; Tolstoguzov, 2002; 2003; Turgeon i sar., 2003).

S obzirom da se kompleksna koacervacija uglavnom dešava kao posledica elektrostatičke interakcije između suprotno naelektrisanih makromolekula, postoji niz fizičko – hemijski faktora koji utiču na ovaj proces. Opšte je poznato da pH vrednost rastvora ima ključnu ulogu u jačini elektrostatičkih interakcija, s obzirom da upravo od nje zavisi gustina naelektrisanja makromolekula. Predmet velikog broja istraživanja je bio upravo uticaj osobina rastvora na proces koacervacije (Park i sar., 1992; Dubin i sar., 1994;



Wang i sar., 1996; Xia i sar., 1999; Kaibara i sar., 2000). Ova istraživanja su pokazala da se proces koacervacije odvija kao dvostepeni proces u odnosu na pH i definisane su dve pH vrednosti pri kojima se dešavaju strukturne promene u sistemu  $pH_c$  i  $pH_\phi$ . Pri  $pH_c$  dolazi do formiranja rastvornih kompleksa (slika 4a), a ispod  $pH_\phi$  se uočava separacija faza (slika 4b). Pored pH vrednosti, i jonska jačina rastvora se mora kontrolisati, s obzirom da prisustvo soli može suzbiti proces formiranja kompleksa (Bungenberg de Jong, 1949a; Overbeek i Voorn, 1957; Schmitt i sar., 1998). Koncentracija polimera je, takođe, jedan od kritičnih parametara. Iznad određene koncentracije polimera može doći do suzbijanja procesa koacervacije (Overbeek i Voorn, 1957). Pored koncentracije, i odnos makromolekula u rastvoru je veoma važan, odnosno koacervacija se dešava pri određenom optimalnom odnosu, pri kome je nalelektrisanje makromolekula ekvivalentno (Burgess i Carless, 1984). Ako je jedan od makromolekula u višku, neće doći do formiranja koacervata zbog niskog energetskog potencijala za njegovo koncentrisanje u jednoj fazi, s obzirom da je koncentracija već visoka. Ostali parametri, kao što su temperatura, molekulska masa, smicanje, takođe utiču na proces koacervacije i osobine formiranog koacervata.

Pojava koacervacije je veoma značajna sa aspekta fundamentalnih istraživanja s obzirom da poznavanje ovog procesa može u mnogome pomoći razumevanju mehanizama kompleksnih bioloških procesa. Pored toga, ova pojava ima i značajnu praktičnu primenu u oblasti prehrambene, kozmetičke i farmaceutske industrije, kao i medicine (Schmitt i sar., 1998). Jedna od njenih najznačajnijih primena je u procesu mikrokapsulacije.

**Termodinamička nekompatibilnost.** Kod segragativnog tipa separacije faza postoji odbijanje između dva makromolekula, odnosno visoka pozitivna slobodna energija mešanja. Na molekularnom nivou ova pojava je posledica efekta sternog istiskivanja (McClements, 2006), koji se odigrava u rastvorima nenaelektrisanih ili istoimeno naelektrisanih makromolekula. Pri dovoljno niskim koncentracijama makromolekula oni se uzajamno mešaju formirajući jednofazni rastvor (slika 4d). Međutim, povećanjem koncentracije iznad određene vrednosti dolazi do separacije faza i formiranja dvofaznog sistema, u kome je jedna faza bogata jednim makromolekulom, a siromašna drugim i obrnuto (slika 4c).

Ponašanje smeša makromolekula pod određenim uslovima prikazuje se pomoću faznih dijagrama (Walstra, 2003). Fazni dijagrami se koriste za optimizaciju sastava smeše makromolekula i uslova pri kojima je moguće dobiti rastvore određene mikrostrukture i fizičko-hemijskih osobina. U zavisnosti od osobina makromolekula, uzroci termodinamičke nekompatibilnosti se mogu opisati pomoću *Flory-Huggins*-ove teorije ili pomoću teorije deplecionih interakcija.

*Flory-Huggins*-ova teorija separaciju faza u smeši dva makromolekula objašnjava kao težnju makromolekula da bude okružen sopstvenim molekulima, više nego molekulima drugog makromolekula, a kvantitativno se može izraziti preko *Flory-Huggins*-ovog parametra interakcije (Aguilera i Stanley, 1999). Ova teorija opisuje termodinamičku nekompatibilnost u smeši makromolekula sličnog konformacionog stanja i uporedive veličine molekula (de Kruiff i sar., 2004; Tirrel 1993; Doublier i sar., 2000). Teorija deplecionih interakcija se primenjuje kod smeša makromolekula različite veličine i konformacije (npr. micelarnih koloida i polisaharida). Dodatak neadsorbujućeg polimera u koloidnu disperziju može dovesti do separacije faza, kao posledice deplecionih interakcija. Naime, u smešama različitih koloidnih čestica, oko veće čestice formira se sloj čistog rastvarača tzv. deplecioni omotač, čija debljina odgovara prečniku manje čestice, odnosno neadsorbujućeg polimera. Kada se koloidne čestice približe jedna drugoj, tako da dođe do preklapanja njihovih deplecionih omotača, dolazi i do povećanja zapremine rastvarača dostupne polimeru. Ovo povećanje zapremine dovodi do povećanja entropije, a samim tim i do smanjenja slobodne energije sistema. Konačno, kao rezultat se pojavljuju privlačne sile između koloidnih čestica, odnosno dolazi do njihove asocijacije, a zatim i separacije faza (Tuinier i sar., 2000; de Bont i sar., 2002; Tuinier i sar., 2003).

## 2. 2. 2. Interakcije u rastvorima proteina

Pored velikog broja istraživanja koja su fokusirana na ispitivanje interakcija između proteina i polisaharida, trenutno postoji svega nekoliko radova o interakcijama u sistemu protein – protein, koji je takođe sistem od dva polielektrolita (Kurskaja i sar. , 1979; Burgess i Carless, 1985; Keogh i sar., 1998). U radu Kurskaja i sar. (1979) autori su uočili formiranje rastvornih i nerastvornih kompleksa u smeši želatina A i B, odnosno želatina dobijenih kiselim i baznim postupkom, u intervalu pH vrednosti između njihovih IET. Sastav i rastvorljivost ovih kompleksa zavisi od naelektrisanja i masenih odnosa proteina. Nekoliko godina kasnije Burgess i Carles (1985) su ukazali na mogućnost primene želatin/želatin kompleksa za dobijanje mikrokapsula. Keogh i sar. (1998) su ispitivali reološke osobine kazeinat – želatin gelova i zaključili da elektrostičke interakcije između suprotno naelektrisanih proteina ne utiču na proces želiranja.

## 2. 2. 3. Primena interakcija u smešama biopolimera

Jedno od najširih polja praktične primene interakcija u smešama biopolimera je njihova primena za stabilnost disperznih sistema. Formiranje kompleksa proteina i polisaharida utiču na stabilnost emulzija na dva načina: njihovim deponovanjem na granicu faza i formiranjem filmova, kao i promenama osobina kontinualne faze nastalih njihovom interakcijom u rastvoru. Trenutno

postoji zaista veliki broj radova u kojima je ispitivana mogućnost stabilizacije emulzionih sistema ovim kompleksima (neki od novijih su: Dickinson i Pawlowsky, 1997; Gu i sar., 2004; Harnsilawat i sar., 2006a; Jourdain i sar., 2008; Cho i sar., 2009; Jourdain i sar., 2009; Zinoviadou i sar., 2012). Osim toga, pojava koacervacije ima široku primenu u procesima mikrokapsulacije. Emulzije i mikrokapsule se danas sve češće koriste kao nosači aktivnih materija u različitim proizvodima.

## 2. 3. Nosači aktivnih materija

U poslednje dve decenije shvatanje hrane se značajno promenilo, od toga da ona služi samo za zadovoljavanje gladi, do zahteva da hrana treba da bude i izvor zdravlja. Povećano interesovanje među potrošačima za hranom koja bi im ovo obezbedila dovelo je do pojave posebne kategorije prehrambenih proizvoda, danas poznatih kao „funkcionalna hrana“. Aktivne materije inkorporirane u odgovarajuće nosače ulaze i u sastav raznih dijetetskih suplemenata koji se danas sve češće koriste. Razlog njihove sve šire upotrebe je pre svega u savremenom načinu života, kao i novim postupcima koji se koriste u poljoprivredi i prehrambenoj industriji. Naime, prema podacima Svetske zdravstvene organizacije pre 1950. godine u hrani je nedostajalo samo 10% hranljivih materija, a od 2000-te godine čak 30%, zbog korišćenja veštačkog đubriva, veštačkih boja, konzervanasa i raznih aditiva. Osnovne karakteristike kvalitetnog suplementa su:

- da je prirodan;
- da ne sadrži veštačke boje, aditive ili šećer;
- da postepeno oslobađa sadržaj;
- da su minerali u heliranom obliku.

Ova kategorija obuhvata proizvode koji sadrže mikronutrijente, kao što su vitamini i minerali, ili funkcionalne sastojke iz prirodnih izvora, kao što su polifenoli ili polisteroli, ili nove kombinacije prehrambenih sastojaka, kao što su vlakna dodata u bezalkoholne napitke, riblje ulje dodato u hleb ili ljudske crevne bakterije dodate u mlečne proizvode (Day i sar., 2009). Dodatak funkcionalnih sastojaka prehrambenim proizvodima često dovodi do različitih problema, počev od problema pri formulaciji proizvoda, stabilnosti proizvoda, promene ukusa i izgleda, ili niske biološke iskoristivosti pojedinih sastojaka (Velikov i Pelan, 2008; Huang i sar., 2010). Pored navedenih problema moguće su i interakcije funkcionalnih sastojaka sa kompleksnim matriksom proizvoda. Zbog svega navedenog glavni pravci razvoja u prehrambenoj industriji su usmereni ka pronalaženju načina za inkorporiranje funkcionalnih sastojaka bez narušavanja

ukupne funkcionalnosti proizvoda. Slični problemi se javljaju i kada je potrebno dodati neke aktivne materije u kozmetičke ili farmaceutske proizvode.

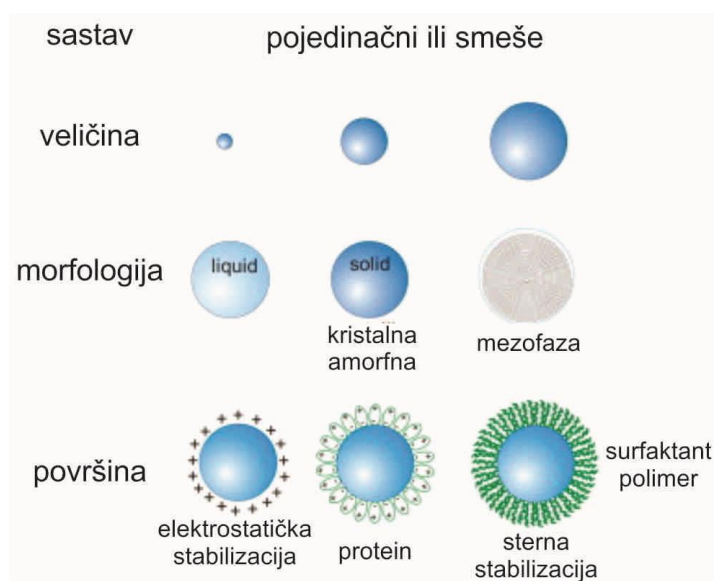
Aktivne materije se u proizvod mogu dodavati u rastvorenom obliku ili u obliku disperzije. Dodavanje aktivnih sastojaka u rastvorenom obliku ima niz prednosti, jer se sastojci dodaju prostim rastvaranjem, a rastvorene komponente su lako dostupne za apsorpciju, a samim tim i dobro biološki iskoristive. Međutim, rastvorene komponente imaju veću hemijsku reaktivnost i lakše reaguju sa drugim komponentama što može da dovede do promene boje ili precipitacije. U nerastvornom obliku se obično dodaju komponente neprijatnog ukusa i mirisa ili komponente velike hemijske reaktivnosti. Dodatak aktivnih sastojaka u ovom obliku često dovodi do promene teksture proizvoda, ili do njegove nestabilnosti usled sedimentacije. Koloidni nosači aktivnih materija imaju dobru perspektivu za prevazilaženje ovih problema. U koloidnom obliku, aktivni sastojci ostaju nerastvorni što obezbeđuje slabu hemijsku reaktivnost i omogućava maskiranje neprijatnog ukusa, a s druge strane kada se unesu u digestivni trakt bivaju soljubilizovani u *in-vivo* uslovima, obezbeđujući dobru biološku iskoristivost.

### 2. 3. 1. Vrste koloidnih nosača aktivnih materija

Koloidni nosači aktivnih materija obuhvataju veliku grupu disperznih sistema od submikronskih emulzija, preko koloidnih čestica do liposoma. Najopštija podela je na osnovu agregatnog stanja obe faze i u tom slučaju se dele na:

- čvrsto – tečne disperzije,
- tečno – tečne disperzije,
- disperzije samoorganizovanih molekula.

Na slici 5 prikazani su različiti tipovi koloidnih nosača aktivnih materija u pogledu sastava, veličine, morfologije i površine. Po pitanju sastava ovakvi sistemi mogu sadržati pojedinačne aktivne komponente (koloidne čestice) ili bioaktivne komponente inkorporirane u neki matriks. Morfologija koloidnih nosača može biti tečna (emulzije), čvrsta (kristalna ili amorfn), ili tečno-kristalna. Što se veličine čestica tiče, koloidni nosači najčešće sadrže čestice čije su veličine od 10 nm do nekoliko  $\mu\text{m}$ . Stabilizacija površine, koja je osnovni zahtev pri formiranju ovih sistema, može se ostvariti na više načina: naelektrisanjem površine (elektrostatička stabilizacija), adsorpcijom surfaktanata i/ili polimera na površini (sterna stabilizacija) ili kombinacijom ova dva mehanizma (elektrosterna stabilizacija) (Patel i Velikov, 2011).



Slika 5. Šematski prikaz podele koloidnih nosača aktivnih materija na osnovu sastava, veličine, morfologije i osobina granične površine (Patel i Velikov, 2011)

Koloidni nosači aktivnih materija se mogu koristiti u tečnim i čvrstim oblicima proizvoda, kada se mora obezbediti da se nakon hidratacije u gastrointestinalnom traktu sistem ponovo prevodi u koloidni oblik.

U koloidne nosače aktivnih materija spadaju: micele, liposomi, emulzije/mikroemulzije, duple emulzije, mikro i nanokapsule, hidrogeli, razni molekularni kompleksi i polimerne čestice.

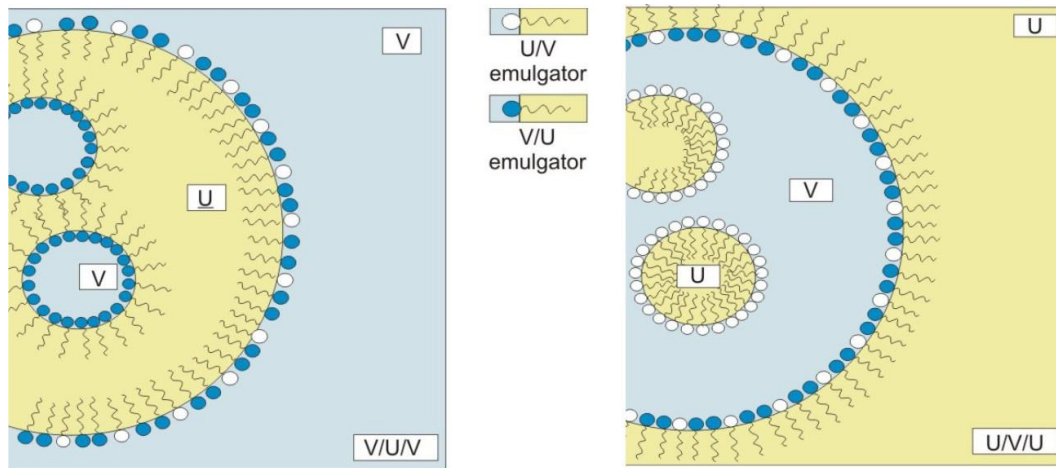
## 2. 4. Duple emulzije

Duple (multiple ili višestruke) emulzije mogu se definisati kao kompleksni sistemi, kod kojih kapi dispergovane faze sadrže manje dispergovane kapi tečnosti, a koje mogu biti iste ili slične spoljašnjoj, kontinualnoj fazi. Često se nazivaju i emulzijama emulzija.

Postoje dva osnovna tipa duplih emulzija:

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

Za razliku od prostih emulzija koje imaju dve tečne faze i jednu granicu faza, duple emulzije sadrže tri odvojene tečne faze i dve ulje/voda granice faza. Ova specifičnost duplih emulzija ukazuje na neophodnost korišćenja dve vrste emulgatora, jednog za stabilizaciju primarne, unutrašnje emulzije i drugog neophodnog za formiranje duple emulzije. Šematski prikaz strukture duplih emulzija dat je na slici 6.



Slika 6. Šematski prikaz strukture V/U/V i U/V/U duplih emulzija

Otkriće duplih emulzija se pripisuje Seifrizu 1925. godine koji je ispitivao kompleksnu mikrostrukturu duplih emulzija, nastalih prilikom inverzije faza emulzija U/V stabilizovanih kazeinom (Seifriz, 1925). Kasnija istraživanja su potvrdila mogućnost spontanog formiranja duplih emulzija pri inverziji faza prostih emulzija, naročito kod sistema koji su sadržali smešu emulgatora odgovarajućih HLB brojeva. Interesovanje za primenu duplih emulzija kao nosača aktivnih komponenti pokazao je veliki broj istraživača narednih godina. Međutim, prve rezultate istraživanja primene duplih emulzija u terapijske svrhe objavio je Herbert 1965. na primeru proteina ovalbumina, korišćenog kao vehikuluma za antigene, inkapsuliranog u unutrašnjoj vodenoj fazi emulzije V/U/V (Herbert, 1965). Ova formulacija je dobijena dvostepenim emulgovanjem uključujući primenu lipofilnog i hidrofilnog emulgatora. Tako je nastala prva dupla emulzija V/U/V sa praktičnom primenom.

Zahvaljujući ovim istraživanjima, tehnologija dobijanja i primena duplih emulzija, pre skoro 50 godina, označavana je kao tehnologija budućnosti i predstavljala je veliki naučni izazov. Međutim, danas se na tržištu može naći svega nekoliko proizvoda u ovom obliku. Osnovni razlog za još uvek dosta ograničenu primenu ovih sistema i postojanje relativno malog broja komercijalnih proizvoda je njihova nestabilnost.

U prehrambenoj industriji duple emulzije tipa V/U/V se koriste: za povećanje rastvorljivosti određenih aktivnih materija; kao zaštitni tečni rezervoari za molekule ostljive na spoljašnje uticaje kao što su oksidacija, svetlost i enzimi; ili kao omotači za maskiranje neprijatnog mirisa i ukusa nekih materija (Lobato – Calleros i sar., 2006; Shima i sar., 2006). Primena duplih emulzija u kozmetičkoj industriji omogućava primenu preparata sa postepenim oslobađanjem aktivnih komponenata, kao i primenu na kožu komponenata rastvornih u vodi preko tzv. preparata koji se ispiraju (*wash-off*) (Yoshida i sar., 1999). Ipak, najšira primena duplih emulzija do sada zapaža se u farmaceutskoj

industriji, gde se primenjuju za imobilizaciju farmakološki aktivnih supstanci, za postizanje hemoterapijskog efekta pri tretmanu kanceroznih ćelija, u antidot terapiji kod predoziranja, za zaštitu insulina od enzimske degradacija, ili kao zamena za crvena krvna zrnca (Okochi i Nakano, 2000; Cournarie, 2004; Shima i sar., 2006; Schmidts i sar., 2010).

### 2. 4. 1. Dobijanje duplih emulzija

Poznato je da su duple emulzije izuzetno nestabilni sistemi, pa je za dobijanje stabilne duple emulzije, osim izbora odgovarajućih sastojaka, od izuzetnog značaja i izbor odgovarajućeg postupka i uslova emulgovanja. U načelu, postupci za dobijanje duplih emulzija se mogu podeliti u dve grupe:

- izrada duplih emulzija postupkom inverzije faza;
- dvostepeni postupak izrade duplih emulzija.

**Izrada duplih emulzija postupkom inverzije faza** može se odvijati u jednom ili dva stepena. Dvostepeni postupak, prema Seiller i sar. (1998), podrazumeva da dupla emulzija nastaje tako što se u uljnu fazu koja sadrži emulgator dodaje unutrašnja vodena faza, a zatim se u tako nastalu emulziju dodaje spoljašnja vodena faza koja sadrži hidrofilni emulgator, do pojave inverzije faza. Osnovni nedostatak ovog postupka što veoma mali višak vode može dovesti do obrazovanja jednostruke emulzije U/V, a suviše sporo dodavanje vode može dovesti do nastanka jednostruke emulzije tipa V/U.

Za razliku od dvostepenog, jednostepeni postupak izrade duplih emulzije inverzijom faza je lakši, ali mu je osnovni nedostatak što u ovom slučaju unutrašnja i spoljašnja vodena faza imaju isti sastav. Do inverzije faza dolazi kada se hidrofilni emulgator inicijalno dodaje u uljnu fazu, a zatim se doda voda. U početku nastaje emulzija V/U, koja pod povoljnim uslovima postaje nestabilna i teži da se pomeša sa vodom, pri čemu nastaje V/U/V emulzija. Jednostepeni postupak izrade inverzijom faza je pogodan za izradu emulzija tipa U/V/U (Oh i sar., 2004).

**Dvostepeni postupak izrade duplih emulzija** je najčešće korišćen postupak. U ovom postupku prvo se izrađuje primarna V/U ili U/V emulzija, koja se zatim disperguje u spoljašnjoj vodenoj, odnosno uljnoj fazi, koje sadrže odgovarajući emulgator. Osnovna prednost ovog postupka, u odnosu na jednostepeni, je što unutrašnja i spoljašnja vodena faza mogu biti različitog sastava.

Prvi korak izrade emulzija V/U/V ovim postupkom podrazumeva pripremu primarne emulzije, koja se dobija tako što se lipofilni emulgator rastvori u uljnoj fazi i u njima disperguje vodena faza. U ovoj fazi se obično primenjuju velike brzine mešanja, pa se koriste homogenizeri koji to

omogućavaju, kao što je *Ultra Turrax*, ili se mešanje obavlja pomoću ultrazvuka. Temperatura i vreme trajanja homogenizovanja su takođe bitni faktori koji utiču na osobine dobijenih primarnih emulzija. Naime, temperatura mora biti dovoljno visoka da bi se lipofilni emulgator dobro dispergovao i da bi došlo do smanjenja međupovršinskog napona.

Druga faza postupka obuhvata dispergovanje primarne emulzije u vodenom rastvoru hidrofilnog emulgatora. Ova faza je posebno osetljiva tako da se mora voditi računa da brzine mešanja ne budu velike (do 500 o/min) kako ne bi došlo do razbijanja kapi primarne emulzije. Pored toga, potrebno je odrediti i optimalnu dužinu mešanja, kao i brzinu kojom se primarna emulzija dodaje u rastvor hidrofilnog emulgatora.

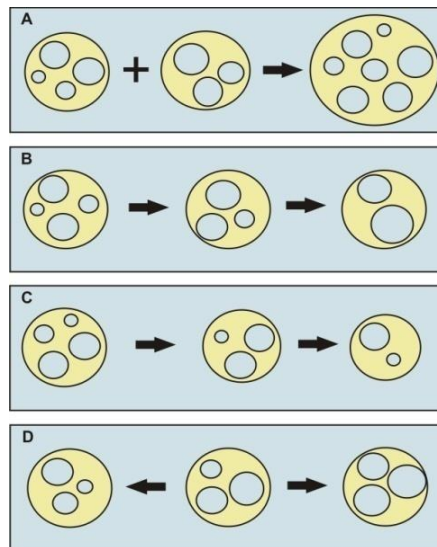
Nedostatak dvostepenog postupka je njegova mala reproduktivnost upravo zbog druge faze, pa se serije duplih emulzija mogu međusobno razlikovati, pre svega u prinosu složenih kapi. Teškoće se mogu javiti i zbog toga što primarna emulzija može biti vrlo viskozna, čime je otežano njeno dispergovanje.

## 2. 4. 2. Mehanizmi nestabilnosti duplih emulzija

Kao što je naglašeno, duple emulzije imaju potencijalno veoma široko polje primene, koje je trenutno samo na teorijskom nivou. U praksi, ove emulzije često sadrže velike, polidisperzne kapi, zbog čega su termodinamički nestabilne i imaju izraženu tendenciju ka koalescenciji, flokulaciji i raslojavanju.

Postoji više mehanizama po kojima dolazi do destabilizacije duplih emulzija, a neki od osnovnih su prikazani na slici 7 (Dickinson, 2011). Mehanizam na slici 7 A pokazuje koalescenciju spoljašnjih kapi, koja je potpuno analogna koalescenciji kapi kod prostih emulzija. Međutim, često dolazi do koalescencije kapi unutrašnje emulzije, bez bilo kakve promene na granici faza spoljašnjih kapi (slika 7 B). Sledeći vid nestabilnosti duplih emulzija (slika 7 C) je posledica koalescencije kapi unutrašnje emulzije, ali pri čemu dolazi do transporta mase unutrašnjih kapi u spoljašnju kontinualnu fazu. Usled prisustva osmotskog gradijenta između spoljašnje i unutrašnje faze, može doći do transporta mase u oba smera, a što za posledica ima skupljanje ili bubrenje unutrašnjih kapi, i ovaj mehanizam je predstavljena na slici 7 D. U praksi se, obično, nestabilnost ovih sistema javlja kao posledica različitih mehanizama koji se javljaju istovremeno.





Slika 7. Šematski prikaz različitih vidova nestabilnosti duplih emulzija

Nestabilnost duplih emulzija je u tesnoj vezi sa oslobađanjem inkorporiranih aktivnih materija iz ovih sistema, koje se odvija putem sledeća tri mehanizma (Pays i sar., 2002; Lutz i sar., 2009):

1. pucanjem složenih kapi usled bubrenja ili pod dejstvom smicanja;
2. „istanjivanjem“ tečnog filma između unutrašnjih kapi i granične površine spoljašnje kapi;
3. difuzijom, bez separacije faza, gde struktura duplih emulzija ostaje nepromenjena, a aktivne komponente se oslobađaju difuzijom kroz uljanu membranu.

Prvi mehanizam se javlja ukoliko postoji koncentracioni gradijent između dve vodene faze. Ukoliko voda teče u pravcu unutrašnje vodene faze, unutrašnje kapi bubre sve do pucanja spoljašnje kapi.

Mehanizam transporta aktivnih materija kroz uljnu fazu V/U/V emulzija se može odvijati preko reverznih micela, kroz tanke lamele emulgatora ili pomoću hidratizanih molekula emulgatora.

Ono što je karakteristično za ove sisteme i što predstavlja poteškoću pri njihovom proučavanju i formulaciji jeste činjenica da su nestabilnost duplih emulzija i oslobađanje aktivnih komponenata usko povezani, odnosno da se dešavaju simultano. S toga se i mogućnosti za povećanje stabilnosti i kontrolisanje oslobađanja aktivnih komponenti iz duplih emulzija moraju razmatrati zajedno.

### 2. 4. 3. Povećanje stabilnosti i kontrolisanje otpuštanja iz duplih emulzija

Trenutno se najveći broj istraživanja iz oblasti duplih emulzija izvodi upravo u cilju postizanja njihove veće stabilnosti i kontrolisanja otpuštanja aktivnih materija. Postoje različiti pristupci koji se primenjuju u ove svrhe (Garti i Bispernik, 1998), a neki od njih su:

➤ tehnike koje uključuju povećanje stabilnosti primarne V/U emulzije izborom odgovarajućeg tipa i koncentracije klasičnih emulgatora. Ovo se postiže smanjenjem veličine kapi, formiranjem mikroemulzija, formiranjem mikrosfera i povećanjem viskoziteta unutrašnje vodene faze;

➤ tehnike koje uključuju promenu prirode uljne faze povećanjem viskoziteta, koje se postiže dodatkom različitih pomoćnih supstanci ili kompleksirajućih agenasa;

➤ stabilizacija unutrašnje i/ili spoljašnje međupovršine upotrebom polimernih emulgatora ili prirodnih makromolekula, koji omogućavaju dobijanje stabilnijeg filma na međupovršini.

Rosano i sar. (1998) su sa teorijskog i eksperimentalnog aspekta ispitivali uticaj prisustva elektrolita u unutrašnjoj vodenoj fazi na stabilnost emulzija. Naime, Davis i sar. (1981) su pokazali da postojanje *Laplas*-ovog pritiska, usled zakrivljenosti površine dispergovanih kapi emulzije, dovodi do njene nestabilnosti. Ovaj efekat je jos poznat i kao *Ostwald*-ovo zrenje. U slučaju emulzija V/U dodatak malih količina elektrolita u disperznu fazu poništava uticaj *Laplas*-ovog pritiska i ima stabilizujući efekat. Pored ovoga, Rosano i sar. (1998) su zaključili da dodatak elektrolita ima i značajnu ulogu u izjednačavanju osmotskih pritisaka dve vodene faze, koja takođe može biti uzrok nestabilnosti ovih sistema.

U najnovijm istraživanjima sve više se ispituje mogućnost zamene niskomolekularnih emulgatora polimernim emulgatorima i prirodnim makromolekulima u cilju povećanja stabilnosti i kontrolisanja otpuštanja iz duplih emulzija. Niskomolekularni emulgatori mogu da migriraju sa unutrašnje granice faza V/U u uljnu fazu, a zatim budu transportovani do spoljašnje granice faza čime se znatno menja hidrofino/lipofilna ravnoteža svake faze. Većina istraživanja sprovedena 70-ih i 80-ih godina imala su za cilj pronalaženje odgovarajuće kombinacije hidrofelnog i lipofilnog emulgatora i njihovog odgovarajućeg masenog odnosa radi povećanja stabilnosti duplih emulzija. Međutim, značajniji napredak u povećanju stabilnosti duplih emulzija ostvaren je tek primenom polimernih emulgatora i biopolimera.

Prirodni makromolekuli kao što su proteini, lipoproteini i polisaharidi spadaju u grupu jedinjenja prehrambenog kvaliteta, za razliku od sintetskih polimera koji se ne mogu koristiti u prehrambenoj industriji.

Upotreba proteina kao amfifilnih makromolekula počela je pre dvadesetak godina ispitivanjem mogućnosti za povećanje stabilnosti duplih emulzija. Ispitivane su emulzije stabilizovane želatinom (Zhang i sar., 1992), proteinima mleka (Cornec i sar., 1998), albumin iz goveđeg seruma (*bovin serum albumin* (BSA)) (Dickinson i sar., 1991; Fredrokumbaradzi i Simov, 1992), humanim serum albuminom (HSA), kazeinom i drugim proteinima. U nekim ispitivanjima proteini su korišćeni u kombinaciji sa niskomolekularnim emulgatorima, naročito u unutrašnjoj vodenoj fazi. U ovom slučaju se uvek nameće pitanje da li je prisutna kompetitivna ili komplementarna adsorpcija između komponenata. Proteini se mogu dodavati u i unutrašnju i u spoljašnju vodenu fazu.

Omotosho i sar. (1986) su prvi ispitivali uticaj prisustva BSA i nejonskog emulgatora (Span 80) u unutrašnjoj vodenoj fazi na stabilnost duplih emulzija. Oni su zaključili da dolazi do izgradnje kompleksa između proteina i emulgatora na granici faza. Formirani kompleks povećava stabilnost emulzije i usporava otpuštanje aktivnih materija inkapsuliranih u unutrašnjoj vodenoj fazi. Kasnija ispitivanja (Fredrokumbaradzi i Simov, 1992) su potvrdila da se BSA može koristiti umesto niskomolekularnih emulgatora unapređujući stabilnost emulzija.

Koberstein – Hajda i Dickinson (1996) inkorporirali su faba proteine u unutrašnju vodenu fazu emulzija koristeći sorbitan monooleat (Span 80), kao hidrofobni, i natrijum kazeinat, kao hidrofilni emulgator. Autori su zaključili da se povećanjem količine proteina i Span-a 80 značajno povećava stabilnost emulzije i prinos inkorporiranog proteina.

Maydani (1994) je koristio lizozim u kombinaciji monomernim emulgatorom i u unutrašnjoj i u spoljašnjoj vodenoj fazi. U dobijenim emulzijama kapi su pokazivale težnju ka koalescenciji, a i formirani međupovršinski sloj nije bio dovoljno stabilan, verovatno zato što je lizozim mali molekul koji se ne adsorbuje snažno na granici faza.

U jednom od novijih istraživanja Su i sar. (2006) su ispitivali uticaj poliglicerol poliricinoolata (PGPR), samog i u kombinaciji sa natrijum kazeinatom, na stabilizaciju primarne V/U emulzije, kao i samog natrijum kazeinata za stabilizaciju spoljašnje granice faza kod duplih emulzija. Zaključeno je da se javlja sinergistički efekat kada su oba stabilizatora prisutna u primarnoj emulziji kao i da značajno doprinose povećanju stabilnosti unutrašnje granice faza. Primećeno je i značajno smanjenje veličine kapi primarne emulzije sa povećanjem koncentracije kazeinata. Ono što je posebno interesantno je to da je prisustvo natrijum kazeinata u koncentraciji od 0,5% omogućilo značajno smanjenje koncentracije emulgatora (sa 8% na 2%) bez uticaja na stabilnost

emulzije, što je posebno značajno s obzirom da visoke koncentracije PGPR-a u prehrambenim proizvodima nisu preporučljive. Osim toga, zaključeno je da protein i polimerni emulgator PGPR formiraju viskoeleastični film na granici faza, koji je značajno uticao na brzinu izlaženja boje iz unutrašnje u spoljašnju vodenu fazu. Dickinson i sar. (1994) su uspjeli da dobiju stabilne prehrambene V/U/V emulzije koristeći smešu natrijum kazeinata i PGPR. I oni su zaključili da povećanjem koncentracije proteina dolazi do smanjenja veličine kapi emulzije, kao i bolje kontrole otpuštanje markera iz unutrašnje vodene faze.

Na osnovu izloženog jasno je da se stabilnost duplih emulzija može značajno povećati u prisustvu amfifilnih molekula proteina iz dva osnovna razloga: fleksibilni molekuli obezbeđuju sternu stabilizaciju formirajući višeslojni omotač na kapima V/U/V emulzija, dok prisustvo proteina u unutrašnjoj vodenoj fazi omogućuje formiranje filma na granici faza koji predstavlja mehaničku barijeru i sprečava nekontrolisano otpuštanje aktivnih materija iz unutrašnje vodene faze.

Proteini ne mogu u potpunosti da zamene niskomolekularne emulgatore u unutrašnjoj fazi duplih emulzija (Dickinson, 1994), međutim, u kombinaciji sa drugim stabilizatorima imaju sposobnost da značajno povećaju stabilnost ovih složenih disperznih sistema. Osnovna prednost njihove primene je što se značajno smanjuje količina niskomolekularnih emulgatora, potrebna za stabilizaciju primarne V/U emulzije. Istovremeno, proteini u spoljašnjoj vodenoj fazi mogu dovoljno stabilizovati emulziju bez potreba za korišćenjem drugih emulgatora ili stabilizatora.

S obzirom da se na brzinu otpuštanja aktivnih materija inkorporiranih unutar duplih emulzija može uticati na različite načine, Florence i Whitehill (1985) predložili su tri načina za usporavanje pokretljivosti, a samim tim i brzine otpuštanja:

1. povećanjem viskoziteta uljne faze, čime se sprečava difuzija vode, emulgatora ili aktivnih materija iz unutrašnje vodene faze;
2. želiranjem uljne ili vodene faze;
3. polimerizacijom molekula PAM adsorbovanih na granici faza.

Weiss i sar. (2005) su ispitivali mogućnost upotrebe semikristalne uljne faze u V/U/gel duplim emulzijama za kontrolu otpuštanja inkapsuliranih hidrofilnih komponenata poredeći je sa otpuštanjem iz polisaharidnog gela. Ispitivana je sposobnost ulja sa trigliceridima srednje dužine lanaca, kao i različitih biljnih ulja da se ponašaju kao svojevrsne hidrofobne barijere za komponente iz unutrašnje vodene faze. Veća efikasnost inkapsulacije uočena je kod svih korišćenih ulja u duplim emulzijama, u poređenju sa količinom aktivne materije inkapsulirane u hidrokoloidnom gelu. Takođe, pokazalo se da različite

uljne faze sprečavaju difuziju vode, emulgatora i aktivnih materija iz unutrašnje vodene faze.

Podošavanje viskoziteta vodene faze duplih emulzija predstavlja jedan od često ispitivanih faktora koji utiču na osobine sistema. Dodatak derivata celuloze, kao što su hidroksipropil celuloza, hidroksipropilmetil celuloza ili hidroksietil celuloza, neki prirodni hidrokoloidi, kao što su ksantan, guar guma, karagenan, utiče na stabilnost duplih emulzija. Ovi korektori viskoziteta i agensi za želiranje imaju uticaja na neke osobine emulzija, kao što su efikasnost inkapsulacije aktivnih materija, stabilnost, veličinu čestica, konzistenciju itd (Ozer i sar., 2000).

Kanouni i sar. (2002) su u svojim ispitivanjima koristili Abil EM90 (polisiloksan) u unutrašnjoj vodenoj fazi. Spoljašnja faza je sadržala betain i SDS, a ksantan je korišćen kao stabilizator, odnosno korektor viskoziteta. Na osnovu mikroskopskih ispitivanja, kao i ispitivanja granice faza i reoloških merenja, Kanouni i sar. su zaključili da je u unutrašnjoj fazi neophodno koristiti emulgator niskog HLB broja da bi se on na granici faza adsorbovao ireverzibilno. Dugoročnija stabilnost zahteva i uspostavljanje ravnoteže između Laplasovog i osmotskog pritiska između kapljica unutrašnje vodene faze,  $V_1$ , i uljne faze. Ovo se rešava dodatkom malih količina soli. Što se spoljašnje faze tiče, zaključeno je da je neophodan dodatak hidrokoloida, kao korektora viskoziteta da bi se postigao odgovarajući odnos viskoziteta između primarne  $V_1/U$  emulzije i spoljašnje vodene faze,  $V_2$ . Za stabilizaciju spoljašnje granice faza ovi autori su predložili korišćenje kombinacije dva hidrofilna emulgatora.

Vaziri i Warburton (1994) su ispitivali uticaj različitih kombinacija emulgatora (Span 80 i Tween 80) i hidrokoloida (akacia i želatin) na brzinu otpuštanja i stabilnost duplih emulzija. Kombinacija emulgatora je omogućila dobijanje stabilnih emulzija sa produženim periodom otpuštanja zbog formiranja stabilnijeg filma na granici faza u poređenju sa emulzijama gde su emulgatori korišćeni pojedinačno. Bolja stabilnost se takođe pripisuje i prisustvu proteina koji se snažno adsorbuje na granici faza tokom procesa emulgovanja.

Pod određenim uslovima neki proteini i polisaharidi imaju sposobnost da formiraju komplekse sa znatno unapređenim osobinama u poređenju sa osobinama samih komponenata. Elektrostatičko povezivanje suprotno naelektrisanih proteina i polisaharida omogućava bolje vezivanje novoformiranog kompleksa na granicu faza ulje/voda (Grinberg i Tolstoguzov, 1997; Tolstoguzov, 2003; Benichou i sar., 2004). Mešanje dva vodena rastvora biopolimera može dovesti do pojave neke od situacija prikazanih na slici 4.

Benichou i sar. (2002) su ispitivanjem sistema protein/polisaharid zaključili da određeni proteini (BSA, kazein, proteini iz surutke) imaju mogućnost formiranja kompleksa sa hidrokoloidima (ksantan, guar guma, LBG).

Ovo su i prva istraživanja u kojima je ispitivan uticaj kompleksa proteina iz surutke i ksantana na stabilnost duplih emulzija.

Maseni odnos proteina i polisaharida je jedan od najvažnijih faktora koji utiče na formiranje kompleksa. [Garti i Wicker \(2005\)](#) su ispitivali uticaj odnosa komponenata na formiranje kompleksa proteina surutke sa ksantanom i modifikovanim pektinom. Dodatak hidrokoloida pozitivno je uticao na osobine duplihe emulzija, pre svega u pogledu veličina kapi. Kapi u ovim emulzijama su bile znatno manje u poređenju sa kapima u emulzijama stabilizovanim samo proteinom.

Emulzije mogu da se ponašaju i kao mikrokapsule ili mikrosfere, s obzirom da je film formiran na površini kapi prilično debeo, i često višeslojan. Takođe, uočeno je da se povećanjem udela proteina, u odnosu na polisaharid, dobijaju emulzije sa manjim kapima i znatno većom stabilnošću.

## 2. 5. Želatin

Želatin je prirodni makromolekul i jedna od osnovnih komponenata u formulacijama širokog spektra proizvoda prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije. Dobija se parcijalnom hidrolizom kolagena, osnovnog proteina kože, kostiju i vezivnog tkiva životinja. Želatin tipa A je proizvod kisele hidrolize kolagena, dok se tip B dobija alkalnom hidrolizom ([Glicksman, 1969](#)). Iako oba tipa želatina imaju slične funkcionalne osobine, postoje značajne razlike između njih, veoma važne za izbor odgovarajućeg želatina za određenu namenu. Razlike u fizičkim karakteristikama želatina tipa A i B prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1: Fizičke karakteristike želatina tipa A i B

Karakteristika	tip A	tip B
Vlaga	8 – 12 %	8 – 12 %
pH	3,5 – 5,5	5,0 – 7,5
Izoelektrična tačka	7,0 – 9,0	4,7 – 5,1
Jačina gela ( <i>Bloom</i> )	50 – 300	50 – 275
Viskozitet	20 – 70 mPas	20 – 75 mPas
Pepeo	0,3%	0,5 – 2,0%

Kao i ostali proteini i želatin poseduje amfoterni karakter usled prisustva funkcionalnih grupa amino kiselina, kao i terminalnih amino i karboksilnih grupa koje nastaju tokom hidrolize.

Od svih poznatih hidrokoloida želatin ima najširu primenu, zahvaljujući njegovim osobinama kao što su: reverzibilna sol – gel transformacija, površinska aktivnost i sposobnosti da deluje kao zaštitni koloid, nerastvorljivosti u hladnoj, ali potpunoj rastvorljivosti u toploj vodi, kao i nutritivnoj vrednosti. Osim toga želatin je jedini protein koji se zaista može okarakterisati kao hidrokoloid (Dickinson, 2009). Nema sekundarnu strukturu, a lanci molekula su izrazito fleksibilni (Keenan, 2003).

Po hemijskoj strukturi želatin je polipeptidni lanac amino kiselina povezanih peptidnom vezom. U izgradnji molekula želatina učestvuje 19 različitih amino kiselina, koje su prisutne i u molekulu kolagena iz koga se želatin dobija. Molekul kolagena se sastoji od tri polipeptidna lanca uvijena u obliku heliksa i povezana vodoničnim vezama. Dva lanca su identična i označavaju se kao  $\alpha_1$ , dok se treći nešto razlikuje i označava se kao  $\alpha_2$ . Prilikom procesa hidrolize, odnosno dobijanja želatina, dolazi do narušavanja ove složene strukture i razdvajanja polipeptidnih lanaca. Amino kiseline prisutne u molekulu želatina, nabrojane prema zastupljenosti, su: glicin, prolin, hidroksiprolin, glutaminska kiselina, alanin, arginin, asparaginska kiselina, lizin, serin, leucin, valin, fenilalanin, treonin, izoleucin, hidroksilizin, histidin, metionin, tirozin, cistein (Keenan, 2003). Od esencijalnih amino kiselina želatin ne sadrži samo triptofan.

Jedna od najznačajnijih osobina želatina je sposobnost termoreverzibilne sol – gel transformacije. Kada se vodeni rastvor želatina, koncentracije veće od 0,5%, ohladi ispod temperature od oko 35 – 40°C, najpre dolazi do povećanja viskoziteta, a zatim do formiranja gela. Proces želiranja obuhvata tri koraka: (1) reorganizaciju pojedinačnih lanaca polipeptida u uređenu, spiralnu orijentaciju; (2) udruživanje dva ili tri uređena segmenta i formiranje kristala; (3) stabilizacija formirane strukture bočnim povezivanjem spiralnih segmenata vodoničnim vezama. Jačina formiranog gela zavisi od koncentracije želatina, pH vrednosti, temperature i prisustva elektrolita i izražava se u *bloom* - ima.

