

Univerzitet u Beogradu
Tehnološko-metalurški fakultet

Ana D. Milivojević

**ENZIMSKA SINTEZA ESTARA
FLAVONOIDA I KONTROLISANO
OTPUŠTANJE IZ KOZMETIČKIH
FORMULACIJA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

University of Belgrade

Faculty of Technology and Metallurgy

Ana D. Milivojević

**ENZYMATIC SYNTHESIS OF FLAVONOID
ESTERS AND CONTROLLED RELEASE
FROM COSMETIC FORMULATIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

MENTORI:

Dr Dejan Bezbradica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Rada Pjanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Marija Ćorović, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Mirjana Antov, redovni profesor
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija realizovana je na Katedri za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a deo eksperimenata urađen je i na Katedri za opštu i neorgansku hemiju istog fakulteta, kao i na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Najveću zahvalnost na podršci, pomoći, razumevanju, prenetom znanju i angažovanju u svim fazama osmišljavanja i izrade ove doktorske disertacije dugujem svom mentoru prof. dr Dejanu Bezbradici. Takođe, neizmerno sam zahvalna i svom drugom mentoru prof. dr Radi Pjanović na podršci i pomoći u osmišljavanju i realizaciji difuzionih eksperimenata, kao i na korisnim savetima i sugestijama tokom pisanja ove doktorske disertacije. Hvala vam na ukazanom poverenju da budem vaš kandidat!

Posebnu zahvalnost za korisne savete, usmeravanje, nesebičnu pomoć tokom eksperimentalnog rada i iskrenu prijateljsku podršku dugujem kolegici dr Mariji Ćorović.

Iskreno zahvaljujem i ostalim članovima komisije, prof. dr Zorici Knežević-Jugović za mogućnost izvođenja brojnih eksperimenata na savremenoj opremi kao i prof. dr Mirjani Antov na ukazanom poverenju.

Veliko hvala prof. dr Svetlani Grujić i kolegici dr Ivani Matić Bujagić na nesebičnoj pomoći, brzim analizama i korisnim savetima u tumačenju rezultata. Takođe, najtoplije se zahvaljujem i kolegama sa Hemijskog fakulteta, dr Nenadu Milosaviću, dr Dušanu Veličkoviću i dr Ljubodragu Vujisiću koji su me srdačno dočekali i pomagali mi u toku eksperimentalnog rada.

Veliko hvala kolegama doktorandima, kao i profesorima i tehničkom osoblju Katedre za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju na prijatnoj radnoj atmosferi i iskrenoj podršci i savetima. Posebno se zahvaljujem kolegama i prijateljima Katarini, Milici, Mladenu i Sonji na prijateljskim, iskrenim savetima i pomoći u svakom trenutku i segmentu rada.

Od srca hvala mojoj rodbini i prijateljima na podršci da istrajem!

Ogromnu zahvalnost na razumevanju, pomoći, bezgraničnoj podršci i velikom odricanju, kao i svemu ostalom što ste činili za mene dugujem svojim roditeljima i sestri Jeleni.

Na kraju, naizmerno sam zahvalna svom suprugu Božidaru na безусловnoj podršci, strpljenju, i razumevanju. Beskrajno hvala mom sinu Vuku!

Enzimaska sinteza estara flavonoida i kontrolisano otpuštanje iz kozmetičkih formulacija

Sažetak

U okviru ove doktorske disertacije ispitana je mogućnost efikasne i ekonomične enzimske sinteze estara tri flavonoida (floridzina, naringina i eskulina) korišćenjem različitih acil-donora i imobilisane lipaze tipa B iz *C. antarctica* kao biokatalizatora. Pored toga, ispitan je transdermalni prenos i određene su difuzione karakteristike sintetisanih estara iz različitih kozmetičkih formulacija. Sinteza estara tri pomenuta flavonoida korišćenjem oleinske kiseline kao acil-donora i Novozym[®] 435 kao biokatalizatora je optimizovana i pokazano je da su koncentracija flavonoida i molski odnos supstrata dva najbitnija faktora koja utiču na tok sinteze. Maksimalni stepen konverzije sva tri flavonoida postiže se pri najmanjoj početnoj koncentraciji flavonoida, 10 mM. Sa druge strane, uočeno je da za postizanje maksimalnog prinosa proizvoda optimalni uslovi zavise od primenjenog acil-akceptora s obzirom da 30 mM naringina i 70 mM eskulina predstavljaju optimalne početne koncentracije ova dva flavonoida za dobijanje visokog prinosa proizvoda. Kada je reč o molskom odnosu supstrata, pokazano je da reakciji sinteze floridzin-oleata pogoduje veliki višak oleinske kiseline (1:18 za stepen konverzije i 1:13 za specifični prinos), dok je za esterifikaciju druga dva flavonoida optimalna pet puta veća koncentracija acil-donora u reakcionoj smeši. Što se tiče uticaja dužine lanca (C₂-C₁₈) i stepena nezasićenosti masne kiseline na sintezu floridzin-oleata, primenom svih kiselina ostvareni su visoki stepeni konverzije, preko 70 %.

