

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Подобност теме и кандидата дипл. инж. Бојане Баланч за израду докторске дисертације

Одлуком бр. 35/198 од 07.05.2015. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену подобности теме и кандидата Бојане Баланч за израду докторске дисертације и научне заснованости теме „Микрочестични и наночестични системи за контролисано отпуштање ресвератрола“. У складу са сугестијама на седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета одржаној 07.05.2015. године, комисија предлаже наслов теме: „**Липозоми и системи липозоми-алгинат за контролисано отпуштање ресвератрола**“.

На основу материјала приложеног уз Захтев кандидата, Комисија подноси следећи

РЕФЕРАТ

1. Подаци о кандидату

1.1. Биографски подаци

Бојана Баланч (рођ. Исаиловић) је рођена 26.09.1985. године у Београду, Република Србија, где је стекла основно и средње образовање (Гимназија, природно – математички смер). Године 2004. уписала је Технолошко–металуршки факултет Универзитета у Београду. Дипломирала је 2009. године на смеру Фармацеутско инжењерство са просечном оценом 9,08, одбравивши дипломски рад на тему „Инкапсулација полифенолних једињења из екстракта чаја у алгинатне честице“ са оценом 10.

Године 2009. уписала је докторске студије на истом факултету, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија. У оквиру докторских студија положила је све испите предвиђене студијским програмом, са просечном оценом 10. Бојана Баланч, дипломирани инжењер технологије, била је стипендиста Министарства за науку и технолошки развој током 2009. и 2010. године и у том периоду ангажована на пројекту под називом „Интеракција имобилисаних ћелија, ткива и биолошки активних молекула у биореакторским системима" 142075-МНРС (2006-2010). Током лета 2010. одобрена јој је и једнократна стипендија Министарства за омладину и спорт за боравак у Интернационалној летњој школи „Advanced Methods in Cell Biology“, Пиран, Словенија, у организацији Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, Центра за трансфузију крви Републике Словеније, Националног института за биологију Републике Словеније и Међународног друштва *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society*. Такође је током 2010. као млади истраживач боравила на Прехрамбено-биотехнолошком факултету у Загребу у оквиру истраживања везаних за Билатерални пројекат под називом „Микроинкапсулација

биљних екстраката и полифенола намењених производњи функционалних прехранбених производа“, а током 2011. и на Фармацеутском факултету у Љубљани у циљу реализације билатералног пројекта под називом „Нови системи за контролисано отпуштање лекова засновани на микроносачима“. У фебруару 2011. године Бојана Баланч запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета као истраживач-приправник. У мају 2011. Бојана Баланч је као један од 35 најбољих младих научника из Алпско-Јадранске регије учествовала у Регионалном Биокампу који је био организован од стране „Сандоз“ компаније (Лек) у Љубљани. Године 2013. Бојана Баланч је стекла звање истраживач-сарадник. Ангажована је на пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања из области пољопривреде и хране: „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (број пројекта ИИИ46010, 2011-2015) где се бави истраживањима везаним за инкапсулацију природних антиоксиданаса. Поред овога, Бојана Баланч је учествовала и на билатералном пројекту под називом „Стабилизација природних биоактивних компонената: испитивања техника инкапсулације и кинетике отпуштања“ који је током 2011. и 2012. године реализован са Републиком Португал, као и на билатералном пројекту под називом „Хемоглобин из обновљивих извора као основ за препарат хемског гвожђа за превенцију и терапију анемије код домаћих животиња: оптимизација процеса изоловања и пречишћавања хемоглобина“ који је током 2012. и 2013. године реализован са Републиком Словенијом. Бојана Баланч је била и учесник Иновационог пројекта „Модуларни систем за добијање обновљиве енергије из отпадних вода и отпада у индустрији пива“ (451-03-2372-ПИТИП1/124, 2012-2013).

Бојана Баланч је похађала радионицу под називом „Knowledge Transfer“ у организацији CAPINFOOD пројекта у Београду, као и програм континуалног тренинга које је одржао Проф. др. Николас Пепас (Nicolas A. Peppas) под називом „Fundamentals and Applications of Controlled Release and Drug Delivery“, такође у Београду. Бојана Баланч је члан акције ФА1001 (MC substitute member) у оквиру КОСТ Европске кооперације за науку и технологију и била је стипендирана од стране те акције за кратак научни боравак (Short term scientific mission) од 1.09.2013. до 31.10.2013. у Љубљани на Биотехничком факултету, где је радила на теми под називом „Preparation and characterisation of resveratrol loaded liposomes“. Од 2009. године до данас, активно је учествовала у промоцији и популаризацији науке, а у току летњег семестра 2013., 2014. и 2015. године Бојана Баланч је изводила вежбе студентима на предмету Програмирање, на ТМФ-у.