Viskozitet vodenog rastvora želatina zavisi od njegove molekulske mase, čistoće i koncentracije, kao i od temperature, pH vrednosti rastvora i prisustva elektrolita. Vodeni rastvor želatina na temperaturama iznad 40°C pokazuju njutnovski tip proticanja. Viskozitet raste sa porastom koncentracije rastvora i sa sniženjem temperature. Za određeni tip želatina minimum viskoziteta je u IET, dok se udaljavanjem pH vrednosti rastvora od IET viskozitet značajno povećava. Na temperaturama između 30–40 °C rastvor želatina pokazuje nenjutnovski tip proticanja, verovatno usled povezivanja susednih lanaca i formiranja prostorne

strukture. Dodatak soli smanjuje viskozitet rastvora želatina usled suzbijene disocijacije naelektrisanih grupa.

Površinska aktivnost, odnosno sposobnost adsorpcije molekula želatina na granicu faza voda/vazduh i ulje/voda, je, takođe, jedna od veoma značajnih osobina koja proširuje oblast njegove primene. Sato i Ueberreiter (1979) su ispitivali proces adsorpcije želatina na granicu faza voda/vazduh na 40 °C pri različitim koncentracijama želatina i zaključili da je koncentracija molekula na granici faza oko 14 puta veća nego u rastvoru. U zavisnosti od koncentracije želatina, ovi autori su definisali i različite stepene intermolekularnih interakcija na granici faza. Prilikom ispitivanja adsorpcije molekula na sobnoj temperaturi uočeno je formiranje trostrukog heliksa na granici faza.

Još jedna od veoma značajnih osobina želatina, koja je posledica njegove površinske aktivnosti, je njegova sposobnost da deluje kao zaštitni koloid. Ovu osobinu želatina uočio je još Zigmund, koji je i prvi otkrio ovu pojavu i uveo princip zlatnog koloida. Smatra se da je zaštitni efekat želatina na koloidnu disperziju zlata rezultat formiranja filma želatina na površini čestice, čija je debljina reda veličine jednog molekula. Rezultat zaštitnog dejstva želatina na koloidne sisteme je i njegova sposobnost stabilizacije disperznih sistema, emulzija i pena, kao posledica formiranja filma na granici faza.

Zahvaljujući svojoj površinskoj aktivnosti želatin je našao primenu kao makromolekularni emulgator za stabilizaciju U/V emulzija (Lobo, 2002). Relativno visoka izoelektrična tačka želatina tipa A ( $IET > 7$ ) omogućava dobijanje emulzija sa kapima koje će biti pozitivno naelektrisane u širokom intervalu pH vrednosti. Osim toga, emulzije stabilizovane želatinom tipa A su znatno oksidativno stabilnije zahvaljujući elektrostatičkom odbijanju jona gvožđa od pozitivno naelektrisane površine kapi ulja. Međutim, ukoliko se za stabilizaciju koristi čist želatin dobijaju se emulzije sa relativno velikim kapima (Dickinson i Lopoez, 2001; Lobo, 2002), stoga se u cilju poboljšanja njegovih emulgujućih osobina predlaže hidrofobna modifikacija molekula uvođenjem bočnih nepolarnih grupa (Toledano i Magdasi, 1998) ili upotreba želatina u kombinaciji sa anjonskim PAM (Muller i Hermel, 1994; Surh i sar., 2005). Surh i sar. (2006) su potvrdili da se stabilne emulzije mogu dobiti sa želatinom dobijenim iz ribe, ali se malim udelom velikih kapi ( $> 10 \mu\text{m}$ ), što se pripisuje manjoj površinskoj aktivnosti ovog želatina u odnosu na druge proteine.

Kao što je već naglašeno, želatin ima veoma široku primenu u raznim granama industrije, pre svih prehrambene, farmaceutske i fotografske. U formulacijama prehrambenih proizvoda želatin se uglavnom koristi u obliku vodenog rastvora i to u formi gela, pri dobijanju bombona i nekih desertnih proizvoda. U mlečne i smrznute proizvode želatin se dodaje, pre svega, zbog njegovih osobina zaštitnog koloida, radi sprečavanja kristalizacije leda i šećera. U nekim mlečnim proizvodima kao što su pavlake i određene vrste sireva, želatin



se dodaje da spreči izdvajanje vode, odnosno pojavu sinerezisa. U proizvodima mesne industrije prisustvo želatina u koncentracijama od 1–5% obezbeđuje zadržavanje prirodnih sokova i očuvanje teksture i ukusa. Upotreba želatina za proizvodnju mekih, tkz. gumenih bombona, značajno je povećala njegovu potražnju širom sveta. Međutim, i dalje se najveće količine želatina, kada je u pitanju prehrambena industrija, koriste za proizvodnju deserata u formi želea.

U farmaceutskoj industriji želatin se koristi, pre svega, za dobijanje mekih i tvrdih želatinskih kapsula. U ovim formulacijama koriste se vodeni rastvori želatina ili rastvori želatina u polihidroksilnim alkoholima. Osim za dobijanje kapsula, želatin se koristi i za oblaganje tableta, a takođe i kao baza pri proizvodnji supozitorija, gde pokazuje niz prednosti u odnosu na kakao buter. Želatin ulazi u sastav raznih dijetetskih suplemenata gde predstavlja izvor esencijalnih amino kiselina.

Specifične osobine želatina su omogućile njegovu upotrebu za fiksiranje mirisa i aroma. Još 1945. su **Olsen i Seltzer** pronašli metod za fiksiranje aroma, po kojem je aromatično ulje emulgovano u vodenom rastvoru želatina, a zatim sistem ohlađen da bi se formirao gel. Gel je potom sušen i mleven da bi se konačni proizvod, ulje inkorporirano u želatinske čestice, dobio u praškastoj formi.

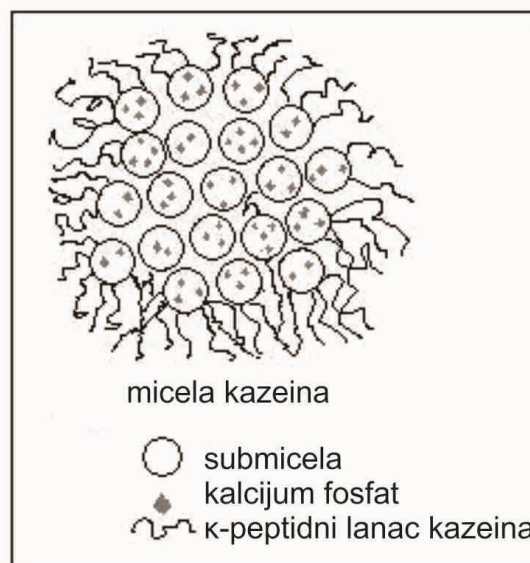
Upotreba želatina za formiranje kapsula i inkorporiranje mirisa i aroma unutar njih, poznata je već godinama. Postoji i nekoliko komercijalnih proizvoda u kojima su mirisi i arome u formi kapsula. Jedan od njih je smeša koja se dodaje u prehrambene proizvode, a u kojoj je citrusna aroma inkorporirana u želatinske kapsule radi sprečavanja oksidacije. Sličnim postupkom je dobijena i dehidratisana pileća supa sa želatinskim kapsulama unutar kojih se nalazi masnoća i koja se na taj način štiti da ne užegne.

Zahvaljujući svojim osobinama želatin je našao široku primenu i bio jedan od prvih polimera korišćenih u novoj metodi mikrokapsulacije. Upotreba želatina za dobijanje mikrokapsula zasnivala se na mehanizmima proste i složene koacervacije.

## 2. 6. Natrijum kazeinat

Natrijum kazeinat (NaKN) je protein koji je, takođe, veoma često prisutan u formulacijama različitih proizvoda, pre svega prehrambene industrije, zahvaljujuću svojim funkcionalnim i nutritivnim svojstvima, a dobija se iz kazeina, osnovnog proteina mleka. Kazein obuhvata grupu fosfoproteina ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  i  $\kappa$ ) prisutnih u mleku sisara, koji u kravljem mleku čine 80% od ukupnih proteina, a u humanom mleku između 25–40%. U građi molekula kazeina nisu

prisutni disulfidni mostovi, što za rezultat ima slabu tercijarnu strukturu. Slabo je rastvoran u vodi usled značajnog udela hidrofobnih delova u strukturi, koji su u većem udelu prisutni na  $\beta$  i  $\kappa$  kazeinima, odnosno njihovim C i N terminalnim delovima (Dagleish, 1997). U mleku se nalazi u obliku suspenzije čestica koje se nazivaju „kazeinske micelle“, prečnika oko 100 nm. Ove micelle samo donekle pokazuju sličnost sa klasičnim micelama PAM, a to je da su im hidrofilni delovi na površini i da su sfernog oblika. Za razliku od micela PAM, u unutrašnjosti kazeinskih micela se nalazi značajna količina vode. Molekuli kazeina su u micelama povezani kalcijumovim jonima i hidrofobnim vezama. Postoji više modela micela kazeina, a jedan od njih, po [Walastru \(1999\)](#), prikazan je na slici 8.



Slika 8. Model micelle kazeina ([Walastra, 1999](#))

NaKN se dobija iz koaguisanih micela kazeina neutralizacijom sa natrijum hidroksidom. Dobijeni derivat kazeina je lako disperguje u vodi, a rastvor sadrži protein i natrijumove jone, lokalizovane oko negativnih grupa na molekulu proteina ([Ho i Waugh, 1965](#)). Stoga, pH vrednost rastvora i koncentracija soli, koji utiču na količinu negativnog naelektrisanja duž lanca proteina, utiču i na asocijaciju molekula NaKN. Izoelektrična tačka NaKN je oko pH vrednosti 4,6, a u neutralnoj sredini NaKN poseduje znatnu količinu negativnog naelektrisanja. Suspenzija NaKN pokazuje njutnovski tip proticanja pri nižim koncentracijama, a povećanjem koncentracije pseudoplastično proticanje. Takođe, koncentrovane suspenzije NaKN pokazuju značajno smanjenje viskoziteta sa povećanjem temperature ([Pitkowski i sar., 2008](#)). [Carr i Munro \(2004\)](#) su uočili reverzibilno povećanje viskoznog ( $G''$ ) i elastičnog ( $G'$ ) modula između 50–55 °C što su pripisali reverzibilnom procesu želiranja pri hlađenju.

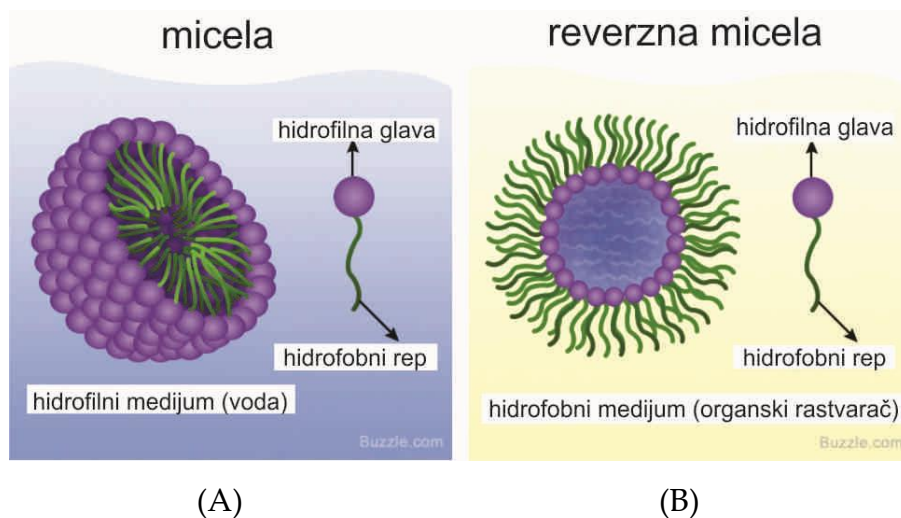
U poređenju sa drugim proteinima, molekuli NaKN pokazuju znatnu neuređenost u rastvoru i hidrofobnost (Sur i sar., 2006). Upravo ove osobine molekula NaKN uslovljavaju njihovu veliku tendenciju ka adsorpciji na granicu faza ulje/voda pri procesu emulgovanja. Formiranje stabilnog sloja molekula NaKN na površini kapi ulja sprečava flokulaciji i koalescenciju kapi kombinacijom elektrostatičkog i sternog mehanizma stabilizacije (Hu i sar., 2003; Liu i sar., 2007). Ovako stabilizovane emulzije pokazuju i veću stabilnost na povišenim temperaturama u poređenju sa emulzijama stabilizovanim proteinima surutke, verovatno zahvaljujući većoj fleksibilnosti molekula kazeinata, kod kojih ne dolazi do značajnih konformacionih promena pri zagrevanju (Hunt i Dalgleish, 1995; Srinivasan i sar., 2002). Takođe, NaKN pokazuje znatnu efikasnost za zaštitu emulgovanog ulja od oksidacije, koja se pripisuje njegovoj sposobnosti helatnog vezivanja gvožđa i formiranju čvrstog sloja na površini kapi ulja (Hu i sra., 2003). Međutim, emulzije stabilizovane molekulima NaKN pokazuju znatnu nestabilnost pri pH vrednostima oko IET (4,6), usled smanjenja ukupnog naelektrisanja molekula proteina, a samim tim i smanjenja elektrostatičkog odbijanje kapi emulzije (Dickinson i McClements, 1995; Agboola i Dalgleish, 1996; Dickinson i sar., 1998; Surh, Decker i McClements, 2006). Pored velikog broja istraživanje koja se bave ispitivanjem mogućnosti stabilizacije emulzija molekulima NaKN, danas se velika pažnja posvećuje i ispitivanju dinamike adsorpcije ovih molekula na granicu faza u prisustvu polisaharida, jer je uočeno da se interakcijom između ovih biopolimera može dodatno uticati na stabilnost emulzija (Jourdain i sar., 2008; Jourdain i sar., 2009; Zinoviadou i sar., 2012).

Danas se praktično sva proizvedena količina NaKN koristi u prehrambenoj industriji, a kao najveći potrošači navode se: industrija proizvodnje modifikovanih mleka i mlečnih proizvoda, klanična industrija, industrija prerade mleka, industrija testa i testenina i druge (Carić, 1985). Dva osnovna razloga dodavanja NaKN u prehrambene proizvode su: njegove funkcionalne karakteristike, odnosno sposobnost da emulguje masti, što se koristi npr. u modifikovanim mlečnim proizvodima (*coffee whitner*, lupana pavlaka, sladoled), i sposobnost da veže vodu, što omogućuje bolji tehnološki kvalitet tokom dužeg vremena kod mnogih mesnih prerađevina. Drugi razlog dodavanja NaKN u prehrambene proizvode je njihovo obogaćenje nutritivno visoko vrednim proteinima animalnog porekla, što se koristi kod proizvoda industrije testa i testenina. Sve je veća primena NaKN i u industriji mlečnih proizvoda i modifikovanih mleka gde ima ulogu obogaćenja mlečnih proizvoda proteinima, kao što je to slučaj u dijetalnim proizvodima, ili poboljšanje tehnološkog kvaliteta proizvoda zbog veće količine vezane vode, sprečavanja sinerezisa ili bolje konzistencije. Jedna od primena NaKN koja privlači posebnu pažnju poslenjih godina je upotreba ovog proteina za proizvodnju jestivih filmova za pakovanje prehrambenih proizvoda (Caprioli i sar., 2009; Dangaran, 2009).

## 2. 7. Lipofilni emulgatori

Priprema stabilne primarne V/U emulzije je jedan od osnovnih zahteva za dobijanje stabilne duple V/U/V emulzije. Kod duplih V/U/V emulzija za prehrambenu i farmaceutsku primenu, stabilnost primarne emulzije zavisi od prirode uljne faze, primenjenog emulgatora kao i od prirode inkapsulirane aktivne materije ili markera, naročito ako su u pitanju elektroliti (Dickinson i sar., 1994).

Emulgatori, poznati i kao površinski aktivne materije ili surfaktanti, su komponente koje snižavaju površinski i međupovršinski napon na granici faza (tečno/tečno, tečno/gas ili tečno/čvrsto). Tendencija ka adsorpciji na granicu faza posledica je specifične građe njihovih molekula. Naime, to su uglavnom organske komponente amfifilne građe, što znači da sadrže i hidrofobne (lipofilne) (rep) i hidrofilne (glava) delove na istom molekulu. Zahvaljujući ovoj specifičnosti u građi molekula oni difunduju kroz rastvor i adsorbuju se na granici faza gde se orijentišu u zavisnosti od prirode faza. U unutrašnjosti rastvora se takođe organizuju formirajući agregate tzv. micela, u kojima se orijentišu u zavisnosti od prirode faze u kojoj su rastvoreni (slika 9).



Slika 9. Organizacija molekula PAM u micelama u polarnoj (A) i nepolarnoj (B) sredini

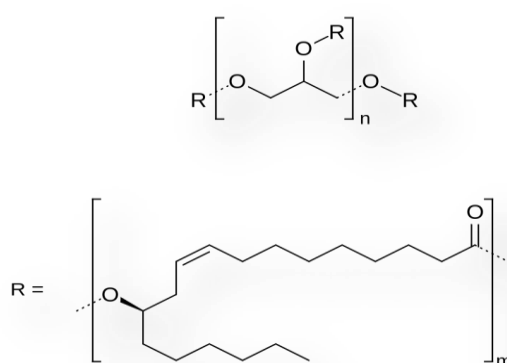
Izbor odgovarajućeg emulgatora predstavlja jedan od ključnih zahteva pri formulaciji stabilnog disperznog sistema. Osim toga, sinergistički efekat na stabilnost emulzija, koji je uočen prilikom kombinovanja više emulgatora, dodatno usložnjava proces izbora emulgatora (O'Brien, 2010). Da bi ovaj proces na neki način pojednostavio različiti autori su predlagali određene šeme za izbor optimalne smeše emulgatora za određenu namenu. Danas je najčešće primenjivan kriterijum HLB vrednosti emulgatora, odnosno broj koji predstavlja

odnos između udela hidrofилnog i lipofilnog dela u molekulu PAM (*hydrophilic lipophilic balance*), koji je uveo je Griffin 1949. godine. Emulgatori se većim HLB brojem (iznad 11) se klasifikuju kao hidrofилni i adsorbuju se na kapi ulja emulgujući ih u vodi, dok se emulgatori sa niskim HLB brojem (nižim od 9) označavaju kao lipofilni i adsorbuju se na kapi vode emulgujući ih u ulju. Osim HLB vrednosti za emulgatore, Griffin je uveo i termin „potrebne“ HLB vrednosti za ulja (Griffin, 1954). Na osnovu ovog principa za dobijanje stabilne emulzije neophodno je koristiti emulgator ili smešu emulgatora koja ima HLB vrednost blisku zahtevanoj vrednosti za ulje koje se koristi. Sinergistički efekat smeše emulgatora na stabilnost emulzije je često posledica funkcionalnih osobina nastalih međusobnom interakcijom pojedinih komponenata.

### 2. 7. 1. Poliglicerol estri masnih kiselina

Poliglicerol estri su nejonski emulgatori sa veoma širokom primenom u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Pored izrazito pozitivnog efekta na stabilnost emulzija i pena, oni utiču i na reološke osobine sistema, na čvrstoću testa, deluju kao humektansi i supstituenti masti, kao i za sprečavanje aglomeracije u nekim kozmetičkim proizvodima (Babayan i sar., 1964; McIntyre, 1979). Na listi prehrambenih aditiva su od 60-ih godina prošlog veka i dele se u dve klase: poliglicerol poliricinolat (E476) i poliglicerol estri jestivih masnih kiselina (E475).

**Poliglicerol poliricinolat (PGPR)** je sintetički emulgator, izrazito lipofilan, rastvoran u mastima i uljima, a nerastvoran u vodi i etanolu. To je žuta, viskozna tečnost koja sadrži poliglicerol estre polikondenzovanih masnih kiselina, najčešće dobijenih iz ricinusovog ulja (slika 10).



Slika 10. Strukturna formula molekula PGPR-a

PGPR ima veoma široku primenu u prehrambenoj industriji, posebno u proizvodnji čokolade i čokoladnih preliva, gde smanjuje viskozitet zahvaljujući osobini dobrog vezivanja vode (Wilson i sar., 1998, Beckett, 1999). Najveći

proizvođači PGPR-a „Palsgard“ i „Danisco“ predlažu da se u čokoladnim proizvodima deo kakao butera, kao jedan od najskupljih sastojaka, može zameniti sa PGPR-om, čime se smanjuje i udeo masti u proizvodu. Koristi se i kao emulgator u raznim namazima i prelivima za salate, kao i za sprečavanje kristalizacije u frakcionisanim biljnim uljima. Trenutno je i najčešće primenjivan emulgator za stabilizaciju V/U i V/U/V emulzija, koje se mogu koristiti kao nosači aktivnih materija u prehrambenoj industriji.

PGPR se poslednjih godina uglavnom dobija enzimskim putem pomoću dve lipaze. Enzimska reakcija se odvija pri umerenim uslovima temperature i pritiska, u neutralnoj sredini, bez prisustva rastvarača, što ovaj proces čini znatno ekološki povoljnijim, a proizvod koji nastaje je veće čistoće.

Paralelno sa povećanom upotrebom PGPR-a u čokoladi i sličnim proizvodima, od 50-ih godina dvadesetog veka, sprovode se i ispitivanja o delovanju ovog aditiva na ljudsko zdravlje. Zaključak sprovedenih studija je da PGPR ne utiče na metabolizam masti, pri čemu nije uočeno ni jedno štetno delovanje na vitalne funkcije organizma (rast, reproduktivne funkcije ili održavanje homeostaze tkiva). 1979. godine Naučni komitet za hranu u okviru Evropske zajednice propisao je dozvoljenu dnevnu dozu PGPR-a od 7,5 mg/kg telesne težine. Pored toga, propisane su i maksimalno dozvoljene količine PGPR-a u prehrambenim proizvodima u Evropi i one su u intervalu od 4–5 g/kg proizvoda (Direktiva broj 95/2/EC).

Iako je PGPR dobio GRAS status (*generally recognized as safe*) od Američke agencije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration (FDA)*), njegova postepena zamena ili smanjenje koncentracije je poželjno na osnovu zahteva potrošača za prirodnim komponentama u hrani (Gulseren i Correding, 2014).

**Poliglicerol estri masnih kiselina** su velika grupa emulgatora sa veoma širokim intervalom HLB vrednosti, koja zavisi od dužine lanca poliglicerola i stepena esterifikacije. S obzirom na širok interval HLB vrednosti, ovi emulgatori se koriste za stabilizaciju i U/V i V/U emulzija (Stauffer, 2005). Njihova izrazita površinska aktivnost ogleda se u značajnom sniženju međupovršinskog napona između vode i različitih ulja.

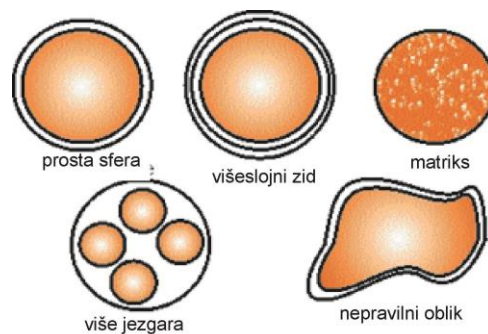
Poliglicerol estri masnih kiselina se dobijaju esterifikacijom odabranih molekula poliglicerola sa masnim kiselinama ili alkoholizom biljnih ulja poliglicerolom. Poligliceroli se dobijaju polimerizacijom glicerola u alkalnoj sredini. Dozvoljena dnevna doza za prehrambene aditive iz ove grupe je 25 mg/kg telesne težine (Lauridsen, 1976).

## 2. 8. Mikrokapsule

Mikrokapsulacija je tehnika kojom se određene materije oblažu polimernim materijalom i na taj način odvajaju od okolnog medijuma. Prve literaturne podatke o procesu mikrokapsulacije objavili su **Bungenburg de Jong i Kaas (1931)**, koji su opisali tehniku dobijanja želatinskih mikrokapsula procesom koacervacije, a prva komercijalna primene mikrokapsula ostvarena je 50-ih godina prošlog veka razvojem papira sa mikrokapsulama koji je omogućio umnožavanje kucanog i pisanog teksta bez upotrebe indiga (**Green, 1955**).

Mikrokapsule su veličine od 1-1000  $\mu\text{m}$ , odnosno u intervalu veličina između nanokapsula ( $<1 \mu\text{m}$ ) i makrokapsula ( $>1 \text{mm}$ ). Inkapsulirana materija čini jezgro mikrokapsule, a filmogena materija omotač ili zid mikrokapsule.

Jezgro mikrokapsule može biti tečno, čvrsto i gasovito, a u zavisnosti od prirode jezgra i omotača mikrokapsule mogu biti: nepravilnog oblika, u obliku proste sfere, sa višeslojnim zidom, sa više kapi, kao i obliku matriksa kod koga su kapi jezgra dispergovane unutar očvrslje kapi polimernog materijala. Ovi oblici mikrokapsula prikazani su na slici 11.



Slika 11. Oblici mikrokapsula

Osnovni razlozi inkorporiranja aktivnih materija unutar mikrokapsula su:

➤ izolovanje materije jezgra od okoline, a primenjuje se u slučaju kada se želi postići:

- ✓ zaštita materije jezgra od uticaja okoline (vlaga, kiseonik, UV zračenje), kao i smanjenje isparljivosti nekih aktivnih materija,
- ✓ prevođenje tečnih komponenata u praškast oblik,
- ✓ razdvajanje nekompatibilnih aktivnih materija,
- ✓ maskiranje neprijatnog ukusa i mirisa;

➤ kontrolisano otpuštanje aktivne materije iz mikrokapsula, a primenjuje se u slučaju kada se želi postići

- ✓ odloženo ili postepeno otpuštanje aktivne materije,
- ✓ povećanje biološke raspoloživosti aktivne materije,
- ✓ otpuštanje aktivne materije na određenom mestu u organizmu.

Zahvaljujući ovim osobinama mikrokapsule imaju veoma široko polje primene, a kao rezultat intenzivnih istraživanja u ovoj oblasti postoji više komercijalnih proizvoda u čiji sastav ulaze i mikrokapsule. U farmaceutskoj industriji mikrokapsule se koriste kao nosači različitih aktivnih materija kao što su različite farmakološki aktivne materije (ibuprofen, indometacin), enzimi i DNK (Walter i sar., 1999; Dong i Bodmeier, 2006; Lam i Gambari, 2014). U proizvodima kozmetičke industrije mikrokapsule ulaze u sastav krema, losiona, kao i preparata dekorativne kozmetike, gde su inkapsulirane različite aktivne materije (vitamini, etarska ulja), boje, pigmenti, antiperspiranti i dr (Vinetsky i Magdassi, 1998; Martins i sar., 2014). U prehrambenoj industriji mikrokapsulacija omogućava prevođenje tečnih materija (raznih ulja visoke nutritivne vrednosti) u praškast oblik i na taj način olakšava njihovo inkorporiranje u različite proizvode. Pored toga, mikrokapsule se sve češće koriste za inkorporiranje različitih vitamina, minerala, aroma i probiotika (Wilson i Shah, 2007; Gharsallaoui i sar., 2007; Anal i Singh, 2007). Jedna od oblasti gde se poslednjih godina sve češće primenjuju mikrokapsule je tekstilna industrija. Radi se o tekstilnim materijalima impregniranim sa mikrokapsulama koje sadrže različite aktivne materije, najčešće mirise i dezinficijense (Nelson, 2002; Mathis i Mehling, 2011). Osim pomenutih, mikrokapsulacija ima široku primenu i u hemijskoj, štamparskoj, agroindustriji, i dr.

Kao omotači mikrokapsula koristi se veliki broj različitih prirodnih, polusintetskih i sintetskih polimera, kao i različite voskaste materije, a njihov izbor zavisi, pre svega, od namene mikrokapsula kao i od primenjene tehnike mikrokapsulacije. Kada su u pitanju mikrokapsule za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, uglavnom se primenjuju biokompatibilni polimeri kao što su ugljeni hidrati i proteini, a sve češće se radi i na razvoju novih materijala za specifičnu namenu, kao što su bioadhezivni ili mukoadhezivni polimeri. Njihovom modifikacijom dobijaju se omotači mikrokapsula koji omogućavaju oslobađanje materije jezgra pod određenim uslovima sredine, odnosno u zavisnosti od pH vrednosti sredine i prisustva enzima (Hsieh, 1998). Neke od najčešće primenjivanih filmogenih materija su (Karsa i Stephenson, 1993; Sovilj, 2000):

➤ prirodne:

- ✓ ugljeni hidrati (skrob, alginat, karagenan, arapska guma, ksantan, hitozan, dekstran),



- ✓ proteini (želatin, kazein, albumin, proteini surutke),
- ✓ voskovi (pčelinji vosak, šelak);
- polusintetske:
  - ✓ derivati celuloze (metil celuloza, etil celuloza, hidroksipropilmetil celuloza, natrijum karboksimetil celuloza, hidroksipropil celuloza),
  - ✓ derivati skorba (hidrofobno modifikovani skrobovi),
  - ✓ viši alkoholi i njihovi derivati;
- sintetske:
  - ✓ vinil polimeri (polivinil alkohol, polivinil pirolidon, polistiren, poliakrilati),
  - ✓ poliamidi i poliestri (najlon, poliglutaminska kiselina, polilizin, polialilamin hidrohlorid),
  - ✓ voskovi (parafin),
  - ✓ poliuretani i polisiloksani.

Mikrokapsule se mogu dobiti primenom različitih tehnika, a najčešća podela ovih tehnika je prema prirodi procesa kojim se formiraju mikrokapsule na: hemijske, fizičko-hemijske i fizičke ili mehaničke. Međutim, ni ova podela nije striktna, jer različiti autori predlažu različitu klasifikaciju (Sovilj, 2000; Dubey i sar., 2009; Umer i sar., 2011). U tabeli 2 dat je pregled tehnika mikrokapsulacije sa kratkim opisom osobinadobijenih mikrokapsula.

Tabela 2. Tehnike mikrokapsulacije i osobine dobijenih mikrokapsula

Tehnike mikrokapsulacije	Osobine mikrokapsula
Koacervacija	Polimerni omotač, može biti i višeslojan, lipofilno jezgro
Otparavanje rastvarača	Omotač uglavnom biodegradabilni polimer nerastvoran u vodi, najčešće se primenjuje u farmaceutskoj industriji (virusi, DNK)
Međupovršinska polimerizacija	Omotač od sintetskih polimera odnosno kopolimera, mogu zaostati neizreagovani monomeri, za inkapsulaciju herbicida, pesticida, enzima
<i>In situ</i> polimerizacija	Polimerizacija monomera izazvana

	inicijatorima, mikrokapsule često nepravilnog oblika, u farmaceutskoj industriji i biotehnologiji (enzimi)
Mikrokapsulacija liposomima	Za inkapsulaciju hidrofilnih i lipofilnih aktivnih materija, dosta se koriste u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji
Inkapsulacija superkritičnim fluidima	Omotač hidrofoban ili hidrofilan, debljine i do 100 $\mu$ m
Sušenje raspršivanjem u struji toplog vazduha	Polimerni omotači, porozan omotač, može se primeniti i za termosenzitivne materije
Raspršivanje u struji hladnog vazduha	Omotači nerastvorni u vodi, mikrokapsule tipa matriksa
Mikrokapsulacija u fluidizovanom sloju	Za inkapsulaciju čvrstih materija jezgra ili tečnih na nekom nosaču, najčešće se koristi u farmaciji
Rotirajući disk	Za čvrste ili tečne materije jezgra, mikrokapsule i do milimetarskih veličina
Kapljična metoda	Porozan omotač, najčešće alginat, za žive ćelije i enzime
Centrifugalna ekstruzija	Za tečne materije jezgra, mikrokapsule od 400-2000 $\mu$ m

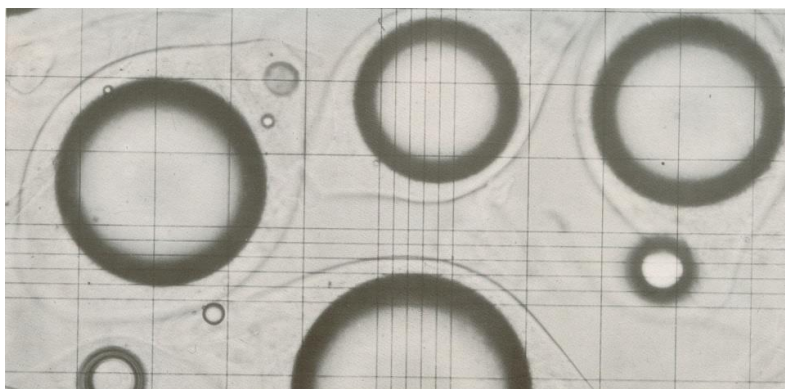
---

### 2. 8. 1. Mikrokapsulacija tehnikom koacervacije

Tehnika koacervacije je najstarija i prva tehnika koja je imala svoju komercijalnu primenu, u proizvodnji kopir papira. Ova tehnika se zasniva na procesu separacije faza, odnosno formiranja koacervata, u vodenoj sredini, pri čemu nastali koacervat obavaja materiju jezgra formirajući omotač mikrokapsula.

Ceo proces se može predstaviti kroz nekoliko karakterističnih faza. Prva faza obuhvata formiranje disperznog sistema materije jezgra u rastvoru jedne ili više makromolekularnih materija. Nakon toga se u sistemu na različite načine, u zavisnosti od toga da li se radi o prostoj ili kompleksnoj koacervaciji, uslovi sredine podese tako da se formira koacervat kao treća faza. Daljim podešavanjem uslova, kao što su vreme i brzina mešanja, promena temperature i dr., kapi koacervata obavijaju čestice jezgra, koalesciraju i formiraju kompaktan omotač

oko materije jezgra. Formirani omotač oko materije jezgra se pod mikroskopom može uočiti kao oreol i predstavlja želatinoznu masu koacervata (slika 12). Ova faza je i najosetljivija u procesu dobijanje mikrokapsula tehnikom koacervacije.



Slika 12. Kapljice ulja stabilizovane koacervatnim omotačem (Katona, 2010)

Barijerne osobine formiranog omotača se dalje mogu regulisati umrežavanjem, hemijskim ili enzimskim putem. Kao hemijski umreživači do sada su se najčešće koristili formaldehid, urea, glutaraldehid, ali se zbog njihove toksičnosti u poslednje vreme sve češće koristi genipin. Nakon toga, mikrokapsule se mogu izdvojiti iz rastvora nekom pogodnom tehnikom, filtriranjem, centrifugiranjem, raspršivanjem u struji toplog vazduha (*spray drying*).

Princip metode mikrokapsulacije **prostom koacervacijom** zasniva se na dispergovanju materije jezgra u rastvoru makromolekularne materije, a zatim se dodatkom elektrolita smanjuje rastvorljivost makromolekula i indukuje formiranje koacervata. Kod prvih mikrokapsula dobijenih ovom metodom omotač je formiran koacervacijom želatina u IET (Kondo, 1978). Kasnije su dobijene mikrokapsule i sa drugim makromolekulima, kao što su polivinil alkohol i hidroksipropilmetil celuloza ftalat, ili biljni proteini, najčešće isoljavanjem pomoću natrijum sulfata (Weib i sar., 1995; Bachtisi i Kiparissides, 1996; Mauguet i sar., 2002; Lazko i sar., 2004; Wu i Xiao, 2005). Osobine dobijenih mikrokapsula zavise pre svega od koncentracije elektrolita, zatim pH vrednosti, koncentracije umreživača, kao i od srednjeg prečnika mikrokapsula.

Princip metode mikrokapsulacije **kompleksnom koacervacijom** je vrlo sličan principu mikrokapsulacije prostom koacervacijom, s tim što se ovde nakon emulgovanja materije jezgra u rastvoru jednog polielektrolita dodaje drugi, suprotno naelektrisan polielektrolit, a podešavanjem uslova sredine dolazi do formiranja nerastvornog kompleksa ova dva polielektrolita koji se deponuje na granicu faza formirajući omotač mikrokapsula. Podešavanje uslova uglavnom podrazumeva odgovarajuću pH vrednost ili maseni odnos polielektrolita. Najčešće korišćen sistem polianjon-polikation za ovu svrhu je želatin-arapska guma (Tirkkonen i sar., 1994; Palmieri i sar., 1996; Huang i sar., 2007; Pakzad i

sar., 2013; Zuanon i sar., 2013). Pored ovog, dobijene su mikrokapsule primenom i niza drugih parova polielektrolita: želatin A-natrijum alginat (Devi i sar., 2012), želatin-pektin (Silva i sar., 2012), želatin-natrijumkarboksimetil celuloza (Sovilj i Dokić, 1997; Katona i sar., 2010), želatin-hitozan (Maji i Hussain, 2008), želatin A-želatin B (Burgess i Carless, 1985), proteini soje-arapska guma (Jun-xia i sar., 2011), pektin-kazein (Oliveira i sar., 2007; Baracat i sar., 2012), albumin-arapska guma (Burgess i Ponsart, 1998).

Metoda mikrokapsulacije putem **termodinamičke nekompatibilnosti** se do sada uglavnom koristila za mikrokapsulaciju čvrstih čestica, a kao omotač mikrokapsula najčešće se koristila etil celuloza. Očvršćavanje omotača se postiže dodatkom nerastvarača ili umrežavanjem.

## 2. 8. 2. Karakterisanje mikrokapsula

Postupak karakterisanja mikrokapsula nakon njihove pripreme podrazumeva određivanje različitih osobina, kao što su: veličina i raspodela veličina mikrokapsula, oblik, poroznost i debljina omotača mikrokapsula, mehanička stabilnost, sadržaj inkapsulirane materije, kao i kinetika oslobađanja materija jezgra.

Veličina i raspodela veličina mikrokapsula određuju se nekom od standardnih tehnika, kao što su mikroskopija, rasipanje svetla i kulterov brojač. Mikroskopija je i najčešće primenjivana tehnika za analiziranje oblika, kao i poroznosti i debljine zida mikrokapsula. Ovde pre svega velike mogućnosti pruža elektronska mikroskopija, pomoću koje se mogu definisati veličina pora i izgled same površine mikrokapsula, a odgovarajućom pripremom uzorka moguće je dovesti do pucanja nekih mikrokapsula i izmeriti debljinu zida. Poroznost površine mikrokapsula se može ispitati i metodom zamene inertnog gasa (Moreau i Rosenberg, 1998).

Mehaničke osobine mikrokapsula se, uglavnom, ispituju centrifugiranjem pri velikim centrifugalnim silama i analizom sadržaja oslobođene aktivne materije.

Jedna od najznačajnijih osobina mikrokapsula je brzina oslobađanja materije jezgra, a dešava se na neki od sledećih načina (Sovilj, 2000):

- rastvaranjem - stavljanjem mikrokapsula u medijum koji predstavlja rastvarač za filmogenu materiju, čijim se rastvaranjem oslobađa aktivna materija;
- termalno - povećanjem temperature topi se omotač mikrokapsula i oslobađa se aktivna materija;
- mehanički - pod dejstvom mehaničke sile dolazi do pucanja mikrokapsule i oslobađanja sadržaja;

- desorpcijom - ukoliko je aktivna materija adsorbovana na površini mikrokapsula;
- difuzijom - aktivna materija difunduje kroz polupropustljivi polimerni omotač ili polimerni matriks;
- biodegradacijom - do oslobađanja sadržaja mikrokapsula dolazi usled razgradnje omotača pod dejstvom enzima ili drugih biohemijskih procesa;
- kombinovano difuzijom i biodegradacijom – prvo dolazi do difuzije sadržaja mikrokapsula kroz porozni omotač, a zatim i do degradacije omotača i oslobađanja ostatka sadržaja.

Kod prva četiri načina, oslobađanje sadržaja iz mikrokapsula dešava se odmah i u potpunosti, a brzina izlaženja se ne može se regulisati, dok su ostali načini vremenski zavisni i takve mikrokapsule se ugrađuju u preparate za kontrolisano oslobađanje aktivne materije.

Za praćenje brzine oslobađanja materije jezgra neophodno je primeniti metodu koja će omogućiti određivanje prividnog koeficijenta difuzije kroz omotač mikrokapsula. Pri tome treba i eliminisati sve faktore koji mogu uticati na brzinu izlaženja, a nisu vezani za samu propustljivost omotača, kao što su zapremina i temperatura medijuma u kojem se oslobađanje ispituje, vreme trajanja eksperimenta, brzina i način mešanja sistema, oblik posude i mešalice, masa uzorka, prisustvo površinski aktivnih materija i drugih pomoćnih sredstava. Osnovne metode koje se primenjuju za ovu svrhu su (Washington, 1990):

**Difuzija kroz membranu.** Kod ove metode se uzorak mikrokapsula disperguje u manjoj zapremini medijuma na konstantnoj temperaturi, a membranom za dijalizu, koja je propustljiva za materiju jezgra, fizički odvoji od medijuma za otpuštanje. Materija jezgra difunduje kroz omotač mikrokapsula i prolazi kroz membranu, a u određenim vremenskim intervalima se uzorkuje deo medijuma i određuje koncentracija aktivne materije.

**Metoda uzorkovanja i odvajanja.** Ovde su mikrokapsule dispergovane u medijumu i u određenim vremenskim intervalima se uzorkuje, odvajaju se mikrokapsule, filtracijom ili centrifugiranjem, a u filtratu se određuje koncentracija oslobođene materije jezgra.

**In situ metod.** Ova metoda je ista kao prethodna s tim što se ovde koncentracija oslobođene materije jezgra određuje bez prethodnog odvajanja mikrokapsula. Kod ove metode se moraju odabrati analitičke tehnike koje su osetljive samo na prisutnu aktivnu materiju.

**Kontinualni metod.** Kod ove metode se mikrokapsule disperguju u maloj zapremini medijuma i postavje u ćeliju za filtraciju. Medijum kontinualno prolazi kroz filter i kroz uređaj za detekciju, koji automatski registruje

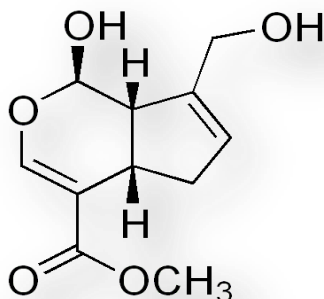
koncentraciju oslobođene aktivne materije. Istovremeno se dovodi svež medijum da bi se održala konstantna zapremina, a koncentracija oslobođene aktivne materije je proporcionalna trenutnoj brzini izlaženja. Ovo je osnovna razlika između ove metode i ostalih, koje su diskontinualne, gde se materija jezgra nakuplja u nepromenjenoj zapremini medijuma, a njena koncentracija je jednaka integralu brzine izlaženja.

Izbor medijuma za određivanje brzine izlaženja zavisi od namene mikrokapsula i prirode materije jezgra. Ukoliko su u pitanju mikrokapsule za farmaceutsku primenu oralnim putem, kinetika oslobađanja se prati u medijumu koji simulira uslove u gastrointestinalnom traktu (GIT). Tehnike koje se najčešće primenju za određivanje koncentracije oslobođene materije jezgra su spektrofotometrija, konduktometrija, hromatografske tehnike sa odgovarajućim detektorom.

Pored brzine oslobađanja aktivne materija, mikrokapsule se karakterišu i preko efikasnosti mikrokapsulacije, koja predstavlja odnos mase inkapsulirane aktivne materije i ukupno dodate mase aktivne materije prilikom pripreme mikrokapsula.

## 2. 9. Genipin

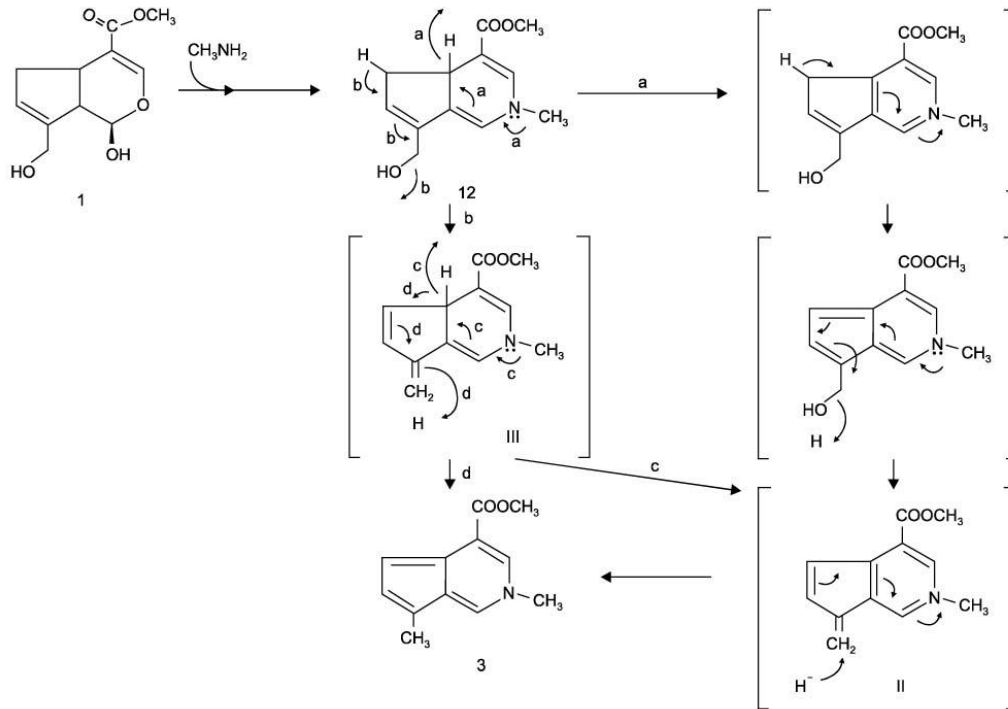
Genipin je aglikon dobijen hidrolizom genipozida, glikozida koji je prisutan u biljci *Gardenia jasminoides Ellis*. Ova biljka je iz familija *Rubiaceace* i godinama se koristila u tradicionalnoj kineskoj medicini za lečenje žutice, akutnog konjuktivitisa, ulceracija kože, kao i uganuća i bolnih otoka. Struktura genipina otkrivena je šezdesetih godina prošlog veka (Djerassi i sar., 1961), a prikazana je na slici 13. Genipin je bezbojna supstanca, a reakcijom sa amino grupama gradi plavo obojeni pigment, koji se koristi kao prehrambena boja (Park i sar., 2002).