U cilju razvoja isplativijeg procesa esterifikacije flavonoida, u drugoj fazi ove disertacije, ispitani su i alternativni, jeftiniji acil-donori, kao što su triacetin i anhidrid sirćetne kiseline za sintezu flavonoid-acetata, i različita biljna ulja (kokosovo, laneno i suncokretovo ulje) za sintezu estara viših masnih kiselina. Triacetin se pokazao kao odgovarajući supstrat za sintezu acetil-derivata flavonoida, pri čemu je postupak acetilovanja floridzina optimizovan u ekološki prihvatljivom sistemu bez rastvarača. Kao proizvod reakcije acetilovanja floridzina dobijena je smeša estara floridzin-6"-*O*-acetata i floridzin-3",6"-*O*-dijacetata. Kinetička studija je pokazala da se proces acetilovanja flavonoida može opisati dvostepenom monosupstratnom reakcijom, a da su oba stupnja reakcije adekvatno opisana reverzibilnom Mihaelis-Mentenovom kinetikom u celom ispitanom reakcionom toku. Kada je reč o upotrebi prirodnih biljnih ulja kao acil-donora, sva ispitana ulja su se pokazala kao dobri supstrati u reakciji

esterifikacije sva tri flavonoida (ostvareni stepeni konverzije preko 65 %) pri čemu kao proizvodi reakcije nastaju smeše estara flavonoida i kiselina prisutnih u ulju. Primenom statističkih metoda planiranja i metode odzivnih površina reakcija esterifikacije eskulina primenom lanenog ulja je optimizovana i visok stepen konverzije (78,5 %), prinos (19,13 mg/ml), kao i specifični prinos proizvoda (2,83 mmol/g_{enzima}) su postignuti pod optimalnim uslovima. Određeni optimalni uslovi su uspešno primenjeni i u reakcijama transesterifikacije eskulina korišćenjem druga dva ulja.

Kao drugi način da se doprinese razvoju isplativijeg procesa esterifikacije estara, u narednoj fazi optimizovana je imobilizacija CAL B na tri odabrana LifeTechTM nosača sa epoksi (ECR 8285F), oktadecil (ECR 8806M) i amino (ECR 8409F) funkcionalnim grupama. Pripremljeni imobilisani preparati primenjeni su u reakciji sinteze estara tri pomenuta flavonoida, pri čemu lipaze imobilisane na hidrofobni i nosač sa epoksi grupama pokazuju veoma dobru esterifikacionu aktivnost i odličnu operativnu stabilnost i tokom 15 ciklusa reakcije esterifikacije.

U cilju proširenja primene estara flavonoida, ispitana je mogućnost njihovog inkorporiranja u različite kozmetičke formulacije i praćena je kinetika otpuštanja sintetisanih estara kroz Strat-MTM membranu koja služi kao model sistem za transdermalni prenos. U svim eksperimentima primećeno je da do prenosa komponente dolazi sa zakašnjenjem (*lag* faza) i da koeficijent difuzije estara opada sa povećanjem broja C atoma i smanjenjem broja dvostrukih veza u lancu masne kiseline. Formulacije u kojima je voda kontinualna faza su se pokazale kao najpogodniji sistemi za inkorporiranje estara, a najveći efektivni koeficijenti difuzije ostvareni su prilikom otpuštanja estara iz gel-emulzija. I na kraju, u cilju ispitivanja mogućnosti komercijalne primene estara flavonoida dobijenih u reakciji sa prirodnim uljima procenjena je stabilnost pripremljenih gel-emulzija, određen efekat hidratacije i stepen iritabilnosti nakon topikalne primene. Pripremljene gel-emulzije pokazuju dobru stabilnost i nakon 2 meseca skladištenja. Štaviše, sve ispitane formulacije pokazuju dobar efekat hidratacije kože, uz minimalnu iritabilnost pojedinih formulacija i odličnu dermatološku kompatibilnost.

Cljučne reči: flavonoidi, lipaza, esterifikacija, imobilizacija, biljna ulja, transdermalna difuzija, kozmetičke formulacije.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj:

Enzymatic synthesis of flavonoid esters and controlled release from cosmetic formulation

Abstract

Within this doctoral dissertation, the possibility of efficient and economical enzymatic synthesis of esters of three flavonoids (floridzin, naringin and esculin) using different acyl donors and immobilized lipases B from *C. antarctica* as a biocatalyst was investigated. Additionally, transdermal diffusion characteristics of synthesized esters from various cosmetic formulations were determined. Synthesis of esters of the three aforementioned flavonoids using oleic acid as an acyl donor and Novozym[®] 435 as a biocatalyst was optimized and it was shown that the concentration of flavonoid and substrate molar ratio were two the most important factors influencing the synthesis process. The maximum conversion degree of all three flavonoids was achieved at a minimum initial flavonoid concentration, 10 mM. On the other hand, the optimum conditions for product yield as output depend on the acyl acceptor used, given that 30 mM and 70 mM were optimal concentrations of naringin and esculin for achieving the highest product yields. When it comes to the substrate molar ratio, it was shown that the large excess of oleic acid (1:18 for the conversion degree and 1:13 for the specific yield) was preferable for synthesis of floridzin-oleate, while for the esterification of other two flavonoids, five fold excess of oleic acid was optimal for high product yields. When it comes to the effect of fatty acids chain length (C₂-C₁₈) and unsaturation degree on floridzin-oleate synthesis, it was shown that high conversion degrees, over 70 % were obtained in reactions with all examined fatty acids.