1.2. Сечено научноистраживачко искуство

Године 2009. Бојана Баланч је уписала докторске студије на Технолошко-металуршком факултету, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија. У оквиру докторских студија положила је све испите предвиђене студијским програмом, са просечном оценом 10. У октобру 2011. одбранила је завршни рад под називом „Инкапсулација антиоксидативних једињења у липозоме: пролипозомна метода и метода танког филма“ са оценом 10 пред комисијом у саставу: ментор – др Бранко Бугарски, ред. проф., др Невенка Бошковић-Враголовић, ванр. проф. и др Рада Пјановић, доцент.

Бојана Баланч је као стипендиста Министарства за науку и технолошки развој током 2009. и 2010. била ангажована на пројекту под називом „Интеракција имобилисаних ћелија, ткива и биолошки активних молекула у биореакторским системима" 142075-МНРС (2006-2010). У фебруару 2011. године Бојана Баланч запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета као истраживач-приправник, а од 2013. стиче звање истраживач-сарадник. Као млади истраживач Бојана Баланч је од почетка пројектног циклуса ангажована на пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања из области пољопривреде и хране: „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу

биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“, Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (број пројекта ИИИ 46010, 2011-2015). Поред овога Бојана Баланч је учествовала и на два билатерална пројекта као и на једном иновационом пројекту: „Стабилизација природних биоактивних компонената: испитивања техника инкапсулације и кинетике отпуштања“ који је током 2011. и 2012. године реализован са Републиком Португал;

„Хемоглобин из обновљивих извора као основ за препарат хемског гвожђа за превенцију и терапију анемије код домаћих животиња: оптимизација процеса изоловања и пречишћавања хемоглобина“ који је током 2012. и 2013. године реализован са Републиком Словенијом;

„Модуларни систем за добијање обновљиве енергије из отпадних вода и отпада у индустрији пива“ (451-03-2372-ПИТИП1/124, 2012-2013).

Поред наведеног, Бојана Баланч је обучена за рад на следећим уређајима: Зетасажер (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd), Универзална тест машина за испитивање механичких карактеристика материјала (Universal Testing AG-Xplus, Shimadzu) и на уређају за течну хроматографију под високим притиском (HPLC, The Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000), (нова опрема набављена преко пројекта ИИИ46010).

Од 2009. године до данас Бојана Баланч је активно учествовала у промоцији и популаризацији науке кроз учешћа на Сајму, представљајући Технолошко-металуршки факултет и Иновациони центар Технолошко-металуршког факултета, као и кроз промоцију факултета ученицима средњих школа и гимназија. У току летњег семестра 2013., 2014. и 2015. године Бојана Баланч је изводила вежбе студентима на предмету Програмирање, на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду. Поред овога, Бојана Баланч је учествовала у изради дипломског рада кандидаткиње Тање Сретеновић под називом „Утицај концентрације алгината на отпуштање ресвератрола из система липозоми-алгинат“, као и у изради заврсног рада кандидаткиње Марије Лазаревић под називом „Утицај концентрације алгината на расподелу величина честица липозоми-у-алгинату добијених методом електростатичке екструзије“.

Научно истраживачки рад Бојане Баланч односи се на развој нових система за контролисано отпуштање активних компоненти. Истраживања су усмерена ка микро и нано системима у које се инкапсулира активна компонента. Овакви ситеми би могли да буду примењени како у прехранбеним тако и у фармацеутским производима.

До сада Бојана Баланч је публиковала 4 рада у врхунским међународним часописима (M21), 1 рад у истакнутом међународном часопису (M22) и два рада у међународним часописима (M23), а поред овога има и више саопштења са међународних скупова штампаних у целини и у изводу (M33 и M34). Бојана Баланч је аутор и коаутор два поглавља у књигама међународног значаја (M13).

Списак положених испита

Предмет	Оцена	ЕСПБ
1. Инжењерство ћелије	10	5
2. Феномени преноса у биолошким системима	10	5
3. Хемијска кинетика	10	5
4. Физичко-хемијске основе фармацеутског инжењерства	10	4
5. Одабрана поглавља инструменталне анализе	10	7
6. Одабрана поглавља биохемије-витамини	10	5
7. Одабрана поглавља математичке анализе	10	5
8. Биоактивне материје у козметичким производима	10	4
9. Имобилизани биокатализатори: технике имобилизације, биореактори и примена	10	6
10. Одабрана поглавља пројектовања процеса у биохемијском инжењерству	10	5
11. Енглески језик	10	-
12. Завршни испит	10	30

Објављени научни радови и саопштења

1. Монографије, монографске студије, тематски зборници, лексикографске и картографске публикације међународног значаја - M10

1.1. Монографска студија/поглавље у књизи M11 или рад у тематском зборнику водећег међународног значаја - M13

1.1.1. **Isailović, B.**, Djordjević, V., Lević, S., Milanović, J., Bugarski, B., Nedović, V. (2014) Encapsulation of flavours and aromas – Controlled release. In: Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications, Eds. Montero, MP; Gómez-Guillén; MC; López-Caballero, ME and Barbosa-Cánovas, GV, CRC Press Taylor & Francis, ISBN 978-1-48-221831-2.