Slika 13. Strukturna formula molekula genipina (Djerassi i sar., 1961)

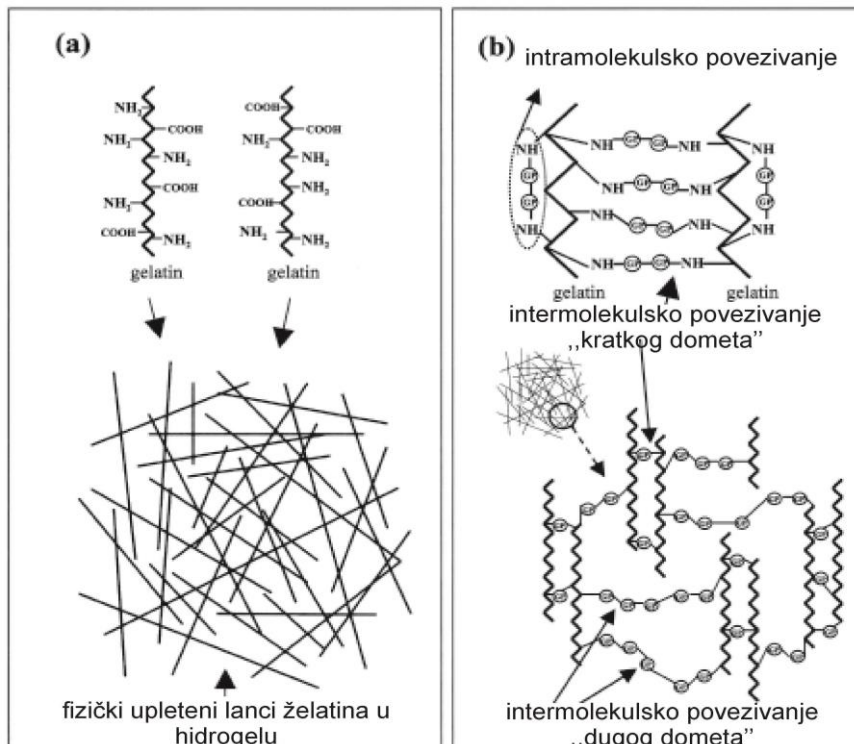
Postupak dobijanja genipina obuhvata ekstrakciju genipozida iz biljnog izvora metanolom. Iz genipozida genipin se dobija hidrolizom pomoću  $\beta$ -glukozidaze na 37 °C pri pH 5,0 u toku tri sata. Nakon isteka reakcionog perioda reakciona smeša se ekstrahuje etrom, a nakon kristalizacije dobija se genipin kao bezbojna, kristalna supstanca (Endo i Taguchi, 1973).

Mehanizam umrežavanja proteina i molekula koji sadrže primarne amino grupe još uvek nije potpuno razjašnjen. Touyama i sar. (1994) predložili su mehanizam reakcije na primeru genipina i metilamina. Oni su objasnili da reakcija počinje nukleofilnom adicijom primarnog amina na C<sub>3</sub> atom ugljenika u molekulu genipina, što dovodi do otvaranja dihidropiranskog prstena, a zatim do vezivanja sekundarnog amina sa nastalom aldehidnom grupom. Ovaj pretpostavljeni mehanizam reakcije između genipina i metilamina, koji je prikazan na slici 14, može se primeniti i na reakciju genipina sa drugim molekulima koji u svom sastavu imaju primarnu amino grupu. Pretpostavka je da u drugom stupnju dolazi do dimerizacije nastalog genipin-amino grupa monomera preko reakcija slobodnih radikala. Na ovaj način može doći do povezivanja dva polipeptidna lanca na rastojanju od 1,6–2,5 nm. Prema tome, genipin može da uspostavi intramolekulske veze unutar jednog lanca i tzv. „kratke” intermolekulske veze između više lanaca polipeptida. Daljim istraživanjima, primenom gel hromatografije, utvrđeno je da u fosfatnom puferu može doći do dalje polimerizacije molekula genipina i to tako da dođe do formiranja oligomera sa 30–40 monomernih jedinica. Polimerizacija se odvija tako što se nukleofilna OH<sup>-</sup> grupa vezuje za molekul genipina otvarajući prsten i formirajući aldehidnu grupu, kao što je već objašnjeno. Nastala aldehidna grupa se dalje polimerizuje preko aldolne kondenzacije. Oligomer genipina može da poveže dva lanca polipeptida formirajući tzv. „duge” intermolekulske veze (Liang, 2004) i formira umrežene strukture koje se šematski prikazane na slici 15.



Slika 14. Predloženi mehanizam reakcije između genipina i metilamina

(Touyama i sar., 1994)



Slika 15. Šematski prikaz predloženih struktura želatina umreženog genipinom

(Touyama i sar., 1994)



Materijali umreženi genipinom imaju veoma široko polje primene, od toga da se koriste kao bioadhezivi (Sung i sar., 1999), zatim za pokrivanje rana (Chang i sar., 2003), kao supstituenti za oštećene delove kostiju (Yao i sar., 2005), ili za regeneraciju perifernih nerava (Chen i sar., 2005). Pored ovih, posebno je zanimljiva još jedna potencijalna primena genipina, koja se još uvek ispituje, a to je kao reagens za detekciju otisaka prstiju na papiru. Za tu svrhu se do sada koristio ninhidrin, ali je u prvim istraživanjima genipin pokazao niz prednosti (Almong i sar., 2004; Levinton-Shamuilov i sar., 2005).

Kao što je već naglašeno, genipin se sve češće koristi kao umreživač omotača mikrokapsula za kontrolisano otpuštanje aktivnih materija. Genipin je pokazao niz prednosti u odnosu na do sada korišćene umreživače, kao što su veća otpornost na enzimsku degradaciju, veća biokompatibilnost i znatno manja citotoksičnost (oko 10.000 puta manja citotoksičnost u odnosu na glutaraldehid) (Huang i sar., 1998; Sung i sar., 1999; Mi i sar., 2002). Iz ovih razloga, poslednjih godina se intenzivno ispituje mogućnost primene genipina kao umreživača, a rezultat tih istraživanja je značajan broj objavljenih radova. Ispitana je mogućnost umrežavanja različitih makromolekula genipinom, kao što su hitozan (Yuan i sar., 2007) i želatin (Huang i sar., 2009), ili njihovih smeša: alginat-hitozan (Chen i sar., 2006; Hongmei, 2009; Paul i sar., 2011), hitozan-želatin (Hussain i Maji, 2008; Maji i Hussain, 2009) i želatin-κ karagenan (Devi i Maji, 2010). U ovako dobijene mikrokapsule inkorporirane su različite aktivne materije, na čiju efikasnost mikrokapsulacije i kinetiku oslobađanja imaju uticaj osobine omotača, a koje zavise i od količine umreživača i vremena trajanja umrežavanja. Međutim, prema do sada dostupnim literaturnim podacima, nije ispitana mogućnost umrežavanja kompleksa dva proteina genipinom.

## 2. 10. Vitamini

Tokom prve trećine dvadesetog veka, jedna od osnovnih tema istraživanja u hemiji bila je identifikacija vitamina, komponenata esencijalnih za ljudsko zdravlje, koje ne mogu biti sintetisane u organizmu. Čovek u dovoljnoj količini ne može da sintetiše ni jedan vitamin, a pojedine ne može uopšte da sintetiše, tako da se moraju unositi hranom (Nelson i Cox, 2000; Karlson, 1988).

Potpuni nedostatak nekog vitamina u organizmu čoveka naziva se avitaminoza. Hipovitaminoza je skup simptoma, koji se javljaju usled nedostatka nekog vitamina. Hipervitaminoze su stanja prouzrokovana preteranim dozama pojedinih vitamina koje su često uzrok nepoželjnih poremećaja zdravlja. Ranije preporuke za vitamine i minerale izražavale su se preko preporučenih doza RDA (*Recommended Dietary Allowances*) i odnosile su se na prevenciju deficita mikronutrijenata. Međutim, danas se pojavljuju novi naučni dokazi da vitamini

imaju dodatne funkcije ako se konzumiraju u većim količinama od preporuka (RDA), a ne u dozama da samo preveniraju nedostatak klasičnog deficita. Iz ovih razloga se potrebe za vitaminima od 2000-te godine označavaju preko ODA (*Optimal Dietary Allowances*).

## 2. 10. 1. Vitamin C

Vitamin C (askorbinska kiselina) je u vodi rastvoran ketolakton sa dve jonizujuće hidroksilne grupe (slika 16). Sposobnost sinteze ovog vitamina ima velika većina živih organizama, sa izuzetkom jedne grupe sisara i antipoda, kao i čoveka. Karakteriše ga izuzetna osetljivost na oksidaciju i toplotu, tako da se lako razlaže pri obradi namirnica, a u nekim slučajevima i samim čuvanjem namirnica. I pri niskim temperaturama vitamin C pokazuje nestabilnost, ali brzo zamrzavanje voća i povrća najmanje škodi.

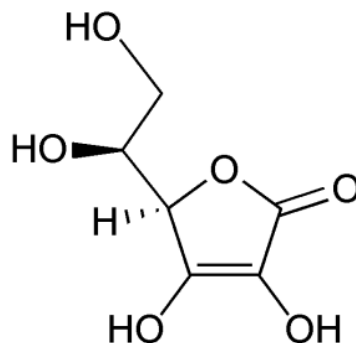
Vitamin C u organizmu deluje kao antioksidans te štiti telo od oksidativnog stresa. U ljudskom organizmu učestvuje u najmanje šest enzimskih reakcija, među kojima je i reakcija sinteze kolagena, čija se disfunkcionalnost manifestuje simptomima bolesti skorbut. Osim toga, učestvuje u sintezi karnitina i neurotransmitera, katabolizmu tirozina, i metabolizmu mikrozoama. Vitamin C je u visokim koncentracijama pronađen i u imunskim ćelijama, ali još uvek nije potpuno poznato na koji način deluje na funkciju imunskog sistema. Dokazano je i da poboljšava apsorpciju gvožđa iz namirnica i iz suplemenata, kao i da smanjuje rizik od urinarnih infekcija tokom trudnoće. Osim toga, deluje i kao antihistaminik, snižava nivo holesterola u krvi, smanjuje broj i veličinu kamena u žučnoj kesi, smanjuje propustljivost kapilara, ima adstringentna svojstva, pomaže apsorpciju vitamina A i B kompleksa i dr. U novijim istraživanjima je uočeno i da vitamin C usporava rast tumora i povećava prosečnu dužinu preživljavanja osoba obolelih od karcinoma, ali za konačnu potvrdu ovih pretpostavki potrebna su dodatna ispitivanja ([Verrax i sar., 2003](#); [Verrax i sar., 2006](#)).

Najbogatiji izvor vitamina C je šipak, a pored njega u značajnijim količinama je prisutan i u ribizli, paprici, prokelju, kelju, spanaću, kiviju, jagodama, citrusima, ananasu. Od životinjskih namirnica najviše ga ima u telećoj i svinjskoj jetri, ostrigama, bakalaru, jagnjećem mozgu i pilećoj jetri.

Preporučene dnevne doze vitamina C od strane Odbora za hranu i nutricionizam Američkog instituta za medicinu su: za muškarce i žene 75–90 mg, za trudnice i dojilje 85–120 mg, a za decu 15–75 mg (u zavisnosti od uzrasta). Na ove doze se u nekim slučajevima preporučuju dodatne količine za određene kategorije, recimo dodatnih 35 mg dnevno za pušače.

Avitaminoza C za posledicu ima nastanak skorbuta, bolesti koja se manifestuje pojavom smeđih pega na koži, suđerastih nepca i krvarenja iz mukoznih membrana, a u težim oblicima i pojavom gnojnih rana i gubitkom

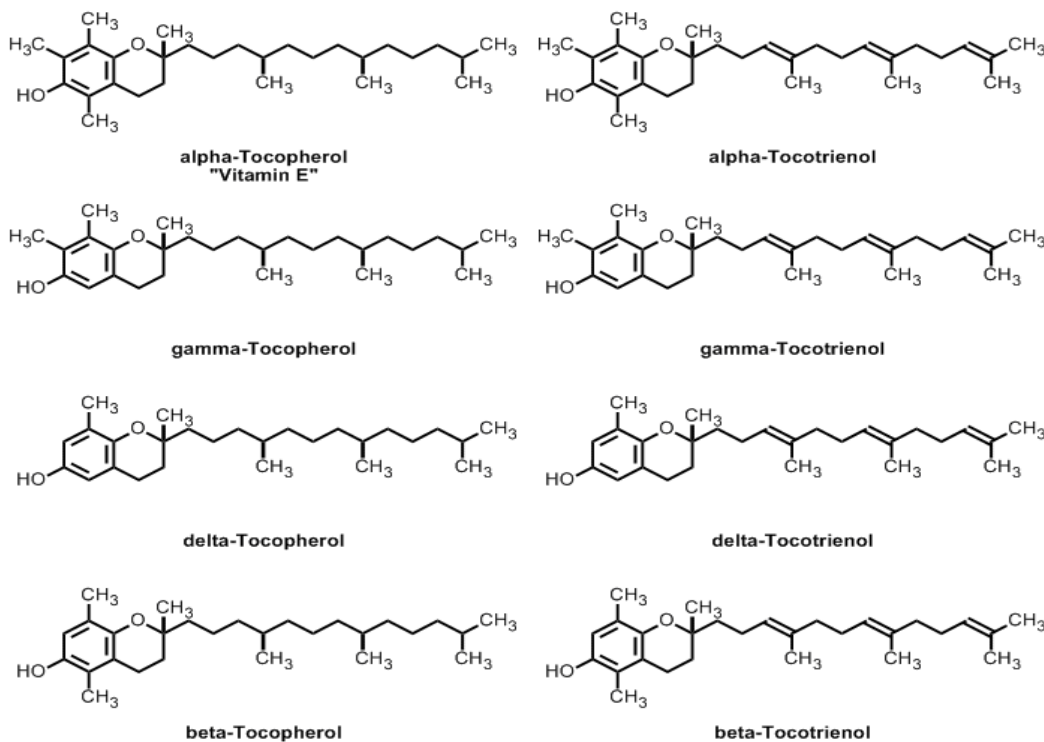
zuba. Kao posledice hipovitaminoze C javljaju se bolovi u mišićima, oticanje zglobova, krtije kosti, tendencija ka krvavljenju i zadobijanju modrica, lošije zarastanje rana, slabija otpornost na infekcije. Visoke doze vitamina C mogu da izazovu dijareju što je posledica osmotskog efekta zadržavanja neadsorbovane vode u gastrointestinalnom traktu.



Slika 16. Struktura vitamina C (askorbinske kiseline)

## 2. 10. 2. Vitamin E

Vitamin E je grupa od osam jedinjenja koja obuhvata tokoferole i tokotrienole (slika 17).  $\alpha$ -Tokoferol je biološki najaktivnija forma dok  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokoferoli i tokotrienoli pokazuju 10–50% biološke aktivnosti  $\alpha$ -tokoferola (Dormann, 2002). Od svih liposolubilnih vitamina vitamin E je najotporniji na toplotu, kiseonik i UV svetlost, ali se niskim temperaturama (zamrzavanjem), kao i mlevenjem znatno uništava.



Slika 17. Struktura  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - tokoferola i tokotrienola

Vitamin E je antioksidans u oksido-redukcionim procesima metabolizma ugljenih hidrata, masti, fosfata i kreatina. Štiti supstance koje se lako oksidišu (npr. vitamin A). Potrebe organizma za vitaminom E dovode se u vezu sa sadržajem polinezasićenih masnih kiselina u telesnim tkivima. Vitamin E sprečava stvaranje i akumulaciju peroksida, naročito polinezasićenih masnih kiselina, koji nastaju dejstvom molekularnog kiseonika. Koristi se radi suzbijanja štetnog dejstva viška (akumulacije) slobodnih radikala. Takođe, neutrališe slobodne radikale (direktnim dejstvom), a glutation neutrališe elektrofile (za sada utvrđeno u jetri, ali se pretpostavlja da je tako i u svim drugim organima). Koristi se protiv štetnog dejstva stresa, ozona, azot dioksida, pušenja, oksidacije, zračenja, žive (100% zaštita centralnog nervnog sistema), i za usporavanje starenja (slobodni radikali se sa starenjem nagomilavaju u svim tkivima). Kombinacija vitamina A, C i E koristi se u detoksikaciji mozga od teških metala. Vitamin E generalno podiže nivo HDL holesterola u krvi, ali samo kod onih pacijenata koji su imali niske vrednosti HDL-a. LDL i VLDL vrednosti holesterola snižava za jednu četvrtinu do jedne petine. Takođe, povećava tonus srčanog mišića, jača zid kapilara, a ima i diuretska svojstva. U pogledu imuniteta, vitamin E podstiče proizvodnju antitela, ali podstiče i njihovu funkcionalnu aktivnost (Sen i sar., 2007; Pekmezci, 2011). Vitamin E štiti ostale vitamine rastvorljive u mastima, a primenjuje se i u terapiji hipervitaminoze D.

Najbogatiji izvori  $\alpha$ -tokoferola su ulje pšeničnih klica, suncokreta i šafranike. Pored njih, tu su i punozrne cerealije, orasi, kikiriki, bademi, suncokretovo i pamučno seme, riba, piletina, džigerica, tamno zeleno povrće, slatki krompir, jaja.

Preporučeno je da u hrani za decu odnos vitamina E prema nezasićenim masnim kiselinama iznosi bar 0,4, a u hrani za odrasle ovaj odnos treba da iznosi bar 0,6. Preporučene dnevne doze za odrasle muškarce i žene iznose 8–10 mg  $\alpha$ -tokoferola, a za tudnice i dojilje 10–11 mg. Dnevna doza podeljena u više pojedinačnih doza dovodi do veće koncentracije u plazmi nego ista doza data jednom dnevno.

Hipovitaminoze E su vrlo retke, s obzirom na njegovu široku zastupljenost u hrani, a mogu se javiti kao posledica iscrpljenosti i neadekvatne ishrane koja traje mesecima. Takođe, nije uočeno da hipervitaminoze pokazuju značajnije negativne efekte po zdravlje.

## 3. EKSPERIMENTALNI DEO

### 3. 1. Materijal

U eksperimentalnom delu ove disertacije korišćene su sledeće hemikalije:

➤ Lipofilni emulgatori:

✓ Caprol 10G100 (dekaglicerol dekaoleat) – HLB vrednosti 3,5 (Abitec, SAD),

✓ Caprol 3GS (triglicerol monostearat) – HLB vrednosti 6,5 (Abitec, SAD),

✓ Caprol ET (heksaglicerol oktastearat) – HLB vrednosti 2,5 (Abitec, SAD),

✓ PGPR (poliglicerol poliricinooleat) – HLB vrednosti 3,0 (poklon od Jaffa Crvenka, Srbija);

➤ Ulje – trigliceridi srednje dužine lanaca (TSDL), (Sabo Spa, Italija). Ulje sadrži trigliceride srednje dužine lanaca masnih kiselina tj. smešu estara kaprilne i kaprinske kiseline. To je visoko-prečišćeno ulje dobre oksidacione stabilnosti. Bez ukusa je, boje i mirisa, niskog viskoziteta, brzo prodire kroz kožu i dobar je emolijens.

➤ Želatin tipa A, dobijen kiselom hidrolizom iz goveđe kože, 300 bloom-a, (Sigma, SAD);

➤ Natrijum kazeinat (NaKN) – dobijen iz kravljeg mleka, IET na pH=4,6 (Surh, Decker i McClements, 2006) (Sigma, SAD);

➤ Vitamin C – askorbinska kiselina (Alfa Aesar, Nemačka);

➤ Vitamin E – tokoferol acetat, 97% (Alfa Aesar, Nemačka);

➤ Genipin – umreživač (Wako, Japan);

➤ Aerosil 200 Pharma – silicijum dioksid (Evonik, Nemačka);

➤ Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) – (Zorka Pharma, Srbija);

- Natrijum hidroksid (NaOH) – (Centrohem, Srbija);
- Hlorovodonična kiselina (HCl) – 36,2% (Zorka Pharma, Srbija);
- Destilovana voda.

### 3. 2. Uređaji

- pH-metar – 827 pH lab (Metrohm, Švajcarska) sa elektrodom za merenje pH vrednosti rastvora polimera i emulzija Flushtrode (Hamilton, SAD);
- Tenziometar – Sigma 703D (KSV Instruments, Finska);
- Kapilarni viskozimetar – Cannon 50 E599 (Cannon Instrument Company, SAD);
- Spektrofotometar – T80 UV/VIS (PG Instruments Ltd., England) sa staklenim i kvarcnim kivetama;
- Homogenizer – Digital Ultra Turrax T25 (Ika, Nemačka), sa dve radne sonde: S 25 N – 10G i S 25 N – 25G;
- Rotacioni viskozimetar – RS600 (Thermo Haake GmbH, Nemačka) sa mernim priborom konus – ploča (d=60 mm,  $\alpha=1^\circ$ );
- *Zetasizer* – Nano ZS (Malvern Instruments, UK), sa kapilarnom ćelijom za merenje zeta potencijala i polistirenskom kivetom za merenje veličine čestica, mernog opsega 0,6 nm–6  $\mu\text{m}$ ;
- Magnetna mešalica – C-MAG HS7 (Ika, Nemačka);
- *Mini Spray Dryer* – Buchi 190 (Buchi, Švajcarska);
- Mikroskop – Bel 3000 (Bioptica, Italija);
- Fotoaparat – Power Shot S50 (Cannon, Japan);
- Elektronski mikroskop – *Scanning electron microscope* (SEM) JOEL JSM 6460 LV;
- *Dissolution tester* – DT70 (Erweka, Nemačka);
- Spektrofotometar – Carry 50 Varian (Darmstadt, Nemačka);
- *Vortex* mešalica – BioVortex V1 (Biosan, SAD);
- Termostati – ED (Julabo, Nemačka) i C25P (Thermo Scientific, Nemačka).

### 3. 3. Metode rada

#### 3. 3. 1. Priprema rastvora

Osnovni rastvori lipofilnih emulgatora (Caprol 10G10O, Caprol ET i PGPR 3 i 10% (m/v) i Caprol 3GS 1% (m/v)) pripremljeni su rastvaranjem odgovarajuće mase emulgatora u ulju (TSDL) uz blago zagrevanje. Rastvori nižih koncentracija dobijeni su razblaživanjem osnovnih rastvora. Rastvori smeša emulgatora PGPR-a i Caprol-a 10G10O i PGPR-a i Caprol-a 3GS pri različitim masenim odnosima (1:1, 1:2, 1:5, 1:10) pripremljeni su mešanjem osnovnih rastvora emulgatora i potrebne količine ulja tako da ukupna koncentracija emulgatora bude 1; 2 i 3% (m/v). HLB vrednosti ispitivanih smeša emulgatora, izračunate iz izraza:

$$HLB_{sm} = x_A \cdot HLB_A + (1 - x_A) \cdot HLB_B$$

gde su  $HLB_A$  i  $HLB_B$  HLB vrednosti emulgatora A i B, a  $x_A$  maseni udeo emulgatora A u smeši, i date su u tabeli 3.

Tabela 3. HLB vrednosti smeša lipofilnih emulgatora PGPR-a i Caprol-a 10G10O i PGPR-a i Caprol-a 3GS

PGPR:Caprol 3GS	$HLB_{sm}$	PGPR:Caprol 10G10O	$HLB_{sm}$
1:1	4,75	1:1	3,25
1:2	5,28	1:2	3,3
1:5	5,91	1:5	3,42
1:10	6,19	1:10	3,46

Osovini rastvori želatina pripremljeni su tako što je odgovarajuća masa proteina prelivena sa  $\frac{1}{4}$  od ukupne potrebne količine destilovane vode i ostavljena da bubri 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodata je preostala količina vode i želatin rastvoren uz mešenje i blago zagrevanje do 40 °C. Koncentracija je izražena u masenim procentima (m/m).

Osnovni rastvor NaKN koncentracije 10% (m/m) pripremljen je rastvaranjem potrebne mase NaKN u vodi, uz mešenje i zagrevanje do 40 °C. Rastvori nižih koncentracija dobijeni su razblaživanjem osnovnog rastvora.

Rastvori oba proteina su ostavljani na sobnoj temperaturi u toku 24 h pre dalje upotrebe.

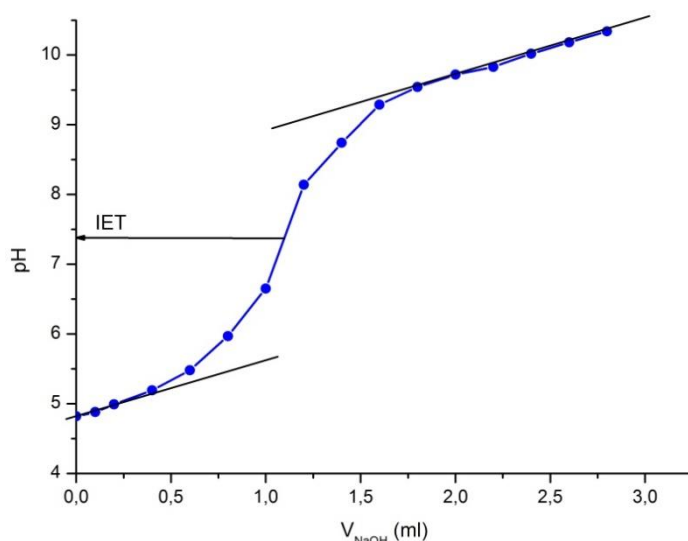
Binarne smeše želatin/NaKN pripremane su mešanjem osnovnih rastvora proteina i destilovane vode do postizanja odgovarajućih koncentracija.

Koncentracija želatina u smešama je bila konstantna (u tri serije koncentracije su bile: 0,25; 0,5 i 1% (m/m)), dok je koncentracija NaKN varirana od 0,00% do 5% (m/m). Pripremljene smeše su stajale na temperaturi od 40 °C u toku 24 h pre izvođenja merenja.

Rastvor genipina je pripreman rastvaranjem odgovarajuće mase genipina u vodi uz blago zagrevanje. Koncentracije rastvora su odabrane tako da nakon dodatka u emulziju sadržaj genipina bude 0,2; 0,5; 1 i 2 mmol/g proteina.

### 3. 3. 2. Merenje pH vrednosti

pH vrednost binarnih smeša želatin/NaKN određena je pomoću laboratorijskog pH metra na 40 °C. Za određivanje IET želatina primenjena je metoda potenciometrijske titracije, odnosno merenje pH vrednosti rastvora želatina u zavisnosti od dodate zapremine NaOH na 40 °C. IET želatina određena je iz ekvivalentne tačke titracije i njena vrednost je iznosila 7,43 (slika 18).



Slika 18. Kriva titracije 0,5% (m/m) rastvora želatina 0,1M NaOH na 40 °C

### 3. 3. 3. Merenje mutnoće

Mutnoća binarnih smeša želatin/NaKN određena je merenjem absorbance uzoraka na 600 nm pomoću spektrofotometra T80 UV/VIS u staklenim kivetama od 1 cm. Kao slepa proba korišćena je destilovana voda.



### 3. 3. 4. Viskozimetrijska merenja

Viskozimetrijska merenja izvođena su pomoću *Cannon*-ovog kapilarnog viskozimetra, vodene vrednosti 160,87 s, na 40 °C. Vreme isticanja  $t$  (s), izraženo je kao srednja vrednost najmanje tri merenja. Za binarne smeše želatin/NaKN rezultati su iskazani kao relativni viskoziteti ( $\eta_{rel}$ )smeša u zavisnosti od koncentracije NaKN:

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

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

### 3. 3. 5. Tenziometrijska merenja

Površinski napon rastvora proteina i njihovih smeša određivan je pomoću tenziometra Sigma 703D na 40 °C, metodom prstena po *Du Noüy*-u. Pre merenja prsten je uronjen u rastvor (ispod površine rastvor/vazduh) i ostavljen 15 min radi stabilizacije adsorpcionog sloja. Površinski napon destilovane vode korišćene za pripremu rastvora iznosio je 70,44 mN/m na 40 °C. Merenja su izvođena u laboratorijskim čašama od 50 ml, a zapremina uzoraka je bila 20 ml. Prikazane vrednost površinskog napona su srednje vrednosti od najmanje tri merenja.

Za merenje međupovršinskog napona na granici faza ulje/voda kao uljna faza korišćeno je TSDL ulje, rastvori lipofilnih emulgatora i njihovih smeša u ulju, kao i rastvor vitamina E u ulju. Kao vodena faza korišćena je destilovana voda ili rastvor vitamina C u vodi. Merenja su izvođena tako što je u čašu sipano 10 ml vodene faze (teža faza), nako čega je ona postavljena u oblogu za termostatiranje i u nju uronjen prsten, nekoliko milimetara ispod površine. Zatim je, pažljivo, uz zid čase dodato 10 ml uljne faze i nakon 15 min stabilizacije adsorpcionog sloja na granici faza vršeno je merenje izvlačenjem prstena iz teže, vodene u lakšu, uljnu fazu. Merenja međupovršinskog napona za svaki ispitivani sistem ulje/voda ponavljana su najmanje tri puta.

### 3. 3. 6. Merenje zeta potencijala

Naelektrisanje kompleksa želatin/NaKN određeno je merenjem zeta potencijala. Za tu svrhu korišćen je *Zetasizer Nano ZS* sa odgovarajućom kapilarnom ćelijom. Pre merenja uzorci su razblaženi do ukupne koncentracije proteina od 0,005% (m/m). Za svaki uzorak je merenje je ponovljeno najmanje tri puta.

### 3. 3. 7. Reološka ispitivanja

Reološke karakteristike binarnih smeša želatin/NaKN ispitane su pomoću reometra RS600 na 20 °C. Koncentracija želatina u uzorcima bila je konstanta (1% (m/m)) dok su koncentracije Na-KN varirane u intervalu od 0,05 do 3% (m/m). Smeše su pre merenja stajale na temperaturi od 40 °C u toku 24 h, a neposredno pre merenja su prevođene u gel stanje hlađenjem na 7 °C u toku 2 h. Pošto je uočeno da gel želatina kao i smeše želatin/Na-KN pokazuju tiksotropno ponašanje, za ispitivanje je primenjen kontinualni histerezisni postupak (Sovilj i Dokić, 1996). Tiksotropne petlje su dobijene kontinualnim povećanjem brzine smicanja  $\dot{\gamma}$  ( $s^{-1}$ ), od  $\dot{\gamma} = 0$  do maksimalne ( $\dot{\gamma}_{max}=200$ ), zatim smicanjem na  $\dot{\gamma}_{max}$  u toku 10 min, i smanjenjem brzine smicanja od  $\dot{\gamma}_{max}$  do  $\dot{\gamma}=0$ . Dobijene tiksotropne petlje su karakterisane preko koeficijenta tiksotropije  $K_t$  (Djaković, Sovilj i Milosević, 1990; Djaković, Milosević i Sovilj, 1994):

$$K_t = \frac{S}{\dot{\gamma}_{max}}$$

$$S = S' - S''$$

gde su  $S'$  i  $S''$  površine ispod uzlazne i povratne krive u intervalu brzina smicanje od  $\dot{\gamma}=0$  do  $\dot{\gamma}_{max}$ .

Pored krivih proticanja, urađena su i oscilatorna merenja u cilju ispitivanja viskoelastičnih osobina smeša želatin/NaKN. Primenjen je metod variranja amplitude oscilovanja (Katona, Sovilj i Petrović, 2008), pri frekvenciji od 1 Hz. Vrednosti elastičnog  $G'$  i viskoznog  $G''$  modula određene su unutar linearne viskoelastične oblasti (LVE). Udeo viskozne u odnosu na elastičnu komponentu izražen je preko vrednosti  $\tan\delta$ :

$$\tan\delta = \frac{G''}{G'}$$

### 3. 3. 8. Priprema emulzija

Duple emulzije su pripremane dvostepenim postupkom emulgovanja pomoću homegenizera *Ultra Turrax T25* i magnetne mešalice

Najpre su pripremane primarne, 20% emulzije vode u ulju (V/U), uz pomoć homogenizera *Ultra Turrax T25*. Kao vodena faza emulzija korišćena je destilovana voda, a kao uljna faza 1, 2 i 3% (m/v) rastvori smeša lipofilnih emulgatora, PGPR-a i Caprol-a 10G100 pomešanih u odnosima 1:0, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 0:1, u TSDL. Emulzije su pripremane pri broju obrtaja homogenizera od 20.000 o/min na temperaturi od 40 °C. Vreme homogenizovanja je iznosilo 10 min, ali tako da je disperzna faza dodavana postepeno u toku prvih 5 min.

Za pripremu emulzija sa aktivnim materijama, kao disperzna faza korišćen je 25% (m/m) rastvor vitamina C u destilovanoj vodi, a kao uljna faza 1,6% (m/m) rastvor vitamina E u uljnom rastvoru lipofilnih emulgatora.

Osnovne, 30% duple emulzije, pripremane su emulgovanjem primarne V/U emulzije (30 g) u 1,7142% (m/m) rastvoru želatina (70 g) homogenizacijom pomoću *UltraTurrax* T25, pri broju obrtaja od 5.000 o/min, na temperaturi od 30 °C u trajanju od 5 min. Nakon toga, konačna 20% V/U/V emulzija dobijena je postepenim dodavanjem rastvora NaKN odgovarajuće koncentracije uz mešanje na magnetnoj mešalici, na 40 °C u toku 20 min. Ovako dobijena dupla V/U/V emulzija predstavlja 20% emulziju primarne V/U emulzije u smeši 1% (m/m) želatina i različitih koncentracija NaKN i to: 0,01; 0,1; 0,5; 1 i 3% (m/m).

### 3. 3. 9. Praćenje sedimentacione nestabilnosti emulzija

Za praćenje nestabilnosti primarnih i duplih emulzija one su, odmah nakon pripreme, prebačene u graduisane cilindre od 10 ml i ostavljene na sobnoj temperaturi u periodu od 14 dana. Za to vreme praćena je visina izdvojene kontinualne faze, seruma, ( $H_S$ ) (kod primarnih emulzija na vrhu cilindra, a kod duplih emulzija na dnu cilindra) u odnosu na ukupnu visinu stuba emulzije ( $H_E$ ), i na osnovu njihovih vrednosti izračunavani indeks sedimentacije kod primarnih emulzija, odnosno *creaming* indeks kod duplih emulzija ( $H$ ):

$$H = \frac{H_S}{H_E}$$

Veće vrednosti indeksa sedimentacije, odnosno *creaming* indeksa, ukazuju na lošiju stabilnost emulzija.

### 3. 3. 10. Određivanje veličine i raspodele veličina kapi emulzija

Veličina i raspodela veličina kapi primarnih V/U emulzija određivana je pomoću *Zetasizer* Nano ZS. Pre merenja uzorci su razblaženi 80 puta, a merenja su izvođena u polistirenskim *disposable sizing* kivetama za jednokratnu upotrebu.

Veličina i raspodela veličina kapi duplih emulzija određivana je mikroskopskom metodom. Primenom *Qwin* softvera obrađene su mikrografije snimljene pomoću mikroskopa i fotoaparata sa optičkim nastavkom za okular mikroskopa. Za svaki uzorak izmeren je prečnik 800–1000 kapi i izražen kao srednji zapreminsko–površinski (*Sauter-ov*) prečnik–  $d_{vs}$  ( $\mu\text{m}$ ):

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

gde su  $d$ –srednji prečnika kapi, a  $n$ –broj kapi.

Takođe, izračunata je i površinska učestalost veličine čestica:

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

Krive površinske raspodele dobijene su fitovanjem eksperimentalnih podataka Gama funkcijom raspodele:

$$Y_p = G \cdot d^m \cdot e^{(-a \cdot d)}$$

gde su G, m i a koeficijenti raspodele.

### 3. 3. 11. Dobijanje mikrokapsula

Da bi se postiglo postepeno otpuštanje aktivnih materija iz mikrokapsula, omotač mikrokapsula, odnosno kompleks dva proteina na granici faza, je umrežen dodatkom genipina. Radi efikasnijeg umrežavanja i razdvajanja pojedinačnih kapi emulzija koje su aglomerirale, odmah nakon pripreme emulzija dodata je suspenzija aerosila (2% (m/m)), a zatim umreživač. Koncentracije umreživača u emulziji bile su 0,2; 0,5; 1 i 2 mmol/g proteina. Umrežavanje je trajalo 1 h uz mešanje na magnetnoj mešalici i postepeno hlađenje, a zatim još 24 h na sobnoj temperaturi bez mešanja.

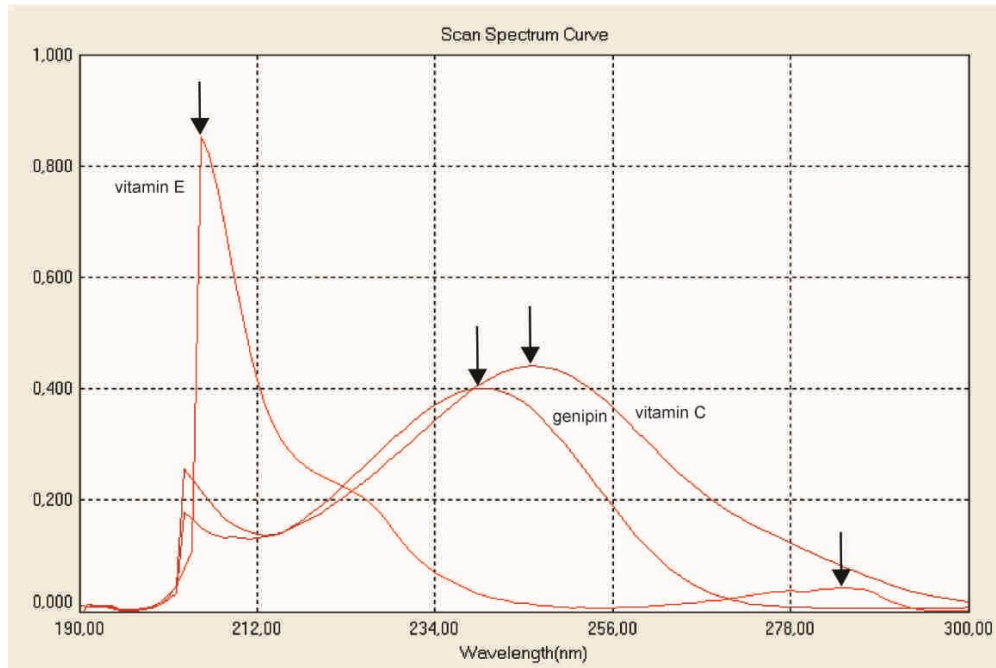
Mikrokapsule sa umreženim omotačem su izdvojene iz suspenzije sušenjem u struji toplog vazduha pomoću *Spray dryer-a*. Temperatura suspenzije mikrokapsula na ulazu u *Spray dryer* bila je 165 °C, a na izlazu 100 °C.

### 3. 3. 12. Ispitivanje morfologije površine mikrokapsula

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

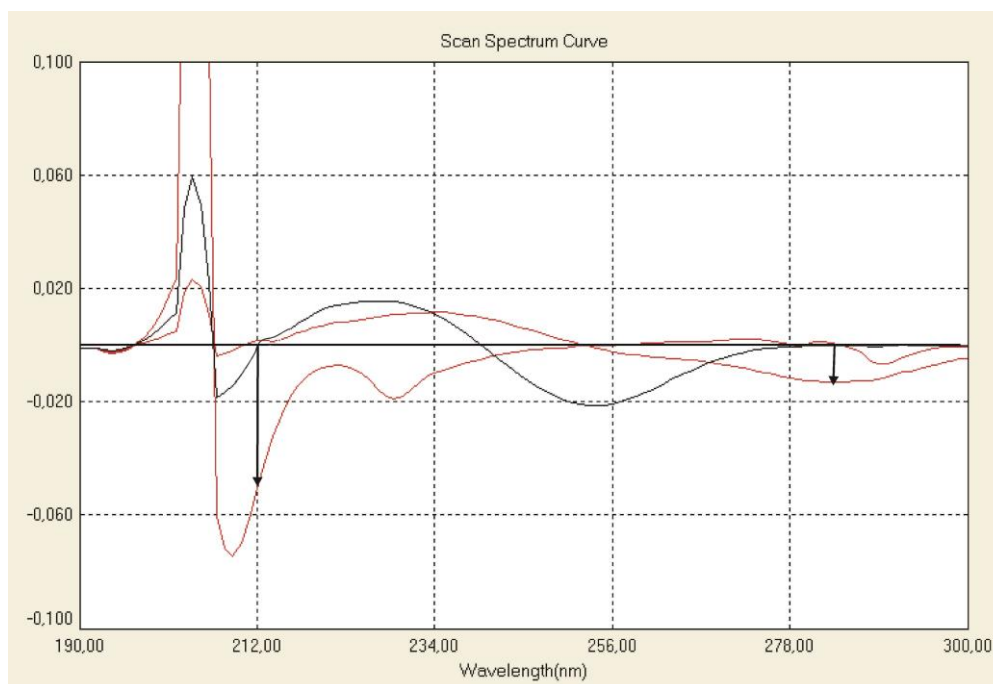
### 3. 3. 13. Ispitivanje efikasnosti mikrokapsulacije vitamina C i E

Ukupna količina vitamina E inkorporirana unutar mikrokapsula određivana je nakon ekstrakcije etanolom uz intenzivno mešanje na *Vortex-u*. Masa mikrokapsula od 0,1 g preneti je u epruvetu i dodato je 10 ml etanola nakon čega je sadržaj intenzivno mešan u toku 5 min. Koncentracija vitamina u rastvaraču određivana je nakon filtriranja uzorka (filter Sartorius, veličina pora 0,1µm) spektrofotometrijski pomoću UV/VIS spektrofotometra T80. Pošto se u etanolu rastvaraju i vitamin C i genipin snimljeni su spektri svih komponenata i prikazani su na slici 19.

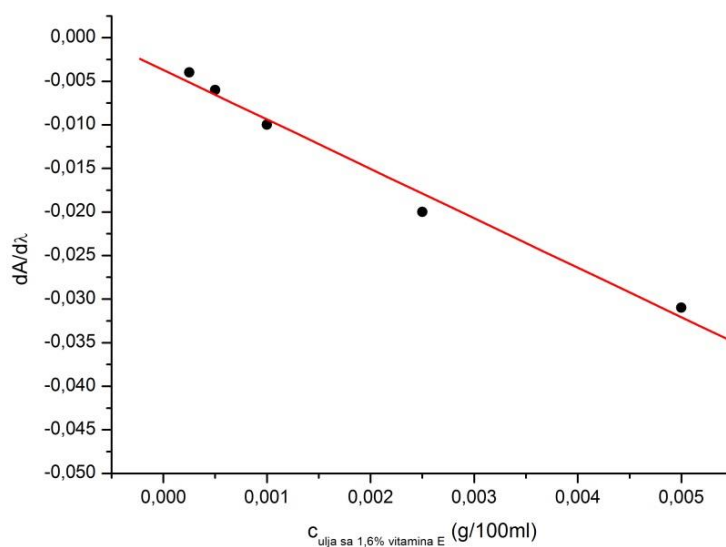


Slika 19. Spektri 0,001% (m/v) rastvora vitamina C; 0,01% (m/v) rastvora vitamina E u ulju i 0,001% (m/v) rastvora genipina u etanolu

Kao što se vidi sa slike 19 oba vitamina, kao i genipin, imaju maksimume apsorbance u UV oblasti i to na bliskim talasnim dužinama (vitamin C na 246 nm, vitamin E na 284 nm i 206 nm, a genipin na 238 nm), tako da se radi određivanja njihovog sadržaja mora primeniti metoda derivativne spektrofotometrije (Surmeian, 1998; Abramović i sar., 2007). Princip metode zasniva se na izračunavanju prvog izvoda spektara ( $dA/d\lambda$ ) komponenata koje se određuju nakon čega se jedna komponenta određuje na talasnoj dužini gde ostale komponente imaju vrednost prvog izvoda apsorbance jednak nuli. Prvi izvodi spektara vitamina C i E i genipina prikazani su na slici 20. Na osnovu dijagrama sa slike 20 odabrana je talasna dužina  $\lambda = 212$  nm na kojoj se reproduktivno može odrediti vitamin E prisutan u uzorcima mikrokapsula. Kalibraciona prava vitamina E na odabranoj talasnoj dužini prikazana je na slici 21.