In order to develop the more economical process of flavonoid esterification, in the second phase of this thesis, alternative, cheaper acyl donors, such as triacetin and acetic anhydride for the synthesis of flavonoid acetate, and various vegetable oils (coconut, linseed and sunflower oil) for the synthesis of long chain fatty acid esters were examined. Triacetin proved to be the appropriate substrate for the synthesis of the acetyl derivative of flavonoids and eco-friendly, solvent-free enzymatic acetylation of floridzin was optimized. The mixture of floridzin-6 "-O-acetate and floridzin-3", 6 "-O-diacetate was obtained as a product of this reaction. Kinetic study revealed that acetylation process could be regarded as a two-step mono-substrate reaction and, within entire reaction time, both stages were adequately described by reversible Michaelis-Menten kinetics. When it comes to the usage of natural

vegetable oils as an alternative acyl donors, it was shown that all examined oils were good substrates for esterification of all three flavonoids (conversion degree above 65%), whereby the mixtures of different fatty acid esters of flavonoids were obtained as products of reactions. By using experimental design and response surface methodology (RSM), the esterification of esculin using linseed oil as acyl donor was optimized and under optimal conditions high molar conversion (78.5%), product yield (19.13 mg/ml), as well as specific yield (2.83 mmol/g_{enzyme}) were achieved. Determined optimums were successfully applied in esculin transesterification with other oils. As another way to contribute to the development of a more cost-effective esterification process, CAL B immobilization on the three selected LifeTech™ carriers with epoxy (ECR 8285F), octadecyl (ECR 8806M) and amino (ECR 8409F) functional groups was optimized. Prepared immobilized enzymes were applied as biocatalyst for esterification of the three aforementioned flavonoids, and the lipase immobilized on the carriers with hydrophobic and epoxy group have shown very good esterification activity and excellent operational stability during the 15 reaction cycles.

In order to extend the use of flavonoid esters, the possibility of their incorporation into various cosmetic formulations was examined and transdermal diffusion of synthesized esters using Strat-M™ membrane was investigated. The presence of *lag* phase was observed in all experiments and it was shown that the effective diffusion coefficient of esters decreased with an increase in the number of C atoms and with decrease in the number of double bonds in the fatty acid chain. Emulsions in which the water was continuous phase proved to be the most suitable systems for the incorporation of flavonoid esters, and the highest effective diffusion coefficients were achieved by release of esters from gel emulsions. Finally, in order to investigate the possibility of commercial application of flavonoid esters obtained in reaction with natural oils, the stability of the prepared gel emulsions, their hydration effect and irritability after topical administration was assessed. The prepared gel emulsions have shown good stability even after 2 months of storage. Moreover, all the examined formulations have shown excellent hydration effect, nonirritant character and overall dermatological compatibility.

Keywords: flavonoids, lipase, esterification, immobilization, vegetable oils, diffusion, transdermal diffusion, cosmetic formulation.

Academic Expertise: Technological Engineering

Major in: Biochemical Engineering and Biotechnology

UDC number:

Sadržaj

1. Uvod	1
2. TEORIJSKE OSNOVE	4
2.1. Flavonoidi: hemijska struktura	4
2.1.1. Klasifikacija flavonoida	5
2.1.2. Prirodni izvori i rasprostranjenost flavonoida	7
2.1.2.1. Flavonoli	7
2.1.2.2. Flavanoni	8
2.1.2.3. Flavoni	9
2.1.2.4. Katehini	9
2.1.2.5. Antocijanidini	9
2.1.2.6. Izoflavonoidi	10
2.1.2.7. Ostale grupe flavonoida: halkoni, dihidrohalkoni, auron i kumarini	10
2.1.3. Biološka aktivnost flavonoida	12
2.1.3.1. Antioksidativna aktivnost flavonoida <i>in vitro</i>	12
2.1.3.2. Antimikrobno dejstvo flavonoida	19
2.1.3.3. Antitrombocitna i vazoprotektivna uloga flavonoida	23
2.1.3.4. Estrogena aktivnost flavonoida	24
2.1.3.5. Citotoksična antitumorna aktivnost flavonoida	24
2.2. Lipaze: osnovne osobine i producenti	26
2.2.1. Struktura i mehanizam delovanja lipaza	27
2.2.2. Lipaza tipa B iz <i>Candida antarctica</i>	29
2.3. Imobilizacija enzima	32
2.3.1. Adsorpcija enzima na čvrstim nosačima	34
2.3.2. Kovalentna imobilizacija	35
2.4. Enzimaska sinteza estara flavonoida	37
2.4.1. Faktori koji utiču na enzimsku esterifikaciju flavonoida	38
2.4.1.1. Uticaj vrste i koncentracije enzima	38
2.4.1.2. Uticaj acil-akceptora (flavonoida)	44
2.4.1.3. Uticaj acil-donora	45
2.4.1.4. Uticaj molarnog odnosa supstrata	47
2.4.1.5. Uticaj reakcionog medijuma	48
2.4.1.6. Uticaj temperature	52
2.4.1.7. Uticaj sadržaja vode	53
2.4.2. Uticaj acilovanja flavonoida na biološku aktivnost, rastvorljivost i stabilnost	54
2.4.2.1. Acilovanje flavonoida aromatičnim kiselinama	54
2.4.2.2. Acilovanja flavonoida alifatičnim kiselinama	55