1.1.2. Nedović, V., Bugarski, B., Mantzouridou, F., Paraskevopoulou, A., Naziri, E., Koupantsis, T., Trifković, K., Drvenica, I., **Balanč, B.**, Đorđević, V. (2014) Recent advances and applications of encapsulated microbial and non-microbial active agents in the manufacture of food and beverages, In: Advances in Food Biotechnology, Eds. V. Ravishankar Rai. John Wiley & Sons Book (accepted).

2. Радови објављени у часописима међународног значаја - M20

2.1. Рад у врхунском међународном часопису - M21

2.1.1. Istenič K., **Balanč B.**, Djordjević V., Bele M., Nedović V., Bugarski B., Poklar Ulrih N. (2015) Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles. *Journal of Food Engineering*, DOI:10.1016/j.jfoodeng.2015.04.007. (IF=2.576, ISSN: 0260-8774).

2.1.2. **Balanč B.**, Ota A., Djordjević V., Šentjerc M., Nedović V., Bugarski B., Poklar Ulrih N. (2015) Resveratrol-loaded liposomes: interaction of resveratrol with phospholipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, DOI:10.1002/ejlt.201400481. (IF=2.003, ISSN: 1438-7697).

2.1.3. Djordjević V., **Balanč B.**, Belščak-Cvitanović A., Lević S., Trifković K., Kalušević A., Kostić I., Komes D., Bugarski B., Nedović V. (2014) Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, DOI: 10.1007/s12393-014-9106-7. (IF=3.036, ISSN: 1866-7910).

2.1.4. **Isailović, B.**, Kostić, I., Zvonar, A., Đorđević V., Gašperlin, M., Nedović, V., Bugarski, B. (2013) Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19 181–189, DOI 10.1016/j.ifset.2013.03.006. (IF=2.248, ISSN: 1466-8564)

2.2. Рад у истакнутом међународном часопису - M22

2.2.1. Lević S., Obradović N., Pavlović V., **Isailović B.**, Kostić I., Mitrić M., Bugarski B., Nedović V. (2014) Thermal, morphological, and mechanical properties of ethyl vanillin immobilized in polyvinyl alcohol by electrospinning process. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 118 661-668, DOI 10.1007/s10973-014-4060-4. (IF=2.206, ISSN: 1388-6150)

2.3. Рад у међународном часопису - M23

2.3.1. Marinković A., Radoman T., Dzunuzović E., Dzunuzović J., Spasojević P., **Isailović B.**, Bugarski B. (2013) Mechanical properties of composites based on unsaturated polyester resins obtained by chemical recycling of poly(ethylene terephthalate). *Hemijska industrija*, 67, 913–922, DOI 10.2298/HEMIND130930077M. (IF=0.562, ISSN: 2217-7426)

2.3.2. Kostić I., **Isailović B.**, Đorđević V., Lević S., Nedović V., Bugarski B. (2012) Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i biološki aktivnih

3. Зборници међународних скупова – M30

3.1. Саопштење са међународног скупа штампано у целини - M33

3.1.1. **Isailović B.**, Trifković K., Kostić I., Pjanović R., Marković S., Nedović V., Bugarski B., Microbeads based on alginate used for prolonged release of resveratrol, *IV International Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“*, CD proceedings pp 307-311, 04.03-06.03.2015, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, DOI: 10.7251/EEMSR1501307I, ISBN 978-99955-81-18-3.

3.1.2. Jovanović A., Zdunić G., Šavikin K., Pravilović R., Đorđević V., **Isailović B.**, Bugarski B., Effects of solvent and degree of fragmentation on total polyphenols and antioxidant activity of thymus serpyllum extracts, *IV International Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“*, CD proceedings pp. 453-458, 04.03-06.03.2015, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, DOI: 10.7251/EEMSR1501453J, ISBN 978-99955-81-18-3.

3.1.3. Trifković K., **Isailović B.**, Milašinović N., Jovanović A., Knežević-Jugović Z., Djordjević V., Bugarski B., Mechanical properties of alginate-liposomes-based beads with encapsulated resveratrol, *IV International Congress: „Engineering, Environment and Materials in Processing Industry“*, CD proceedings pp. 318-325, 04.03-06.03.2015, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, DOI: 10.7251/EEMEN1501318T, ISBN 978-99955-81-18-3.

3.1.4. **Isailović B.**, Kostić I., Đorđević V., Nedović V., Bugarski B., Proliposome and thin film method for production of liposomes incorporating resveratrol. *III International Congress: “Engineering, Environment and Materials in Processing Industry”*, Jahorina, Bosna i Hercegovina, 04-06 March 2013. *Proceedings*, ISBN 978-99955-81-11-4, pp 247-253.

3.1.5. **Isailović B.**, Đorđević V., Nedović V., Bugarski B., Liposome-in-alginate systems for encapsulation of natural antioxidants. *Inside Food symposium*, April 9-12, 2013, Leuven, Belgium. *Book of Abstracts and Full Papers*, pp 1-5

http://www.insidefood.eu/INSIDEFOOD_WEB/UK/WORD/proceedings/092P.pdf

3.1.6. **Isailović B.**, Kostić I., Zvonar A., Đorđević V., Gašperlin M., Nedović V., Bugarski B., Encapsulation of natural antioxidant resveratrol in liposomes. *6th Central European Congress on Food*, 23-26 May 2012, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts and Full Papers, pp. 1046-1052, Published by: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, Novi Sad, Serbia, ISBN 978-86-7994-027-8,.