Slika 20. Prvi izvodi izvodi spektara 0,001% (m/v) rastvora vitamina C; 0,01% (m/v) rastvora vitamina E i 0,001% (m/v) rastvora genipina u etanolu



Slika 21. Kalibraciona prava vitamina E u etanolu na 212 nm

Efikasnost mikrokapsulacije, odnosno ukupna količina inkapsuliranog vitamina C, određivana je kao njegov maksimalan sadržaj u akceptorskom medijumu (0,1 M HCl) prilikom praćenja kinetike otpuštanja.

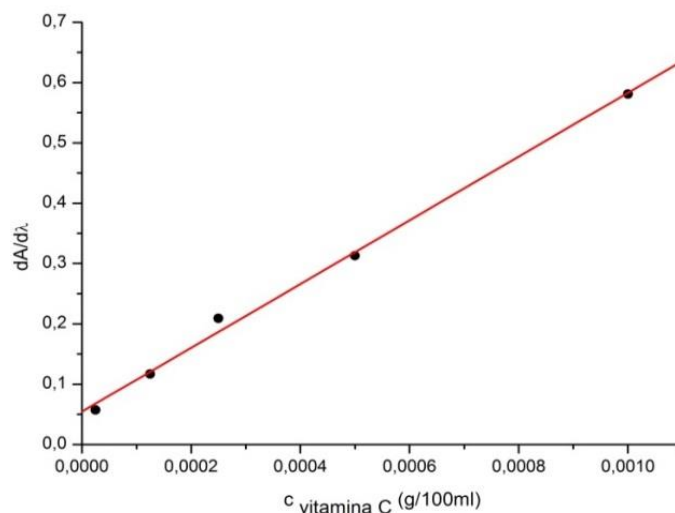
Efikasnost mikrokapsulacije vitamina C ili E ( $E$ ) računata je prema izrazu:

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

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

### 3. 3. 14. *In vitro* ispitivanje oslobađanja vitamina C iz mikrokapsula

Za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja vitamina C iz mikrokapsula korišćen je uređaj za ispitivanje brzine rastvaranja sa rotirajućom lopaticom (*dissolution tester*) DT 70 na temperaturi od 37 °C i pri brzini rotiranja lopatica od 50 o/min. Za simulaciju uslova u gastro-intestinalnom traktu koriste se dve vrste medijuma: fosfatni pufer (pH 7,4), koji odgovara uslovima u tankom crevu, i 0,1 M HCl (pH 1,8), koji odgovara uslovima u želucu. S obzirom da se stabilnost vitamina C značajno smanjuje sa povećanjem pH vrednosti, za naša ispitivanja kao akceptorski medijum korišćena je 0,1 M HCl. U odgovarajući posudu sipano je 500 ml medijuma i nakon temperiranja dodato je 1 g mikrokapsula. U određenim vremenskim intervalima (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150 i 180 min) uzorkovano je po 3 ml medijuma u kome je koncentracija oslobođenog vitamina C određivana spektrofotometrijski. Zapremina uzetog uzorka je svaki put nadoknađena istom zapreminom svežeg medijuma zagrejanog na 37 °C. Koncentracija vitamina C u uzorcima određivana je na spektrofotometru Evolution 300 UV/VIS nakon filtriranja. S obzirom da se u ovom medijumu rastvara i genipin, kao i da se njegov spektralni preklapa sa spektrom vitamina C, i ovde je primenjena metoda derivativne spektrofotometrije. Koncentracija vitamina C određivana je na talasnoj dužini 213,5 nm na kojoj prvi izvod spektra genipina ima nultu vrednost. Na slici 22 prikazan je kalibracioni dijagram za vitamin C.



Slika 22. Kalibraciona prava vitamina C u 0,1 M HCl na 213,5 nm

### 3. 3. 15. Kinetika oslobađanja vitamina C iz mikrokapsula

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

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

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

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

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

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



## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

Da bi se ostvario postavljeni cilj disertacije, eksperimentalni deo rada podeljen je u nekoliko faza.

U prvoj fazi istraživanja ispitane su interakcije u sistemu dva suprotno naelektrisana proteina, želatina i natrijum kazeinata (NaKN), primenom različitih tehnika: turbidimetrije, tenziometrije, viskozimetrije i reologije. Određen je maseni odnos želatina i NaKN pri kom dolazi do kompleksne koacervacije i izdvajanja koacervata iz rastvora.

Prvi korak ka formulaciji stabilne duple, V/U/V emulzije je dobijanje stabilne primarne V/U emulzije. Iz ovih razloga ispitan je uticaj koncentracije lipofilnih emulgatora i njihovih smeša različitog sastava, na međupovršinski napon na granici faza ulje/voda, a zatim i na stabilnost i veličinu i raspodelu veličina kapi emulzija. S obzirom da će se kao aktivne supstance u ovom radu koristiti vitamini C i E, ispitan je i uticaj prisustva ovih vitamina u vodenoj, odnosno uljnoj fazi emulzija, na njihove osobine. Na osnovu rezultata ovih ispitivanja, odabrane su optimalne koncentracije emulgatora za pripremu primarnih emulzija zadovoljavajućih karakteristika, koje će se u daljem radu koristiti za dobijanje duplih V/U/V emulzija.

U sledećoj fazi rada ispitana je mogućnost dobijanja stabilnih duplih V/U/V emulzija, emulgovanjem odabranih V/U emulzija u smeši želatin/NaKN. Koncentracije NaKN odabrane su na osnovu rezultata prve faze istraživanja, sa ciljem ispitivanja uticaja mehanizma interakcije između proteina na osobine emulzija.

Završna faza ove disertacije obuhvatila je optimizaciju uslova za dobijanje mikrokapsula, umrežavanjem kompleksa proteina na spoljašnjoj granici faza ulje/voda, kao i načina za izdvajanje mikrokapsula iz rastvora. Izvršena je karakterizacija dobijenih mikrokapsula ispitivanjem morfologije njihove površine, određivanjem efikasnosti inkapsulacije i kinetike otpuštanja aktivnih materija iz mikrokapsula.

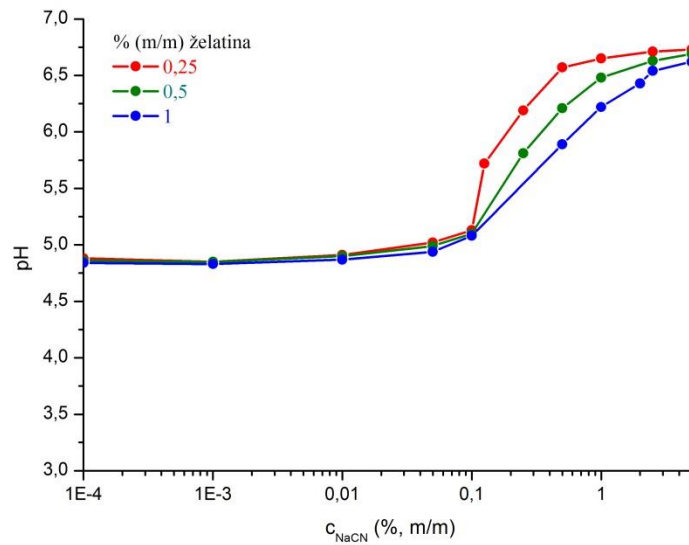
## 4. 1. Ispitivanje interakcija između želatina i NaKN

Želatin i NaKN su amfoterni makromolekuli, čije ukupno naelektrisanje molekula zavisi od pH vrednosti rastvora. Naime, pri pH vrednostima nižim od IET proteini imaju višak pozitivnog naelektrisanja, usled suzbijene disocijacije karboksilne grupe i jonizacije amino grupe, dok pri pH vrednostima iznad IET imaju višak negativnog naelektrisanja, kao posledicu jonizacije karboksilne grupe (Belitz i sar., 2009). Vodeni rastvor želatina ima pH vrednost od 4,7, i s obzirom da je njegova IET na pH vrednosti od 7,43, jasno je da u ovim uslovima molekuli želatina imaju višak pozitivnog naelektrisanja. S druge strane, pH vrednost vodenog rastvora NaKN je 6,9, a njegova IET je na pH 4,6, što ukazuje da rastvaranjem u vodi dolazi do disocijacije karboksilne grupe na natrijumove jone i negativno naelektrisane molekule proteina. Interval pH vrednosti u kojoj su dva proteina suprotno naelektrisana je između njihovih IET, odnosno, za sistem želatin/NaKN to je između 4,6 i 7,43.

Različito ukupno naelektrisanje molekula želatina i NaKN u vodenim rastvorima daje mogućnost za pojavu različitih tipova interakcija u njihovim smešama. Burgess i Carless (1984) su, ispitujući interakcije u smeši dva suprotno naelektrisana proteina (želatin A i želatin B), zaključili da u oblasti pH vrednosti između njihovih IET dolazi do pojave kompleksne koacervacije i izdvajanja kompleksa proteina iz rastvora. S toga su, da bi se detaljno ispitala interakcije u smeši želatina i NaKN, primenjene različite metode, osetljive na promene kako unutar rastvora, tako i na granci faza.

### 4. 1. 1. Turbidimetrijsko ispitivanje interakcija u smeši želatin/NaKN

U cilju ispitivanja interakcija između želatina i NaKN pripremljene su smeše ovih proteina različitih koncentracija. Da bi se ispitaio uticaj koncentracije želatina pripremljene su tri serije rastvora u kojima su koncentracije želatina bile konstantne i to: 0,25; 0,5 i 1% (m/m), dok su koncentracije NaKN u svim serijama varirane od 0 do 5% (m/m). S obzirom da na naelektrisanje polielektrolita, a samim tim i na njihove interakcije u rastvoru značajno utiče pH vrednost sredine, pripremljenim smešama proteina najpre su izmerene pH vrednosti na 40 °C, prikazane na slici 23.

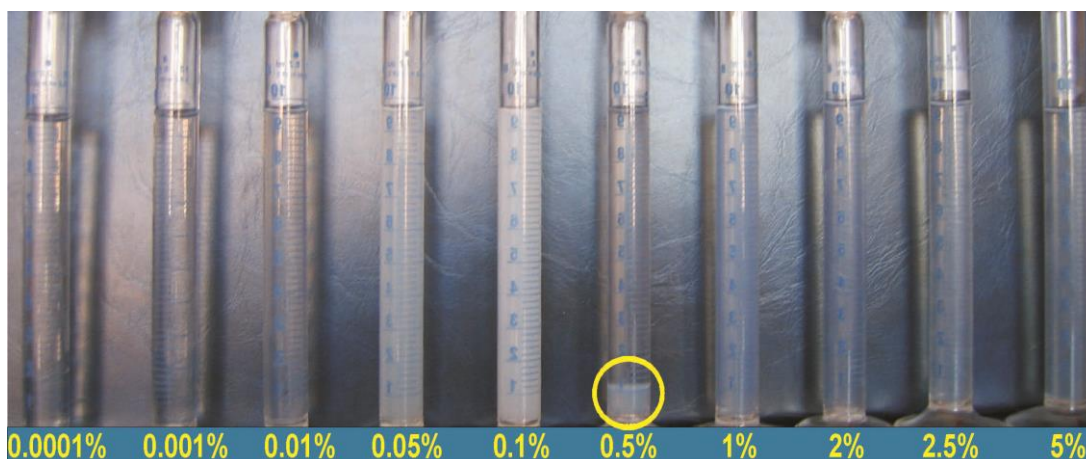


Slika 23. Promena pH vrednosti smeša želatin/NaKN sa koncentracijom NaKN na 40 °C

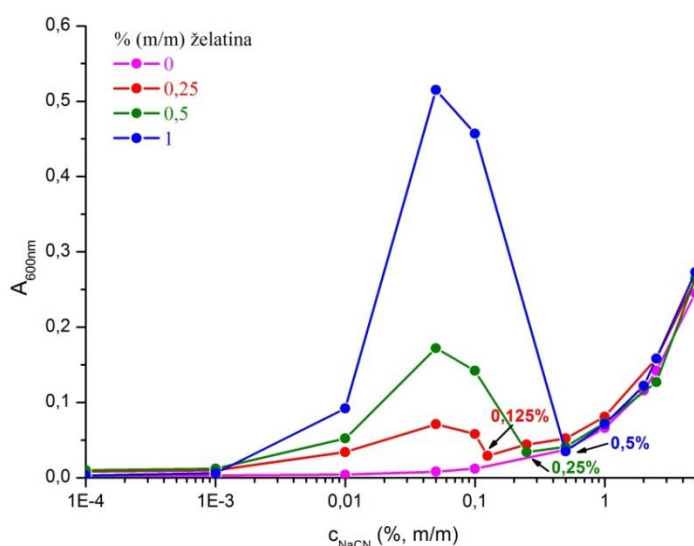
Sa slike 23 se jasno vidi da pH vrednost smeša proteina ne zavisi od koncentracije želatina. Porast koncentracije NaKN do 0,1% (m/m) praktično ne utiče na pH vrednost rastvora. Međutim, daljim povećanjem koncentracije NaKN značajno se povećava pH vrednost smeša, ali ona i dalje ostaje u intervalu između IET želatina i NaKN, odnosno molekuli ova dva proteina nose suprotno naelektrisanje. Povećanje pH vrednosti se može pripisati povećanoj koncentraciji negativno naelektrisanih molekula NaKN u rastvoru.

Uočeno je da mešanjem rastvora želatina i NaKN dolazi do vizuelnih promena (pojave mutnoće) njihovih smeša, koje su bile naročito izražene u seriji rastvora sa 1% (m/m) želatina (slika 24).

Radi kvantifikacije ovih promena izmerena je apsorbancia ispitivanih serija smeša želatin/NaKN na  $\lambda=600$  nm, a rezultati ovih merenja prikazani su na slici 25.



Slika 24. Smeše 1% (m/m) želatina i različitih koncentracija NaKN



Slika 25. Promena apsorbance rastvora NaKN i smeša želatin/NaKN sa koncentracijom NaKN

Vodeni rastvori NaKN nižih koncentracija bili su blago zamućeni, dok se značajnije povećanje mutnoće rastvora uočavalo pri koncentracijama većim od 0,1% (m/m). Vodeni rastvori želatina svih ispitivanih koncentracija bili su potpuno transparentni. Dodatak NaKN u rastvore želatina u koncentracijama nižim od 0,01% (m/m) nije imao uticaj na mutnoću rastvora, međutim, dalje povećanje koncentracije NaKN u smešama dovodi da značajnog porasta mutnoće. Svaka značajnija varijacija apsorbance može da ukazuje na pojavu agregata ili koacervata u sistemu, koji utiču na optičke osobine rastvora, odnosno kod ovakvih sistema ukazuje na formiranje rastvornih kompleksa (Schmitt i sar., 1999; Ducei i sar., 2004; Harnsilawat i sar., 2006b). Maksimum mutnoće je izmeren pri koncentraciji NaKN od 0,05% (m/m), nakon čega dolazi do njenog opadanja, što može biti posledica početka separacije faza u sistemima.

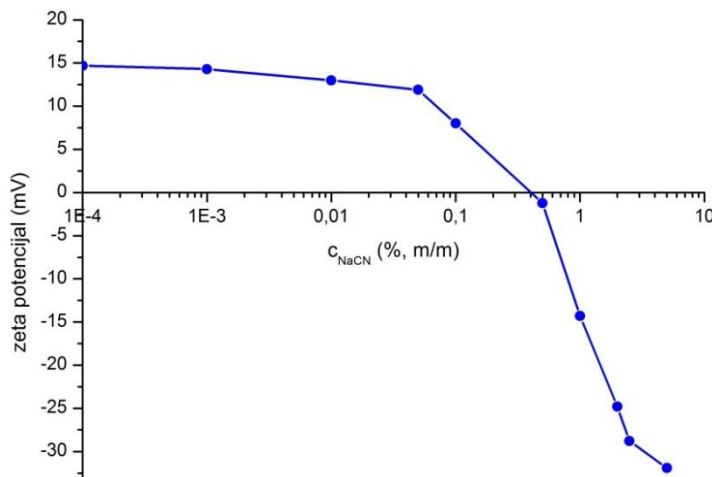
Pri koncentracijama NaKN od 0,125; 0,25 i 0,5% (m/m) u smešama sa koncentracijama želatina od 0,25; 0,5 i 1% (m/m), redom, dolazi do formiranja nerastvornih kompleksa i njihovog izdvajanja iz rastvora kao posebne faze (slika 24). Ove koncentracije odgovaraju masenom odnosu želatina i NaKN u smeši od 2:1. Formirana koacervatna faza je veoma kompaktna i lepljiva, a ravnotežna faza iznad nje (supernatant) pokazuje minimum mutnoće (označeno strelicama na slici 25).

Formiranje nerastvornih kompleksa se javlja kao posledica kompleksne koacervacije. Za sisteme protein-polisaharid formiranje kompleksa je do sada detaljno ispitivano i predložen je mehanizam koji objašnjava njihovo formiranje kroz nekoliko faza: 1) formiranje rastvornog „primarnog“ protein-polisaharid kompleksa, uglavnom elektrostatičkim privlačenjem između suprotno naelektrisanih grupa na njihovim molekulima; 2) iniciranje agregacije „primarnih“ kompleksa; 3) formiranje nenaelektrisanih, nerastvornih kompleksa daljom agregacijom, nakon koje sledi i makroskopska separacija faza na fazu obogaćenu kompleksima i ravnotežnu fazu, odnosno rastvarač (Weinbreck i sar., 2003; Cooper i sar., 2005; Schmitt i Turgeon, 2011). Ovaj mehanizam se može primeniti i na sistem dva proteina, koji takođe predstavlja sistem dva polielektrolita suprotnog naelektrisanja u intervalu pH vrednosti između njihovih IET. Neutralizacija pozitivno naelektrisanih grupa na molekulu želatina elektrostatičkim vezivanjem za negativno naelektrisane grupe na molekulu NaKN dovodi do smanjenja rastvorljivosti kompleksa i izdvajanja iz rastvora (Jourdain i sar., 2008; Ghorbani Gorji i sar., 2012).

Pri koncentracijama NaKN u smešama većim od 0,125; 0,25 i 0,5% (m/m) ne uočava se separacija faza, ali dolazi do povećanja mutnoće, koja odgovara mutnoći čistih rastvora NaKN odgovarajućih koncentracija. Ovo ukazuje na postepeno rastvaranje formiranih kompleksa proteina, koje može biti posledica nagomilavanja negativnog naelektrisanja pri većim koncentracijama NaKN, i njihovog elektrostatičkog odbijanja (Harnsilawat i sar., 2006b).

#### 4. 1. 2. Određivanje zeta potencijala smeša želatin/NaKN

Formiranje rastvornih i nerastvornih kompleksa između polielektrolita je najčešće posledica elektrostatičkih interakcija između naelektrisanih grupa njihovih molekula (Yang i sar., 2012). Da bi odredili naelektrisanje formiranih kompleksa proteina, izmeren je zeta potencijal u smešama 1% (m/m) želatina i različitih koncentracija NaKN, a rezultati su prikazani na slici 26.

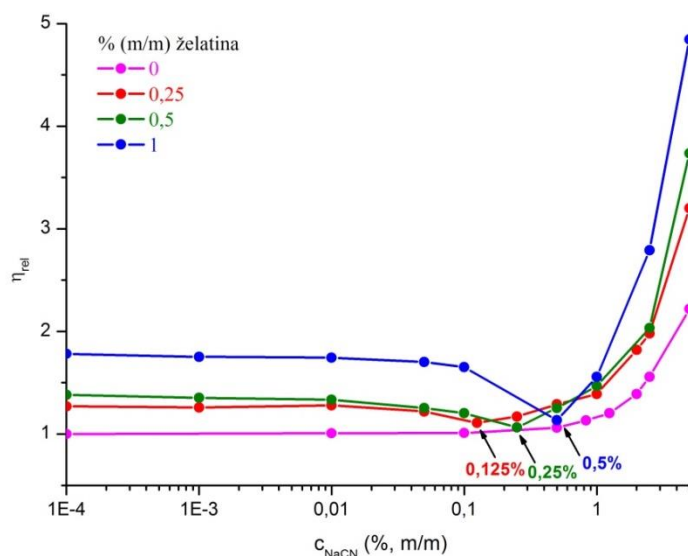


Slika 26. Promena zeta potencijala smeša želatin/NaKN sa koncentracijom NaKN

Kao što je već naglašeno, vodeni rastvor želatina ima pH vrednost 4,7, što je ispod njegove IET, i njegovi molekuli nose pozitivno naelektrisanje. Merenjem zeta potencijala utvrđeno je da vodeni rastvor čistog želatina ima vrednost zeta potencijala od 15,2 mV. Dodatak suprotno naelektrisanih molekula NaKN u rastvor želatina dovodi do postepenog smanjenja vrednosti pozitivnog zeta potencijala. Smanjenje ukupnog pozitivnog naelektrisanja čestica u smeši je posledica elektrostatičkih interakcija između suprotno naelektrisanih grupa na molekulima želatina i NaKN. Važno je napomenuti, da izmerena vrednost zeta potencijala smeša polimera predstavlja prosečnu vrednost naelektrisanja različitih vrsta molekula prisutnih u rastvoru, i slobodnih i vezanih (Mattison i sar., 1995). U konkretnom sistemu, u oblasti gde dolazi do postepenog smanjenje zeta potencijala, prisutne su relativno velike čestice nerastvornih kompleksa, te se može očekivati da oni rasipaju svetlost mnogo jače od eventualno prisutnih pojedinačnih molekula obe proteinske vrste (Harnsilawat i sar., 2006b). Iz ovih razloga možemo tvrditi da izmerene vrednosti zeta potencijala u ovoj oblasti potiču uglavnom od nastalih kompleksa želatin/NaKN. Pri koncentraciji NaKN od 0,5% (m/m) nerastvorni kompleksi su slabo negativno naelektrisani (-1,23 mV). S obzirom da kompleksi pokazuje veliku tendenciju ka precipitaciji, može se pretpostaviti da u toku samog merenja počinje njihovo izdvajanje iz rastvora. Slabo negativno naelektrisanje potiče od viška negativno naelektrisanih molekula NaKN eventualno prisutnih u supernatantu. Dalje povećanje koncentracije NaKN dovodi do porasta negativnog naelektrisanja formiranih kompleksa i, usled toga, do njihovog postepenog rastvaranja. Porast mutnoće smeša želatin/NaKN javlja se kao posledica upravo ovog fenomena.

### 4. 1. 3. Viskozimetrijsko i tenziometrijsko ispitivanje interakcije u smeši želatin/NaKN

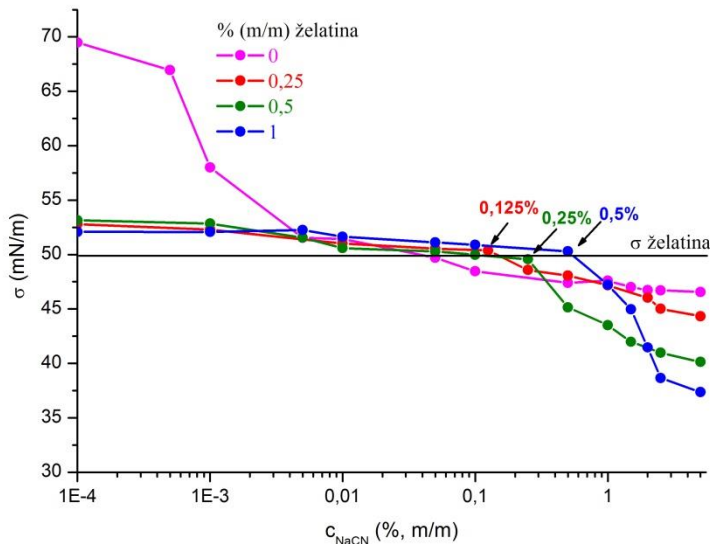
S obzirom da viskozimetrijske i tenziometrijske metode daju značajne podatke o osobinama sistema kako u rastvoru, tako i na granici faza, upravo ove tehnike su primenjene za detaljnije ispitivanje interakcija u smešama želatin/NaKN. Relativni viskoziteti čistih rastvora NaKN kao i smeša 0,25; 0,5 i 1% (m/m) želatina i različitih koncentracija NaKN prikazani su na slici 27.



Slika 27. Promena relativnog viskoziteta rastvora NaKN i smeša želatin/NaKN sa koncentracijom NaKN na 40 °C

Određeni su relativni viskoziteti čistih rastvora želatina koncentracija 0,25; 0,5 i 1% (m/m) na 40 °C koji su iznosili 1,18; 1,32 i 1,69, redom. Dodatak NaKN u rastvore želatina dovodi do povećanja relativnog viskoziteta, usled postepenog elektrostatičkog vezivanja negativno naelektrisanih molekula NaKN za pozitivne grupe molekula želatina i promene njegove konformacije, odnosno razmotavanja lanaca proteina. Pri koncentracijama NaKN od 0,125; 0,25 i 0,5% (m/m) u smešama sa 0,25; 0,5 i 1% (m/m) želatina, redom, pri kojima dolazi do separacije faza i izdvajanja koacervata, meren je viskozitet supernatanta koji je pokazivao minimalne vrednosti (označeno strelicama na slici 27). Dalje povećanje koncentracije NaKN, iznad masenog odnosa želatin:NaKN od 2:1, dovodi do značajnog povećanja viskoziteta ispitivanih smeša što ukazuje na povećanje rastvorljivosti formiranih kompleksa proteina. Jasno je, da prikazane promene viskoziteta u potpunosti koreliraju sa rezultatima merenja mutnoće i zeta potencijala rastvora smeša želatin/NaKN.

Poznato je da proteini poseduju određenu površinsku aktivnost, te je iz tih razloga za ispitivanje interakcija u sistemu želatin/NaKN primenjena i tenziometrijska metoda, odnosno ispitan je uticaj interakcija na njihovo ponašanje na granici faza. Rezultati merenja površinskog napona rastvora NaKN, kao i njegovih smeša sa želatinom prikazani su na slici 28.



Slika 28. Promena površinskog napona rastvora NaKN i smeša želatin/NaKN sa koncentracijom NaKN na 40 °C

Površinski napon čistog rastvora želatina ispitivanih koncentracija iznosio je oko 50 mN/m. Površinska aktivnost molekula želatina potiče od prisustva hidrofobnih amino kiselina u strukturi proteina (Onesippe i Lagerge, 2009). S druge strane, molekuli NaKN su izrazito fleksibilni i pokazuju tendenciju ka razmotavanju i adsorpciji na granici faza voda/vazduh ili ulje/voda, pri čemu se formira monomolekulski film proteina (Hasenhuettl i Hartel, 2008). Sa slike 28 se jasno vidi da površinski napon rastvora NaKN opada sa porastom njegove koncentracije u rastvoru, što ukazuje na postepenu adsorpciju molekula na graničnu površinu. Ovo sniženja površinskog napona je značajno do dostizanja koncentracije NaKN u rastvoru od 0,5% (m/m), dok daljim povećanjem koncentracije površinski napon ostaje skoro nepromenjen. Pri ovoj koncentraciji granična površina je zasićena molekulima NaKN i dalje povećanje njegove koncentracije u rastvoru ne dovodi do promena u adsorbovanom sloju.

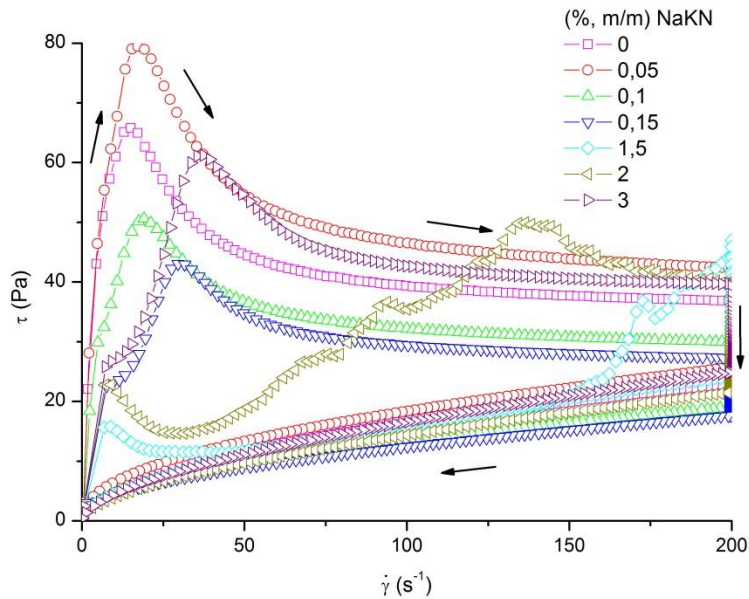
Promene površinskog napona smeša želatin/NaKN sa koncentracijom NaKN pokazuju karakteristične prelomne tačke označene strelicama na slici 28. Ove prelomne tačke javljaju se pri masenom odnosu želatin:NaKN od 2:1, odnosno pri koncentracijama NaKN od 0,125; 0,25 i 0,5% (m/m) u smešama sa 0,25; 0,5 i 1% (m/m) želatina, redom. Pri nižim koncentracijama NaKN od



naznačenih, površinski napon smeša ima nešto veće vrednosti od površinskog napona čistih rastvora želatina i ne menja se sa porastom koncentracije NaKN, ukazujući da su u ovom intervalu koncentracija na graničnoj površini uglavnom prisutni molekuli želatina. Dodatak NaKN i njegovo vezivanje za molekule želatina uslovljava konformacijske promene molekula želatina adsorbovanog na granici faza, usled čega dolazi do blagog povećanja površinskog napona. Površinski napon ostaje konstantan do dostizanja koncentracija NaKN pri kojima dolazi do formiranja nerastvornih kompleksa, odnosno do dostizanja masenog odnosa želatin:NaKN od 2:1. Nakon toga, u sve tri ispitivane serije smeša, dolazi do značajnog opadanja površinskog napona, i to ispod vrednosti površinskih napona čistih rastvora oba proteina. Ovaj sinergistički efekat molekula želatina i NaKN na površinski napon pri masenom odnosu želatin:NaKN većem od 2:1 je rezultat površinske aktivnosti rastvornih, negativno naelektrisanih kompleksa prisutnih u rasvoru (Sovilj i sar., 2013).

#### 4. 1. 4. Reološke karakteristike smeša želatin/NaKN

S obzirom da je pokazano da interakcije u smešama želatin/NaKN dovode do formiranja kompleksa proteina koji utiču na međufazno i viskozno ponašanje sistema, bilo je interesantno ispitati uticaj interakcija na reološke karakteristike smeša. U ovom setu eksperimenata koncentracija želatina je bila 1% (m/m), dok su koncentracije NaKN odabrane tako da obuhvate oblast pre formiranja nerastvornog koacervata (0,05; 0,1 i 0,15% (m/m)), i oblast nakon njegovog postepenog rastvaranja (1,5; 2 i 3% (m/m)). Merenja su izvođena na temperaturi od 20 °C, jer su uzorci želatina ispitivane koncentracije na toj temperaturi u obliku gela. Krive proticanja ispitivanih smeša prikazane su na slici 29.

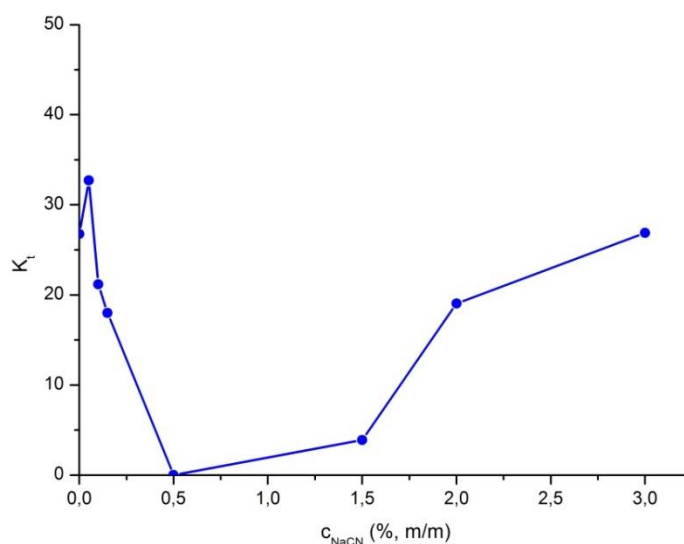


Slika 29. Krive proticanja smeša 1% (m/m) želatina sa različitim koncentracijama NaKN na 20°C

Krive proticanja čistog rastvora želatina, kao i smeša želatin/NaKN, pri koncentracijama NaKN pre formiranja nerastvornog koacervata, pokazuju tiksotropno ponašanja sa razrušavanjem gel strukture na uzlaznim krivama pri određenim brzinama smicanja, što je karakteristično za gele želatina i skroba (Djaković i sar., 1990; Sovilj i Dokić, 1996). Brzine smicanja, pri kojima dolazi do razrušavanja strukture, se blago pomeraju ka većim vrednostima sa povećanjem koncentracije NaKN, ukazujući na čvršću gel strukturu koja nastaje kao rezultat interakcija između želatina i NaKN. Povratne krive, dobijene nakon smicanja na maksimalnoj brzini smicanja ( $D=200 \text{ s}^{-1}$ ) do konstantne vrednosti napona smicanja, opisuju neki vid ravnotežnog stanja, a po obliku odgovaraju plastičnom ili pseudoplastičnom proticanju. Reološke karakteristike koacervata, formiranog pri koncentraciji NaKN od 0,5% (m/m), nisu mogle biti određene zbog njegove izuzetno kompaktne i lepljive strukture. S druge strane, kriva proticanja supernatanta iznad koacervata pokazuje klasično njutnovsko ponašanje sa vrednošću viskoziteta od  $\eta=1,5 \text{ mPas}$ , što je nešto veće od vrednosti za vodu, i potvrđuje činjenicu da ova faza predstavlja čist rastvarač sa zanemarljivo malom količinom proteina. Smeše želatin/NaKN sa koncentracijama NaKN od 1,5 i 2% (m/m) pokazuju značajno odstupanje od ponašanja klasičnih gela želatina, ukazujući na postojanje slabe gel strukture koja se lako razrušava smicanjem. Međutim, povećanjem koncentracije NaKN na 3% (m/m) ponovo se javlja tiksotropna petlja karakteristična za gele želatina i skroba. Kod ove smeše razrušavanje gel strukture na uzlaznoj krivoj javlja se pri većoj brzini smicanja u poređenju sa smešama pre formiranja nerastvornog koacervata, što ukazuje na

jaku gel strukturu koja se ovde uspostavlja. Slične rezultate su dobili i Keogh i sar. (1998) za smeše želatin/NaKN u istom intervalu koncentracija.

Kao što se uočava na slici 29, uzlazna i povratna kriva formiraju tiksotropnu petlju, a kao mera tiksotropnog ponašanja koristi se koeficijent tiksotropije,  $K_t$ , čije su vrednosti u zavisnosti od koncentracije NaKN, prikazane na slici 30.

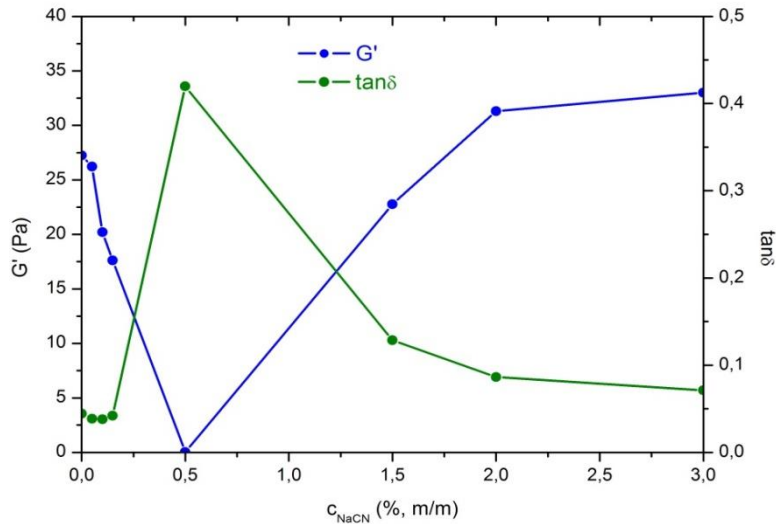


Slika 30. Promena koeficijenta tiksotropije ( $K_t$ ) smeša 1% (m/m) želatina sa različitim koncentracijama NaKN na 20 °C

Na slici 30 se vidi da dodatak NaKN u koncentraciji od 0,05% (m/m) u rastvor želatina dovodi do blagog povećanja  $K_t$ . Ovo je posledica konformacijskih promena (razmotavanja) molekula želatina izazvanih jonskim vezivanjem molekula NaKN, i u skladu je sa viskozimetrijskim merenjima. Dalje povećanje koncentracije NaKN dovodi do smanjenja  $K_t$ , kao rezultat formiranja kompleksa proteina sa smanjenim ukupnim naelektrisanjem, tako da je gelirajuće svojstvo slabije izraženo. Pri koncentraciji NaKN od 0,5% (m/m), usled separacija faza, uočava se potpuno odsustvo tiksotropije i  $K_t=0$ . Povećanjem koncentracija NaKN iznad 0,5% (m/m)  $K_t$  se značajno povećava. Ovakvo ponašanje je posledica postepenog rastvaranja koacervata usled viška negativnog naelektrisanja formiranih kompleksa (slika 26), i potpuno u saglasnosti sa viskozimetrijskim ispitivanjima smeša želatin/NaKN (slika 27).

Osim preko krivih proticanja, promene u gel strukturi sistema mogu se pratiti i određivanjem viskoelastičnih osobina. Sa ciljem određivanja parametara viskoelastičnosti smeša želatin/NaKN, izvođena su reološka merenja u oblasti linearne viskoelastičnosti (LVE). Sve ispitivane smeše su imale elastične module veće od viskoznih. Relativni udeo viskozne ( $G''$ ) u odnosu na elastičnu ( $G'$ )

komponentu izražava se preko vrednosti  $\tan\delta$ . Vrednost  $\tan\delta > 1$  ukazuje na dominantne viskozne karakteristike fluida, dok  $\tan\delta < 1$  označava fluide sa dominantnim elastičnim osobinama (Katona i sar., 2008). Promene elastičnog modula ( $G'$ ) i  $\tan\delta$  vrednosti smeša želatin/NaKN sa koncentracijom NaKN prikazane su na slici 31.



Slika 31. Promena elastičnog modula ( $G'$ ) i vrednosti  $\tan\delta$  smeša 1% (m/m) želatina sa različitim koncentracijama NaKN na 20 °C

Sa slike se jasno vidi da povećanjem koncentracije NaKN, u oblasti pre formiranja koacervata, vrednost elastičnog modula ( $G'$ ) opada kao posledica jonskog vezivanja molekula NaKN za molekule želatina i razrušavanja njegove 3D strukture (Katona i sar., 2008). U istoj oblasti koncentracija, ne uočava se značajnija promena vrednosti  $\tan\delta$ , ukazujući na činjenicu da interakcija između proteina dovodi do smanjenja oba modula, i  $G''$  i  $G'$ . Ravnotežna faza iznad nerastvornog koacervata pokazuje minimum (skoro nulu) vrednosti  $G'$ , kao posledicu odsustva proteina u njoj. S druge strane, vrednost  $\tan\delta$  ove faze je maksimalna, ukazujući na dominantno viskozno ponašanje karakteristično za fluide. Dalje povećanje koncentracije NaKN dovodi do značajnog povećanja  $G'$  i smanjenja vrednosti  $\tan\delta$ . Rastvaranje koacervata, usled viška negativnog naelektrisanja, dovodi do ponovnog uspostavljanja gel strukture u sistemu sa značajnim udelom elastične komponente.

## 4. 2. Dobijanje emulzija V/U

Prva faza u formulaciji stabilne duple, V/U/V emulzije je dobijanje stabilne primarne V/U emulzije (Kanouni i sar., 2002). Ulje i voda se ne mešaju usled postojanja međupovršinskog napona na granici faza, koji uglavnom iznosi oko 30–35 mN/m. Dodatkom površinski aktivnih materija u sistem snižava se međupovršinski napon na 1–5 mN/m, i omogućava i dispergovanje jedne faze u drugoj, odnosno formiranje emulzije. Molekuli površinski aktivnih materija se adsorbuju na granici faza snižavajući međupovršinski napon, formirajući sternu i/ili elektrostatičku barijeru između kapi disperzne faze i sprečavajući njihovu koalescenciju. Postoji nekoliko grupa jedinjenja koja pokazuju sposobnost adsorpcije na granicu faza, zahvaljujući specifičnoj građi njihovih molekula, odnosno činjenici da unutar molekula sadrže i polarne i nepolarne grupe koje se orijentišu prema odgovarajućoj fazi. To su: emulgatori, sapuni, površinski aktivni makromolekuli, kao i neke čvrste čestice (Stamkulov i sar., 2009). Stoga, izbor odgovarajuće površinski aktivne materije predstavlja prvi korak ka dobijanju stabilne emulzije, s obzirom da njene karakteristike, kao što su priroda, koncentracija, kao i to da li se primenjuju pojedninačni emulgatori ili u smeši, direktno utiču na osobine emulzija. U zavisnosti od tipa emulzije koji je potrebno dobiti, pri izboru emulgatora polazi se od *Bankroft*-ovog pravila, koje glasi da je kontinualna faza emulzije uvek ona u kojoj je emulgator bolje rastvorljiv. To znači da se za dobijanje emulzija U/V koriste u vodi rastvorni (hidrofilni) emulgatori, a za dobijanje emulzija V/U u ulju rastvorni (lipofilni) emulgatori.

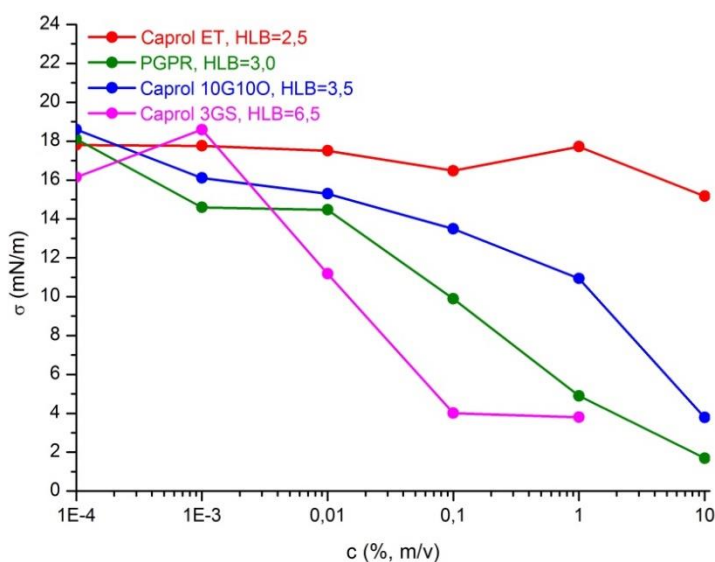
S obzirom da je cilj ove faze rada dobijanje stabilne emulzije V/U, najpre su ispitane adsorpcione osobine nekoliko lipofilnih emulgatora iz grupe poliglicerol estara. Ispitan je uticaj koncentracije Caprol-a 3GS, Caprol-a 10G10O, Caprol-a ET, PGPR-a, i njihovih smeša, na međupovršinski napon na granici faza ulje/voda i na osobine emulzija V/U. Kao uljna faza korišćeni su trigliceridi srednje dužine lanaca (TSDL), zbog njihovog lakog metabolisanja u organizmu. Emulzije su pripremane pomoću rotor-stator homogenizera pri broju obrtaja od 20.000 o/min, homogenizovanjem u toku 10 min na 40 °C.

### 4. 2. 1. Ispitivanje uticaja koncentracije lipofilnih emulgatora na međupovršinski napon na granici faza ulje/voda

Osobine emulgatora zavise od hemijske strukture njegovih molekula, odnosno od udela hidrofilnih i lipofilnih grupa u molekulu. Broj koji izražava odnos hidrofilnog i lipofilnog dela u molekulu naziva se HLB broj, odnosno hidrofilno (H) – lipofilna (L) ravnoteža (*balance*, B). Jasno je da su emulgatori sa većim HLB brojem rastvorljiviji u vodi, a manji HLB broj imaju emulgatori rastvorljivi u nepolarnim rastvaračima. Prema *Bankroft*-ovom pravilu, jasno je

da će emulgatori sa većim HLB brojem (obično od 6 do 17) formirati emulziju tipa U/V, dok će emulgatori sa manjim HLB brojem (manjim od 6) formirati emulziju tipa V/U.

U cilju ispitivanja adsorpcionih osobina lipofilnih emulgatora, Caprol 3GS, Caprol 10G10O, Caprol ET i PGPR, mereni su međupovršinski naponi na granici faza rastvora emulgatora u ulju i vode, na 40 °C. Emulgatori iz grupe Caprol-a, koji imaju različite HLB brojeve, razlikuju se po udelu glicerola i masnih kiselina u molekulu, kao i vrsti masnih kiselina (Caprol ET i Caprol 3GS sadrže sterarinsku, a Caprol 10G10O oleinsku masnu kiselinu). Promena međupovršinskog napona u zavisnosti od koncentracije emulgatora prikazana je na slici 32.