2.4.3. Mogućnosti primene acilovanih flavonoida	58
2.4.3.1. Primena u prehrambenoj industriji	58
2.4.3.2. Primena u kozmetici	59
2.5. Enzimaska kinetika bisupstratnih reakcija	61
2.6. Transdermalni prenos bioaktivnih komponenti	66
2.6.1. Koža kao biološka barijera	66
2.6.1.1. Putevi prenosa aktivne komponente kroz kožu	67
2.6.1.2. Uticaj fizičko-hemijskih svojstava bioaktivne komponente na put apsorpcije	69
2.6.2. Kozmetičke formulacije kao sistemi za kontrolisano otpuštanje	70
2.6.2.1. Emulzije	70
2.6.2.1.1. Emulzije tipa ulje u vodi (U/V)	72
2.6.2.1.2. Emulzije sa tečnim kristalima	72
2.6.2.1.3. Emulzije na bazi akril-auratnih kopolimera	73
2.6.2.1.4. Emulzije tipa voda u ulju (V/U)	74
2.6.2.2. Lipozomi kao sistemi za kontrolisano otpuštanje	75
2.6.3. Prenos mase	77
2.6.3.1. Molekulska difuzija	77
2.6.3.1.1. Stacionarna difuzija	79
2.6.3.1.2. Nestacionarna difuzija	81
2.6.3.2. Sistemi za eksperimentalno određivanje koeficijenata difuzije	85
2.6.3.3. Sintetičke membrane koje se koriste za ispitivanje transdermalnog prenosa	87
3. EKSPERIMENTALNI DEO	90
3.1. Materijali	90
3.2. Metode	93
3.2.1. Enzimaska sinteza estara flavonoida	93
3.2.2. HPLC kvantitativna analiza uzoraka	93
3.2.3. HPLC-MS analiza	95
3.2.4. Prečišćavanje proizvoda	95
3.2.5. Spektralne analize	96
3.2.6. Centralni kompozitni rotabilni plan i metoda odzivnih površina	96
3.2.7. Kinetička studija sinteze acetil-derivata flavonoida	97
3.2.8. Imobilizacija lipaze na LifeTech™ ECR nosače	98
3.2.9. Imobilizacija lipaze na Purolite® MN102	99
3.2.10. Imobilizacija lipaze na Eupergit® C250L	99
3.2.11. Imobilizacija lipaze na nanočestice SiO ₂	99
3.2.12. Određivanje hidrolitičke aktivnosti lipaze	100

3.2.13. Određivanje sadržaja proteina metodom po Bredfordu	101
3.2.14. Određivanje antioksidativne aktivnosti estara floridzina	101
3.2.15. Priprema kozmetičkih formulacija	102
3.2.15.1. Priprema gel-emulzija	103
3.2.15.2. Priprema emulzija tipa ulje u vodi	103
3.2.15.3. Priprema emulzija tipa gel u ulju	103
3.2.15.4. Priprema emulzija sa tečnim kristalima	103
3.2.15.5. Priprema lipozoma prolipozomnom metodom	104
3.2.15.6. Priprema lipozoma sa kolesterolom metodom tankog filma	104
3.2.16. Difuzioni eksperimenti	105
3.2.17. Određivanje stabilnosti emulzija	106
3.2.18. Ispitivanje efekta hidratacije	106
3.2.19. Ispitivanje iritabilnosti - Zein test	107
3.2.20. RBC test	107
4. REZULTATI I DISKUSIJA	109
4.1. Enzimska sinteza estara flavonoida sa masnim kiselinama kao acil-donorima	109
4.1.1. Enzimska sinteza floridzin-oleata: HPLC i spektralna analiza proizvoda	110
4.1.2. Optimizacija faktora enzimske sinteze floridzin-oleata	112
4.1.2.1. Izbor reakcionog medijuma	112
4.1.2.2. Optimizacija reakcionih faktora metodom odzivnih površina	114
4.1.2.3. Uticaja dužine lanca karboksilnih kiselina na esterifikaciju floridzina	123
4.1.2.4. Uticaja stepena nezasićenosti lanca masne na esterifikaciju floridzina	125
4.1.3. Antioksidativna aktivnost sintetisanih estara floridzina	127
4.1.4. Optimizacija enzimske sinteze estara naringina i eskulina	128
4.1.4.1. Uticaj koncentracije flavonoida	128
4.1.4.2. Uticaj molskog odnosa supstrata	131
4.1.5. Optimalni uslovi sinteze estara tri različita flavonoida	132
4.2. Primena alternativnih acil-donora u reakciji sinteze estara flavonoida	135
4.2.1. Primena alternativnih acil-donora za sintezu flavonoid-acetata	135
4.2.1.1. Acetilovanje floridzina u organskom rastvaraču	136
4.2.1.2. Acetilovanje floridzina u sistemu bez rastvarača	141
4.2.1.2.1. Optimizacija procesa u sistemu bez rastvarača: uticaj koncentracije floridzina	143
4.2.1.2.2. Optimizacija procesa u sistemu bez rastvarača: uticaj koncentracije enzima	144
4.2.1.3. Sintaza acetil-derivata naringina i eskulina	146
4.2.1.4. Ispitivanje kinetike reakcije acetilovanja flavonoida u sistemu bez rastvarača	147
4.2.1.4.1. Validacija dobijenog kinetičkog modela	150
4.2.2. Primena biljnih ulja kao acil-donora za sintezu estara flavonoida	152