3.1.7. Trifković K., Milašinović N., **Isailović B.**, Kalagasidis Krušić M., Đorđević V., Knežević-Jugović Z., Bugarski B., Encapsulation of Thymus Serpyllum L. aqueous extract in chitosan and alginate-chitosan microbeads. *6th Central European Congress on Food*, 23-26 May 2012, Novi Sad, Srbija. Book of Abstracts and Full Papers, pp. 1052-1058., Published by: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, Novi Sad, Serbia, ISBN 978-86-7994-027-8.

3.1.8. **Isailović B.**, Kalušević A., Žuržul N., Teresa Coelho M., Đorđević V., Alves V.D., Isabel S., Moldão-Martins M., Bugarski B., Nedović V., Microencapsulation of natural antioxidants from Pterospartum Tridentatum in different alginate and inulin systems. *6th Central European Congress on Food* 23-26 May 2012, Novi Sad, Srbija. Book of Abstracts and Full Papers, pp 1075-1082., Published by: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, Novi Sad, Serbia, ISBN 978-86-7994-027-8.

3.1.9. Kalušević A., **Isailović B.**, Đorđević V., Coelho T., Alves V., Bugarski B., Nedović V., Alginate-inulin microbeads encapsulating antioxidants from *Pterospartum tridentatum*. 20th

International Conference on Bioencapsulation, Proceedings, pp. 158-159. Neufeld r., Gu F., Hoelsli C (eds.), Orillia, Ontario, Canada, 21-24 September 2012.

3.2. Саопштење са међународног скупа штампано у изводу - М 34

3.2.1. **Balanč B.**, Djordjević V., Marković S., Trifković K., Kostić I., Nedović V., Bugarski B. Liposome-in-hydrogel systems for delivery of antioxidants. *II International Congress „Food Technology, Quality and Safety“*, 28-30. October 2014, Novi Sad, Serbia. *Book of abstracts*, Eds.: Lević J., Brlek T., Pojić M., p83, ISBN 978-86-7994-041-4.

3.2.2. Kalušević A., Lević S., **Isailović B.**, Djordjević R., Veljović M., Djordjević V., Nedović V., Bugarski B. Electrostatic extrusion – Encapsulation Technique for Functional Food Products. *II International Congress „Food Technology, Quality and Safety“*, 28-30 October 2014, Novi Sad, Serbia. *Book of abstracts*, Eds: Lević J., Brlek T., Pojić M., p16, ISBN 978-86-7994-041-4.

3.2.3. **Isailović B.**, Ota A.; Djordjević V., Šentjurs M., Nedović, V., Bugarski B., Poklar Ulrih N., Influence of resveratrol on membrane fluidity of proliposomes. *Ist Congress on Food Structure Design, Book of Abstracts*, Eds: Vicente A.A., Silva C.L.M., Piazza L., p.44, 15-17th October 2014, Porto, Portugal, ISBN: 978-989-97478-5-2.

3.2.4. Kostić I., Bukara K., Ilić V., Mojsilović S., Đorđević V., **Isailović B.**, Veljović Đ., Bugarski B., Scanning electron microscopy observation of erythrocyte ghosts isolated from slaughterhouse blood by gradual hemolysis, *Microscopy Conference*, 25-30 August 2013. University of Regensburg, Regensburg, Germany, MIM.4.P066, *Proceedings of the Microscopy Conference*, pp 520-521 (The Best Poster Award), urn:nbn:de:bvb:355-epub-287343.

4. Зборници скупова националног значаја– М60

4.1. Саопштење са скупа националног значаја штампано у целини М63

4.1.1. **Isailović B.**, Kostić I., Trifković K., Stojanović R., Zarić M., **Đorđević V.**, Bugarski B., Difuzija resveratrola iz lipidnih mikročestica dobijenih različitim tehnikama. *Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Zbornik radova*, pp. 115-119, .Klub mladih hemičara Srbije, Srpsko hemijsko društvo, Beograd 19. – 20. oktobar, 2012, urednici, I. Opsenica, A. Dekanski, ISBN 978-86-7132-051-1.

1.3. Оцена подобности кандидата за рад на предложеној теми

На основу досадашњег рада и показаних резултата током последипломских студија и у оквиру научно-истраживачког рада на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, ИИИ 46010 (2011-2015), Бојана Баланч, дипл. инжењер технологије, показала је склоност и изразиту способност за бављење научно-истраживачким радом. Такође, тема докторске дисертације припада области из које је дипл. инж. Бојана Баланч до сада објавила 2 научна рада штампана у врхунским међународним часописима и 5 саопштења на међународним и националним скуповима на којима је она први аутор, што указује на то да већ поседује квалитетне научне резултате и показује високу компетентност за рад на предложеној теми докторске дисертације.