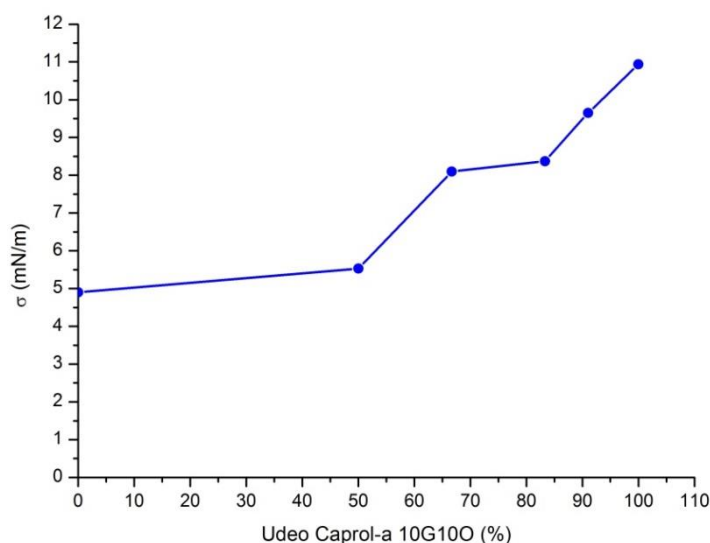
Slika 32. Promena međupovršinskog napona na granici faza ulje/voda sa koncentracijom emulgatora u uljnoj fazi na 40 °C

Sa slike 32 se vidi da sa povećanjem koncentracije emulgatora dolazi do sniženja međupovršinskog napona na granici faza ulje/voda. Poređenjem iznosa sniženja međupovršinskog napona različitih emulgatora, pri istoj koncentraciji u rastvoru, uočava se da emulgatori iz grupe Caprol-a u većoj meri snižavaju međupovršinski napon sa porastom njihovog HLB broja. Porast HLB broja je posledica povećanja udela hidrofilnog dela u molekulu emulgatora, čime raste i njegov afinitet ka granici faza na kojoj se orijentiše tako da su hidrofilni delovi istisnuti u vodenu fazu, što značajno smanjuje međupovršinski napon (Gao i Sharma, 2013). S druge strane, PGPR pokazuje veće sniženje međupovršinskog napona u poređenju sa Caprol-om 10G10O, iako ima nižu HLB vrednost. Ovo je posledica razgranatosti hidrofobnog lanca molekula PGPR-a, što omogućava formiranje kompaktnijeg filma na granici faza (Varadaraj i sar., 1991; Rosen,

2004). Caprol ET nije pokazao značajniji uticaj na sniženje međupovršinskog napona, što je očekivano s obzirom na nisku vrednost HLB broja (2,5) i njegov lipofilni karakter, odnosno izrazito dobru rastvorljivost u uljnoj fazi. Na osnovu ovih rezultata, za dalja ispitivanja odabrani su emulgatori koji su pokazali značajniji uticaj na međupovršinski napon ulje/voda, odnosno Caprol 10G10O, Caprol 3GS i PGPR.

Poznato je da emulgatori u smeši pokazuju različito ponašanje na granici faza ulje/voda u odnosu na čiste emulgatore (Đaković, 1990). U nekim slučajevim smeše emulgatora pokazuju sinergistički efekat na sniženje međupovršinskog napona i stabilnost emulzije. To su, uglavnom, smeše jonskih i nejonskih emulgatora, čiji se molekuli bolje pakuju na granici faza formirajući kompaktnije filmove, a samim tim i povećavajući stabilnost emulzija u odnosu na pojedinačne emulgatore. Međutim, to nije uvek slučaj, odnosno prisustvo različitih molekula emulgatora u sistemu može dovesti do njihovog lošijeg pakovanja na granici faza, što zavisi od osobina i građe molekula oba emulgatora i njihovog uzajamnog dejstva.

Iako je PGPR emulgator koji ima izuzetno široko primenu, naročito u prehrambenoj industriji, sve češće se javljaju tendencije za smanjenje njegove koncentracije u određenim proizvodima. Sa druge strane, poredeći maksimalno dozvoljene dnevne unose za PGPR (oko 7,5 mg/kg telesne težine) i emulgatora iz grupe Caprola (25 mg/kg telesne težine) uočavamo da je dozvoljeni dnevni unos Caprola oko tri puta veći. Iz tih razloga, ispitan je uticaj povećanja udela Caprol-a 3GS i Caprol-a 10G10O u smešama sa PGPR-om na međupovršinski napon, a potom i na osobine emulzija. Međutim, kod smeša PGPR-a i Caprol-a 3GS, kod kojih je udeo Caprol-a 3GS bio veći od 50%, došlo je do formiranja čvrstog filma na granici faza ulje/voda, tako da merenje međupovršinskog napona nije bilo izvodljivo. Iz ovih razloga ispitivanja su obuhvatila samo smeše PGPR-a i Caprol-a 10G10O (slika 33).

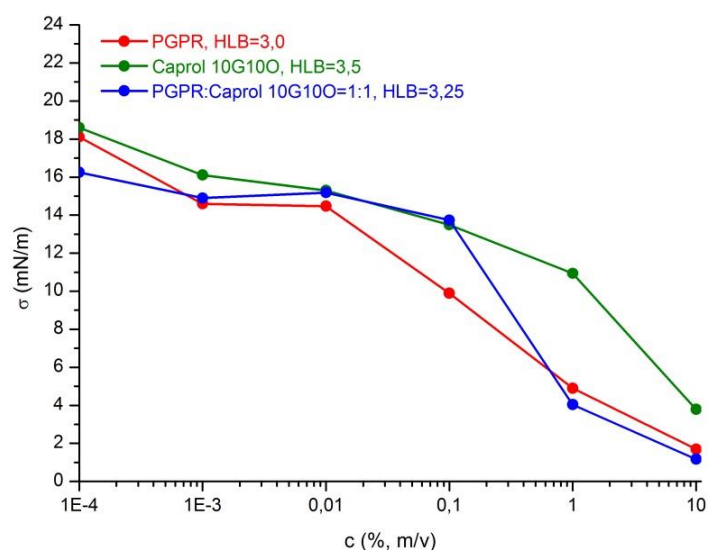


Slika 33. Promena međupovršinskog napona na granici faza ulje/voda sa povećanjem udela Caprol-a 10G100 u smeši sa PGPR-om ukupne koncentracije 1% (m/v) na 40 °C

Kao što se može videti na grafiku, sa povećanjem udela Caprol-a 10G100 u smeši sa PGPR-om dolazi do povećanja vrednosti međupovršinskog napona na granici faza ulje/voda. Iako sa povećanjem udela Caprol-a 10G100 raste i vrednost HLB broja smeše (tabela 4), njegove lošije emulgujuće karakteristike, odnosno lošije pakovanje na granici faza, u odnosu na PGPR dolaze do izražaja. Međutim, zadovoljavajuća vrednost međupovršinskog napona od 5,53 mN/m postignuta je kod binarne smeše emulgatora masenog odnosa 1:1.

Pored masenog odnosa emulgatora u smeši, na međupovršinski napon i stabilnost adsorbovanog sloja utiče i ukupna koncentracija emulgatora. Iz ovih razloga praćena je promena međupovršinskog napona binarne smeše PGPR-a i Caprol-a 10G100, masenog odnosa 1:1, sa koncentracijom u rastvoru. Rezultati ovih merenja prikazani su na slici 34, a radi lakšeg poređenja na istoj slici je prikazana i zavisnost međupovršinskog napona od koncentracije pojedninačnih emulgatora u uljanim rastvorima.





Slika 34. Promena međupovršinskog napona na granici faza ulje/voda u zavisnosti od koncentracije emulgatora u uljnoj fazi u rastvorima emulgatora PGPR i Caprol 10G100 i njihovih binarnih smeša masenog odnosa 1:1, na 40 °C

Sa slike 34 se vidi da, kao i kod pojedinačnih emulgatora, i kod rastvora binarnih smeša emulgatora dolazi do značajnijeg sniženja međupovršinskog napona na granici faza sa povećanjem ukupne koncentracije emulgatora. S druge strane, poredeći rastvore pojedinačnih emulgatora i njihovu smešu uočavamo da smeša PGPR:Caprol 10G100 masenog odnosa 1:1, pri koncentracijama većim od 0,1% (m/v) pokazuje nešto veće sniženje međupovršinskog napona. S obzirom da je HLB vrednost smeše emulgatora (tabela 4) niža u odnosu na HLB broj Caprol-a 10G100, ovaj sinergistički efekat se može pripisati boljem pakovanju molekula na granici faza i formiranju kompaktnijeg filma.

Na osnovu prikazanih rezultata jasno je da minimalna vrednost ukupne koncentracije emulgatora, potrebna za postizanje zadovoljavajućeg sniženja međupovršinskog napona na granici faza ulje/voda, iznosi 1% (m/v).

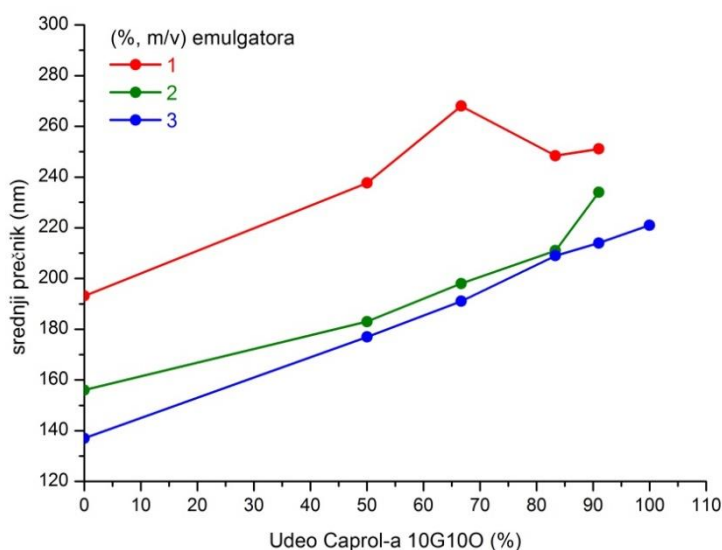
#### 4. 2. 2. Ispitivanje uticaja koncentracije lipofilnih emulgatora na osobine emulzija V/U

Prethodna merenja ukazala su na dobru površinsku aktivnost lipofilnih emulgatora PGPR-a i Caprol-a 10G100, kao i na sinergistički efekat njihovih molekula u smeši na sniženje međupovršinskog napona na granici faza ulje/voda. Međutim, niska vrednost međupovršinskog napona nije jedini preduslov za formiranje stabilnih emulzionih sistema. Iz ovih razloga ispitana je

mogućnost dobijanja stabilnih 20% V/U emulzija primenom ove kombinacije lipofilnih emulgatora.

Jedan od parametara koji ima najveći uticaj na stabilnost emulzija je veličina kapi disperzne faze. Poznato je da smanjenje veličine kapi i uniformnost raspodele njihove veličine povećava sedimentacionu stabilnost sistema, usled smanjene tendencije ka koalescenciji i *Ostwald*-ovom zrenju. Stoga je, jedan od osnovnih uslova za dobijanje stabilne primarne V/U emulzije, postizanje uslova pri kojima će se obrazovati kapi čiji je prečnik manji od 1  $\mu\text{m}$ , a raspodela veličina kapi što uža. Iz ovih razloga, u daljem radu su ispitane osobine (veličina i raspodela veličina kapi i sedimentaciona stabilnost) 20% emulzija V/U stabilizovanih smešama PGPR:Caprol 10G10O masenih odnosa 1:0; 1:1; 1:2; 1:5; 1:10 i 0:1. Radi određivanja optimalne koncentracije emulgatora neophodne za dobijanje primarnih V/U emulzija zadovoljavajuće stabilnosti, pripremane su emulzije stabilizovane sa ukupnom koncentracijom emulgatora od 1; 2 i 3% (m/v).

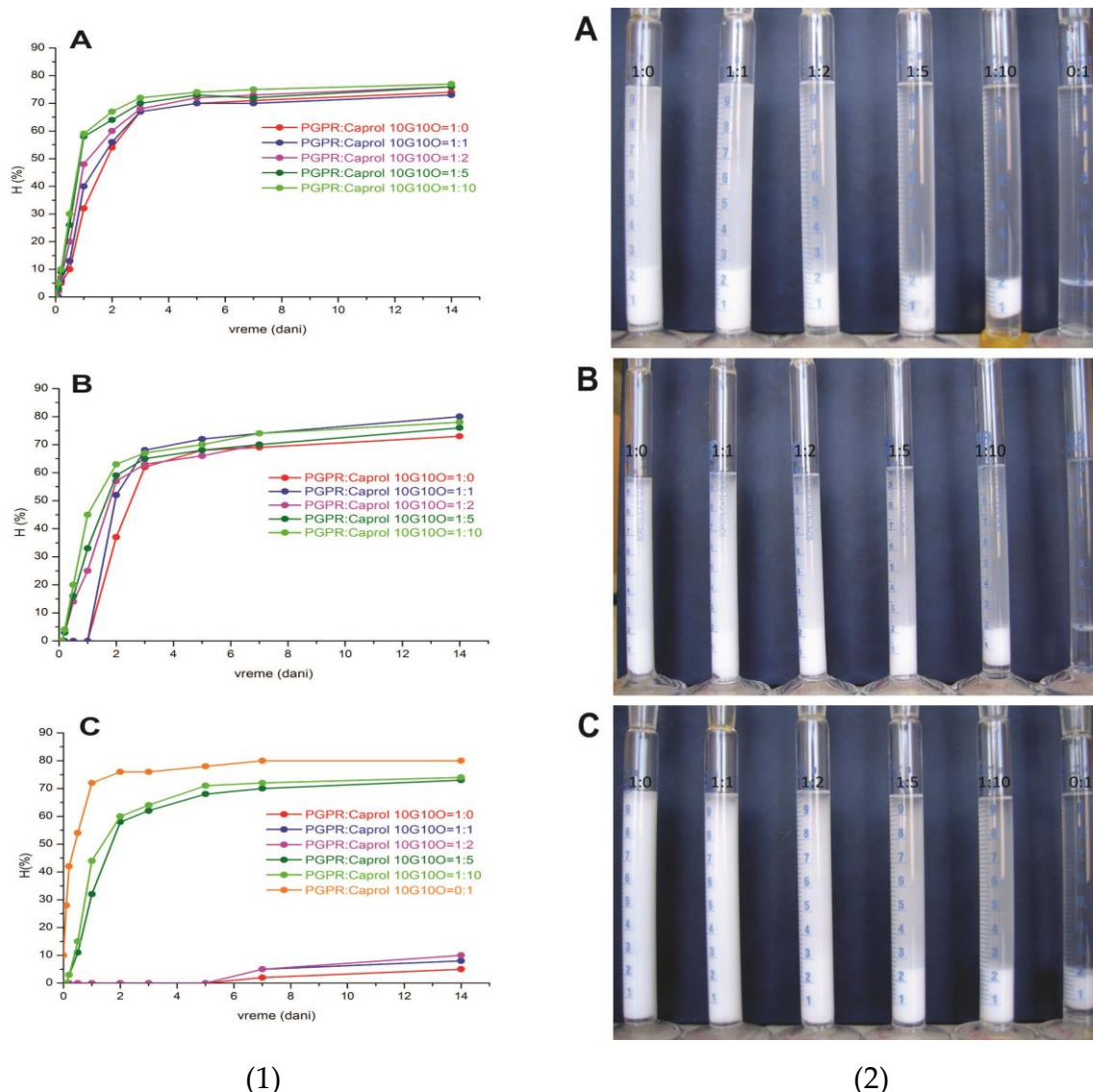
Posmatranjem dobijenih uzoraka emulzija pod mikroskopom uočene su vrlo sitne kapi, čija veličina nije mogla biti određena metodom obrade mikrofotografije. Iz tog razloga je, veličina i raspodela veličina kapi određena metodom merenja intenziteta rasute svetlosti, pomoću *Zeta sizer* Nano ZS. Promena srednjeg prečnika kapi emulzija sa povećanjem udela Caprol-a 10G10O u smeši sa PGPR-om, pri različitim ukupnim koncentracijama emulgatora, prikazana je na slici 35. Krive raspodele veličina kapi za sve emulzije prikazane su na slikama P1, P2 i P3, koje su date u Prilogu.



Slika 35. Promena srednjeg prečnika kapi 20% emulzija V/U stabilizovanih sa 1; 2 i 3% (m/v) emulgatora u zavisnosti od udela Caprol-a 10G10O u smeši sa PGPR-om

Na slici 35 se jasno vidi da su kod svih ispitivanih uzoraka emulzija prisutne kapi čiji je srednji prečnik manji od 280 nm, kao i da sa povećanjem masenog udela Caprol-a 10G10O u smeši sa PGPR-om dolazi do povećanja njihovog srednjeg prečnika. Ovo je u skladu sa rezultatima ispitivanja međupovršinskog napona, koja su ukazala na slabiju površinsku aktivnost molekula Caprol-a 10G10O (slika 33). Povećan maseni udeo Caprol-a 10G10O u smeši utiče, takođe, i na više izraženu polidisperznost emulzija, kako se može videti sa krivih raspodele veličina kapi datih u Prilogu (P1-P3). Osim toga, uočava se da povećanje ukupne koncentracije emulgatora dovodi do smanjenja srednjeg prečnika kapi emulzija. Veličina i raspodela veličina kapi emulzija stabilizovanih sa 1 i 2% (m/v) čistog Caprol-a 10G10O nisu mogle biti određene zbog njihove izrazite nestabilnosti. Naime, do razrušavanja ovih emulzija došlo je već u toku prvih nekoliko minuta nakon pripreme.

Veoma važna osobina emulzija, sa aspekta njihove primene, je i stabilnost sa vremenom. Sedimentaciona nestabilnost emulzija je posledica razlike u gustinama između disperzne i kontinualne faze. Naime, usled dejstva sile gravitacije dolazi do raslojavanja emulzije i, ukoliko je disperzna faza manje gustine od kontinualne, do isplivavanja kapi i formiranja krema (*creaming* emulzije), odnosno, ukoliko je disperzna faza veće gustine od kontinualne, do njihovog „taloženja“ i formiranja sedimenta (Robins, 2000; Tadors, 2013). U tom smislu, raslojavanje ispitivanih V/U emulzija, odnosno njihova stabilnost, izražena je kao promena indeksa sedimentacije (H) sa vremenom i prikazana na slici 36 (1). Stabilnost je praćena u toku 14 dana stajanja na sobnoj temperaturi, a izgled emulzija u cilindrima nakon ovog vremenskog perioda prikazan je na slici 36 (2).



Slika 36. Promena indeksa sedimentacije sa vremenom (1) i izgled 20% V/U emulzija stabilizovanih smešom emulgatora PGPR i Caprol 10G10O različitih masenih odnosa, nakon 14 dana stajanja na sobnoj temperaturi (2). Ukupna koncentracija emulgatora 1% (A); 2% (B) i 3%(m/v) (C)

Već u toku prvih nekoliko sati nakon pripreme kod svih emulzija stabilizovanih smešom PGPR-a i Caprol-a 10G10O ukupne koncentracije emulgatora od 1% (m/v) došlo je do raslojavanja na sediment, odnosno gusto pakovane kapi emulzije na dnu cilindra, i gornji, blago opalescentni sloj kontinualne uljne faze. Indeks sedimentacije se postepeno povećavao u toku prvih pet dana, nakon čega nije bilo značajnije promene (slika 36 A (1) i (2)). Kod emulzija stabilizovanih smešama emulgatora ukupne koncentracije 2% (m/v) (slike 36 B (1) i (2)), pri masenim odnosima PGPR:Caprol 10G10O od 1:0 i 1:1 do raslojavanja je došlo nakon 2 dana, dok je kod emulzija sa većim udelom Caprol-a 10G10O do raslojavanja došlo već u prvim satima nakon pripreme. Dalje povećanje ukupne koncentracije emulgatora na

3% (m/v) (slike 36 C (1) i (2)) dovodi do još izraženijih razlika u brzini raslojavanja. Naime, pri ovoj koncentraciji, kod emulzija stabilizovanih smešom PGPR-a i Caprol-a 10G100 masenih odnosa 1:0; 1:1 i 1:2, do pojave raslojavanja u stubu emulzije došlo je tek nakon sedam dana, sa znatno nižom vrednošću indeksa sedimentacije (manje od 10 (%)), što ukazuje na njihovu veću sedimentacionu stabilnost. Emulzije sa većim udelima Caprol-a 10G100 raslojile su se već u prvim satima nakon pripreme. S obzirom da je pojava raslojavanja u stubu emulzije posledica sedimentacione nestabilnosti, odnosno raslojavanja kapi emulzije po veličini, vrednost indeksa sedimentacije je u korelaciji sa rezultatima merenja veličine čestica.

Sa slike 36 (2) jasno se vidi da je kod uzoraka stabilizovanih smešom PGPR:Caprol 10G100 masenog odnosa 1:10 pri koncentracijama od 1 i 2% (m/v), kao i kod emulzije stabilizovane čistim Caprol-om 10G100 pri koncentraciji od 3% (m/v), došlo do potpunog izdvajanja dela vodene faze na dnu cilindra, što je posledica uznapredovale koalescencije i delimičnog i/ili potpunog razrušavanja emulzije, odnosno loših emulgujućih osobina molekula Caprol-a 10G100 (Kabalnov, 1998; Tadros, 2013).

Na osnovu ovih rezultatata možemo zaključiti da povećanje ukupne koncentracije emulgatora i smanjenje udela Caprol-a 10G100 u smeši sa PGPR-om pozitivno utiče na stabilnost 20% emulzija V/U, odnosno da se najstabilnije emulzije dobijaju pri ukupnoj koncentraciji emulgatora od 3% (m/v) i pri masenim odnosima PGPR:Caprol 10G100 od 1:0; 1:1 i 1:2.

#### **4. 2. 3. Ispitivanje uticaja prisustva vitamina C i E na međupovršinski napon i osobine emulzija V/U**

S obzirom da je cilj ovog rada dobijanje duplih emulzija, odnosno mikrokapsula, koje bi služile kao nosači hidrosolubilnih i liposolubilnih aktivnih materija, kao model supstance korišćeni su vitamini C i E. Biološki aktivne supstance mogu uticati na međupovršinski napon, a time i na osobine emulzionih sistema, pre svega na njihovu stabilnost. Iz ovih razloga interesantno je ispitati i potencijalni uticaj prisustva vitamina na osobine primarnih V/U emulzija. U literaturi postoje podaci o površinskoj aktivnosti molekula vitamina C i E (Howell, 1996; Quinn, 2007). Ona je ispitana merenjem međupovršinskog napona pri koncentracijama koje će se koristiti u daljem radu (vitamin C 25% (m/v) u vodenoj fazi i vitamin E 1,6% (m/v) u uljnoj fazi). Koncentracije vitamina odabrane su tako da njihov sadržaj u mikrokapsulama obezbeđuje terapijske doze. Pored toga, izmerene su i vrednosti međupovršinskog napona rastvora vitamina u prisustvu odabranih emulgatora, PGPR-a i Caprol-a 10G100, a rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Vrednosti međupovršinskog napona na granici faza ulje/voda u prisustvu lipofilnih emulgatora PGPR i Caprol 10G10O i vitamina C u vodenoj i vitamina E u uljnoj fazi na 40 °C

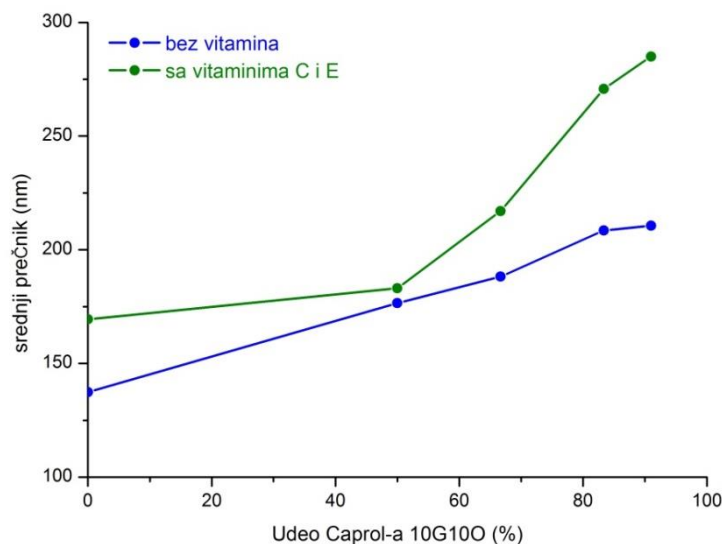
Međupovršinski napon (mN/m)		
Ulje/voda	Vitamin C (25%)	Vitamin E (1,6%)
19,87	16,96	15,31
	Vitamin C (25%) i vitamin E (1,6%)	
	16,9	
PGPR (3%)		
2,71	1,94	1,9
	Vitamin C (25%) i vitamin E (1,6%)	
	2,42	
Caprol 10G10O (3%)		
5,45	5,33	4,84
	Vitamin C (25%) i vitamin E (1,6%)	
	5,45	

Rezultati merenja međupovršinskog napona potvrđuju određenu površinsku aktivnost molekula vitamina C i E, jer njihovo prisustvo u vodenoj, odnosno uljnoj fazi, dovodi do sniženja međupovršinskog napona sa 19,87 mN/m na 16,95 mN/m u prisustvu vitamina C i na 15,31 mN/m u prisustvu vitamina E. Molekuli vitamina E imaju nešto izraženiji afinitet ka granici faza u poređenju sa molekulima vitamina C, što se može objasniti razlikom u strukturi molekula. Dodatkom lipofilnog emulgatora PGPR-a u uljnu fazu, kao što je već pokazano u prethodnim poglavljima, značajno se snižava međupovršinski napon, a dodatak vitamina C i E u sistem dovodi do njegovog dodatnog sniženja. Ista je situacija i sa emulgatorom Caprol 10G10O. Na osnovu ovoga se može zaključiti da prisustvo vitamina C i E ne ometa adsorpciju lipofilnih emulgatora na granici faza, odnosno da u izvesnoj meri dodatno stabilizuje adsorpcioni film molekula emulgatora. Međutim, sinergistički efekat sniženja međupovršinskog napona u prisustvu oba vitamina, istovremeno, izostaje.

S obzirom na dobijene rezultate merenja međupovršinskog napona može se očekivati da prisustvo vitamina C i E u sistemu povoljno utiče na stabilnost emulzija.

Iz ovih razloga pripremane su 20% emulzije V/U stabilizovane smešama PGPR:Caprol 10G100 masenih odnosa 1:0; 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 0:1, ukupne koncentracije 3% (m/v), sa vitaminom C u vodenoj fazi (25% (m/v)) i vitaminom E u uljnoj fazi (1,6% (m/v)). Dobijenim emulzijama određene su veličina i raspodela veličina kapi, a sedimentaciona stabilnost praćena je u toku 14 dana.

Posmatranjem uzoraka emulzija pod mikroskopom utvrđeno je da su prečnici kapi manji od 1  $\mu\text{m}$ , tako da je za disperznu analizu i ovih uzoraka emulzija korišćen *Zeta sizer Nano ZS*. Krive raspodele veličina kapi prikazane su na slici P4 u Prilogu, dok su promene srednjeg prečnika kapi emulzija u zavisnosti od masenog udela Caprol-a 10G100 u smeši sa PGPR-om prikazane na slici 37. Radi lakšeg poređenja, na istom grafiku su prikazani i srednji prečnici odgovarajućih emulzija bez vitamina.

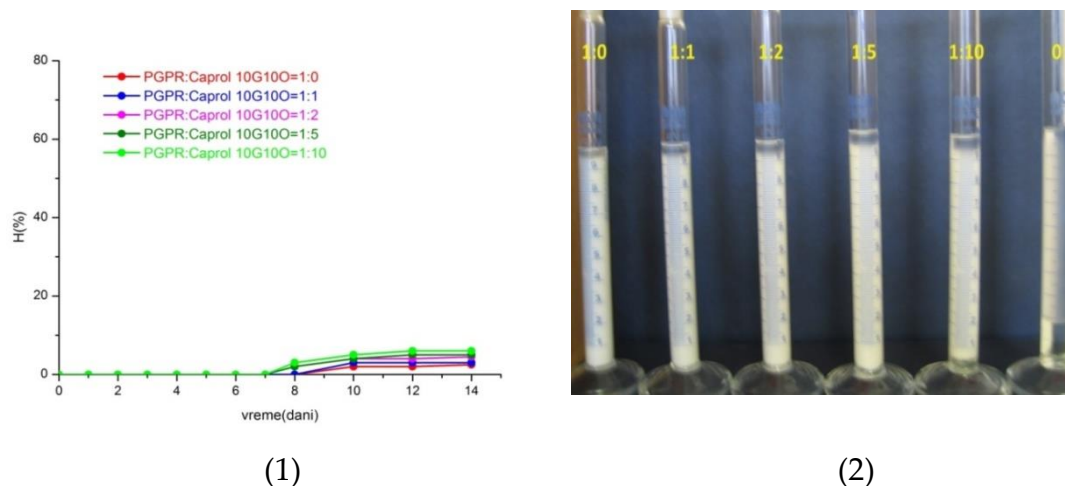


Slika 37. Promene srednjeg prečnika kapi 20% emulzija V/U u zavisnosti od masenog udela Caprol-a 10G100 u smeši sa PGPR-om, pri ukupnoj koncentraciji emulgatora od 3% (m/v) sa i bez prisustva vitamina C u vodenoj fazi (25% (m/v)) i vitamina E u uljnoj fazi (1,6% (m/v))

Na slici 37 se jasno vidi da sa povećanjem udela Caprol-a 10G100 u smeši emulgatora dolazi do povećanja srednjeg prečnika kapi u obe serije emulzija. Ovo je posledica lošijih emulgujućih osobina Caprol-a 10G100, kao što je već objašnjeno u prethodnom poglavlju. S druge strane, prateći uticaj dodatka vitamina C i E u vodu, odnosno uljnu fazu emulzija, uočavamo da prisustvo vitamina dovodi do povećanja srednjeg prečnika kapi emulzija, s tim da je taj uticaj izraženiji pri većim udelima Caprol-a 10G100 u smeši. Ovo povećanje srednjeg prečnika kapi emulzija može biti posledica blagog povećanja viskoziteta disperzne faze dodatkom vitamina C (Khalid, 2013).

Promena indeksa sedimentacije sa vremenom i izgled emulzija u graduisanim cilindrima nakon 14 dana stajanja na sobnoj temperaturi prikazani su na slici 38 (1) i (2).

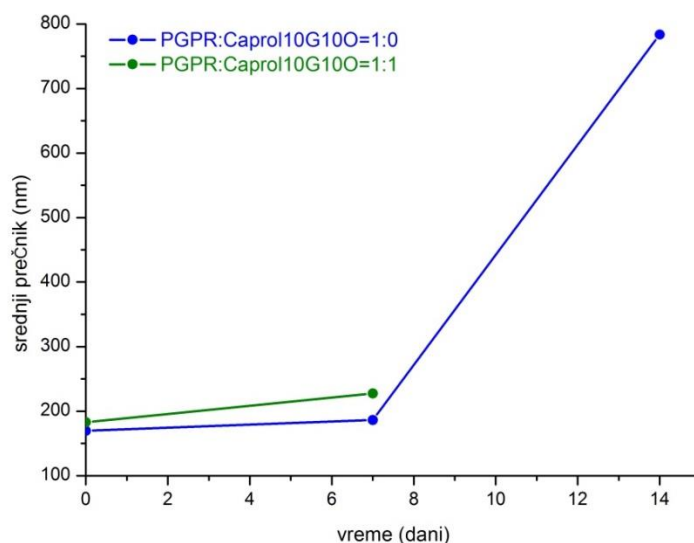




Slika 38. Promena indeksa sedimentacije sa vremenom (1) i izgled 20% V/U emulzija stabilizovanih smešom emulgatora PGPR i Caprol 10G10O različitih masenih odnosa, ukupne koncentracije 3% (m/v), nakon 14 dana stajanja na sobnoj temperaturi (2). Koncentracija vitamina C u vodenoj fazi 25% (m/v) i vitamina E u uljnoj fazi 1,6% (m/v).

Sa slike 38 se jasno vidi da su sve emulzije, stabilizovane čistim PGPR-om i smešama PGPR:Caprol 10G10O, u prisustvu vitamina stabilne u toku 7 dana, da bi nakon toga došlo do blagogo raslojavanja u stubu emulzije. Udeo izdvojene kontinualne faze kod svih uzoraka je manji od 10%. Poredeći uticaj prisustva vitamina C i E u emulzijama, uočavamo znatno niže vrednosti indeksa sedimentacije, pre svega kod emulzija sa većim udelom Caprol-a 10G10O (PGPR:Caprol 10G10O 1:5 i 1:10), dok su uzorci sa većim udelom PGPR podjednako stabilni kao oni bez prisustva vitamina. Jasno je da prisustvo vitamina pozitivno utiče na stabilnost emulzija, što se može pripisati obrazovanju kompaktnijeg adsorpcionog sloja. Emulzija stabilizovana čistim Caprol-om 10G10O pokazala je izrazitu nestabilnost, odnosno došlo je do potpunog razrušavanja neposredno nakon pripreme.

Pored vizuelnog praćenja raslojavanja u stubu emulzije, značajan parametar stabilnosti emulzije je i eventualna promena veličina i raspodela veličina kapi sa vremenom, kao mera procesa koalescencije. Iz tog razloga rađena je disperzna analiza pripremljenih emulzija, sa inkorporiranim vitaminima, nakon 7 i 14 dana stajanja na sobnoj temperaturi, a rezultati su prikazani na slikama 39 i P5 (data u Prilogu).



Slika 39. Promena srednjeg prečnika kapi 20% emulzija V/U stabilizvanih smešom emulgatora PGPR i Caprol 10G100 pri masenim odnosima 1:0 i 1:1 u prisustvu 25% (m/v) vitamina C u vodenoj i 1,6% (m/v) vitamina E u uljnoj fazi sa vremenom

Kod emulzije stabilizovane čistim PGPR-om nakon 7 dana stajanja na sobnoj temperaturi praktično nije došlo do promene veličina kapi, što nam govori o dobroj stabilnosti sistema zahvaljujući dobrim emulgujućim osobinama ovog emulgatora, kao i pozitivnog uticaja prisutnih vitamina na stabilnost. Nakon 14 dana došlo je do značajnog povećanja srednjeg prečnika kapi i stepena polidisperznosti, što se ogleda u povećanju širine krive raspodele, kao i do pojave frakcije kapi sa srednjim prečnicima većim od 1  $\mu\text{m}$  (slika P5 u Prilogu). Ove promene su posledica flokulacije i koalescencije kapi, međutim, i dalje nije došlo do potpunog izdvajanja dela disperzne vodene faze iz sistema. Kod emulzija stabilizovanih smešom PGPR:Caprol 10G100 masenog odnosa 1:1, nakon sedam dana stajanja došlo je do blagog povećanja srednjeg prečnika kapi i stepena polidisperznosti. Međutim, merenja pomoću *Zeta sizer Nano ZS* nisu bila izvodljiva kod emulzija starih 14 dana, jer je u toku merenja dolazilo do sedimentacije čestica, odnosno krupnijih kapi, a uređaj je merio veličine samo sitnijih kapi. Isti problem javio se i kod određivanja srednjeg prečnika kapi ostalih emulzija stabilizovanih smešama sa većim udelom Caprol-a 10G100, kod kojih merenja nisu bila izvodljiva ni nakon 7 dana.

Na osnovu ovih ispitivanja možemo zaključiti da su 20% emulzije V/U, sa inkorporiranim vitaminima C (25% (m/v)) i E (1,6% (m/v)), stabilizovane čistim PGPR-om stabilne i da ne dolazi do značajnih promena u veličini i raspodeli veličina kapi u toku 7 dana. Kod emulzija stabilizovanih smešom PGPR:Caprol 10G100 (1:1) dolazi do manjih promena u veličini kapi nakon 7 dana, ali su emulzije sedimentaciono stabilne. Emulzije stabilizovane smešama PGPR:Caprol 10G100, sa

većim udelima Caprol-a 10G100 imale su značajnije promene u veličinama kapi nakon 7 dana, a došlo je i do raslojavanja u stubu emulzije. Priprema emulzije stabilizovane čistim Caprol-om 10G100 praktično nije izvodljiva, jer se ona potpuno razrušava neposredno nakon pripreme. Imajući u vidu ove činjenice, emulzije V/U stabilizovane smešama PGPR:Caprol 10G100, masenih osnosa 1:0; 1:1 i 1:2, ukupne koncentracije emulgatora 3% (m/v), u prisustvu vitamina C u vodenoj fazi (25% (m/v)) i vitamina E u uljnoj fazi (1,6% (m/v)), odabrane su kao primarne emulzije za dobijanje duplih V/U/V emulzija.

### **4. 3. Dobijanje V/U/V emulzija**

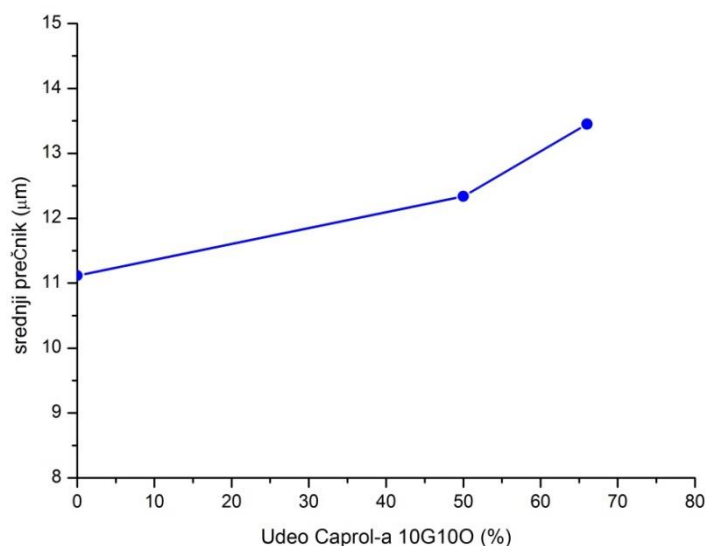
Detaljna tenziometrijska, viskozimetrijska i reološka ispitivanja interakcija u smešama želatin/NaKN pokazala su da one u velikoj meri utiču na osobine sistema. Naime, kao rezultat interakcija ova dva suprotno naelektrisana proteina, pri njihovim različitim masenim odnosima, dolazi do formiranja kompleksa različitih osobina, tako da se ovi fenomeni mogu koristiti za stabilizaciju emulzionih sistema i dobijanje mikrokapsula. Iz ovih razloga, naredna faza eksperimentalnih ispitivanja obuhvatila je karakterizaciju i ispitivanje stabilnosti duplih V/U/V emulzija, dobijenih u intervalima koncentracija proteina pre formiranja nerastvornog koacervata, pri masenom odnosu karakterističnom za formiranje nerastvornog koacervata i nakon toga. Kao aktivne materija u emulzije su dodavani vitamin C (25% (m/v)), u unutrašnju vodenu fazu, i vitamin E (1,6% (m/v)) u uljnu fazu.

#### **4. 3. 1. Ispitivanje uticaja interakcija između želatina i NaKN na veličinu i raspodelu veličina kapi V/U/V emulzija**

Duple V/U/V emulzije su dobijene dvostepenim postupkom emulgovanja odabranih primarnih emulzija u 1,7142% (m/m) rastvoru želatina, uz pomoć rotor-stator homogenizera pri 5.000 o/min, na temperaturi od 30 °C i vremenu trajanja homogenizovanja od 5 min. Na ovaj način su dobijene 30% V/U/V emulzije, kojima je, nakon formiranja, dodavan rastvor NaKN odgovarajuće koncentracije, uz mešanje na magnetnoj mešalici, na 40 °C, radi postizanja željenih masenih odnosa proteina. Treba naglasiti da, prilikom dodatka NaKN ne dolazi do reorganizacije adsorbovanog sloja želatina na spoljašnjoj granici faza ulje/voda, odnosno veličina i raspodela veličina kapi ostaje nepromenjena. Iz ovih razloga, disperzna analiza V/U/V emulzija rađena je nakon emulgovanja u želatinu, u osnovnoj 30% V/U/V emulziji.

Mikroskopskim ispitivanjima uzoraka emulzija uočeno je prisustvo dispergovanih kapi vode u kapima ulja (prečnika >1 μm), odnosno postojanje duplih emulzija, tako da je za određivanje njihove veličine i raspodele veličina kapi

primenjen postupak obrade mikrofotografija uzoraka pomoću Qwin softvera. Rezultati disperzne analize 30% V/U/V emulzija prikazani su na slici 40, a krive raspodele veličina kapi na slici P6 u Prilogu.

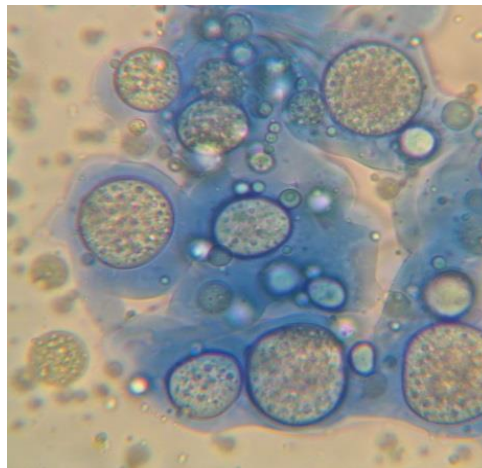


Slika 40. Srednji prečnik kapi 30% V/U/V emulzija pri koncentraciji želatina od 1,7142% (m/m) u kontinualnoj fazi u funkciji masenog udela Caprol-a 10G100 u smeši sa PGPR-om u kontinualnoj fazi primarnih 20% V/U emulzija (standardna devijacija)

Sa slike 40 uočava se da se veličina kapi višestrukih emulzija kreće u intervalu od 11,12 µm do 13,45 µm. Maseni udeo Caprol-a 10G100, pored uticaja na veličinu kapi primarnih V/U emulzija, utiče i na srednji prečnik kapi iz njih dobijenih duplih emulzija. Naime, dispergovanjem primarne emulzije u vodenom rastvoru želatina njegovi molekuli se, zahvaljujući površinskoj aktivnosti, adsorbuju na granicu faza formirajući film oko kapi ulja. Istovremeno, višak PGPR-a prisutan u uljnoj fazi se takođe adsorbuje i na spoljašnju granicu faza ulje/voda, dodatno stabilizujući adsorbovani sloj želatina. Povećanjem udela Caprol-a 10G100 u smeši sa PGPR-om, smanjuje se višak molekula PGPR-a u uljnoj fazi, koji imaju veću površinsku aktivnost, što utiče na stabilnost adsorpcionog sloja, odnosno dovodi do blagog povećanja srednjeg prečnika kapi emulzija.