4.2.2.1. Uticaj vrste biljnog ulja na prinos enzimske transesterifikacije	154
4.2.2.2. Optimizacija sinteze estara eskulina sa lanenim uljem kao acil-donorom	159
4.2.2.2.1. Uticaj temperature.....	159
4.2.2.2.2. Optimizacija ostalih reakcionih parametara metodom odzivne površine	160
4.2.2.3. Primena dobijenih optimalnih reakcionih uslova u reakciji transesterifikacije eskulina sa drugim uljima 169	
4.2.3. Različiti acil-donori u reakciji sinteze estara flavonoida	171
4.3. Imobilizacije lipaze tipa B iz <i>C.antarctica</i>	173
4.3.1. Imobilizacija CAL B na LifeTech™ ECR nosače.....	174
4.3.1.1. Uticaj pH na imobilizaciju CAL B.....	176
4.3.1.2. Uticaj početne koncentracije proteina na imobilizaciju CAL B.....	177
4.3.1.3. Uticaj vremena na tok imobilizacije CAL B	179
4.3.2. Primena CAL B imobilisane na različite nosače u reakciji sinteze estara flavonoida..	181
4.3.2.1. Operativna stabilnost CAL B imobilisane na LifeTech nosače	185
4.4. Inkorporiranje estara flavonoida u kozmetičke formulacije i praćenje njihove difuzije.....	190
4.4.1. Difuzija estara flavonoida kroz celuloznoacetatnu membranu	190
4.4.2. Difuzija estara flavonoida inkorporiranih u kozmetičke formulacije kroz celuloznoacetatnu membranu	193
4.4.3. <i>In vitro</i> analiza transdermalne difuzije estara flavonoida inkorporiranih u kozmetičke formulacije	201
4.4.3.1. Transdermalna difuzija acetil-derivata floridzina	202
4.4.3.2. Transdermalna difuzija smeša estara flavonoida dobijenih transesterifikacijom biljnih ulja	207
4.4.3.2.1. Transdermalna difuzija iz gel-emulzija	208
4.4.3.2.2. Transdermalna difuzija iz emulzije ulje u vodi	214
4.4.3.2.3. Transdermalna difuzija iz emulzije tipa gel u ulju	218
4.4.4. Zaključci analize difuzionih karakteristika	221
4.5. Karakterizacija kozmetičkih formulacija sa inkorporiranim estrima flavonoida .	225
4.5.1. Predviđanje stabilnosti emulzija merenjem <i>zeta</i> potencijala	225
4.5.2. Ispitivanje efekta hidratacije i dermatološke kompatibilnosti	227
4.5.2.1. Efekat hidratacije	227
4.5.2.2. Ispitivanje iritabilnosti i dermatološke kompatibilnosti	229
5. Zaključak	231
6. Literatura.....	234

1. Uvod

Flavonoidi su široka grupa strukturno različitih polifenolnih jedinjenja koja se u prirodi pojavljuju u voću, povrću, semenkama, cveću i kori drveta. Najčešće se u prirodi pojavljuju u formi glikozida, mada su prisutni i u oblicima bez šećerne jedinice (aglikon formi). Sastavni su deo ljudske ishrane, a vrlo često se koriste i u kozmetičkim preparatima. Strukturna raznolikost flavonoida posledica je velikog broja kombinacija aglikon formi i različitih šećernih jedinica. Zbog ogromnog broja jedinjenja koja pripadaju grupi flavonoida, ovi molekuli podeljeni su u nekoliko klasa, s tim da broj klasa varira u zavisnosti od toga koji klasifikacioni sistem se koristi. Najčešći oblik klasifikacije flavonoida predstavlja podelu na osnovu njihove hemijske strukture tako da se izdvajaju grupe flavona, flavonola, izoflavonoida, antocijanidina, dok ostale manje grupe flavonoida uključuju halkone, dihidrohalkone, dihidroflavanole, kumarine i aurone [1]. Flavonoidi poseduju nekoliko značajnih fizičko-hemijskih svojstava i pokazuju širok spektar bioloških efekata, kao što su antibakterijsko, antivirusno, antiinflamatorno, antialergijsko, vazodilaciono dejstvo, zatim inhibiraju peroksidaciju lipida, agregaciju trombocita, kao i aktivnost nekih enzimskih sistema, što ih svrstava u dobre konstituente hrane, kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda [2-7]. Flavonoidi ispoljavaju ove osobine jer deluju kao antioksidanti, uklanjaju slobodne radikale i helatori su dvovalentnih katjona [4].

Pored značajnih bioloških svojstava, flavonoide odlikuje slaba rastvorljivost i nestabilnost u različitim medijumima, posebno u lipofilnim sredinama, što značajno otežava njihovu primenu. Imajući ovo u vidu, u novije vreme sve se više primenjuju postupci derivatizacije ovih jedinjenja (glikozilovanje i acilovanje) jer je primećeno da derivati mogu imati veću stabilnost od polaznog flavonoida, a vrlo često dolazi i do poboljšanja biološke aktivnosti u odnosu na polazni molekul. Primećeno je da, pored poboljšanja rastvorljivosti i stabilnosti u lipofilnim sredinama, selektivno acilovanje molekula flavonoida dovodi do poboljšane penetracije ovih molekula kroz ćelijsku membranu [8, 9], povećane antioksidativne [10], antiinflamatorne [11], antikancerogene [10, 12] kao i antimikrobne [13, 14] aktivnosti. Ranije se uglavnom primenjivala hemijska sinteza estara flavonoida katalizovana neorganskim katalizatorima, ali je ovakva sinteza previše zahtevna jer je, zbog neselektivnosti katalizatora, neophodno blokiranje funkcionalnih grupa i njihovo kasnije deblokiranje. Enzimaska sinteza estara je mnogo efikasnija od hemijske sinteze zbog pozicione specifičnosti, s obzirom da enzimskom sintezom ne dolazi do esterifikacije fenolnih hidroksilnih grupa, koje su