2. Предмет и циљ истраживања

Основни циљ предложених истраживања је развој система за контролисано отпуштање антиоксиданаса. Последњих година, када су стрес и лоше животне навике све присутније, природни антиоксиданси постају атрактивна област у домену науке. Сазнања о њиховим позитивним дејствима на здравље људи довела су до захтева тржишта за развојем нових прехранбених и фармацеутских производа обogaћених управо антиоксидансима природног

порекла. Ипак, стабилност природних антиоксиданаса представља проблем због кога су употреба антиоксиданса као и њихово складиштење ограничени.

Ресвератрол је природан антиоксиданс који се у људској исхрани уноси кроз кикирики, јагодичасто воће, грожђе, вино, а у мањој мери је заступљен и у какау [1]. Сматра се да повећање уноса ресвератрола може позитивно да утиче на здравље људи јер је показано да овај антиоксиданс има и противупално, кардио-протективно, неуро-протективно и анелгетичко дејство, као и да успорава старење [2-3]. У свету је већ познато и заштитно дејство које ресвератрол има при дејству ултравиолетног зрачења [4] па се на тржишту могу наћи и козметичких производа са ресвератролом [5]. Ипак, позитивно дејство ресвератрола је ограничено због његове осетљивости на присуство светлости, склоности ка оксидацији, слабе растворљивости у води и слабе апсорпције након оралне конзумације. Поред овога, ресвератрол има кратко време полуживота и цитотоксично дејство уколико се примењује у великим дозама [6]. Имајући у виду поменуте карактеристике ресвератрола, јавља се потреба да се ова активна компонента стабилизује и заштити на начин који би омогућио лако руковање и његову примену у прехранбеним и фармацеутским производима.

Инкапсулација се показала као погодна метода за превазилажење неких од проблема јер носач, који формира омотач или капсулу у коју се уноси антиоксиданс, представља баријеру којом се ова активна компонента штити од спољашњих утицаја. У литератури постоји велики број различитих метода и материјала који се користе за инкапсулацију [7]. Ипак, карактеристике саме активне компоненте као и даља примена диктирају избор оптималне методе. Како је ресвератрол слабо растворан у води, инкапсулација ове активне компоненте у липозоме намеће се као погодан избор. Инкапсулација у липозоме може да се користи како за инкапсулацију хидрофилних тако и липофилних активних компоненти по чему се издваја у односу на друге инкапсулационе методе. Једна од главних предности инкапсулације у липозоме у односу на друге инкапсулационе методе је стабилност коју липозоми пружају када се додају у намирнице са високим садржајем воде [8] у које ресвератрол (због слабе растворљивости) не би могао да буде унет *per se*. Још једна предност липозома је у томе што се најчешће припремају од природних компоненти, те није тешко испунити регулативе за евентуалну примену у прехранбеним и фармацеутским производима. Метода танког филма је најчешће коришћена метода за припрему липозома, ипак ова метода се сматра неподобном за производњу липозома за примену у прехранбеним производима јер се као растварач користи хлороформ. Осим тога метода танког филма је тешко применљива за добијање већих количина липозома. Са друге стране, пролипозомна метода има већи потенцијал за индустријску примену [9-11]. Обе методе омогућавају добијање вишеслојних липозома (мутиламеларни липозоми), док се на број ламела може утицати накнадно применом неке од метода као што су екструзија и соникација. Стога, један део истраживања у овој докторској тези има за циљ испитивање методе танког филма и пролипозомне методе за добијање липозома припремљених од комерцијалне липидне смеше (Phospholipon 90, Natterman Phospholipids, Germany) са инкапсулираним ресвератролом и да упореди ове две методе са аспекта величине липозома, расподеле величине, површинског наелектрисања, степена ефикасности за инкапсулацију и стабилности. Такође, циљ је и да се кроз експерименте отпуштања ресвератрола из овако припремљених липозома укаже на потенцијал ових формулација за примену у функционалним прехранбеним производима или фармацеутским препаратима. Отпуштање ће бити праћено уз помоћ стандардне Францове дифузионе ћелије која се састоји из доносског и рецепторског дела. Узорак из кога се прати отпуштање уноси се у доносски део који је ацетатно-целулозном мембраном одвојен од рецепторског дела. Узорковање се врши из рецепторског дела у одређеним временским интервалима. На основу експерименталних резултати отпуштања ресвератрола могуће је одредити коефицијент дифузије и дифузиони отпор који потиче од липозома [12].

Поред овога, истраживања имају за циљ да утврде како ресвератрол утиче на саму мембрану липозома у погледу њене флуидности, јер управо флуидност мембране има значајан утицај на стабилности липидне дисперзије у сложеним формулацијама као што су храна или

фармацеутски и козметички производи [13]. Флуидност липозомне мембране у многоме контролише и кинетику отпуштања активне компоненте па је стога овај параметар од интереса и за дефинисање липозома као система за контролисано отпуштање ресвератрола. До сада је показан утицај различитих флавоноида на флуидност липозомне мембране [14-15], а утицај ресвератрола испитан је само у случају када су липозоми припремљени од некомерцијалних липида као што су 1,2-миристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидил-холин и 1,2-дипалмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидил-холин [16-19]. У литератури је показано и да неки антиоксиданси могу да спрече оксидацију липида [20,21]. То је повод да у ову тезу буде укључено и испитивање утицаја ресвератрола на липозоме, добијене употребом комерцијалне липидне смеше, у погледу њихове заштите од слободних радикала.