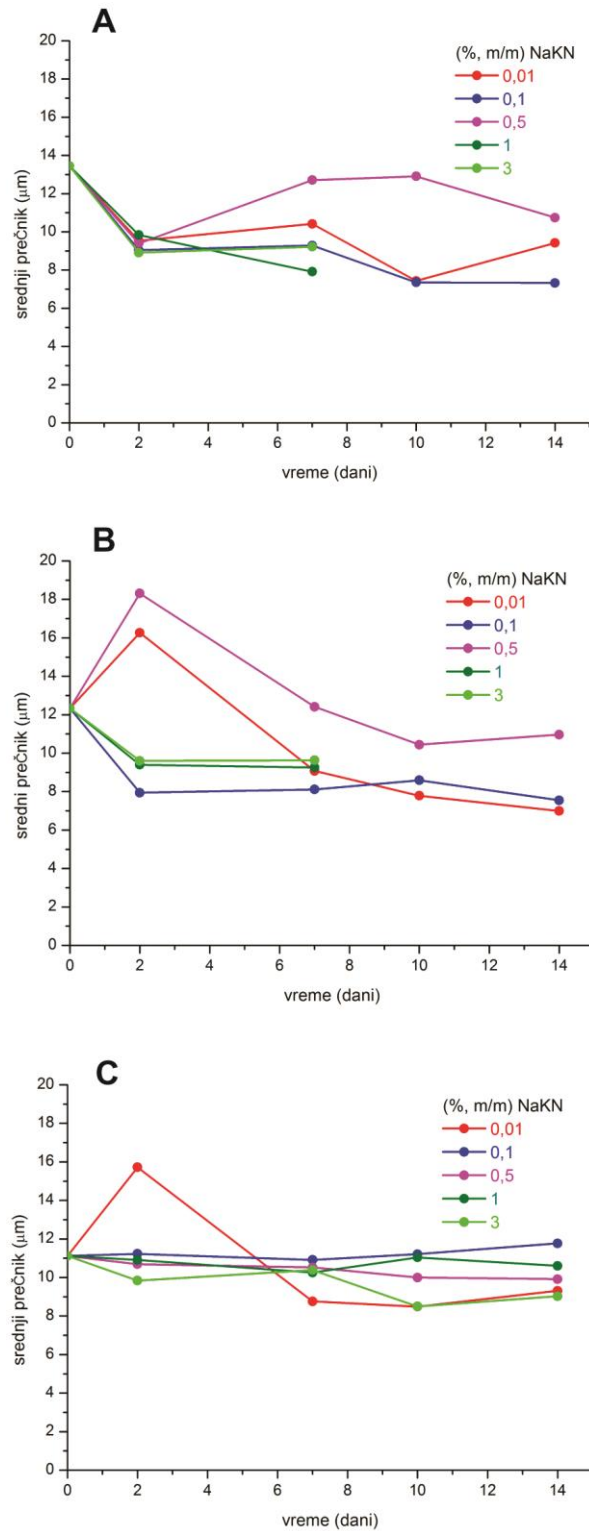
Dodatkom NaKN u 30% emulziju V/U/V sa 1,7142% (m/m) želatina u kontinualnoj fazi uz mešanje na magnetnoj mešalici dobijene su finalne 20% duple emulzije V/U/V. Na osnovu prethodnih ispitivanja može se zaključiti da koncentracija NaKN u smeši sa želatinom značajno utiče ne osobine formiranih kompleksa, prvenstveno na njegovu površinsku aktivnost i naelektrisanje, te se može očekivati da osobine formiranih kompleksa utiču i na stabilnost V/U/V emulzija. Iz ovih razloga, u osnovnu V/U/V emulziju (30%) dodavani su rastvori NaKN različite koncentracije, radi postizanja koncentracija u kontinualnoj fazi emulzija od 0,01; 0,1; 0,5; 1 i 3% (m/m). Ovaj interval koncentracija NaKN obuhvata oblast pre i nakon

obrazovanja nerastvornog koacervata proteina. Pri masenom odnosu želatin:NaKN od 2:1 dolazi do formiranja nerastvornog koacervata. S obzirom da je koncentracija želatina u finalnim duplim emulzijama 1% (m/m), formiranje koacervata se očekuje pri koncentraciji NaKN od 0,5%. Mikroskopskim ispitivanjem uzorka 20% emulzija V/U/V stabilizovanih smešom 1% (m/m) želatina i 0,5% (m/m) NaKN, uočava se sloj koacervata oko kapi ulja (Slika 41). Radi lakšeg uočavanja, u preparat za mikroskopiranje dodat je rastvor metilensko plavog, te se na slici jasno uočava plavo obojeni sloj koacervata oko kapi ulja unutar kojih su dispergovane kapi unutrašnje vodene faze.

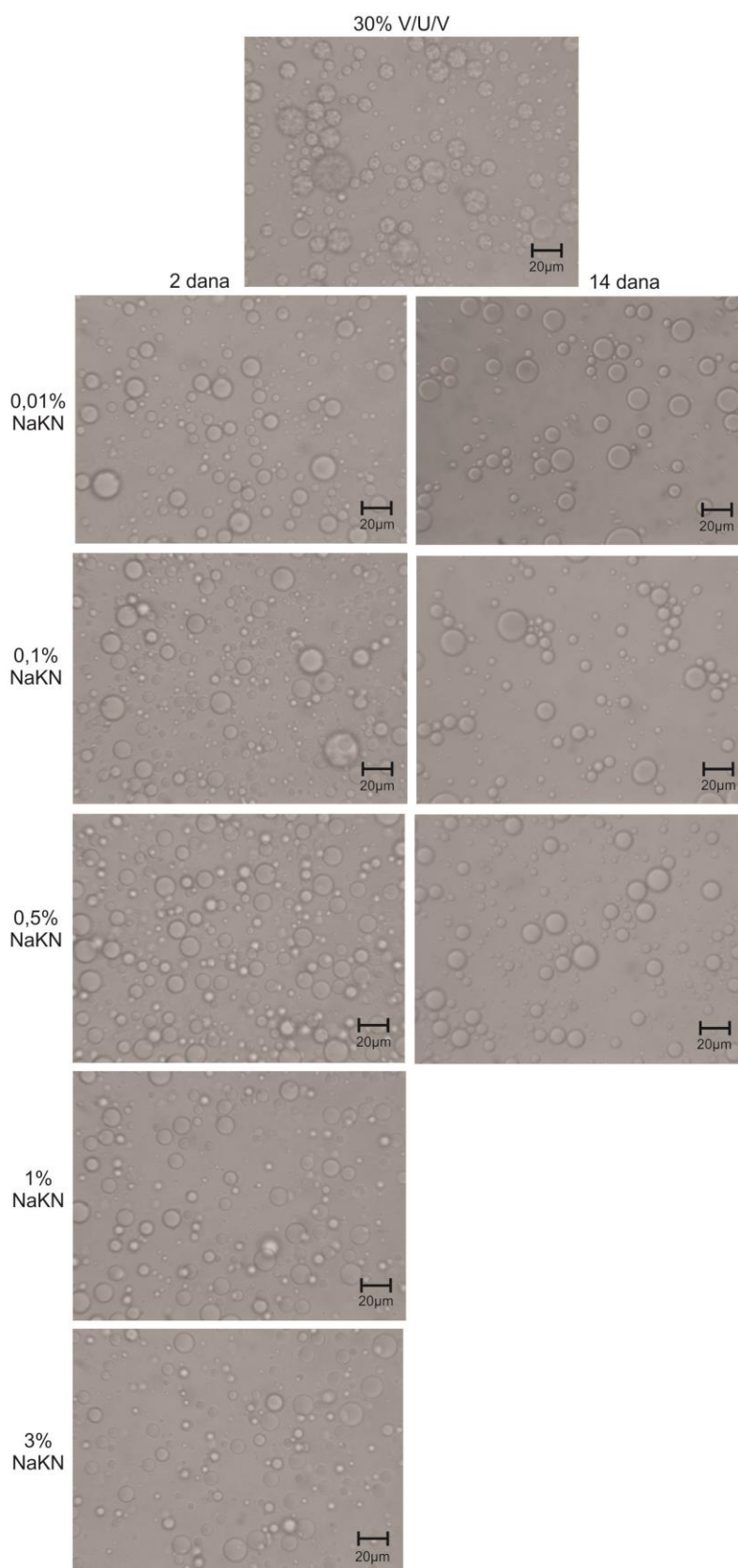


Slika 41. Mikrofotografija 20% V/U/V emulzije stabilizovane smešom želatin:NaKN masenog odnosa 2:1, pri uvećanju 40x

S obzirom na različite osobine formiranih kompleksa, može se očekivati da starenjem V/U/V emulzija dolazi do promena u veličini i raspodeli veličina kapi, kao i promena stabilnosti. Rezultati promene srednjeg prečnika kapi ispitivanih duplih emulzija sa vremenom, u toku 14 dana stajanja na sobnoj temperaturi, prikazani su na slici 42, dok su na slikama 43, 44 i 45 prikazane mikrofotografije 30% V/U/V emulzija stabilizovanih želatinom, kao i mikrofotografije finalnih 20% V/U/V emulzija nakon 2 i 14 dana stajanja na sobnoj temperaturi.



Slika 42. Promene srednjeg prečnika kapi sa vremenom 20% V/U/V emulzija stabilizovanih smešom 1% (m/m) želatina i različitim koncentracija NaKN. Primarne emulzije stabilizovane su smešom PGPR:Caprol 10G100 masenih odnosa 1:2 (A); 1:1 (B) i 1:0 (C) ukupne koncentracije 3% (m/v)



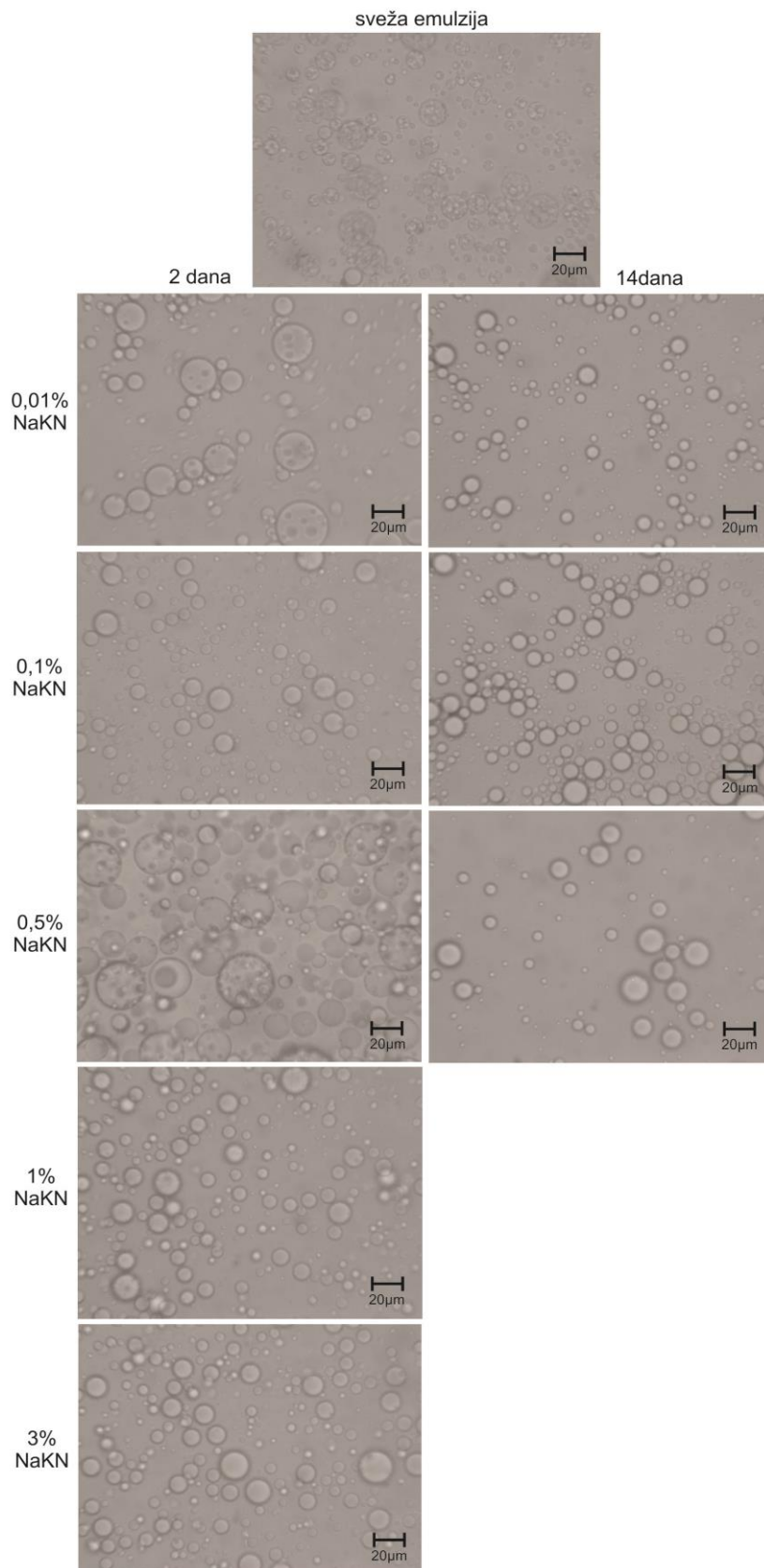
Slika 43. Mikrofotografije 30% V/U/V emulzije stabilizovane 1,7142% rastvorom želatina i 20% V/U/V emulzija stabilizovanih smešom 1% (m/m) želatina i različitim koncentracija NaKN, starih 2 i 14 dana, pri uvećanju 40x. Primarna emulzija je stabilizovana 3% (m/v) smešom PGPR:Caprol 10G100 masenog odnosa 1:2

Dispergovanjem primarne emulzije stabilizovane smešom PGPR:Caprol 10G10O masenog odnosa 1:2 u rastvoru 1,7142% (m/m) želatina formira se dupla emulzija, sa kapima ulja srednjeg prečnika 13,45  $\mu\text{m}$ , unutar kojih su dispergovane kapi unutrašnje vodene faze. Dodatkom rastvora NaKN uz mešanje na magnetnoj mešalici dobijene su 20% V/U/V emulzije kojima je praćena stabilnost i promena veličine kapi sa vremenom, čije su mikrofotografije prikazane na slici 43.

Kod jednostrukih emulzija promena veličine kapi je uglavnom posledica procesa koalescencije. S druge strane, kod duplih emulzija veći broj različitih faktora može uticati na promenu u veličini i raspodeli veličina kapi. Kao što se sa slike 42 vidi došlo je do smanjenja veličine kapi sa vremenom kod svih uzoraka emulzija V/U/V. Jedan od faktora nestabilnosti u ovakvim sistemima može da bude i difuzija vode između unutrašnje i spoljašnje vodene faze uslovljena osmotskim gradijentom između ovih faza. Kod ispitivanih uzoraka emulzija unutrašnja vodena faza je hipertonični rastvor vitamina C, što uslovljava tok vode u pravcu smanjenja osmotskog gradijenta, odnosno iz spoljašnje u unutrašnju vodenu fazu, i bubrenje kapi unutrašnje vodene faze. Nakon dostizanja kritične tačke, dolazi do razrušavanja sloja uljne faze koji razdvaja dve vodene faze i kapi unutrašnje vodene faze migriraju u spoljašnju. Rezultat svih tih procesa je razrušavanje duple emulzije, odnosno njeno prevođenje u jednostruku emulziju U/V, kao i smanjenje srednjeg prečnika kapi ulja (Ficheux i sar., 1998; Schmidts, 2010). Ovo promene se jasno uočavaju na mikrofotografijama prikazanim na slici 43, gde primećujemo da je kod skoro svih uzoraka emulzija došlo do razrušavanja duple emulzije, već nakon dva dana stajanja na sobnoj temperaturi. Mala stabilnost V/U/V emulzija ove serije je posledica loših osobina adsorpcionog sloja na kapima ulja, gde se adsorbuju i kompleksi proteina, kao i lipofilni emulgatori iz uljne faze (Benichou, 2002).

Kod V/U/V emulzije stabilizovane smešom želatin:NaKN masenog odnosa 2:1, nakon sedam dana dolazi do blagog povećanja srednjeg prečnika kapi ulja, što može biti posledica koalescencije kapi koje su slepljene jedna za drugu slojem koacervata. Uzorcima emulzija stabilizovanih smešom želatin/NaKN pri koncentracijama NaKN od 1 i 3% (m/m), nije mogla biti određena veličina i raspodela veličina kapi nakon sedam dana jer je došlo do mikrobiološkog kvarenja uzorka.



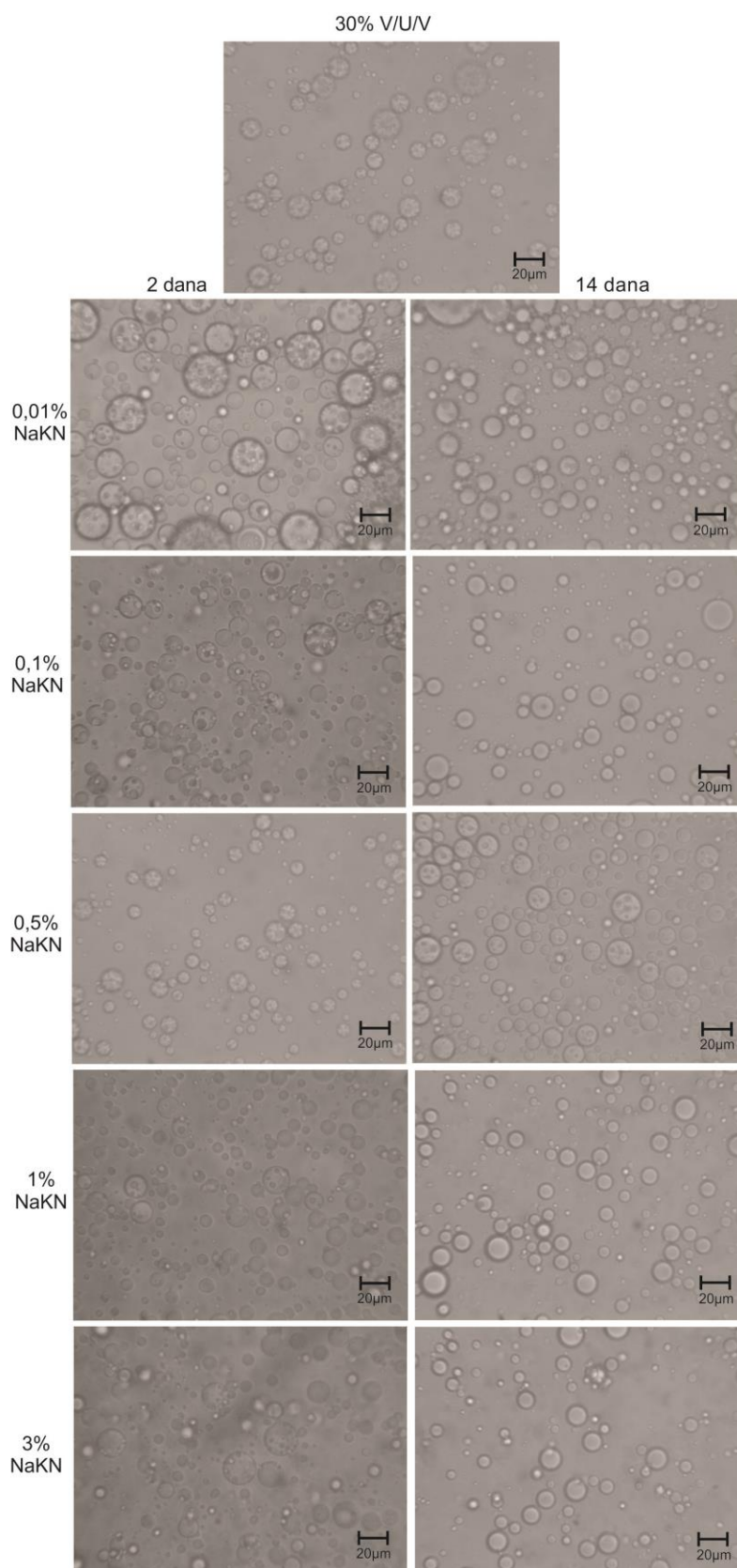


Slika 44. Mikrofotografije 30% V/U/V emulzije stabilizovane 1,7142% rastvorom želatina i 20% V/U/V emulzija stabilizovanih smešom 1% (m/m) želatina i različitim koncentracija NaKN, starih 2 i 14 dana, pri uvećanju 40x. Primarna emulzija je stabilizovana 3% (m/v) smešom PGPR:Caprol 10G100 masenog odnosa 1:1

Emulgovanjem primarne emulzije, stabilizovane smešom PGPR:Caprol 10G100 masenog osnosa 1:1, u rastvoru 1,7142 % (m/m) želatina dobijena je dupla 30% V/U/V emulzija sa kapima srednjeg prečnika 12,33  $\mu\text{m}$ . Dodatkom rastvora NaKN dobijene su 20% duple emulzije kojima je praćena promena srednjeg prečnika sa vremenom, a rezultati su prikazani na slici 42 (B). Morfologija dobijenih V/U/V emulzija prikazana je na slici 44.

Kao što vidimo na slici 42 (B), kod emulzija stabilizovanih smešama 1% (m/m) želatina i NaKN pri koncentracijama od 0,01 i 0,5% (m/m), nakon dva dana stajanja na sobnoj temperaturi, dolazi do povećanja srednjeg prečnika kapi, dok kod ostalih uzoraka dolazi do njihovog smanjenja. Dodatak manje količine NaKN (0,01% (m/m)) ne narušava u značajnoj meri sloj želatina adsorbovan na kapima ulja, tako da se usporava difuzija vode iz spoljašnje vodene faze i bubrenje dispergovanih kapi vode, kao i njihova migracija u spoljašnju fazu, odnosno razrušavanja duple emulzije je sporije. Sa mikrofotografija prikazanih na slici 44 se vidi da nakon dva dana i dalje postoji određen udeo kapi ulja sa dispergovanim kapima unutrašnje vodene faze. U odnosu na prethodnu seriju emulzija, ovde dolaze do izražaja znatno bolje emulgujuće osobine smeše emulgatora sa većim udelom PGPR-a. S druge strane, dodata količina NaKN nije dovoljna da prekrije celu površinu kapi ulja i formira kompaktno koacervatni sloj, ali se adsorbovanjem jednog molekula proteina na više kapi one povezuju preko tzv. makromolekulskih mostova, bridžing flokulacija (*bridge eng. most*). Kao posledica flokulacije dolazi i do koalescencije, odnosno povećanja srednjeg prečnika kapi V/U/V emulzije (Blijdenstein, 2004). Do bridžing flokulacije dolazi u sistemima gde je koncentracija dodatog makromolekula toliko niska da je proces sudaranja kapi brži od procesa adsorpcije makromolekula na kapima (Dickinson, 2008).

Kod emulzije stabilizovane smešom želatin:NaKN masenog odnosa 2:1 se nakon dva dana, takođe, uočava određen udeo kapi vode dispergovanih u kapima ulja, što se može pripisati kompaktnom koacervatnom filmu formiranom oko kapi ulja, koji usporava migraciju vodene faze. Prisustvo koacervata slepljuje kapi i ubrzava njihovu koalescenciju, usled čega se javlja povećanje srednjeg prečnika kapi duplih emulzija. Kod svih ostalih uzoraka dolazi do smanjenja srednjeg prečnika kapi emulzija već nakon dva dana od njihove pripreme. I u ovoj seriji uzoraka, kod emulzija stabilizovanih smešom želatin/NaKN pri koncentraciji NaKN od 1 i 3% (m/m), nakon sedam dana došlo je do mikrobiološkog kvarenje uzorka, tako da disperzna analiza nije mogla biti urađena.

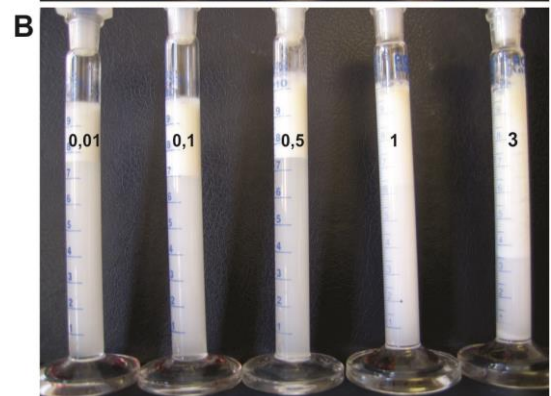
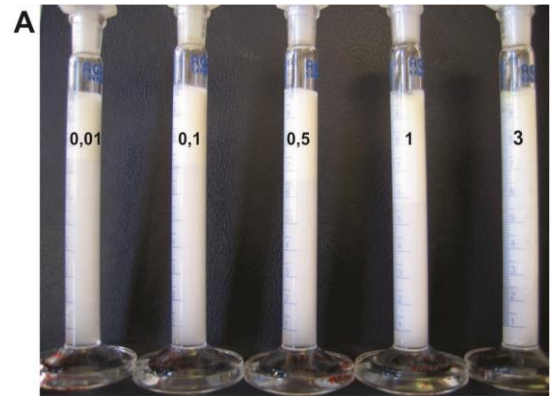
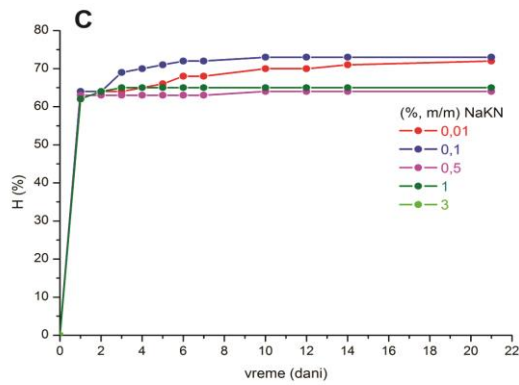
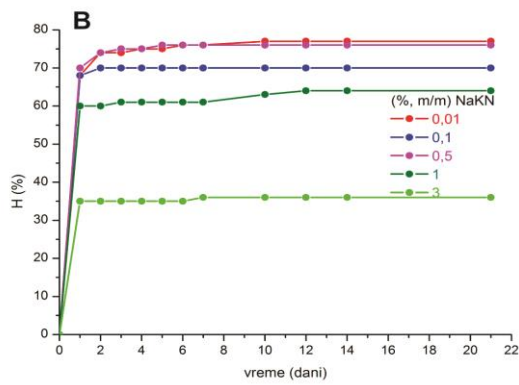
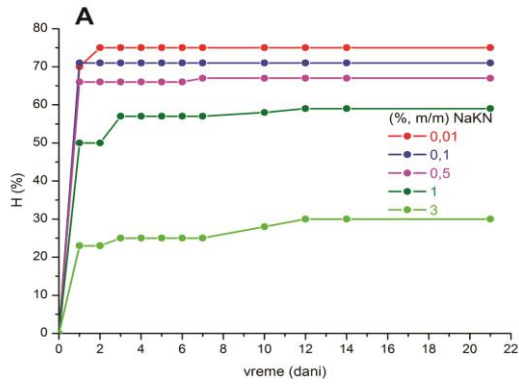


Slika 45. Mikrofotografije 30% V/U/V emulzije stabilizovane 1,7142% rastvorom želatina i 20% V/U/V emulzija stabilizovanih smešom 1% (m/m) želatina i različitim koncentracija NaKN, starih 2 i 14 dana, pri uvećanju 40x. Primarna emulzija je stabilizovana 3% (m/v) smešom PGPR:Caprol 10G100 masenog odnosa 1:0

Emulgovanjem primarne emulzije stabilizovane čistim PGPR-om u rastvoru 1,7142% (m/m) želatina, dobijena je 30% dupla emulzija sa kapima srednjeg prečnika 11,12  $\mu\text{m}$  (slike 42 (C) i 45). Praćenjem promene srednjeg prečnika kapi emulzije, nakon dodatka NaKN, sa vremenom uočavamo da kod uzorka sa koncentracijom NaKN od 0,01% (m/m), nakon dva dana, dolazi do povećanja srednjeg prečnika kapi, kao posledica bridžing flokulacije. Kod ostalih uzoraka nakon dva dana nema značajnih promena srednjeg prečnika kapi emulzija, što je posledica stabilnosti adsorpcionog sloja na kapima ulja i sinergističkog efekta molekula PGPR-a i formiranog kompleksa želatin/NaKN. Naime, pri koncentraciji NaKN od 0,1% (m/m) njegovi molekuli se vezuju za molekule želatina adsorbovanog na kapima ulja formirajući kompaktniji sloj, što usporava migraciju vode između dve vodene faze. Pri koncentraciji NaKN od 0,5% (m/m), kada dolazi do formiranja nerastvornog koacervata, stabilnost emulzije je posledica prisustva kompaktnog omotača na kapima ulja, kao i kod prethodne serije emulzija. Daljim povećanjem koncentracije NaKN dolazi do rastvaranja koacervata, međutim, nastali kompleksi imaju značajnu površinsku aktivnost, kako je potvrđeno tenziometrijskim merenjima (slika 28), odnosno tendenciju da se adsorbuju na granicu faza ulje/voda i time stabilizuju emulzioni sistem. Osim toga, u ovoj oblasti koncentracija NaKN ( $>0,5\%$  (m/m)) dolazi i do značajnog povećanja viskoziteta sistema, što otežava kretanje kapi, a samim tim njihovo sudaranje i koalescenciju (McClements, 2004; O'Regan i Mulvihill, 2009). Kod svih uzoraka se, nakon dva dana stajanja na sobnoj temperaturi, uočava postojanje duple emulzije, odnosno dispergovanih kapi vode unutar kapi ulja. Nakon ovog perioda, kod uzorka sa 0,01% (m/m) NaKN dolazi do smanjenja srednjeg prečnika kapi, usled lošijih osobina adsorpcionog sloja na kapima ulja. Kod ostalih emulzija ne dolazi do značajnijih promena srednjeg prečnika kapi, što ukazuje na činjenicu da se sinergističkim delovanjem lipofilnog emulgatora PGPR-a i kompleksa želatin/NaKN mogu dobiti duple emulzije stabilne u toku 7 dana.

#### **4. 3. 2. Ispitivanje uticaja interakcije između želatina i NaKN na sedimentacionu stabilnost V/U/V emulzija sa vremenom**

Uporedo sa disperznom analizom uzoraka emulzija V/U/V, praćena je i njihova sedimentaciona stabilnost. Emulzije su, neposredno nakon pripreme, sipane u graduisane cilindre, gde je praćeno njihovo raslojavanje na sobnoj temperaturi u toku 14 dana. Promena *creaming* indeksa,  $H$ , sa vremenom, u zavisnosti od koncentracije NaKN, prikazana je na slici 46 (1), dok je na slici 46 (2) prikazan izgled emulzija u cilindrima nakon 14 dana.



(1)

(2)

Slika 46. Promena *creaming* indeksa sa vremenom (1) i izgled 20% V/U/V emulzija stabilizovanih smešom 1% (m/m) želatina i različitih koncentracija NaKN nakon 14 dana stajanja na sobnoj temperaturi (2). Primarne emulzije su stabilizovane se 3% (m/v) smešama PGPR:Caprol 10G10O masenih odnosa 1:2 (A); 1:1 (B) i 1:0 (C)

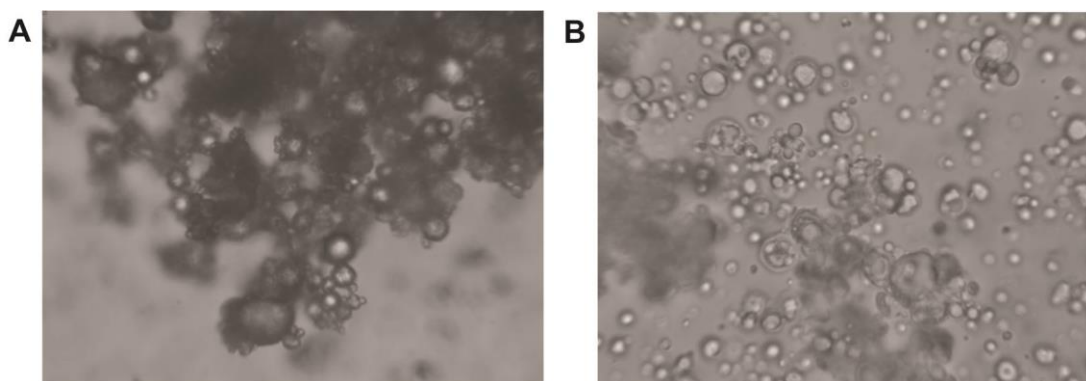
Na slici 46 se vidi da je kod svih uzoraka emulzija došlo je do raslojavanja u toku prvih 24 h nakon pripreme, a daljim stajanjem ne menjaju se značajno visine izdvojenih slojeva. Do pojave raslojavanja dolazi usled razlike u gustinama između kontinualne i disperzne faze. Pri koncentracijama NaKN od 0,01 i 0,1% (m/m) jasno se uočava oštra granica između dva sloja, što je uglavnom posledica bridžing flokulacije, odnosno isplivavanja flokulisanih kapi emulzije ka vrhu cilindara, dok u sloju seruma ostaju sitnije i neflokulisane kapi ulja (Blijdenstein i sar., 2004; Neiryneck i sar., 2007; Zinoviadou i sar., 2012). Kod emulzija stabilizovanih nerastvornim želatin/NaKN koacervatom (pri koncentraciji NaKN od 0,5% (m/m)), takođe se uočava granica između dva sloja. S obzirom da je formirani koacervat elektro neutralan (slika 26), smanjeno je elektrostatičko odbijanje između kapi, što omogućava njihovo gušće pakovanje, a sam kompleks ih dodatno slepljuje, usled čega dolazi do separacije flokula. Međutim, poredeći transparentnost slojeva seruma kod ovih uzoraka sa uzorcima emulzija sa nižom koncentracijom NaKN, serum je zamućeniji, što je posledica prisustva većeg udela kapi emulzije u ovom sloju.

Daljim povećanjem koncentracije NaKN, visina izdvojenog sloja seruma je manja, a granica između slojeva manje oštra. Kod emulzije sa koncentracijom NaKN od 3% (m/m) i 3% (m/m) PGPR-a u uljnoj fazi, nije se mogla odrediti jasna granica između slojeva, što je posledica povećanja viskoziteta kontinualne faze (slika 27). Naime, poznato je da povećanje viskoziteta znatno povećava sedimentacionu stabilnost emulzija, zbog otežanog kretanja kapi u kontinualnoj fazi (McClements, 2004; Klinkesorn i sar., 2004). Osim toga, povećanje ukupnog negativnog naelektrisanja kompleksa na površini kapi V/U/V emulzija, sa povećanjem koncentracije NaKN, takođe, pozitivno utiče na stabilnost sistema povećavajući elektrostatično odbijanje između kapi ulja. I na kraju, veoma je bitno naglasiti da, ni kod jednog uzorka emulzije nije došlo do izdvajanja ulja na vrhu cilindra, odnosno do razrušavanja emulzije.

Na osnovu rezultata treće faze istraživanja može se zaključiti da na stabilnost duplih V/U/V emulzija, obogaćenih vitaminima C i E, utiču interakcije između želatina i NaKN u kontinualnoj fazi, kao i sastav smeše lipofilnih emulgatora korišćenih za stabilizaciju primarnih V/U emulzija. Iz tog razloga, za dalja istraživanja odabrane su duple emulzije stabilizovane smešama 1% (m/m) želatina i različitih koncentracija NaKN, kod kojih su primarne emulzije stabilizovane smešama PGPR:Caprol 10G10O masenih odnosa 1:0 i 1:1.

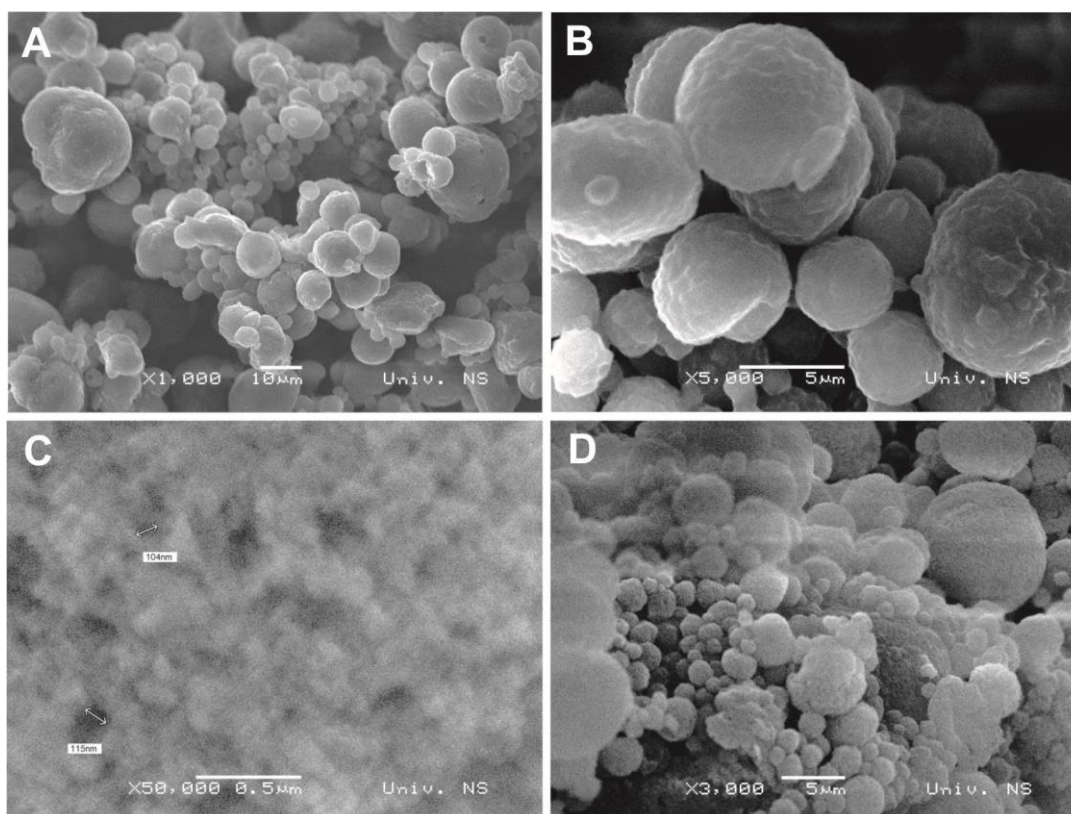
#### 4. 4. Dobijanje mikrokapsula umrežavanjem kompleksa želatin/NaKN na granici faza ulje/voda

Može se reći da dobijene duple emulzije sa inkorporiranim vitaminima i same predstavljaju svojevrsne mikrokapsule. Međutim, umrežavanjem adsorbovanog sloja oko kapi emulzija mogu se, dodatno regulisati osobine ovih nosača aktivnih materija. Iz tog razloga je kompleks želatin/NaKN, adsorbovan na spoljašnjoj granici faza duplih emulzija, umrežavan pomoću genipina. Nakon umrežavanja, mikrokapsule su iz suspenzije izdvajane sušenjem u struji toplog vazduha pomoću *Spray dryer*-a. Mikrokapsule su dobijene u obliku finog praha, a posmatranjem pod mikroskopom uočavaju se aglomerati (slika 47 (A)), koji se ne razbijaju ni nakon dispergovanja u vodi, tako da nije bilo moguće izvršiti disperznu analizu. Posmatranjem pod mikroskopom, nakon dispergovanja, uočava se sloj koacervata oko kapsula nepravilnog oblika (slika 47 (B)). S obzirom da su efikasnost mikrokapsulacije, kinetika otpuštanja sadržaja iz mikrokapsula, kao i morfologija njihovog omotača jedne od najvažnijih osobina, koje određuju njihovu primenu, ovi parametri su ispitani u daljem radu.



Slika 47. Mikrofotografije suvih mikrokapsula (A) i mikrokapsula redispergovanih u vodi (B)

Morfologija površine mikrokapsula ispitana je analizom fotografija dobijenih primenom SEM (slika 48). Na slikama se jasno vidi da je najveći udeo mikrokapsula sfrenog oblika, sa blago naboranom površinom. Međutim, pri dovoljno velikom uvećanja (50.000x) uočavaju se i pore u omotaču mikrokapsula reda veličine <math><100\text{ nm}</math> (na slici 48 (C) su naznačene i dimenzije pora). Analizom mikrofotografije uzorka mikrokapsula nakon otpuštanja aktivnih komponenata (slika 48 (D)) možemo zaključiti da suspendovanje mikrokapsula u vodi ne dovodi do promene u morfologiji njihovog omotača, odnosno ne dolazi do njegovog skupljanja ili bubrenja. Na osnovu ovoga možemo pretpostaviti da se oslobađanje sadržaja mikrokapsula uglavom odvija putem proste difuzije kroz pore omotača.

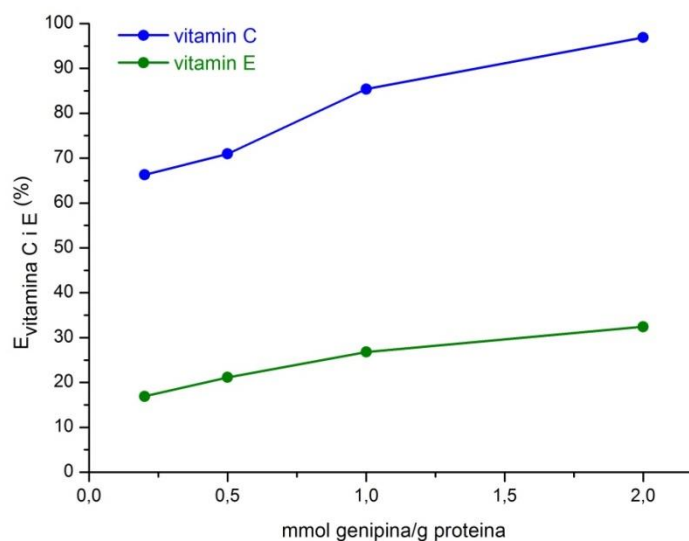


Slika 48. SEM mikrokapsula dobijenih umrežavanjem koacervata želatin:NaKN masenog odnosa 2:1 na spoljašnjoj granici faza duplih emulzija sa 0,2 mmol genipina/g proteina Uvećanje 1.000x (A); 5.000x (B); 50.000x (C). Izgled mikrokapsula nakon ekstrakcije aktivnih materija (3.000x) (D).

#### 4. 4. 1. Ispitivaje uticaja koncentracije genipina na osobine mikrokapsula

Opšte je poznato da količina dodatog umreživača značajno utiče na mehaničku otpornost i poroznost zida mikrokapsula, a samim tim i na zaštitu inkapsuliranih aktivnih materija od faktora sredycyxycine i kinetiku njihovog oslobađanja. Iz ovih razloga najpre je ispitan uticaj koncentracije genipina na efikasnost mikrokapsulacije i brzinu oslobađanja vitamina iz mikrokapsula. Uticaj koncentracije genipina na osobine mikrokapsula ispitan je na uzorku duple emulzije stabilizovane smešom želatin:NaKN masenog odnosa 2:1, dobijene dispergovanjem primarne V/U emulzije stabilizovane sa 3% (m/v) PGPR-a. Efikasnost mikrokapsulacije vitamina C određena je na osnovu maksimalne vrednosti oslobođene količine vitamina prilikom praćenja kinetike otpuštanja, dok je efikasnost mikrokapsulacije vitamina E određena nakon ekstrakcije ukupne količine ovog vitamina etanolom (postupci opisani u poglavlju Materijal i metode). Količine oslobođenih vitamina izražene su u procentima u odnosu na količine vitamina dodate u procesu pripreme emulzija. Rezultati ovih ispitivanja su prikazani na slici 49.

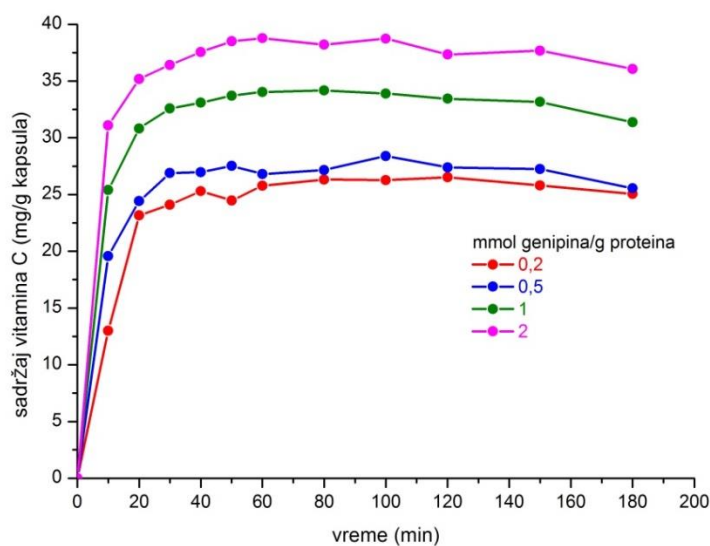




Slika 49. Zavisnost efikasnosti mikrokapsulacije vitamina C i E od koncentracije genipina

Rezultati prikazani na slici 49 jasno ukazuju da količina dodatog umreživača značajno povećava efikasnost mikrokapsulacije oba vitamina, što je posledica veće sposobnosti zadržavanja ulja unutar mikrokapsula usled većeg stepena umreženosti omotača (Maji i Hussain, 2009; Devi i Maji, 2010). Međutim, treba naglasiti da je efikasnost inkapsuliranja vitamina C značajno veća. Naime, primenom genipina koncentracije 2,0 mmol/g proteina za umrežavanje moguće je ostvariti efikasnost inkapsulacije vitamina C od oko 97%, dok je efikasnost inkapsulacije vitamina E pri istim uslovima značajno manja, oko 32%. S obzirom da se radi o dvostrukim emulzijama V/U/V kod kojih je vitamin C prisutan u unutrašnjoj vodenoj fazi, dok je vitamin E u uljnoj fazi, bliže umreženom omotaču mikrokapsula, jasno je da je njegova izloženost faktorima sredine (povišena temperatura pri sušenju mikrokapsula, prisustvo kiseonika u procesu dobijanja dvostruke emulzije i dr.) veća. Iz ovih razloga može se pretpostaviti da je u toku postupka pripreme mikrokapsula došlo do delimične degradacije vitamina E.

Kinetika otpuštanja inkapsuliranih aktivnih materija u fiziološkim uslovima je, takođe, jedna od veoma važnih osobina mikrokapsula. Kod mikrokapsula namenjenih oralnoj upotrebi, kinetika otpuštanja u fiziološkim *in vitro* uslovima podrazumeva praćenje oslobađanja aktivnih materija u medijumu koji simulira uslove u želucu (pH 1,8) i intestinalnom traktu (pH 7,4). S obzirom da se vitamin E ne rastvara u vodenoj sredini, kao i da je vitamin C veoma nestabilan pri većim pH vrednostima, praćena je kinetika otpuštanja vitamina C u *in vitro* uslovima koji odgovaraju želudačnom soku, odnosno u 0,1 M HCl, pri pH 1,8. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na slici 50.