odgovorne za antioksidativnu aktivnost molekula, već isključivo hidroksilnih grupa u ugljenohidratnom delu molekula [15, 16]. Pored toga, enzimski katalizovana reakcija esterifikacije flavonoida pruža mogućnost izvođenja reakcije pod blažim uslovima, daje veće prinose i bolji kvalitet proizvoda i što je za industriju najznačajnije, mogućnost isplativije proizvodnje. Lipaze predstavljaju najčešće korišćene biokatalizatore za ovu vrstu reakcije, posebno komercijalni preparat Novozym[®] 435. Da bi enzimski postupak bio konkurentan, svi važni reakcioni parametri moraju biti optimizovani, upotreba biokatalizatora mora biti dovoljno efikasana i ekonomična.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ostvari doprinos u razvoju efikasnog i ekonomičnog postupka sinteze estara predstavnika različitih klasa flavonoida, optimizacijom procesnih parametara, izborom alternativnih acil-donora i biokatalizatora, kao i da se ostvari doprinos proširenju polja primene sintetisanih derivata u kozmetičkim preparatima. Radi dobijanja konkurentnog enzimskog postupka i povećanja prinosa željenih proizvoda cilj prve faze istraživanja je optimizacija ključnih reakcionih parametara (temperature, reakcionog vremena, koncentracije biokatalizatora, koncentracije supstrata) sinteze estara predstavnika različitih klasa flavonoida (floridzina, naringina i eskulina) u reakciji sa oleinskom kiselinom kao acil-donorom. Metoda odzivnih površina i statistička obrada eksperimentalnih podataka pružiće jasan uvid kako u uticaj pojedinačnih faktora, tako i u njihov združeni uticaj na proces sinteze estara floridzina, čime će biti olakšan postupak optimizacije sinteze estara preostala dva flavonoida konvencionalnom metodom.

Pored optimizacije samog postupka sinteze, kao mogući način za snižavanje troškova proizvodnje estara u drugoj fazi ove doktorske disertacije biće ispitani odgovarajući alternativni acil-donori kao supstrati za enzimsku esterifikaciju flavonoida. Dakle, pored čistih masnih kiselina biće ispitani i drugačiji acil-donori koji obezbeđuju veću ekonomičnost proizvodnog postupka i/ili povećanu efikasnost. Tako će u reakciji sinteze floridzin-acetata biti ispitani anhidrid sirćetne kiseline i triacetin kao alternativni acil-donori jer ove supstance obezbeđuju manju kiselost u okolini enzima nego kada se koristi sirćetna kiselina što bi moglo pozitivno uticati na stabilnost enzima. S druge strane, kao supstrati za dobijanje estara viših masnih kiselina biće ispitana različita biljna ulja (suncokretovo, laneno, kokosovo ulje). Ova ulja sadrže smeše masnih kiselina pa se kao proizvod očekuju smeše različitih estara flavonoida, ali to ne smanjuje kvalitet potencijalnog proizvoda, a drastično smanjuje cenu proizvodnje jer su ulja mnogo jeftiniji supstrati od čistih masnih kiselina, naročito polinezasićenih masnih kiselina. Zbog složenosti finalne smeše i velike hidrofobnosti svih

komponentata, veliki deo eksperimentalnih aktivnosti biće posvećen i pronalaženju adekvatnog operativnog režima reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi u cilju analize reakcionog toka sinteze smeše estara flavonoida.

Kao i u većini istraživanja koja se bave ovom tematikom i u prethodnim istraživanjima ove disertacije, obećavajući rezultati su postignuti primenom komercijalne imobilisane lipaze iz *Candida antarctica*, Novozym[®] 435. Imajući u vidu da je cena enzima među najvažnijim faktorima u ukupnoj ceni proizvoda, sledeća faza istraživanja biće posvećena ekonomičnijoj potrošnji enzima u reakcijama sinteze estara flavonoida. Pošto su komercijalni preparati skupi, biće ispitani različiti alternativni i jeftiniji nosači za imobilizaciju enzima, pa tako imobilizacija lipaze tipa B iz *C. antarctica* na odabrane LifeTech nosače ECR serije biće optimizovana, a odabrani imobilisani preparati biće ispitani u reakciji sinteze estara strukturno različitih flavonoida.

U četvrtoj fazi istraživanja, sintetisani estri flavonoida, dobijeni u reakciji transesterifikacije biće inkorporirani u različite kozmetičke formulacije i sisteme za kontrolisano otpuštanje. Fokus istraživanja biće na praćenju brzine difuzije estara flavonoida u Francovoj ćeliji. Prvi, preliminarni deo istraživanja biće izveden sa celuloznoacetatnom membranom da bi se identifikovale razlike u difuzionim profilima različitih estara flavonoida. Cilj je da se definiše uticaj vrste masne kiseline i vrste flavonoida na difuzione karakteristike enzimski sintetisanog estera. U drugoj fazi rada difuzija odabranih estara biće ispitana u sistemu sa sintetskom membranom koja predstavlja model sistem za transdermalni prenos. Ovi eksperimenti će omogućiti da se proceni efikasnost primene estara flavonoida kao aktivnih supstanci u kozmetičkim proizvodima.