Флуоресцентна спектроскопија, диференцијална скенирајућа калориметрија и електрон парамагнетна резонанција (ЕПР) биће примењене како би се дефинисао положај ресвератрола у липозомима и испитао његов утицај на флуидност липозомне мембране. У циљу испитивања антиоксидативне активности ресвератрола у погледу инхибиције липозомне пероксидације биће употребљен тиобарбитурни тест и флуоресцентна спектроскопија са флуоресцентном пробом BODIPY 581/ 591 C1.

Поред тога што ће дати увид у понашање ресвератрола, резултати ових испитивања уједно претпостављају утицај и понашање других у води слабо растворљивих антиоксиданата при инкапсулацији у липозоме.

У даљем раду на овој тези, биће испитани и микрочестични системи за инкапсулацију ресвератрола. Ово су сложени системи у којима ће липозоми бити обложени још једним слојем који ће пружити додатну заштиту и уједно успорити отпуштање ресвератрола. Тај слој ће чинити гел калцијум-алгината. Алгинат, природни линеарни полисахарид, спада у групу хетерогених полимера и његов водени раствор формира хидрогел при интеракцији са двовалентним јоним, као што је јон калцијума. Конкретно, смеша воденог раствора алгината и липозома који садрже ресвератрол биће преведена у гел микрочестце екструзионим поступком укапавања у раствор за гелирање (калцијум-хлорид). Када се, у циљу добијања честица малог пречника, при овој екструзионој методи уведе и напон између раствора за гелирање и игле из које се одвајају капи, метода добија назив електростатичка екструзија. У овом раду алгинатне микрочестице биће припремљене оптимизованом методом електростатичке екструзије [22]. Овако припремљене микрочестице биће окарактерисане са становишта степена инкапсулације као и отпуштања ресвератрола. Поред тога ће бити испитане и механичке карактеристике микрочестица због потенцијала који имају за примену у прехранбеним и фармацеутским производима.

- [1] Collin S., Callemien D., Counet C. : *Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid*, Food Chemistry, 98, 2006, 649–657
- [2] Baur A., Sinclair D.: *Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence*, Nature Reviews Drug Discovery, 5, 2006, 493–506.
- [3] Gusman J., Malonne H., Atassi G.: *A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol*, Carcinogenesis, 22, 2001, 1111–1117.
- [4] Caddeo C., Teskac K., Sinico C., Kristl J.: *Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells*, International Journal of Pharmaceutics, 363, 2008, 183-91.
- [5] Dostupno na : <https://www.vinevera.com/resveratrol>
- [6] Lopez-Nicolas M., Nunez-Delicado E., Perez-Lopez J.: *Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for cyclodextrin complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography*, Journal of Chromatography. A, 1135, 2006, 158–165.
- [7] Đorđević V., Balanč B., Belščak-Cvitanović A., Lević S., Trifković K., Kalušević A., Kostić I., Komes D., Bugarski B., Nedović V.: *Trends in encapsulation technologies for delivery of*

food bioactive compounds, Food Engineering Reviews, 2014, DOI: 10.1007/s12393-014-9106-7