Slika 50. Kinetika otpuštanja vitamina C iz mikrokapsula u 0,1 M HCl na 37 °C pri različitim koncentracijama genipina

Podaci dobijeni na osnovu *in vitro* testa praćenja oslobađanja vitamina C iz mikrokapsula analizirani su primenom matematičkih modela u cilju definisanja mehanizma oslobađanja aktivne materije. Eksperimentalni podaci su fitovani pomoću matematičkih jednačina, koje opisuju različite kinetike oslobađanja aktivne materije iz nosača i to: *Higuchi* kinetika, kinetika nultog reda, kinetika prvog reda i *Korsmeyer-Peppas* model, čiji su matematički izrazi dati u poglavlju Materijal i metode. Vrednosti konstanti brzine oslobađanja vitamina C iz mikrokapsula (K) i koeficijenata korelacije sa sve primenjene modele prikazani su u tabeli 5. Analiziran je deo *in vitro* profila oslobađanja vitamina C tokom prvih 60 minuta, jer se nakon tog perioda na profilu uočava plato, tj. može se reći da je oslobađanje aktivne materije praktično završeno.

Tabela 5. Konstanta brzine difuzije ( $K$ ) i koeficijent korelacije ( $r$ ) za *Higuchi* kinetiku ( $K_H$ ,  $r_H$ ), kinetiku nultog reda ( $K_0$ ,  $r_0$ ), kinetiku prvog reda ( $K_1$ ,  $r_1$ ) i *Korsmeyer-Peppas*-ov model ( $K_{KP}$ ,  $r_{KP}$ ) oslobađanja vitamina C iz uzoraka mikrokapsula, pri različitim koncentracijama genipina

Koncentracija umreživača (mmol/g proteina)	$K_H$ (%)	$r_H$	$K_0$ (%)	$r_0$	$K_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$r_1$	$K_{KP}$	$r_{KP}$
0,2	18,26	0,83020	0,20	0,76731	243,53	0,77426	19,69	0,83656
0,5	13,78	0,92743	0,15	0,88059	388,80	0,88657	14,81	0,93181
1	13,57	0,91423	0,15	0,86305	352,71	0,87014	14,60	0,91913
2	12,57	<b>0,96155</b>	0,14	0,92533	396,50	0,93156	13,49	<b>0,96477</b>

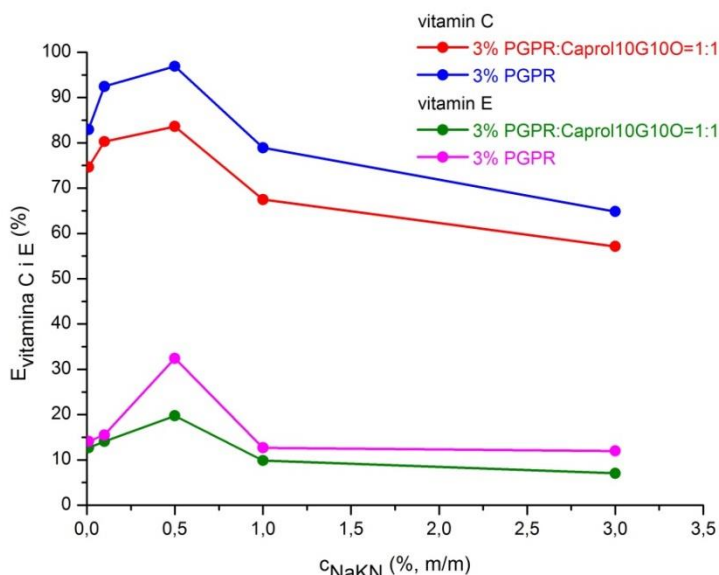
Na osnovu prikazanih podataka se vidi da su najviše vrednosti koeficijenta korelacije dobijene za *Higuchi*-jev i *Korsmeyer-Peppas*-ov model, kada je difuzioni eksponent ( $n$ ) iznosio 0,45. *Higuchi* model se odnosi na oslobađanje aktivne materije iz nosača u kome je ona suspendovana, tako da tokom *dissolution* testa medijum prodire kroz pore nosača, rastvara je, a rastvorena frakcija se difuzijom oslobađa iz nosača. S druge strane, *Korsmeyer-Peppas*-ov model se primarno odnosi na oslobađanje aktivne materije iz polimernog nosača, a kada je vrednost difuzionog eksponenta 0,45, mehanizam oslobađanja je prosta difuzija (Saravanan i sar., 2003; Singhvi i Singh, 2011). Nešto veća vrednost koeficijenta korelacije za *Korsmeyer-Peppas*-ov model može se objasniti činjenicom da se vitamin C brzo rastvara u vodenom medijumu i prostom difuzijom oslobađa iz mikrokapsula, odnosno brzina rastvaranja mu je visoka pa ne predstavlja ograničavajući faktor za oslobađanje iz nosača, za razliku od *Higuchi* modela kod koga postoji ravnoteža između rastvorenog i nerastvorenog dela aktivne materije, a iz nosača se difuzijom oslobađa rastvorena frakcija. Osim toga, analizom mikrofotografija snimljenih SEM tehnikom, vidimo da se morfologija mikrokapsula ne menja nakon *dissolution* testa, odnosno da medijum za *in vitro* test ne rastvara omotač mikrokapsula niti on bubri, što nam, takođe, potvrđuje činjenicu da se vitamin C iz mikrokapsula oslobađa prostom difuzijom kroz pore pristune na omotaču mikrokapsula.

Jasno je, da se povećanjem koncentracije genipina, brzina oslobađanja vitamina C iz mikrokapsula smanjuje. Ovo se može objasniti činjenicom da se povećanjem koncentracije umreživača formira kompaktniji zid mikrokapsula što otežava difuziju aktivne materije (Maji i Hussain, 2009; Devi i Maji, 2010). Osim toga, sa povećanjem koncentracije genipina raste i koeficijent korelacije za primenjene matematičke modele, tako da pri koncentraciji genipina od 2

mmola/g proteina dostiže vrednost od 0,965 za *Korsmeyer-Peppas*-ov model, što potvrđuje činjenicu da je dizajniran sistem sa kontrolisanim oslobađanjem aktivne materije. Na osnovu ovih ispitivanja možemo zaključiti da je optimalna koncentracija genipina, za umrežavanje kompleksa želatin/NaKN, kao omotača mikrokapsula, 2 mmola/g proteina.

#### 4. 4. 2. Ispitivanje uticaja interakcija između želatina i NaKN na osobine mikrokapsula

Nakon određivanja optimalne koncentracije umreživača, za dobijanje nosača sa kontrolisanim otpuštanjem aktivnih materija, ispitan je uticaj interakcije u sistemu želatin/NaKN na osobine dobijenih mikrokapsula, s obzirom da je u prethodnim ispitivanjima potvrđen njihov uticaj na osobine duplih emulzija i osobine formiranog adsorpcionog sloja. Primenjene koncentracije proteina bile su iste kao i prilikom ispitivanja osobina duplih emulzija, odnosno 1% (m/m) želatina i 0,01; 0,1; 0,5; 1 i 3% (m/m) NaKN. Ispitane su dve serije mikrokapsula, prva serija kod koje su primarne emulzije V/U stabilizovane smešom 3% (m/v) PGPR:Caprol 10G10O masenog odnosa 1:1 i druga serija gde je kao lipofilni emulgator korišćen čist 3% (m/v) PGPR. Rezultati ispitivanja zavisnosti efikasnosti mikrokapsulacije vitamina C i E od koncentracije NaKN u smeši sa želatinom, za obe serije mikrokapsula, prikazani su na slici 51.



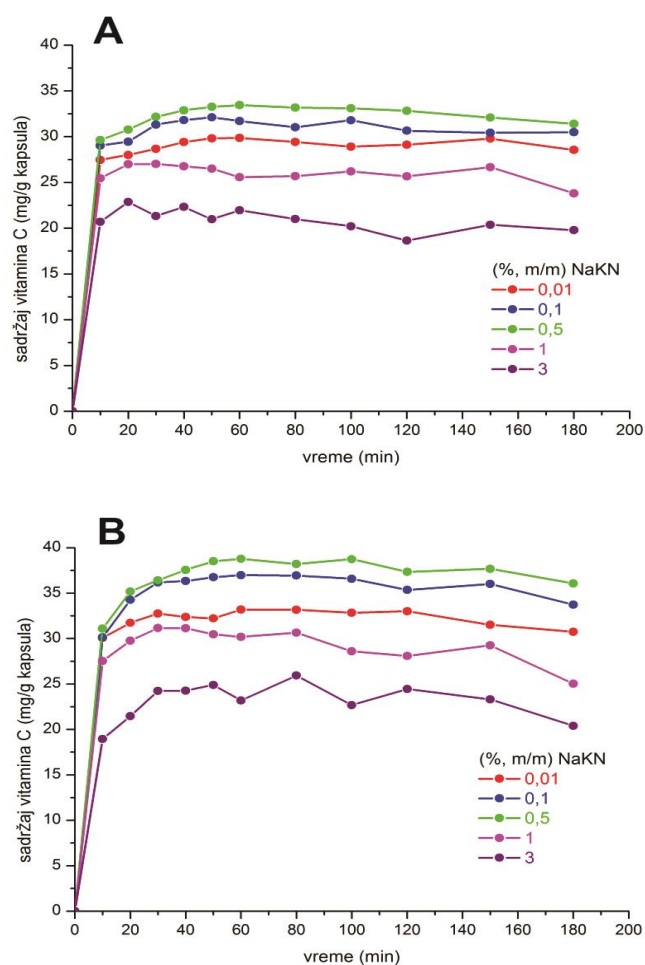
Slika 51. Zavisnost efikasnosti mikrokapsulacije vitamina C i E od koncentracije NaKN u smeši sa 1% (m/m) želatinom u spoljašnjoj vodenoj fazi 20% V/U/V emulzija. Primarne emulzije stabilizovane sa 3% PGPR-a i 3% smeše PGPR:Caprol 10G10O masenog odnosa 1:1

Na slici 51 se jasno vidi da se najveća efikasnost mikrokapsulacije oba vitamina postiže pri koncentraciji NaKN, u smeši sa 1% (m/m) želatinom, od 0,5% (m/m), odnosno kada dolazi do formiranja kompaktnog, nerastvornog koacervata. Ovo je u skladu sa prethodnim ispitivanjima, s obzirom da su i duple emulzije, sa ovim koncentracijama proteina u kontinualnoj fazi, pokazale najveću stabilnost (slike 42–45). Osim toga, na efikasnost mikrokapsulacije vitamina ima uticaj i vrsta emulgatora, korišćenog za stabilizaciju primarnih emulzija. Tako da se kod svih ispitivanih koncentracija NaKN u spoljašnjoj vodenoj fazi, nešto veća efikasnost mikrokapsulacije oba vitamina postiže primenom čistog 3% PGPR-a, u odnosu na 3% (m/m) smešu emulgatora PGPR:Caprol 10G100 masenog osnosa 1:1. Ovo je, kao što je već naglašeno kod ispitivanja stabilnosti duplih emulzija, posledica boljih emulgujućih karakteristika PGPR-a u odnosu na Caprol 10G100. Efikasnost inkapsuliranja vitamina C značajno je veća u odnosu na vitamin E, što može biti posledica delimične degradacije vitamina E u toku postupka pripreme mikrokapsula.

U cilju daljeg ispitivanja uticaja interakcije između želatina i NaKN na osobine mikrokapsula, praćena je kinetika otpuštanja vitamina C u fiziološkim uslovima, a rezultati, za obe serije uzoraka, prikazani su na slici 52. Podaci dobijeni na osnovu *in vitro* testa analizirani su primenom matematičkih modela u cilju ispitivanja mehanizma oslobađanja aktivne materije. Eksperimentalni podaci su fitovani pomoću istih matematičkih jednačina kao i u prethodnom poglavlju. Vrednosti konstanti brzine oslobađanja vitamina C iz mikrokapsula ( $K$ ) i koeficijenta korelacije ( $r$ ) sa sve primenjene modele prikazani su u tabelama 6 i 7.

Tabela 6. Konstanta brzine difuzije ( $K$ ) i koeficijent korelacije ( $r$ ) za *Higuchi* kinetiku ( $K_H$ ,  $r_H$ ), kinetiku nultog reda ( $K_0$ ,  $r_0$ ), kinetiku prvog reda ( $K_1$ ,  $r_1$ ) i *Korsmeyer-Peppas*-ov model ( $K_{KP}$ ,  $r_{KP}$ ) uzoraka mikrokapsula pri različitim koncentracijama NaKN u smeši sa 1% (m/m) želatinom u spoljašnjoj vodenoj fazi 20% V/U/V emulzija. Primarne emulzije stabilizovane su sa 3% (m/v) smeše PGPR:Caprol 10G100 masenog osnosa 1:1

% (m/m) NaKN	$K_H$		$K_0$		$K_1$		$K_{KP}$	
	(%) $\text{min}^{-1/2}$	$r_H$	(%) $\text{min}^{-1}$	$r_0$	( $\text{min}^{-1}$ )	$r_1$	$r_{KP}$	$r_{KP}$
0,01	4,48	0,98716	18,42	0,97622	1313,54	0,97661	4,79	<b>0,98730</b>
0,1	6,89	0,96595	12,56	0,88636	872,81	0,88660	5,33	<b>0,96207</b>
0,5	6,88	0,98243	11,69	0,95648	801,43	0,95808	7,37	<b>0,98419</b>
1	9,29	0,95225	6,98	0,92403	493,76	0,9253	9,84	<b>0,95507</b>
3	-	-	-	-	-	-	-	-



Slika 52. Kinetika otpuštanja vitamina C iz mikrokapsula u 0,1 M HCl na 37 °C pri različitim koncentracijama NaKN u smeši sa 1% (m/m) želatinom u spoljašnjoj vodenoj fazi 20% V/U/V emulzija. Primarne V/U emulzije stabilizovane sa 3% (m/v) smeše PGPR:Caprol 10G100 masenog odnosa 1:1 (A) i sa 3% PGPR-a (B)

U seriji mikrokapsula, kod kojih su primarne emulzije stabilizovane smešom PGPR:Caprol 10G100 masenog odnosa 1:1 (slika 52 (A) i tabela 7), prilikom ispitivanja modela oslobađanja vitamina C, analiziran je deo *in vitro* profila do platoa, odnosno do vremenskog perioda nakon kog se količina oslobođene supstance više ne menja. Za uzorke mikrokapsula sa 0,01; 0,1 i 0,5% (m/m) NaKN to je tokom prvih 60 minuta, a za uzorke sa 1% (m/m) NaKN tokom prvih 30 minuta. Kod uzorka sa 3% (m/m) NaKN cela inkapsulirana količina vitamin C je oslobođena već tokom prvih 20 minuta, tako da nije bilo dovoljno podataka za model zavisnu analizu.

Više vrednosti koeficijenta korelacije dobijene su za *Higuchi* i *Korsmeyer-Peppas*-ov model, kada je difuzioni eksponent  $n=0,45$ . Međutim, za nijansu više vrednosti koeficijenta korelacije za *Korsmeyer-Peppas*-ov model, kao i morfologija mikrokapsula nakon *in vitro* testa, ukazuju na činjenicu da je mehanizam oslobađanja vitamin C iz mikrokapsula prosta difuzija. Korelacija sa *Korsmeyer-Peppas*-ovim modelom ( $r>0,95$ ) postoji za sve analizirane uzorke mikrokapsula, s tim što kod uzoraka sa 0,01; 0,1 i 0,5% (m/m) NaKN oslobađanje traje 60 minuta, a za uzorak sa 1% (m/m) NaKN oslobađanje je brže i završava se u toku prvih 30 minuta. Kod uzorka sa 3 % (m/m) NaKN ukupno inkapsulirana količina vitamina C se oslobodi već za 20 minuta. Ovo povećanje brzine oslobađanja vitamina C, pri koncentracijama NaKN od 1 i 3% (m/m), odnosno nakon rastvaranja nerastvorng koacervata, može se objasniti značajnim povećanjem viskoziteta kontinualne faze u ovoj oblasti. Naime, iako kompleks želatin/NaKN, u ovoj oblasti, poseduje značajnu površinsku aktivnost (slika 28) i tendenciju ka deponovanju na površini kapi ulja, njegov veliki viskozitet (slika 27) može značajno otežati umrežavanje, i na taj način sprečiti formiranje kompaktnijeg omotača mikrokapsula.

Na osnovu izloženog može se zaključiti da uzorci mikrokapsula sa 0,01; 0,1 i 0,5% (m/m) NaKN imaju karakteristike nosača sa kontrolisanim oslobađanjem aktivne supstance (vitamin C), kao i da interakcija između želatina i NaKN utiče na brzinu oslobađane vitamin C iz mikrokapsula.

U drugoj seriji uzoraka mikrokapsula (slika 52 (B) i tabela 7), kod kojih su primarne emulzije stabilizovane 3% PGPR-om, za ispitivanje modela oslobađanje vitamina C, takođe je analiziran je deo *in vitro* profila do platoa, a to je za uzorke mikrokapsula sa koncentracijama NaKN od 0,01; 0,1 i 0,5% (m/m) prvih 60 minuta, za uzorak sa 1% (m/m) NaKN prvih 40 minuta, a za uzorak sa 3% (m/m) NaKN tokom prvih 50 minuta.

Tabela 7. Konstanta brzine difuzije (K) I koeficijent korelacije I za *Higuchi* kinetiku ( $K_H$ ,  $r_H$ ), kinetiku nultog reda ( $K_0$ ,  $r_0$ ), kinetiku prvog reda ( $K_1$ ,  $r_1$ ) I *Korsmeyer-Peppas*-ov model ( $K_{KP}$ ,  $r_{KP}$ ) uzoraka mikrokapsula pri različitim koncentracijama NaKN u smeši sa 1% (m/m) želatinom u spoljašnjoj vodenoj fazi 20% V/U/V emulzija. Primarne emulzije stabilizovane su sa 3% (m/v) PGPR-om

% (m/m) NaKN	$K_H$		$K_0$		$K_1$		$K_{KP}$	
	(%) $\text{min}^{-1/2}$	$r_H$	(%) $\text{min}^{-1}$	$r_0$	( $\text{min}^{-1}$ )	$r_1$	$K_{KP}$	$r_{KP}$
0,01	4,32	0,86282	13,98	0,81668	957,81	0,81773	4,64	0,86729
0,1	10,87	0,90747	6,10	0,85359	407,52	0,85880	11,70	0,91261
0,5	12,57	0,96155	6,06	0,92533	396,50	0,93156	13,50	<b>0,96477</b>
1	9,29	0,95225	6,98	0,92403	493,76	0,92531	9,84	<b>0,95507</b>
3	12,18	0,95792	5,83	0,92582	455,95	0,92773	12,98	<b>0,96055</b>

Kao i kod prethodnih serija umreženih mikrokapsula postignuta je bolja korelacija za *Korsmeyer-Peppas*-ov model, što potvrđuje činjenicu da se i ovoj seriji uzoraka mikrokapsula oslobađanje vitamina C odvija prostom difuzijom. Korelacija sa *Korsmeyer-Peppas*-ovim modelom ( $r > 0,95$ ) se uspostavlja za uzorke mikrokapsula sa 0,05; 1 i 3% (m/m) NaKN, s tim da je najveća vrednost koeficijenta korelacije za uzorak sa 0,5% (m/m) NaKN i aktivna supstanca se oslobađa tokom 60 minuta. Pri višim koncentracijama NaKN, korelacija se blago narušava i skraćuje vreme oslobađanja ukupne inkapsulirane količine vitamina C. U odnosu na prethodnu seriju emulzija, ovde je pri višim koncentracijama NaKN (1 i 3% (m/m)) dominantan uticaj i lipofilnog emulgatora, odnosno PGPR.

Na osnovu sprovedenog ispitivanja može se zaključiti da je optimalna koncentracija NaKN, za dobijanje nosača sa kontrolisanim oslobađanjem vitamina C, 0,5% (m/m), odnosno pri masenom odnosu želatin:NaKN od 2:1, kada dolazi do formiranja kompaktnog nerastvornog koacervatnog sloja na granici faza.



## 5. ZAKLJUČCI

U okviru ove doktorske disertacije ispitana je mogućnost dobijanja stabilnih nosača hidrosolubilnih i liposolubilnih aktivnih materija primenom protein/protein interakcija. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Merenjem pH vrednosti smeša želatin/NaKN u vodi utvrđeno je da su njihove pH vrednosti u intervalu između IET, što ukazuje na suprotno naelektrisanje molekula ova dva proteina. Vizuelnim posmatranjem smeša uočeno je da pri masenom odnosu želatina i NaKN od 2:1 dolazi do separacije faza i precipitacije nerastvornih kompleksa. Utvrđeno je da interakcija između želatina i NaKN utiče na osobine sistema, kako u rastvoru, tako i na granici faza. Povećanjem koncentracije NaKN iznad masenog odnosa želatin:NaKN od 2:1 dolazi do značajnog povećanja viskoziteta i sniženja površinskog napona rastvora smeša, što je posledica rastvaranja formiranog koacervata, koji poseduje značajnu površinsku aktivnost.

2. Merenjem zeta potencijala smeša želatin/NaKN utvrđeno je da povećanjem koncentracije NaKN dolazi do smanjenja neto pozitivnog naelektrisanja molekula želatina i formiranja neutralnog kompleksa, pri masenom odnosu od 2:1. Dalje povećanje koncentracije NaKN dovodi do povećanja negativnog naelektrisanja kompleksa i njegovog postepenog rastvaranja.

3. Krive proticanja čistog rastvora želatina (1%), kao i smeša želatin/NaKN, pri koncentracijama NaKN pre formiranja nerastvornog koacervata, pokazuju tiksotropno ponašanja sa razrušavanjem gel strukture na uzlaznim krivama pri određenim brzinama smicanja. Brzine smicanja pri kojima dolazi do razrušavanja strukture se pomeraju ka većim vrednostima sa povećanjem koncentracije NaKN, ukazujući na jaču gel strukturu, nastalu kao rezultat interakcije između ova dva proteina. Reološke karakteristike koacervata, formiranog pri koncentraciji NaKN od 0,5% (m/m), nisu mogle biti određene (kompaktna i lepljiva struktura), dok supernatant pokazuje klasično njutnovsko ponašanje viskoziteta  $\eta=1,5$  mPas, odnosno ova faza predstavlja skoro čist rastvarač. Smeše želatin/NaKN sa koncentracijama NaKN od 1,5 i 2% (m/m)

pokazuju značajno odstupanje od ponašanja klasičnih gela želatina, dok se pri koncentraciji od 3% (m/m) jaka gel struktura ponovo uspostavlja. Promene elastičnog modula  $G'$  ispitivanih smeša, određenog u oblasti linearne viskoelastičnosti, potpuno su u saglasnosti sa određivanjima krivih proticanja.

4. Poredeći uticaj različitih lipofilnih emulgatora (Caprol 3GS, Caprol 10G100, Caprol ET i PGPR) na vrednost međupovršinskog napona ulje/voda, uočeno je da kod emulgatora iz grupe Caprol-a sa porastom vrednosti HLB broja dolazi do značajnijeg sniženja međupovršinskog napona, kao posledice veće hidrofilnosti molekula i njegovog afiniteta ka granici faza. Najveći efekat na sniženje međupovršinskog napona pokazao je PGPR. Ispitivanjem međufaznog ponašanja binarnih smeša emulgatora utvrđeno je da oni sinergistički deluju jedino u smeši PGPR:Caprol:10G100 masenog odnosa 1:1, koncentracije veće od 0,1% (m/v). Minimalna vrednost ukupne koncentracije emulgatora, potrebna za postizanje zadovoljavajuće vrednosti međupovršinskog napona na granici faza ulje/voda, iznosi 1% (m/v).

5. Analizom veličine i raspodele veličina kapi 20% emulzija V/U, stabilizovanih sa PGPR-om, Caprol-om 10G100 i njihovim smešama, utvrđeno je da se radi o nano emulzijama čija je veličina kapi u intervalu od 130 do 280 nm. Povećanje masenog udela Caprol-a 10G100 u smeši dovodi do povećanja srednjeg prečnika kapi emulzija i stepena polidisperznosti, što je posledica lošijih emulgujućih osobina molekula ovog emulgatora. Primenom čistog rastvora Caprol-a 10G100 pri koncentracijama od 1 i 2% (m/v) dobijaju se izrazito nestabilne emulzije, koje se razrušavaju neposredno nakon pripreme. Povećanjem ukupne koncentracije emulgatora smanjuje se srednji prečnik kapi kod svih ispitivanih emulzija.

6. Povećanje ukupne koncentracije emulgatora i smanjenje udela Caprol-a 10G100 u smeši sa PGPR-om pozitivno utiče na sedimentacionu stabilnost 20% emulzija V/U. Najstabilnije emulzije se dobijaju pri ukupnoj koncentraciji emulgatora od 3% (m/v) i masenim odnosima PGPR:Caprol 10G100 1:0; 1:1 i 1:2.

7. Rezultati ispitivanja uticaja prisustva vitamina C i E u vodenoj, odnosno uljnoj fazi, na vrednost međupovršinskog napona ukazuju na slabu površinsku aktivnost molekula ovih vitamina. U prisustvu emulgatora PGPR-a i Caprol-a 10G100 u uljnoj fazi, dodatak vitamina C i E u sistem ulje/voda ne ometa adsorpciju lipofilnih emulgatora na gnanicu faza, ali sinergistički efekat na sniženje međupovršinskog napona izostaje.

8. Dodatak vitamina C (25% (m/v)) i vitamina E (1,6% (m/v)) u 20% emulzije V/U stabilizovane sa 3% (m/v) emulgatora, PGPR-om, Caprol-om 10GO i njihovim smešama, dovodi do povećanja srednjeg prečnika kapi kod svih ispitivanih emulzija, koje je izraženije pri većim masenim udelima Caprol-a

10G10O. Promene disperznih osobina emulzija su, najverovatnije, posledica blagog povećanja viskoziteta disperzne faze izazvanog dodatkom vitamina C.

9. Primenom 3% (m/v) emulgatora, PGPR-a, i smeša PGPR:Caprol 10G10O različitih masenih odnosa, mogu se dobiti 20% V/U emulzije sa vitaminima C (25% (m/v)) i E (1,6% (m/v)) zadovoljavajuće stabilnosti u toku 7 dana. Sve ispitivane emulzije pokazuju veću sedimentacionu stabilnost od odgovarajućih emulzija bez prisustva vitamina. Kod emulzije stabilizovane čistim PGPR-om u toku ovog perioda praktično ne dolazi do koalescencije kapi, za razliku od emulzije stabilizovane smešom PGPR:Caprol 10G10O (1:1), kod koje je uočeno blago povećanje srednjeg prečnika kapi i stepena polidisperznosti. Tek nakon 14 dana stajanja na sobnoj temperaturi u emulziji sa PGPR-om dolazi do povećanja srednjeg prečnika kapi, koje su i dalje nano-dimenzija, dok je kod ostalih emulzija koalescencija i/ili flokulacija izraženija (kapi veće od  $1\mu\text{m}$ ). Emulzije V/U stabilizovane smešama PGPR:Caprol 10G10O, masenih osnosa 1:0; 1:1 i 1:2, ukupne koncentracije 3% (m/v), odabrane su kao primarne emulzije za dobijanje duplih, V/U/V emulzija.

10. Dispergovanjem odabranih primarnih emulzija u 1,7142% (m/m) želatinu dobijene su 30% V/U/V emulzije. Uočeno je da sa povećanjem udela Caprol-a 10G10O u smeši sa PGPR-om, koja je korišćena za stabilizaciju primarnih emulzija, dolazi do blagog povećanja srednjeg prečnika kapi duplih emulzija (sa 11,12 na 13,45  $\mu\text{m}$ ). Ova promena ukazuje na sinergistički efekat molekula želatina i PGPR-a na stabilizaciju spoljašnje granične površine V/U.

11. Dispergovanjem primarne emulzije stabilizovane smešom PGPR:Caprol 10G10O 1:2 (3%) u rastvoru želatina formira se 30% V/U/V emulzija sa kapima ulja srednjeg prečnika 13,45  $\mu\text{m}$ , a dodatkom rastvora NaKN različitih koncentracija, 20% emulzije različitih osobina spoljašnje granične površine. Uočeno je da nakon dva dana dolazi do smanjenja srednjeg prečnika kapi sa vremenom i razrušavanja duple emulzije kod svih uzoraka, što je posledica loših osobina adsorpcionog sloja na kapima unutrašnje vodene faze i kapima ulja. Kod emulzije stabilizovane smešom želatin:NaKN 2:1 (uslovi formiranja koacervata), nakon sedam dana dolazi do blagog povećanja srednjeg prečnika kapi ulja, kao posledica koalescencije kapi koje su flokulisane slojem koacervata.

12. V/U/V emulzija dobijena dispergovanjem primarne emulzije, stabilizovane smešom PGPR:Caprol 10G10O 1:1, u rastvoru želatina imala je srednji prečnik kapi 12,33 $\mu\text{m}$ . Dodatkom NaKN formirane su 20% V/U/V emulzije. Pri koncentraciji NaKN od 0,01 (m/m) nakon dva dana stajanja na sobnoj temperaturi dolazi do povećanja srednjeg prečnika kapi, koje je posledica je bridžing flokulacije i koalescencije, dok je kod emulzije sa 0,5 % (m/m) NaKN povećanje srednjeg prečnika kapi posledica slepljivanja kapi na čijoj površini je formiran kompaktan sloj koacervata proteina. Kod ostalih uzoraka V/U/V emulzija dolazi do smanjenja srednjeg prečnika u toku dva dana.

13. Dispergovanjem primarne emulzije stabilizovane čistim rastvorom PGPR-a u rastvor želatina, dobija se dupla emulzija sa kapima srednjeg prečnika 11,12 $\mu$ m. Dodatkom NaKN i praćenjem promene srednjeg prečnika kapi emulzija sa vremenom uočavamo da kod uzorka sa koncentracijom NaKN od 0,01% (m/m) nakon dva dana dolazi do povećanja srednjeg prečnika kapi, kao posledica bridžing flokulacije. Kod ostalih uzoraka u toku ovog perioda nema značajnih promena disperznih karakteristika emulzija, što je rezultat stabilnog adsorpcionog sloja na kapima ulja i sinergističkog efekta molekula PGPR-a i kompleksa želatin/NaKN.

14. Sve ispitivane 20% V/U/V emulzije pokazuju sedimentacionu nestabilnost već u toku prvih 24 h nakon pripreme, koja se sa vremenom praktično ne menja. Treba naglasiti da ni kod jednog uzorka emulzije nije došlo do izdvajanja uljne faze, odnosno do razrušavanja emulzije.

15. Mikrokapsule sa inkorporiranim vitaminima C i E u obliku praha dobijene su dodatkom umreživača, genipina, u V/U/V emulzije i njihovim sušenjem u struji toplog vazduha. Analizom morfologije površine uočeno je da je najveći udeo mikrokapsula sfernog oblika, sa blago naboranom površinom i porama reda veličine do 100 nm. Suspendovanje mikrokapsula u vodenom rastvoru ne dovodi do promene u morfologiji njihovog omotača, odnosno ne dolazi do njegovog skupljanja ili bubrenja.

16. Ispitivanjem uticaja koncentracije genipina na efikasnost inkapsulacije vitamina C i E, zaključeno je da se povećanjem koncentracije umreživača povećava efikasnost inkapsulacije oba vitamina, kao posledica formiranja kompaktnijeg omotača mikrokapsula. Istovremeno, efikasnost inkapsulacije vitamina C je značajno veća, te se može pretpostaviti da dolazi do delimične degradacije vitamina E tokom postupka pripreme mikrokapsula.

17. Ispitivanjem kinetike otpuštanja vitamina C u *in vitro* uslovima i primenom model zavisne analize za ispitivanje modela otpuštanja, najveće vrednosti koeficijenta korelacije dobijene se za *Korsmeyer-Peppas*-ov model, što ukazuje na njegovo oslobađanje prostom difuzijom. Uočeno je da se povećanjem koncentracije genipina brzina oslobađanja vitamina C iz mikrokapsula smanjuje, odnosno formira se kompaktniji zid mikrokapsula i usporava difuzija aktivne materije. Sa povećanjem koncentracije genipina raste i koeficijent korelacije za primenjene matematičke modele, što ukazuje da je dizajniran sistem sa kontrolisanim oslobađanjem aktivne materije. Optimalna koncentracija genipina, za umrežavanje kompleksa želatin/NaKN, kao omotača mikrokapsula, je 2 mmola/g proteina.

18. Ispitivanjem uticaja interakcije između želatina i NaKN na efikasnost inkapsulacije vitamina C i E utvrđeno je da se najveća efikasnost mikrokapsulacije oba vitamina postiže pri koncentraciji NaKN od 0,5% (m/m), odnosno u uslovima formiranja nerastvornog koacervata proteina.

19. Na efikasnost mikrokapsulacije vitamina C i E i kinetiku njihovog otpuštanja ima uticaj i vrsta emulgatora korišćenog za stabilizaciju primarnih emulzija. Kod svih ispitivanih uzoraka mikrokapsula potvrđeno je da se oslobađanje vitamina C odvija prostom difuzijom. Kada se za stabilizaciju primarnih emulzija koristi 3% smeša PGPR:Caprol 10G10O masenog odnosa 1:1, moguće je dobiti mikrokapsule sa kontrolisanim oslobađanjem vitamina C (u toku 60 min) pri koncentracijama NaKN od 0,01; 0,1 i 0,5% (m/m) u smeši sa 1% želatinom, ali je efikasnost inkapsulacije najveća u uslovima formiranja nerastvornog koacervata oko kapi V/U/V emulzije (0,5% NaKN). Kada se za stabilizaciju primarne emulzije koristi 3% PGPR korelacija sa *Korsmeyer-Peppas*-ovim modelom ( $r > 0,95$ ) se uspostavlja za uzorke mikrokapsula sa 0,5; 1 i 3% (m/m) NaKN, s tim da je najveća vrednost koeficijenta korelacije za uzorak sa 0,5% (m/m) NaKN (aktivna supstanca se oslobađa tokom 60 minuta), dok se pri višim koncentracijama, korelacija blago narušava i skraćuje vreme oslobađanja aktivne materije.

## 6. LITERATURA

Abramović B., Anderluh V., Gaal F., Šojić D., Derivative spectrophotometric determination of the herbicides picloram and triclopyr in mixtures, *Journal of Serbian Chemical Society* 72 (2007) 809 – 819

Adachi T., Ida J., Wakita M., Preparation of spherical and porous chitosan particles by suspension evaporation with O/W/O multiple emulsions, *Polymer Journal* 31 (1999) 319 – 323

Agboola S. O., Dalglish D. G., Effect of pH and ethanol on the kinetics of destabilization of oil – in – water emulsions containing milk proteins, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72 (1996) 448 – 454

Aguilera J. M., Stanley D. W., *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering*, Aspen Publishers, Merilend (1999)

Almog J., Cohen Y., Azoury M., Hahn T. R., Genipin-a novel fingerprint reagent with colorimetric and fluorogenic activity, *Journal of Forensic Science* 49 (2004) 255 – 257

Anal A. K., Singh H., Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends in Food Science and Technology* 18 (2007) 240 – 251

Antonov Y. A., Goncalves M. P., Phase separation in aqueous gelatin- $\kappa$  carrageenan systems, *Food Hydrocolloids* 13 (1999) 517-524

Babayan V. K., Kaufman T. G., Lehman H., Tkaczuk R. J., Some uses and applications of polyglycerol esters in cosmetic and pharmaceutical preparations, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 15 (1964) 473 – 783

Bachtsi A. R., Kiparissides C., Synthesis and release studies of oil-containing poly(vinyl alcohol) microcapsules prepared by coacervation, *Journal of Controlled Release* 38 (1996) 49 – 58

Baken J. A., Anderson J. L., Microencapsulation, in Lacham L., Lieberman H. A., Kanig J. L., *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, Lea & Febiger, (1976) 420

Baracat M., Nakagawa A. M., Casagrande R., Georgetti S. R., Verri W. A., de Freitas O., Preparation and characterization of microcapsules based on biodegradable polymers: pectin/casein complex for controlled drug release

systems, *Journal of American Association of Pharmaceutical Scientists* 13 (2012) 364 – 372

Beckett S. T., *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, Blackwell Science, London (1999)

Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P., *Food Chemistry*, Heidelberg: Springer-Verlag (2009)

Benichou A., Aserin A., Garti N., Double emulsions stabilized by new recognition hybrids of natural polymers, *Polymers for Advanced Technologies* 13 (2002) 1019 – 1031

Benichou A., Aserin A., Garti N., Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters *Advances in Colloid and Interface Science*, 108 (2004) 29 – 41

Blijdenstein T. B. J., van Winden A. J. M., van Vliet T., van der Linden E., van Aken G. A., Serum separation and structure of depletion- and bridging-flocculated emulsions: a comparison, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 245 (2004) 41 – 48

Borrega R., Tribet C., Audebert R., Reversible gelation in hydrophobic polyelectrolyte/protein mixture-an example of cross-links between soft and hard colloids, *Macromolecules* 32 (1999) 7798 – 7806

Bos M. A., van Vliet T., Interfacial Rheological Properties of Adsorbed Protein Layers and Surfactants: a review, *Advances in Colloid and Interface Science* 91 (2001) 437

Boyd R. H., Phillips P. J., *The Science of Polymer Molecules*, Cambridge University Press, (1996) p. 330

Bungenberg de Jong H. G., Complex colloid systems, in Kruyt H. R., *Colloid Science*, Elsevier Publishing Company (1949b) p. 335-432.

Bungenberg de Jong H. G., Crystallisation- Coacervation- Flocculation, in Kruyt H. R., *Colloid Science*, Elsevier Publishing Company (1949a) p. 232-258.

Bungenberg de Jong H. G., Kruyt H. R., Coacervation (Partial miscibility in colloid systems), *Proceedings of the Royal Dutch Academy of Science* 32 (1929) 849-856

Bungenberg de Jong H. G., Morphology of coacervates, in Kruyt H. R., *Colloid Science*, Elsevier Publishing Company, (1949c) p. 433-480.

Bungenburg de Jong H. G., Kaas A. J., Zar Kennetus komplex-koazeration, in V. Mitteilung: Relative verschiebumer im elektrischen gleichstromfeide von flussigkeits-einschliebungen in komplex koazervatropfehen, *Biochemische Zeitschrift* 232 (1931) 338 – 345

Burgess D. J., Carless J. E., Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation, *Journal of Colloid and Interface Science* 98 (1984) 1-8

Burgess D. J., Carless, J. E., Manufacture of gelatin/gelatin coacervate microcapsules, *International Journal of Pharmaceutics* 27 (1985) 61-70

Burgess D. J., Kwok K. K., Megremis P. T., Characterization of albumin-acacia complex coacervation, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43 (1991) 232-236

Burgess D. J., Ponsart S.,  $\beta$ -Glucuronidase activity following complex coacervation and spray drying microencapsulation, *Journal of Microencapsulation* 15 (1998) 569 – 579

Caprioli I., O'Sullivan M., Monahan F. J., Use of sodium caseinate/glycerol edible films to reduce lipid oxidation in sliced turkey meat, *European Food Research and Technology* 228 (2009) 433 – 440

Carić M., *Tehnologija koncentrovanih i sušenih mlečnih proizvoda*, (1985) Naučna knjiga, Beograd

Carr A., Munro P., Reversible cold gelation of sodium caseinate solutions with added salt, *Journal of Dairy Research* 71 (2004) 126 – 128

Chang W.H., Chang Y., Lai P.H., Sung H.W., A genipin-crosslinked gelatin membrane as wound-dressing material: in vitro and in vivo studies, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14 (2003) 481 – 495

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

Chen Y. S., Chang J. Y., Cheng C. Y., Tsai F. J., Yoa C. H., Lui B. S., An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material, *Biomaterials* 26 (2005) 3911 – 3918

Cho Y. H., Decker E. A., McClements D. J., Competitive adsorption of mixed anionic polysaccharides at the surface of protein lipid droplets, *Langmuir* 25 (2009) 2654-2660

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

Cornec M., Wilde P. J., Gunning P. A., Mackie A. R., Husband F. A., Parker M. L., Clark D. C., Emulsion stability as affected by competitive adsorption between an oil – soluble emulsifier and milk proteins at the interface, *Journal of Food Science* 63 (1998) 39 – 43

Cournarie F., Savelli M. – P., Rosilo V., Bretez F., Vauthier C., Grossiord J. – L., Seiller, M., Insulin – loaded W/O/W multiple emulsions: comparison of the



performances of systems prepared with medium – chain – triglycerides and fish oil, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 (2004) 447

Dagleish D. G., Adsorption of protein and the stability of emulsions, *Trends in Food Science and Technology* 8 (1997) 1 – 6

Damodaran S., Food proteins: An overview, in Damodaran S., Paraf A., *Food Proteins and Their Applications*, Marcel Dekker (1997)

Dangaran K., Tomasula P. M., Qi P., Structure and function of protein – based edible films and coatings, u Ed. Embuscado M. E., Huber K. C., *Edible Films and Coatings for Food Application*, Springer (2009) London

Davis S., Round H., Purewal T., Ostwald ripening and the stability of emulsion systems: an explanation for the effect of an added third component, *Journal of Colloid and Interface Science* 80 (1981) 508

Day L., Seymour R. B., Pitts K. F., Konczak I., Lundin L, Incorporation of functional ingredients into food, *Trends in Food Science and Technology* 20 (2009) 388 – 395

de Bont P. W., van Kempen G. M. P., Vreeker R., Phase separation in milk protein and amylopectine mixtures, *Food Hydrocolloids* 13 (2002) 127 – 138

de Kruif C. G., Tuinier R., Polysaccharide protein interactions, *Food Hydrocolloids* 15 (2001) 555 – 563

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

Devi N., Hazarika D., Deka C., Kakati D. K., Study of complex coacervation of gelatin A and sodium alginate for microencapsulation of olive oil, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* 49 (2012) 936 – 945

Devi N., Maji T. K., Genipin crosslinked microcapsules of gelatin A and  $\kappa$ -carrageenan polyelectrolyte complex for encapsulation of Neem (*Azadirachata Indica A. Juss*) seed oil, *Polymer Bulletin* 65 (2010) 347 – 362

Dickinson E., *An Introduction to Food Colloids*, Oxford University Press (1992)

Dickinson E., Double emulsions stabilized by food biopolymers, *Food Biophysics* 6 (2011) 1

Dickinson E., Evison J., Owusu R. K., Preparation of fine protein stabilized water – in – oil – in – water emulsion, *Food Hydrocolloids* 5 (1991) 481 – 485

Dickinson E., Evison J., Owusu R. K., Williams A., Protein stabilized water – in – oil – in – water emulsions, in Phillips G. O., Williams P. A., Wedlock

D. J., Gums and stabilizers for the food Industry, Oxford: IRL Oxford University Press, (1994) 91 – 101

Dickinson E., Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers, *Food Hydrocolloids* 23 (2009) 1473 – 1482

Dickinson E., Hydrocolloids at interface and influence on the properties of dispersed systems, *Food Hydrocolloids* 17 (2003) 25 – 39

Dickinson E., Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein – polysaccharide interactions, *Soft Matter* 4 (2008) 932 – 942

Dickinson E., Lopez G., Comparison of the emulsifying properties of fish gelatin and commercial milk proteins, *Journal of Food Science* 66 (2001) 118 – 123

Dickinson E., McClements D. J., *Advances in Food Colloids*, Chapman & Hall (1995) London

Dickinson E., Pawlowsky K., Effect of  $\iota$ -carageenan on flocculation, creaming and rheology of a protein stabilized emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997) 3799 – 3806

Dickinson E., Proteins at interfaces and in emulsions. Stability, rheology and interactions., *Journal of Chemistry Society, Faraday Transactions* 94 (1998) 1657-1669

Dickinson E., Proteins in solution and at interface, in Goddard E. D., Ananthapadmanbhan K. P., *Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins*, CRC Press (1993) 295

Dickinson E., Semenova M. G., Antipova A. S., Salt stability of casein emulsions, *Food Hydrocolloids* 12 (1998) 227 – 235

Dickinson E., Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions, *Trends in Food Science and Technology* 9 (1998) 347-354

Djerassi C., Nakano T., James A. N., Zalkow L. H., Eisenbraun E. J., Shoolery J. N., Terpenoides. XLVII. The structure of genipin, *Journal of Organic Chemistry* 26 (1961) 1192 – 1206

Dobrynin A. V., Rubinstein, M., *Theory of Polyelectrolytes in Solution and at Surfaces*, *Progress in Polymer Science* 30 (2005) 1049

Domenek S., Petit E., Mezdour S., Brambati N., Ridoux C., Guedj S., Michon C., Influence of concentration and ionic strength on the adsorption kinetics of gelatin at the air/water interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 331 (2008) 48

Dong W., Bodmeier R., Encapsulation of lipophilic drugs within enteric microparticles by a novel coacervation method, *International Journal of Pharmaceutics* 326 (2006) 128 – 138

Dormann P., Functional diversity of tocochromanols in plants, *Planta* 225 (2002) 269-276