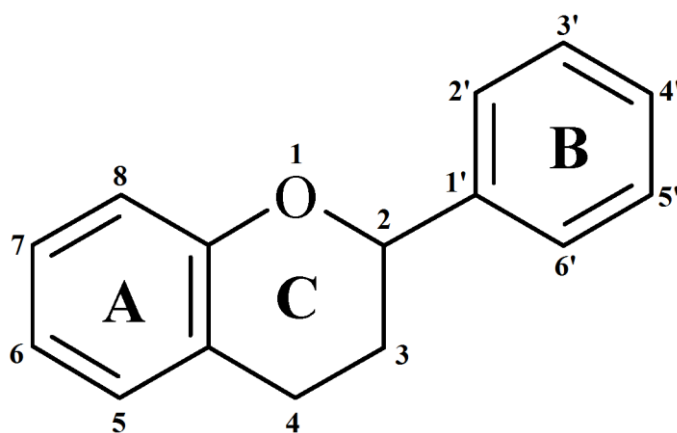
I na kraju, u poslednjoj fazi istraživanja, sistemi iz kojih se ostvaruje najbolji transdermalni prenos estara flavonoida biće korišćeni kao model sistemi za ispitivanje i procenu efikasne i sigurne dermatološke upotrebe. U tom smislu, biće ispitan njihov uticaj na hidrataciju kože, kao i procenjen stepen iritabilnosti i dermatološke kompatibilnosti nakon topikalne primene. Kao sistem za poređenje biće korišćeni isti nosači koji sadrži standardne emoliente: izopropil-miristat i kaprilno-kaprinske trigliceride.

2. TEORIJSKE OSNOVE

2.1. Flavonoidi: hemijska struktura

Flavonoidi, sekundarni metaboliti viših biljaka, su velika grupa polifenolnih jedinjenja koji se međusobno razlikuju u hemijskoj strukturi i karakteristikama. Sveprisutni su u biljnim tkivima u svim ćelijama u kojima se vrši fotosinteza, prema tome, može se očekivati da učestvuju u tom procesu [17]. Otkriveno je da učestvuju u svetloj fazi fotosinteze tokom koje katalizuju transport elektrona [18]. Identifikovano je više od 6000 flavonoida, iako je broj značajan za ishranu daleko manji [4, 19]. U velikom broju naučnih radova objavljeno je da poseduju širok spektar biološke aktivnosti, uključujući antibakterijsku, antivirusnu, antialergijsku [6, 7] i vazodilatatorsku [5]. Pored toga, flavonoidi inhibiraju lipidnu peroksidaciju, agregaciju trombocita, kapilarnu propustljivost, kao i aktivnost enzimskih sistema, uključujući ciklooksigenaze i lipoksigenaze [4]. Ispoljavaju ove aktivnosti kao antioksidanti i helatori dvovalentnih katjona. Manje se zna o apsorpciji i metabolizmu flavonoida, kada se govori o količinama prosečnog dnevnog unosa, ali veruje se da su netoksični. Biohemijske aktivnosti ovih jedinjenja i njihovih metabolita zavise od hemijske strukture i relativne orijentacije različitih ostataka u molekulu.

Flavonoidi su derivati benzo- γ -pirona koji se sastoje od dva kondenzovana prstena. Prvi A prsten je aromatični molekul (benzen), drugi C prsten je heterociklični prsten koji sadrži kiseonik i koji je preko C-C veze povezan sa trećim aromatičnim prstenom B (benzen) (slika 2.1) [19-21].



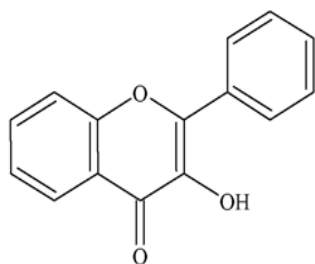
Slika 2.1 Osnovna struktura flavonoida.

Uglavnom su prisutni u biljkama kao glikozidi, dok se aglikon forme (strukture bez šećernog ostatka) javljaju ređe. Najmanje osam različitih monosaharida ili njihove kombinacije (di- i trisaharidi) se mogu vezati za različite hidroksilne grupe aglikon formi. Pa tako, veliki broj flavonoida rezultat je različitih kombinacija aglikon formi flavonoida i šećera. Najčešći šećeri koji se javljaju u molekulu glikozida su D-glukoza i L-ramnoza [19]. Ovi glikozidi su obično *O*-glikozidi sa šećernim ostatkom vezanim za hidroksilnu grupu na poziciji C-3 ili C-7.

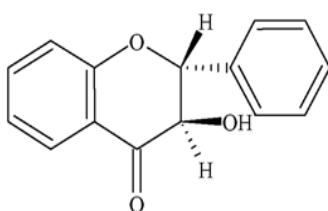
2.1.1. Klasifikacija flavonoida

S obzirom da postoji veliki broj jedinjenja koja se ubrajaju u flavonoide, neophodna je njihova klasifikacija, bazirana najčešće na strukturi osnovnog molekula. Broj klasa varira u zavisnosti od toga koji klasifikacioni sistem se koristi. U literaturi su dostupne različite verzije, ali jedna od sveobuhvatnijih je sistem koji flavonoide koji sadrže hidroksilnu grupu na poziciji C-3 C prstena klasifikuje kao 3-hidroksiflavonoidi i u tu porodicu spadaju grupe: flavonola, dihidroflavanola, antocijanidina, katehina i halkona, dok flavonoidi koji nemaju pomenutu hidroksilnu grupu su klasifikovani kao 3-dezoksiflavonoidi (flavanoni i flavoni) [19]. Klasifikacija u okviru ove dve grupe se zasniva na tome da li i kako se dodatne hidroksi i metil grupe uvode na različite pozicije u molekulu. Izoflavonoidi se razlikuju od ostalih grupa; B prsten je povezan sa C-3 atomom C prstena umesto sa C-2. Antocijanidini i katehini, s druge strane, nemaju karbonilnu grupu na C-4 atomu [4, 19]. Ostale manje grupe flavonoida uključuju dihidrohalkone, flavan-3,4-diole, kumarine i aurone [1].