- [8] Desai K., Park, H.: *Recent developments in microencapsulation of food ingredients*, Drying Technology, 23, 2005, 1361–1394
- [9] Chen C., Alli D.: *Use of fluidized bed in proliposome manufacturing*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 76, 1987, 419.
- [10] Turanek J., Zaluska D., Neča J.: *Linkup of a fast protein liquid chromatography system with a stirred thermostated cell for sterile of liposomes by the proliposome–liposome application to encapsulation of antibiotics peptide immunomodulators, and a photosensitizer*, Analytical Biochemistry, 249, 1997, 131–139.
- [11] Wagner A., Vorauer-Uhl K.: *Liposome technology for industrial purposes*, Journal of Drug Delivery, 2011, 2011, 1-9.
- [12] Pjanović R., Bošković-Vragolović N., Veljković-Giga J., Garić-Grulović R., Pejanović S., Bugarski B.: *Diffusion of drugs from hydrogels and liposomes as drug carriers*, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 85, 2010, 693–698.
- [13] Park SH., Oh SG., Suh KD., Han SH., Chung DJ., Mun JY., Han SS., Kim JW.: *Control over micro-fluidity of liposomal membranes by hybridizing metal nanoparticles*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 70, 2009, 108–113.
- [14] Poklar Ulrih N., Ota A., Šentjerc M., Kure S., Abram V.: *Flavonoids and cell membrane fluidity*. Food Chemistry, 121, 2010, 78–84.
- [15] Abram V., Berlec B., Ota A., Šentjerc M., Blatnik P., Poklar Ulrih N.: *Effect of flavonoid structure on the fluidity of model lipid membranes*, Food Chemistry, 139, 2013, 804–813.
- [16] Tsuchiya H., Nagayama M., Tanaka T., Furusawa M., Kashimata M., Takeuchi H.: *Membrane-rigidifying effects of anti-cancer dietary factors*, BioFactors, 16, 2002, 45–56.
- [17] Fabris S., Momo F., Ravagnan G., Stevanato R.: *Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles monolamellar liposomes*, Biophysical Chemistry, 135, 2008, 76–83.
- [18] Wesołowska O., Kuźdżał M., Štrancar J., Michalak K.: *Interaction of the chemopreventive agent resveratrol and its metabolite, piceatannol with model membranes*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1788, 2009, 1851–1860.
- [19] Brittes J., Lúcio M., Nunes C., Lima J., Reis S.: *Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects*, Chemistry and Physics of Lipids, 163, 2010, 747–754.
- [20] Heinonen M., Meyer A.S., Frankel E.N.: *Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1998, 4107–4112.
- [21] Cesquini M., Torsoni M., Stoppa G., Ogo S.: *t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids*, Biomedicine & Pharmacotherapy, 57, 2003, 124–129.
- [22] Kostić I., Isailović B., Đorđević V., Lević S., Nedović V., Bugarski B.: *Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i biološki aktivnih supstanci.*, Hemijska Industrija, 66, 2012, 505–517.

3. Polazne hipoteze

Kako je u literaturi već pokazano, lipozomi su pogodni nosači za inkapsulaciju i hidrofilnih i lipofilnih komponenti. Resveratrol, prirodni antioksidans je слабо растворан у води и лако прелази у свој мање активан облик када је изложен спољашњим факторима. Како овај антиоксиданс има позитивна дејства на здравље људи, идеја о његовој инкапсулацији има јасан циљ. Стога, предложена истраживања у оквиру ове докторске дисертације полазе од хипотезе да инкапсулација ревератрола у липозоме доводи до чувања

његове активности и даје могућности лакше имплементације овог антиоксиданса у прехранбене и фармацеутске производе, као и да омогућава продужено отпуштање ресвератрола у околни медијум. При томе се полази од следећих претпоставки:

- Пролипозомна метода је најмање једнако ефикасна као и метода танког филма за инкапсулацију ресвератрола, прихватљивија је за индустријске размере и не користи токсичне раствараче.
- Липозомима са инкапсулираним ресвератролом добијеним претходно поменутих методама могуће је редуковати величину методама екструзије и соникације, а да ресвератрол не изгуби активност.
- Ресвератрол као хидрофобна компонента уграђује се у липидни двослој.
- Ресвератрол штити и саме липозоме од липидне пероксидације.
- Инкапсулација липозома са ресвератролом у алгинатне микрочестице треба да омогући још спорије ослобађање ресвератрола, а микрочестице је могуће добити методом електростатичке екструзије.

4. Научне методе истраживања

У поступку реализације научних резултата, односно предмета и циља истраживања, као и да би се потврдиле постављене хипотезе, биће коришћена метода танког филма и пролипозомна метода за добијање липозома са инкапсулираним ресвератролом. Липозоми ће бити припремљени од комерцијалне липидне смеше, а однос липида и ресвератрола биће исти кроз обе методе припреме. У циљу смањења величине липозома биће примењена екструзија и соникација. Одређивање концентрације ресвератрола у свим узорцима вршиће се спектрофотометријски на 306 nm, а ова метода биће примењена и код антиоксидативног теста који потврђује својства ресвератрола - одређивање активности слободног радикала 2,2-азинобис-(3-етилбензтиазолин-6-сулфонске киселине (ABTS•). Величина, расподела величине и зета потенцијал липозома са и без активне супстанце биће одређени фотон корелационом спектроскопијом (PCS). Физичко стање ресвератрола уграђеног у липидну мембрану биће одређено диференцијално-скенирајућом калориметријом (DSC). Одређивање позиције ресвератрола у липидној мембрани и његов утицај на флуидност липозомне мембране обавиће се уз употребу флуорофора 1,6 -дифенил-1,3,5-хексатриен (DPH) и 1-(4-триметил-амонијум-фенил)-6-фенил-1,3,5-хексатриен p-толуенсулфонат (ТМА-DPH) којима ће липозоми бити маркирани. Интензитет флуоресцентне поларизације ће бити детектован на флуоресцентном спектрометру. Да би се показало антиоксидативно дејство ресвератрола при липидној пероксидацији биће примењен тест TBARS (thiobarbituric acid reacting substances). Сви експерименти праћења отпуштања ресвератрола одвијаће се у Францовој дифузионој ћелији уз употребу ацетатно-целулозне мембране као баријере између донорског и рецепторског дела ћелије. Инкапсулација липозома са ресвератролом у калцијум-алгинатни гел биће изведена употребом електростатичке екструзије, а механичке карактеристике честица биће испитане на уређају AG-X plus , Shimadzu, Japan опремљеној мерном јединицом од 100 N.