Doublier J.-L., Garnier C., Renard D., Sanchez C., Protein-polysaccharide interactions, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 5 (2000) 202-214

Dubey R., Shami T. C., Bhasker Rao K. U., Microencapsulation technology and application, *Defence Science Journal* 59 (2009) 82 – 95

Dubin P. L., Gao J., Mattison K., Protein purification by selective phase separation with polyelectrolytes, *Separation and Purification Methods* 23 (1994) 1-16

Ducel V., Richard J., Saulnier P., Popineau, Y., Boury, F., Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 232 (2004) 239 – 247

Daković, Lj., Koloidna hemija, Tehnološki fakultet, Zavod za izdavanje udžbenika (1990)

Daković Lj., Milošević S., Sovilj V., Influence of surfactants on the rheological behavior of starch/gelatin gels and gel-emulsions, *Starch/ Staerke* 46 (1994) 266 – 272

Daković Lj., Sovilj V., Milošević S., Rheological behavior of thixotropic starch and gelatin gels, *Starch/ Staerke* 10 (1990) 380 – 385

Endo T., Taguchi H., The constituents of *Gardenia jasminoides* geniposide and genipin-geitobioside, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 21 (1973) 2684 – 2688

Ficheux M. F., Bonakdar L., Leal-Calderon F., Bibette J., Some stability criteria for double emulsions, *Langmuir* 14 (1998) 2702 – 2706

Florence A. T., Whitehill D., Stability and stabilization of water – in – oil – in – water multiple emulsions, in Shah D. O., *Macro – and Microemulsions: Theory and Applications*, ACS Symp. Ser. Washington, DC: American Chemical Society (1985) 359 – 380

Forster S., Schmidt M., Polyelectrolytes in solution, *Advances in Polymer Science* 120 (1995) 51 – 133

Fredrokumbaradzi E., Simov A., Effect of bovin serum albumin (BSA) on release of sulfacetamide sodium from multiple W/O/W emulsions, *Pharmazie* 47 (1992) 388 – 389

Galazka V. B., Smith D., Ledward D. A., Dickinson E., Complexes of bovin serum albumin with sulphated polysaccharides: effect of pH, ionic strength and high pressure treatments, *Food Chemistry* 64 (1999) 303-310

Gao B., Sharma M. M., A family of alkyl sulfate gemini surfactants. 2. Water-oil interfacial tension reduction, *Journal of Colloid and Interface Science* 407 (2013) 375 – 381

Garti N., Bispernik C., Double emulsions: progress and application, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 3 (1998) 657

Garti N., Wicker L., Pectin methylesterase modified pectin interaction with whey protein isolate and stability of double emulsions, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society, American Chemical Society, Washington, DC* 229 (2005) U295 – U296 119 – CELL Part 1

Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R., Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, *Food Research International* 40 (2007) 1107 – 1121

Ghorbani Gorji S., Ghorbani Gorji E., Amin Mohammadifar M., Characterisation of gum tragacanth (*Astragalus gossypinus*)/sodium caseinate complex coacervation as a function of pH in an aqueous medium, *Food Hydrocolloids* 34 (2014) 161 – 168

Glicksman M., *Gum Technology in the Food Industry*, Academic Press (1969) New York str. 359

Green B. K., U. S. Patent: 2,712,507 (1955)

Griffin W. C., Calculation of HLB values of non-ionic surfactants, *Journal of Cosmetic Science* 5 (1954) 249 – 256

Griffin W. C., Classification of surface-active agents by "HLB", *Journal of Cosmetic Science* 1 (1949) 311 – 326

Grinberg V. Y., Tolstoguzov V. B., Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions, *Food Hydrocolloids* 11 (1997) 145 – 158

Gu Y. S., Decker E. A., McClements D. J., Influence of pH and  $\kappa$ -carageenan concentration on physicochemical properties and stability of  $\beta$ -lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsions *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 3626-3632

Gulseren I., Correding M., Interactions between polyglycerol polyricinolate (PGPR) and pectins at the oil-water interface and their influence on the stability of water-in-oil emulsions, *Food Hydrocolloids* 34 (2014) 154 – 160

Hara M., *Polyelectrolytes: Science and Technology*, Marcel Dekker (1992)

Harnsilawat T., Pongsawatmanit R., McClements D. J., Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin – sodium alginate interactions in aqueous solution: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study, *Food Hydrocolloids* 20 (2006b) 577 – 585

Harnsilawat T., Pongsawatmanit R., McClements D. J., Stabilization of model beverage cloud emulsions using protein-polysaccharide electrostatic complexes formed at the oil-water interface, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006a) 5540 – 5547

Hasenhuettl G. L., Hartel R. W., *Food emulsifiers and their applications*, Springer (2008) New York

Herbert W. J., Multiple emulsions: a new form of mineral – oil antigen adjuvant, *Lancet* 2 (1965) 771

Hill S. E., Emulsions and Foams. In Hill, S. E., Ledward, D. A., Mitchell, J. R., *Functional Properties of Food Macromolecules*, Aspen Publishers, Inc., (1998) 302

Ho C., Waugh D. F., Interactions of bovine caseins with divalent Cations<sup>1</sup>, *Journal of American Chemical Society* 87 (1965) 889 – 892

Holmberg K., Jonsson B., Kronberg B., Lindman B., *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, John Wiley and Sons (2002) 93

Hongmei C., Wei O., Christopher M., Satya P., Genipin cross-linked polymeric alginate-chitosan microcapsules for oral delivery: In-vitro analysis, *International Journal of Polymer Science* 2009 (2009) 1 – 16

Howell N. K., *Chemical and Enzymatic Modifications*, in Ed. Nakai S., Modler H. W., *Food Proteins Properties Characterisation*, Wiley-VCH (1996)

Hsieh D., Controlled release systems: past, present and future, in Hsieh D. Ed., *Controlled Release Systems: Fabrication Technology*, CRC Press (1998) Florida

Hu M., McClements D. J., Decker E. A., Lipid oxidation in corn oil – in – water emulsions stabilized casein, whey protein isolate, and soy protein isolate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 1696 – 1700

Huang K. S., Lu K., Yeh C. S., Chung S. R., Lin C. H., Yang C. H., Dong Y. S., Microfluidic controlling monodisperse microdroplet for 5-fluorouracil loaded genipin-gelatin microcapsules, *Journal of Controlled Release* 137 (2009) 15 – 19

Huang L. L., Sung H. W., Tsai C. C., Huang D. M., Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent, *Journal of Biomedical Materials Research* 42 (1998) 568 – 576

Huang Q., Yu H., Ru Q., Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology, *Journal of Food Science* 75 (2010) 50 – 57

Huang Y. I., Cheng Y., Yu C., Tsai T., Cham T., Microencapsulation of extract containing shikonin using gelatin-acacia coacervation method: a formaldehyde-free approach, *Colloids and Surfaces B: Biointerface* 58 (2007) 290 – 297

Hunt J. A., Dalgleish D. G., Heat stability of oil – in – water emulsions containing milk proteins: Effect of ionic strength and pH, *Journal of Food Science* 60 (1995) 1120 – 1123

Hussain M. R., Maji T. K., Preparation of genipin cross-linked chitosan-gelatin microcapsules for encapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) using salting-out method, *Journal of Microencapsulation* 25 (2008) 414 – 420

Jourdain L., Leser M. E., Schmitt C., Michel M., Dickinson E., Stability of emulsions containing caseinate and dextran sulfate: Relationship to complexation in solution, *Food Hydrocolloids* 22 (2008) 647-659

Jourdain L., Schmitt C., Leser M. E., Murray B. S., Dickinson E., Mixed layers of sodium caseinate + dextrane sulfate: Influence of order of addition to oil-water interface, *Langmuir* 25 (2009) 10026-10037

Kabalnov A., Thermodynamic and theoretical aspects of emulsions and their stability, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 3 (1998) 270 – 275

Kaibara K., Okazaki T., Bohidar H. B., Dubin P. L., pH-induced coacervation in complexes of bovine serum albumine and cationic polyelectrolytes, *Biomacromolecules* 1 (2000) 100-107

Kanouni M., Rosano H. L., Naouli N., Preparation of a stable double emulsion ( $W_1/O/W_2$ ): role of the interfacial films on the stability of the system, *Advances in Colloid and Interface Science* 99 (2002) 229 – 254

Karlson, P., *Biohemija*, Školska knjiga Zagreb (1988)

Karsa D. R., Stephenson R. A., *Encapsulation and Controlled Release*, Royal Society of Chemistry (1993) Cambridge

Katona J., *Primena polimer-polimer nekompatibilnosti za mikrokapsulaciju ulja metodom koacervacije*, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad (2010)

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

Katona J., Sovilj V., Petrović L., Rheological investigation on dynamic and structure of separated phase in polymer mixture-ionic surfactant ternary system, *Carbohydrate Polymers* 74 (2008) 193 – 200

Keenan T. R., Gelatin, u Mark H. F., Kroschwitz J. I., *Encyclopedia in Polymer Science and Technology*, John Wiley and Sons (2003) str. 311

Keogh M. K., Galazka V. B., O'Kennedy B. T., O'Callaghan D. J., Rheology of sodium caseinate-gelatin mixtures, *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 37 (1998) 209-218

Khalid N., Kobayashi I., Neves M. A., Uemura K., Nakajima M., Preparation and characterization of water-in-oil-in-water emulsions containing a high concentration of L-ascorbic acid, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 77 (2013) 120870-1 – 8

Kizilay E., Kayitmazer A. B., Dubin P. L., Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids, *Advances in Colloid and Interface Science* 167 (2011) 24 – 37

Klinkesorn U., Sophanodora P., Chinachoti P., McClements D. J., Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrine, *Food Research International* 37 (2004) 851 – 859

Kondo T., in ed. Matijevic E., *Surface and Colloid Science*, Plenum Press, (1978) New York

Korbstein – Hajda A., Dickinson E., Stability of water – in – oil – in – water emulsions containing faba bean proteins, *Food Hydrocolloids* 10 (1996) 251 – 254

Kragel J., Siegel S., Miller R., Surface shear rheological studies of protein adsorption layer, *Progress in Colloid and Polymer Science* 97 (1994) 183 – 187

Kurskaja E. A., Vajnerman E. S., Rogozin S. V., On complex formation of acid-processed and alkaline-processed gelatins, *Die Nahrung* 23 (1979) 581-588

Lam P. L., Gambari R., Advanced progress of microencapsulation technology: *In vivo* and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries, *Journal of Controlled Release* 178 (2014) 25 – 45

Lauridsen J. B., Food Emulsifiers: Surface activity, edibility, manufacture, composition, and application, *Journal of the American Oil Chemists Society* 53 (1976) 400 – 407

Lazaridou A., Biliaderis C. G., Izydorczyk Molecular Size Effects on Rheological Properties of Oat  $\beta$ -glucans in Solution and Gels, *Food Hydrocolloids* 17 (2003) 693

Lazko J., Popineau Y., Legrand J., Soy glicinin microcapsules by simple coacervation method, *Colloids and Surfaces B: Biointerface* 37 (2004) 1 – 6

Levinton-Shamuilov G., Cohen Y., Azoury M., Chaikovsky A., Almog J., Genipin, a novel fingerprint reagent with colorimetric and fluorogenic activity, Part II: Optimization, Scope, and Limitations, *Journal of Forensic Science* 50 (2005) 1367 – 1371

Liang H. C., Chang W. H., Liang H. F., Lee M. H., Sung H. W., Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water soluble carbodiimide, *Journal of Applied Polymer Science* 91 (2004) 4017 – 4026

Liu J., Verespej E., Alexander M., Correding M., Comparison on the effect of high – methoxyl pectin or soybean – soluble polysaccharide on the stability of sodium caseinate – stabilized oil/water emulsions, *Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 6270 – 6278

Liu L., Zhao Q., Liu T., Zhao M., Dynamic surface pressure and dilatational viscoelasticity of sodium caseinate/xanthan gum mixtures at the oil-water interface, *Food Hydrocolloids* 25 (2011) 921-927

Lobato – Calleros C., Rodriguez E., Sandoval – Castilla O., Vernon – Carter E. J., Alvarez – Ramirez J., Reduced – fat white fresh cheese – like products obtained from W/O/W multiple emulsions: Viscoelastic and high – resolution image analyses, *Food Research International* 39 (2006) 678

Lobo L., Coalescence during emulsification: 3. Effect of gelatin on rupture and coalescence, *Journal of Colloid and Interface Science* 254 (2002) 165 – 174

Lutz R., Aserin A., Wicker L., Garti N., Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74 (2009) 178

Maji T. K., Hussain M. R., Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in genipin crosslinked chitosan-gelatin complex for mosquito repellent application, *Journal of Applied Polymer Science* 111 (2009) 779 – 785

Martins I. M., Barreiiro M. F., Coelho M., Rodrigues A. E., Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic application, *Chemical Engineering Journal* 245 (2014) 191 – 200

Mathis R., Mehling A., Textiles with cosmetic effects, *Handbook of Medical Textiles* (2011) 153 – 172

Mattison K. W., Brittain I. J., Dubin P. L., Protein-polyelectrolyte phase boundaries. *Biotechnology Progress* 11 (1995) 632 – 637

Mauguet M. C., Legrand J., Brujes L., Carnelle G., Larre C., Popineau Y., Gliadin matrices for microencapsulation processes by simple coacervation method, *Journal of Microencapsulation* 19 (2002) 377 – 384

Maydani Y., Multiple emulsions based on lysozyme as emulsifier, Graduate thesis (1994) Hebrew University of Jerusalem

McClements D. J., Biopolymers in food emulsions, in Kasapis S., Norton I. T., Ubbink J. B., *Modern Biopolymer Science*, Elsevier (2009)

McClements D. J., *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*, (2nd ed.) Boca Raton: CRC Press (2004)

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



McClements D. J., Protein-stabilized emulsions, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 9 (2004) 305-313

McIntyre R. T., Polyglycerol esters, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56 (1979) 835–840

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

Moreau D. L., Rosenberg M., Porosity of whey protein-based microcapsules containing anhydrous milkfat measured by gas displacement pycnometry, *Journal of Food Science* 63 (1998) 819 – 823

Muller H. J., Hermel H., On the relation between molecular-mass distribution of gelatin and its ability to stabilize emulsions, *Colloid and Polymer Science* 242 (1994) 433 – 439

Neiryneck N., Van Ient K., Dewettinck K., Van der Meeren P., Influence of pH and biopolymer ratio on sodium caseinate-guar gum interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions, *Food Hydrocolloids* 21 (2007) 862 – 869

Nelson D. L., Cox M. M., *Principles of Biochemistry*, Worth, 2000

Nelson G., Application of microencapsulation in textiles, *International Journal of Pharmaceutics* 242 (2002) 55 – 62

Norn V., Polyglycerol esters, in *Emulsifiers in Food Technology*, Whitehurst R. J., Ed., (2008)

O'Brien R. D., *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications*, CRC Press Taylor & Francis Group, New York (2010) 320

O'Regan J., Mulvihill D. M., Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate-maltodextrine conjugates, *Food Chemistry* 115 (2009) 1257 – 1267

Oh C., Park J. H., Shin S., Oh S. G., O/W/O multiple emulsions via one – step emulsification process, *Journal of Dispersion Science and Technology* 25 (2004) 53 – 62

Okochi, H., Nakano, M., Preparation and evaluation of W/O/W type emulsions containing vancomycin, *Advanced Drug Delivery Reviews* 45 (2000) p. 5

Oliveira A. C., Moretti T. S., Bochini C., Baliero J. C. C., Freitas O., Favaro-Trindade C. S., Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying, *Journal of Microencapsulation* 24 (2007) 685 – 693

Olsen A. G., Seltzer E., US Patent, (1945)

Omotosho M. A., Law K. T., Whateley T. L., Florence A. T., The stabilization of W/O/W emulsions by interfacial interaction between albumin and non-ionic surfactant, *Colloid Surfaces* 20 (1986) 133 – 143

Onesippe C., Lagerge S., Study of the complex formation between sodium dodecyl sulphate and gelatin, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 337 (2009) 61 – 66

Overbeek J. T. G., Voorn M. J., Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of Complex Coacervation, *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 49 (1957) 7-26

Ozer O., Muguet V., Roy E., Grossiord J. L., Siller M., Stability study of W/O/W viscified multiple emulsions, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 26 (2000) 1185 – 1189

Pakzad H., Alemzadeh I., Kazemii A., Encapsulation of peppermint oil with arabic gum -gelatin by complex coacervation method, *International Journal of Engineering* 26 (2013) 807 – 814

Palmieri G. F., Martell S., Lauri D., Wehrle P., Gelatin-acacia complex coacervation as a method for ketoprofen microencapsulation, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 22 (1996) 951 – 957

Park J. E., Lee J. Y., Kim H. G., Hahn T. R., Paik Y. S., Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *Gardenia jasminoides*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002) 6511 – 6514

Park J. M., Muhoberac B. B., Dubin P. L., Xia J., Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation, *Macromolecules* 25, (1992) 290-295

Patel A. R., Velikov K. P., Colloidal delivery systems in food, *Food Science and Technology*, 44 (2011) 1958 – 1964

Paul A. Cantor A., Shum-Tim D., Prakash S., Superior cell delivery features of genipin crosslinked polymeric microcapsules: preparation, in vitro characterization and pro-angiogenic applications using human adipose stem cells, *Molecular Biotechnology* 48 (2011) 116 – 127

Pays, K., Giermanska – Kahn, J., Poulihny, B., Bibette, J., Lael – Calderon, F., Double emulsions: how does release occur?, *Journal of Controlled Release* 79 (2002) 193

Pekmezci D., Vitamin E and immunity, *Vitamins and Hormones* 86 (2011) 179-215

Pitkowski A., Durand D., Nicolai T., Structure and dynamical mechanical properties of suspensions, *Journal of Colloid and Interface Science* 326 (2008) 96 – 102

Porcar I., Cottet H., Gareil P., Tribet C., Association between protein particles and long amphiphilic polymers – effect of the polymer hydrophobicity on binding isotherms, *Macromolecules* 32 (1999) 3922 – 3929

Quinn P. J., Molecular associations of vitamin E, in Ed. Litwack G., *Vitamin E. Vitamins and Hormones, Volume 76*, Elsevier Inc. (2007) San Diego

Rehm H., *Protein Biochemistry and Proteomics*, Academic Press (2006)

Robins M. M., Emulsions-creaming phenomena, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 5 (2000) 265 – 272

Rosano H., Gandolfo F., Hidrot J. – D., Stability of W1/O/W2 multiple emulsions. Influence of ripening and interfacial interactions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 138 (1998) 109

Rosen M. J., *Surfactants and Interfacial Phenomena*, John Wiley & Sons, Inc. (2004) New Jersey

Ross Y. H., Phase transition and transformation in food systems, in Heldman D. R., Lund D. B., Sabliov C., *Handbook of Food Engineering*, CRC Press (2006)

Saravanan M., Bhaskar K., Srinivasa Rao G., Dhanaraju M. D., Ibuprofen-loaded ethylcellulose/polystyren microspheres: an approach to get prolonged drug release with reduced burst effect and low ethylcellulose content, *Journal of Microencapsulation* 20 (2003) 289 – 302

Sato H., Ueberreiter K., Surface tension of aqueous gelatin solutions, 1, concentration dependence, *Macromolecular Chemistry* 180 (1979) 829 – 835

Schmidts T., Dobler D., Guldan A. C., Paulus N., Runkel F., Multiple W/O/W emulsions-Using the required HLB for emulsifier evaluation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 372 (2010) 48 – 54

Schmidts T., Dobler D., Schlupp P., Nissing C., Garn H., Runkel F., Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier systems of oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability, *International Journal of Pharmaceutics* 398 (2010) 107

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

Schmitt C., Sanchez C., Thomas F., & Hardy J., Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium, *Food Hydrocolloids* 13 (1999) 483-496

Schmitt C., Turgeon S. L., Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food system, *Advances in Colloid and Interface Science* 167 (2011) 63 – 70

Schulz P. C., Rodriguez M. S., Del Blanco L. F., Emulsification properties of chitosan, *Journal of Colloid and Polymer Science* 276 (1998) 1159 – 1165

Seifriz W., Studies in emulsions, *Journal of Physical Chemistry A*, 29 (1925) 738

Sen C. K., Khanna S., Roy S., Tocotrienols in health and disease: The other half of the natural vitamin E family, *Molecular Aspects of Medicine* 28 (2007) 692-728

Shima M., Morita J., Yamashita M., Adachi S., Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion, *Food Hydrocolloids* 20 (2006a) p. 1164

Shima M., Tanaka M., Fujii T., Egawa K., Kimura Y., Adachi S., Matsuno R., Oral administration of insulin included in fine W/O/W emulsions to rats, *Food Hydrocolloids* 20 (2006b) p. 523

Silva D. F., Favaro-Trindade C. S., Rocha G. A., Thimazini M., Microencapsulation of lycopene by gelatin-pectin complex coacervation, *Journal of Food Processing and Preservation* 36 (2012) 185 – 190

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

Sovilj V., Dokić P., Influence of shear rate on gelation of biopolymers solution, *Progress in Colloid and Polymer Science* 102 (1996) 15 – 18

Sovilj V., Fizička hemija polimera, *Praktikum za vežbe*, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, (1996)

Sovilj V., Makromolekuli u procesima mikrokapsulacije, *Tehnološki fakultet Novi Sad*, Novi Sad (2000)

Sovilj V., Milanovic J., Petrovic, L., Viscosimetric and tensiometric investigations of interactions between gelatin and surface active molecules of various structures, *Food Hydrocolloids* 32 (2013) 20 – 27

Srinivasan M., Singh H., Munro P. A., Formation and stability of sodium caseinate emulsions: influence of retorting (121°C for 15 min) before or after emulsification, *Food Hydrocolloids* 16 (2002) 153 – 160

Staisby G. The physical chemistry of gelatin in solution, in Ward A. G., Courts A., *The Science and Technology of Gelatin*, Academic Press (1977)

Stamkulov N. S., Mussabekov K. B., Aidarova S. B., Luckham P. F., Stabilisation of emulsions by using a combination of an oil soluble ionic

surfactant and water soluble polyelectrolytes. I: Emulsions stabilisation and Interfacial tension measurements, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 335 (2009) 103 – 106

Stauffer C. E., *Emulsifiers for the food industry*, in Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Shahidi F., Ed., John Wiley & Sons (2005) New York

Su J., Flanagan J., Hemar Y., Singh H., Synergistic effects of polyglycerol esters of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water – oil – water emulsions, *Food Hydrocolloids* 20 (2006) 261 – 268

Sung H. W., Huang R. N., Huang L. L. H., Tsai C. C., In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 10 (1999) 63 – 78

Sung H.W., Huang D.M., Chang W.H., Huang R.N., Hsu J.C., Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study, *Journal of Biomedical Materials Research* 46 (1999) 520 – 530

Surh J., Decker E. A., McClements D. J., Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium – caseinate stabilized oil – in – water emulsions, *Food Hydrocolloids* 20 (2006) 607 – 618

Surh J., Decker E. A., McClements D. J., Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin, *Food Hydrocolloids* 20 (2006) 596 – 606

Surh J., Gu Y. S., Decker E. A., McClements D. J., Influence of environmental stresses on stability of o/w emulsions containing cationic droplets stabilized by SDS-fish gelatin membranes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 4236 – 4244

Surmeian M., Simultaneous determination of ascorbic acid, pyridoxine hydrochloride and tyrosine by derivative UV spectrophotometry, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 24 (1998) 691 – 696

Tadros T. F., *Emulsions formation, stability and rheology*, in Ed. Tadros T. F., *Emulsion Formation and Stability*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. (2013)

Tiebackx F. W. Z., Gleichzeitige Ausflockung zweier Kolloide, *Chemie und Industrie der Kolloide* (1911) 198-201.

Tirrell M., *Fundamentals in Polymer Solutions*. In Goddard, E. D., Ananthapadmanbhan, K. P., *Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins*, CRC Press (1993) p. 60

Toledano O., Magdassi S., Emulsification and foaming properties of hydrophobically modified gelatin, *Journal of Colloid and Interface Science* 200 (1998) 235 – 240

Tolstoguzov V. B., Some thermodynamic considerations in food formulations, *Food Hydrocolloids* 17 (2003) 1 – 23

Tolstoguzov V.B., Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages, *Critical Reviews in Biotechnology* 22 (2002) 89-174

Touyama R., Inoue K., Takeda Y., Yatsuzuka M., Ikumoto T., Moritome N., Shingu T., Yokoi T., Intuye H., Studies of the blue pigments produced from genipin and methylamine. II. On the formation mechanisms of brownish-red intermediates leading to the blue pigment formation, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 42 (1994) 1571 – 1578

Trikkonen S., Turakka L., Paronen P., Microencapsulation of indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in presence of surfactants, *Journal of Microencapsulation* 11 (1994) 615 – 626

Tuinier R., Dhont J. K. G., de Kruif C. G., Depletion – induced phase separation of aggregated whey protein colloids by an exocellular polysaccharide, *Langmuir* 16 (2000) 1497 – 1507

Tuinier R., Rieger J., de Kruif C. G., Depletion – induced phase separation in colloid – polymer mixtures, *Advances in Colloid and Interface Science* 103 (2003) 1 – 31

Turgeon S. L., Beaulieu M., Schmitt C., Sanchez C., Protein – polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects, *Current opinion in colloid and interface science* 8 (2003) 401-414

Umer H., Nigam H., Tamboli A. M., Sundara Moorthi Nainar M., Microencapsulation: Process, techniques and applications, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2 (2011) 474 – 481

Varadaraj R., Bock J., Zushma S., Brons N., Colletti T., Effect of hydrocarbon chain branching on interfacial properties of monodisperse ethoxylated alcohol surfactants, *Journal of Colloid and Interface Science* 147 (1991) 387 – 395

Vaziri A., Warburton B., Some preparative variable influencing the properties of W/O/W multiple emulsions, *Journal of Microencapsulation* 11 (1994) 649 – 656

Velikov K. P., Pelan E., Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals, *Soft Matter* 4 (2008) 1964

Verrax J., Cadrobbi J., Delvaux M., Jamison J. M., Gilloteaux J., Summers J. L., Taper H. S., Calderon P. B., The association of vitamins C and K3 kills cancer cells mainly by autophagy, a novel form of cell death. Basis of their potential use as adjuvants in anticancer therapy, *European Journal of Medicinal Chemistry* 38 (2003) 451 – 457

Verrax J., Stockis J., Tison A., Taper H. S., Calderon P. B., Oxidative stress by ascorbate/menadion association kills K562 human chronic myelogenous

leukaemia cells and inhibits its tumour growth in nude mice, *Biochemical Pharmacology* 72 (2006) 671 – 680

Vinetsky Y., Magdassi S., *Microcapsules in Cosmetics*, in Magdassi S., Touitou E., eds., *Novel Cosmetic Delivery Systems*, CRC Press (1998) New York

Walastra P., Casein sub – micelles: Do they exist? *International Dairy Journal*, 9 (1999) 189 – 192

Walstra P., *Physical Chemistry of Food*, Marcel Decker (2003) New York

Walter E., Moelling K., Pavlovic J., Merkle H. P., Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics, *Journal of Controlled Release* 61 (1999) 361 – 347

Wang Y-f., Gao J. Y., Dubin P. L., Protein separation via polyelectrolyte coacervation: selectivity and efficiency, *Biotechnology Progress* 12 (1996) 356-362

Washington C., Drug release from microdisperse systems: a critical review, *International Journal of Pharmaceutics* 58 (1990) 1 – 12

Weib G., Knoch A., Laicher A., Stanislaus F., Daniels R., Simple coacervation of hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP): II. Microencapsulation of ibuprofen, *International Journal of Pharmaceutics* 124 (1995) 97 – 105

Weinbreck F., de Vries R., Schrooyen P., de Kruif C. G., Complex coacervation of whey proteins and gum arabic, *Biomacromolecules* 4 (2003) 293 – 303

Weinbreck F., Nieuwenhuijse H., Robijn G. W., de Kruif C. G., Complexation of whey proteins with carageenan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 3550-3555

Weiss J., Scherze I., Muschiolik G., Polysaccharide gel with multiple emulsions, *Food Hydrocolloids* 12 (2005) 605 – 615

Wilson N., Shah N. P., Microencapsulation of Vitamins, *ASEAN Food Journal* 14 (2007) 1 – 14

Wilson R., Van Schie B., Howes D., Overview of the preparation, use and biological studies on polyglycerol polyricinolate (PGPR), *Food and Chemical Toxicology* 36 (1998) 711 – 718

Wollenweber C., Makievski A. V., Miller R., Daniels R., Adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect on emulsion stability, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 172 (2000) 91 – 101

Wu K. G., Xiao Q., Microencapsulation of fish oil by simple coacervation of hydroxypropyl methylcellulose, *Chinese Journal of Chemistry* 23 (2005) 1569 – 1572

Xia J., Dubin P. L., Kokufuta E., Havel H., Muhoberac B. B., Light scattering, CD, and ligand binding studies of ferrihemoglobin-polyelectrolyte complexes, *Biopolymers* 50 (1999) 153-161

Yang Y., Anvari M., Pan C., Chung D., Characterization of interactions between fish gelatin and gum arabic aqueous solution, *Food Chemistry* 135 (2012) 555-561

Yao C.H., Lui B.S., Hsu S.H., Chen Y.S., Cavariial bone response to tricalcium phosphate-genipin crosslinked gelatin composite, *Biomaterials* 26 (2005) 3065 – 3074

Yoshida K., Sekine T., Matsuzaki F., Yanaki T., Yamaguchi M., Stability of vitamin A in O – in – water – in – oil – type multiple emulsions, *Journal of American Oil Chemists' Society* 76 (1999) p. 1

Yu S. C., Bochot A., Cheron M., Seiller M., Grossiord J. L., Le Bas G., Duchene D., Design and evaluation of an original o/w/o multiple emulsion, *STP Pharmaceutical Science* 9 (1999) 273 – 277

Yuan Y., Chesnutt B. M., Utturkar G., Haggard W. O., Yang Y., Ong J. L., Bumgardner J. D., The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release, *Carbohydrate Polymers* 68 (2007) 561 – 567

Yun-xia X., Hai-yan Y., Jian Y., Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybeen protein isolate/gum arabic, *Food Chemistry* 125 (2011) 1267 – 1272

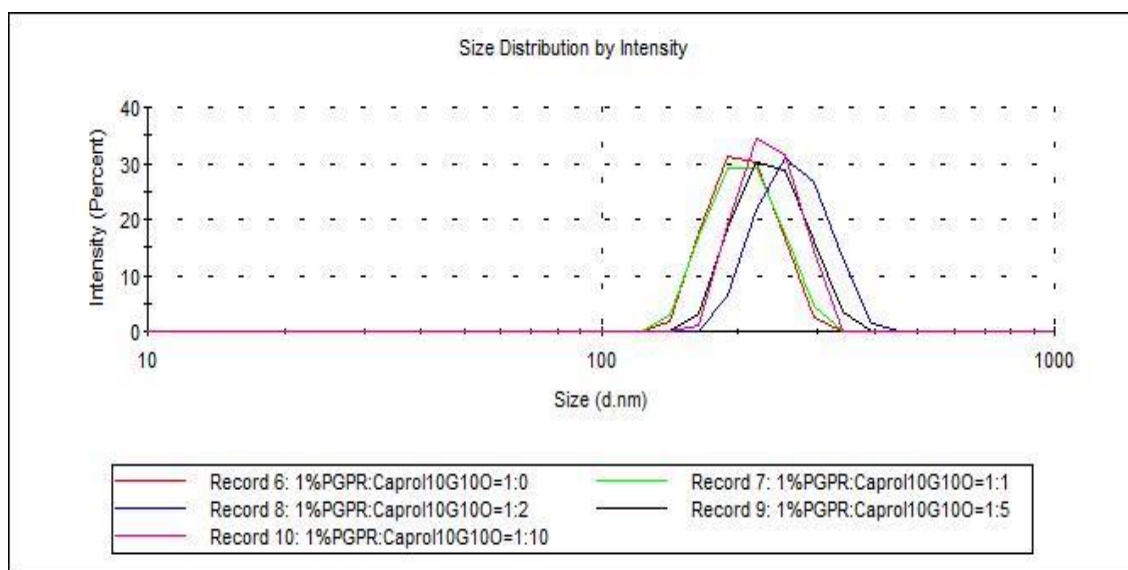
Zhang W., Miyakawa T., Uchida T., Goto S., Preparation of stable W/O/W type multiple emulsion containing water – soluble drugs and in – vitro evaluation of its drug releasing properties, *Journal of Pharmaceutical Society of Japan* 112 (1992) 73 – 80

Zinoviadou K. G., Scholten E., Moschakis T., Biliaderis C. G., Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate-chitosan complexes, *International Dairy Journal* 26 (2012) 94-101

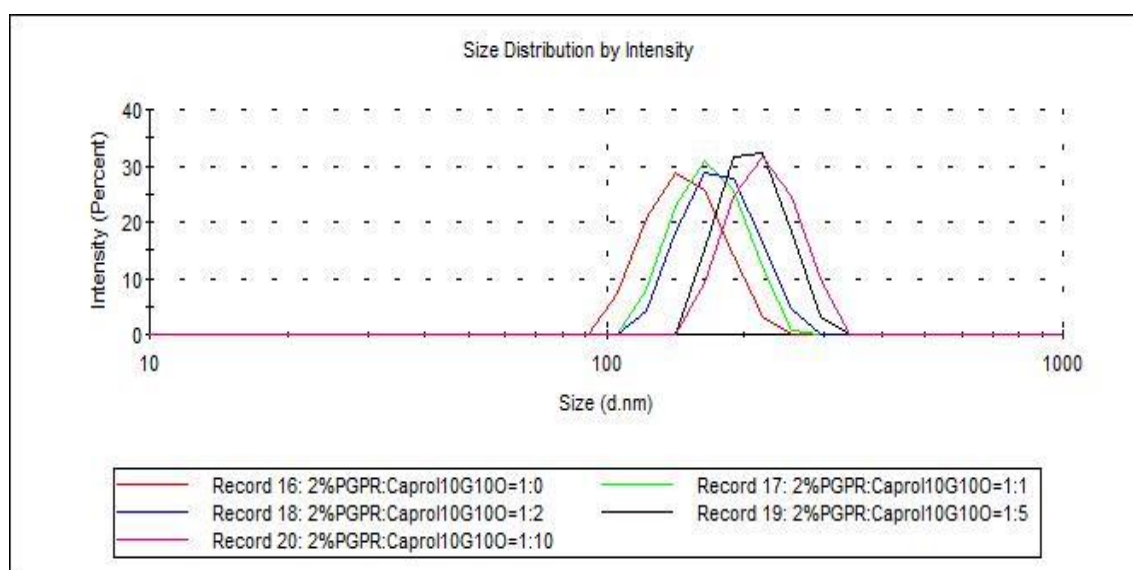
Zuanon L. A. C., Malacrida C. R., Telis V. R. N., Production of turmeric oleoresin microcapsules by complex coacervation with gelatin-gum arabic, *Journal of Food Process Engineering* 36 (2013) 364 – 373



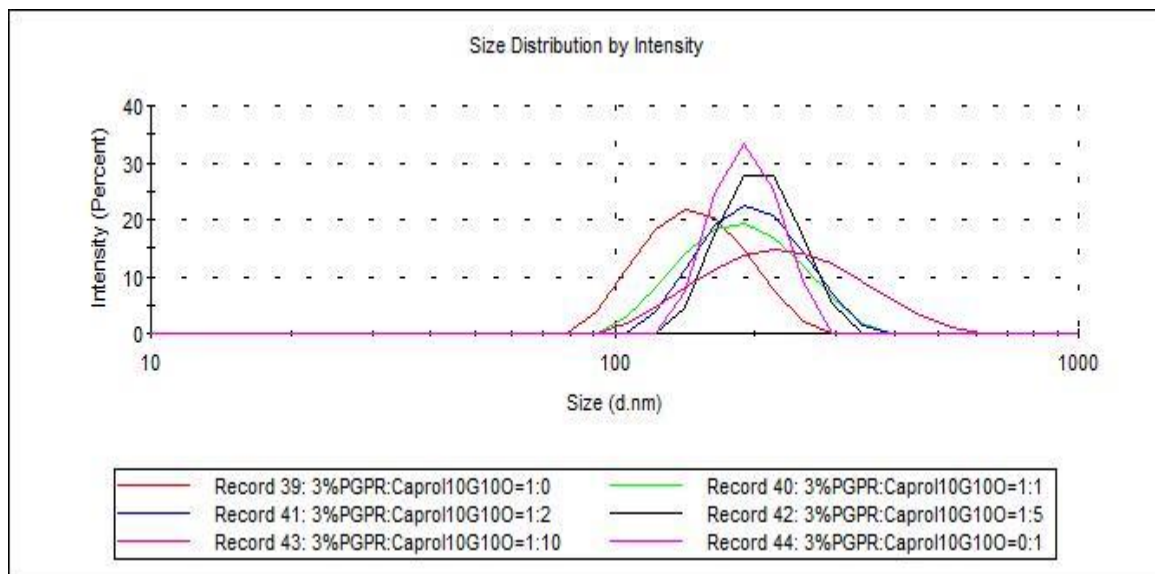
## 7. PRILOG



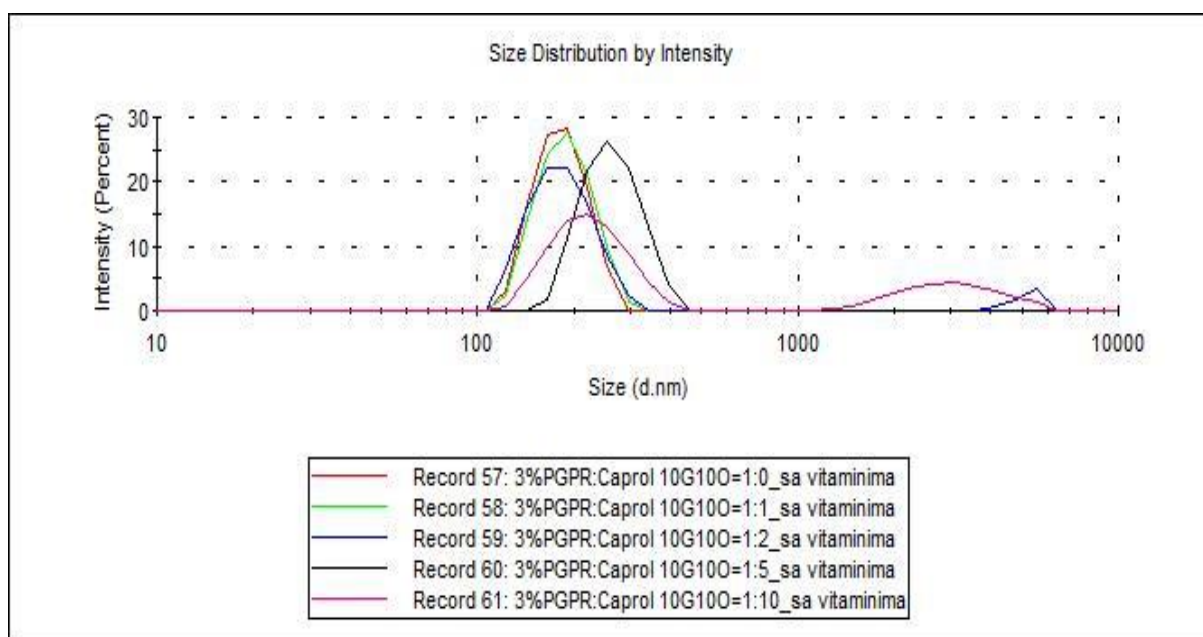
Slika P1. Krive raspodele veličina kapi 20% emulzija V/U stabilizovanih smešom emulgatora PGPR:Caprol 10G100 ukupne koncentracije 1% (m/v)



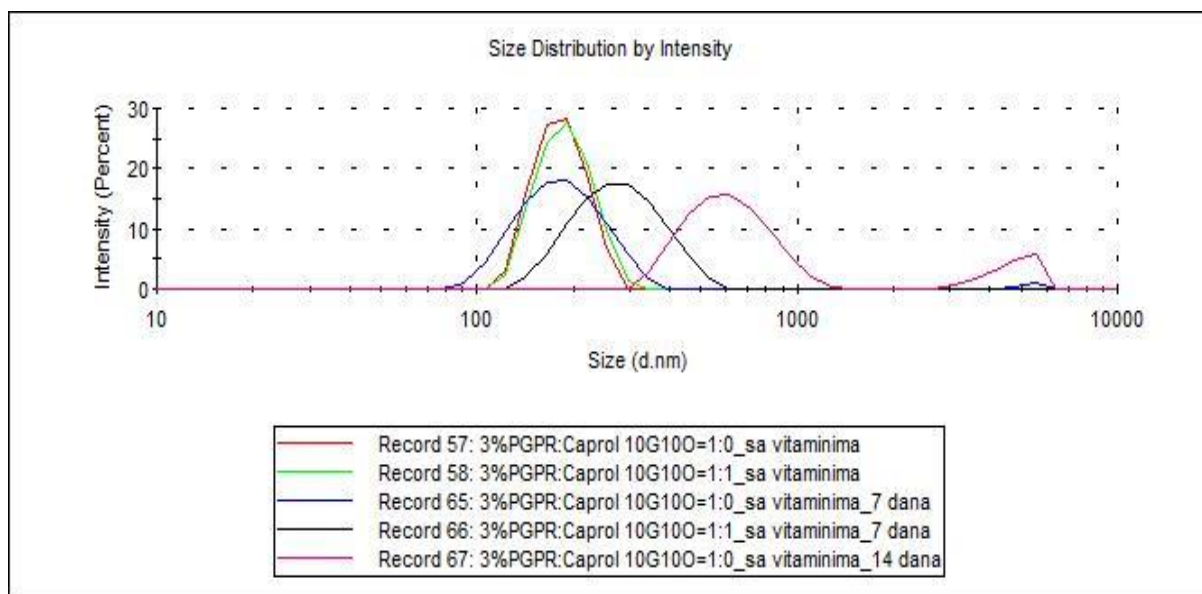
Slika P2. Krive raspodele veličina kapi 20% emulzija V/U stabilizovanih smešom emulgatora PGPR:Caprol 10G100 ukupne koncentracije 2% (m/v)



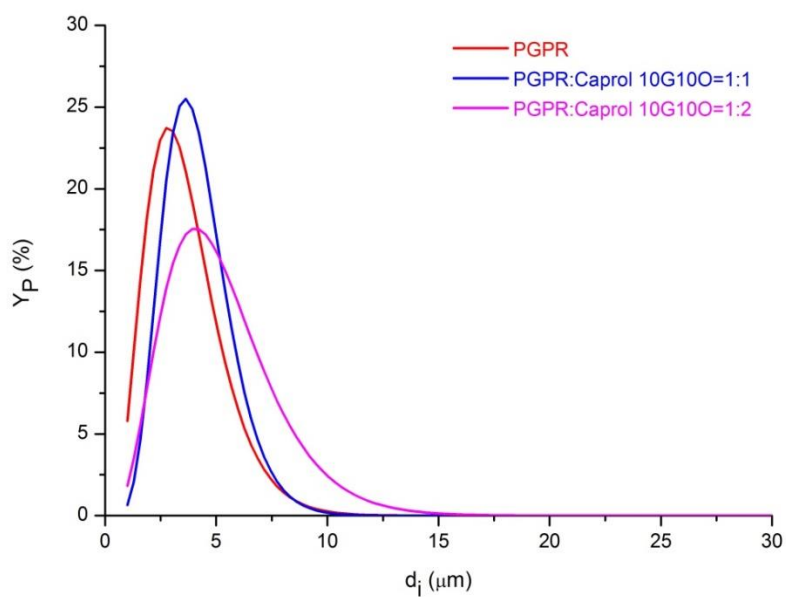
Slika P3. Krive raspodele veličina kapi 20% emulzija V/U stabilizovanih smešom emulgatora PGPR:Caprol 10G100 ukupne koncentracije 3% (m/v)



Slika P4. Krive raspodele veličina kapi 20% emulzija V/U stabilizovanih smešom emulgatora PGPR:Caprol 10G100 ukupne koncentracije 3% (m/v) sa vitaminom C (25% (m/v)) u vodenoj fazi i vitaminom E (1,6% (m/v)) u uljnoj fazi



Slika P5. Krive raspodele veličina kapi 20% emulzija V/U stabilizovanih smešom emulgatora PGPR:Caprol 10G100 ukupne koncentracije 3% (m/v) sa vitaminom C (25% (m/v)) u vodenoj fazi i vitaminom E (1,6% (m/v)) u uljnoj fazi, neposredno nakon pripreme, nakon 7 i 14 dana stajanja na sobnoj temperaturi



Slika P6. Krive raspodele veličina kapi 30% V/U/V emulzija stabilizovanih 1,7142% (m/m) želatinom, sa 20% primarnim emulzijama stabilizovanih smešama PGPR:Caprol 10G100 različitih masenih odnosa