5. Очекивани научни допринос

По завршетку предложених истраживања може се очекивати следећи научни допринос:

- Скраћење поступка припреме липозома са инкапсулираним ресвератролом утврђивањем ефикасности пролипозомне методе за инкапсулацију ресвератрола.
- Одабир методе за инкапсулацију ресвератрола у липозоме узимајући у обзир све аспекте: ефикасност инкапсулације, величину добијених липозома, једносоставност поступка и продуктивност методе.

- Утврђивање ефикасности метода екструзије и соникације за смањење величине липозома са инкапсулираном активном компонентом.
- Потврда о задржаној антиоксидативности ресвератрола након инкапсулације у липозоме.
- Утврђивање кинетике липидне пероксидације у присуству ресвератрола.
- Нова сазнања о механизму уградње ресвератрола у липозоме који су припремљени употребом комерцијалних липида.
- Нова сазнања о утицају ресвератрола на структуру и флуидност липозомне мембране.
- На основу кинетике отпуштања ресвератрола биће одређени коефицијенти дифузије и дифузиони отпори преноса ресвератрола кроз липозомну и алгинатну баријеру.
- Карактеризација микрочестица липозоми-алгинат и сагледавање могућности њиховог потенцијалног коришћења као адитива у прехранбеној и фармацеутској индустрији.

6. План истраживања и структура рада

Рад ће бити сачињен из три целине: прва целина обухвата припрему липозома као система за контролисано отпуштање ресвератрола, друга целина ће садржати истраживања везана за утицај ресвератрола на структурне карактеристике липозомне мембране, док ће у трећој целини бити испитане микрочестице липозоми-алгинат као системи за контролисано отпуштање ресвератрола.

Предвиђено је да докторска дисертација има следећа поглавља: *Увод, Теоријски део, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература.*

Поглавље *Увод* обухватиће актуелност проблематике, предмет истраживања и очекивани допринос.

Теоријски део обухватиће преглед литературе у оквиру досадашњих истраживања на тему инкапсулације активних компоненти у липозоме као и она истраживања која се уско односе на инкапсулацију ресвератрола. Такође ће бити дат теоријски приказ познатих механизма отпуштања активних компоненти из липозома и полимерних микрочестица.

Експериментални део обухватиће:

- Материјал и опрему коришћену током рада;
- Детаљан приказ метода за припрему липозома;
- Методе за смањење величине липозома;
- Опис методе за карактеризацију липозома: расподела величина, индекс полидисперзије, зета потенцијал;
- Одређивање ефикасности инкапсулације, ABTS тест, DSC анализу;
- Кинетику отпуштања ресвератрола из липозома и одређивање коефицијената дифузије и отпора липидне мембране;
- Методе за одређивање положаја ресвератрола и његовог утицаја на флуидност липидне мембране;
- Опис метода за одређивање утицаја ресвератрола на успорену пероксидацију липида;
- Припрему микрочестица липозоми-алгинат;
- Карактеристике микрочестица липозоми-алгинат добијених на претходно описан начин.

У поглављу *Резултати* и дискусија биће приказана анализа резултата добијених спроведеним експериментима, као и дискусија добијених резултата. Детаљно ће бити упоређени резултати добијени припремом липозома методом танког филма и пролипозомном методом, али и утицај метода за смањење величине липозома. Резултати који говоре о положају ресвератрола у липидном двослоју као и о његовом утицају на флуидност липидне мембране ће се поредити са релевантним подацима из доступне научне литературе. Такође ће бити дискутован и проценат инкапсулације како код липозома тако и у систему

липозоми-алгинат. У складу са тим донеће се закључци о потенцијалној примени инкапсулираног ресвератрола у производњи функционалних намирница и суплемената. У поглављу *Закључак* на основу извршених експеримената биће сумирани сви добијени резултати. Поглавље *Литература* ће обухватити наводе цитиране у дисертацији обухватајући и радове проистекле у току рада на докторској дисертацији.

7. Закључак и предлог

На основу изнетих података Комисија сматра да је предложена тема докторске дисертације дипл. инж. Бојане Баланч „**Липозоми и системи липозоми-алгинат за контролисано отпуштање ресвератрола**“, научно заснована и предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, да је прихвати и одобри израду ове дисертације. За ментора се предлаже проф. др Бранко Бугарски, редовни професор Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду. Истраживања у оквиру ове дисертације припадају научној области Технолошко инжењерство, ужа научна област Биохемијско инжењерство и биотехнологија, за коју је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду, матична установа.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

.....
Проф. др Бранко Бугарски,
Универзитета у Београду, Технолошко-
металуршки факултет

.....
Проф. др Виктор Недовић,
Универзитета у Београду, Пољопривредни
факултет

.....
Доцент др Рада Пјановић,
Универзитета у Београду, Технолошко-
металуршки факултет

.....
Др Верица Ђорђевић,
Научни сарадник, Технолошко-металуршки
факултет