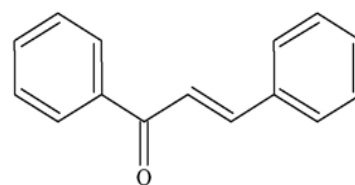
Hemijske strukture određenih grupa flavonoida prikazane su na slici 2.2, dok su u tabeli 2.1 detaljnije navedeni broj i pozicija hidroksilnih grupa i drugih supstituenata pojedinih predstavnika nekoliko klasa flavonoida.



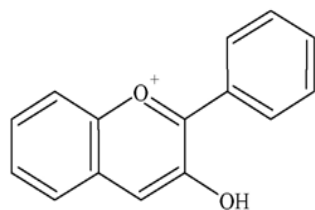
Flavonoli



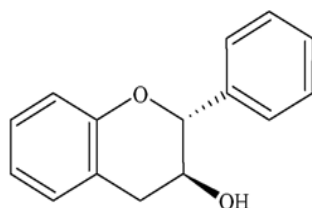
Dihidroflavonoli



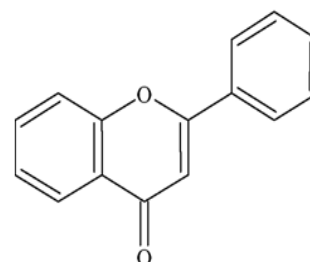
Halkoni



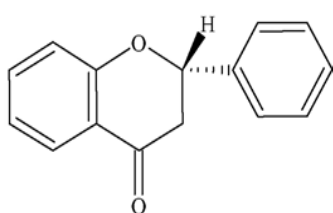
Antocijanidini



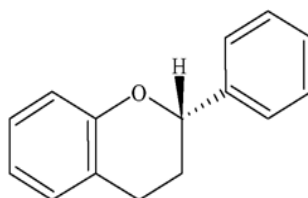
Katehini (flavan-3-ol)



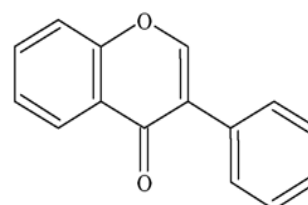
Flavoni



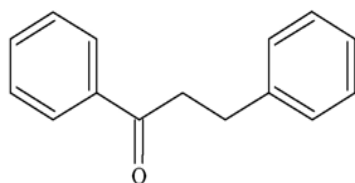
Flavanoni



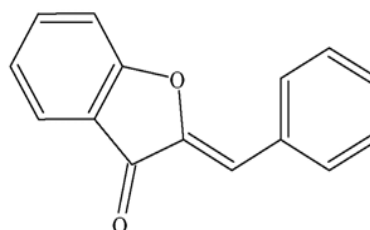
Flavoni



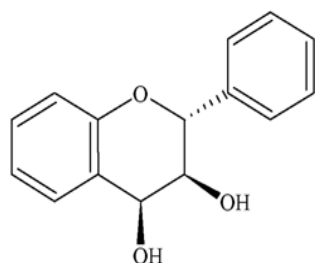
Izoflavonoidi



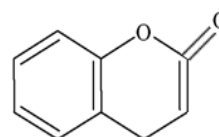
Dihidrohalkoni



Auroni



Flavan-3,4-dioli



Kumarini

Slika 2.2 Hemijske strukture pojedinih grupa flavonoida [22].

Tabela 2.1 Struktura pojedinih predstavnika grupa flavanona, katehina, antocijanidina, izoflavona, dihidroflavonola i halkona [4].

Grupe flavonoida	Ukupan broj OH grupa	Pozicija OH grupa	Supstituenti	Pozicija supstituenta
Flavanoni				
Eriodiktiol	4	5,7,3',4'		
Hesperetin	3	5,7,3'	O-Me	4'
Naringenin	3	5,7,4'		
Hesperidin	2	5,3'	Rh-Glu, O-Me	7, 4'
Naringin	2	7,4'	O-Rh-Glu	5
Katehini				
Leukocianidol	6	3,4,5,7,3',4'		
(+)-katehin	5	3,5,7,3',4'		
(+)-epikatehin	5	3,5,7,3',4'		
Antocijanidini				
Delfinidin hlorid	6	3,5,7,3',4', 5'	Hlor	1
Delfinidin	6	3,5,7,3',4', 5'		
Cijanidin	5	3,5,7,3',4'		
Petunidin	5	3,5,7,4', 5'	O-Me	3'
Peonidin	4	3,5,7,4'	O-Me	3'
Malvidin	4	3,5,7,4	O-Me	3', 5'
Izoflavoni				
Ganistein	3	5,7,4'		
Daidzdein	2	7,4'		
Dihidroflavonoli				
Taksifolin	5	3,5,7,3',4'		
Fustin	4	3,7,3',4'		
Halkoni				
Butein	4	3,4,4',6		
Floretin	4	4,2',4',6'		
Floridzin	3	4,2',4'	O-Glu	6

*Glu-glukoza; Me-metil grupa (CH₃); Rh-ramnoza;

2.1.2. Prirodni izvori i rasprostranjenost flavonoida

Flavonoidi su široko rasprostranjeni u lišću, semenu, kori i cvetovima biljaka. Kao važni konstituenti ljudske ishrane sveprisutni su u voću, povrću, orašastim plodovima, kao i u čajevima, kafi, vinu i pivu [21, 23].

2.1.2.1. Flavonoli

Najpoznatiji flavonoli u ishrani su kvercetin i kaempferol. Kvercetin je prisutan u različitom voću i povrću, ali su najveće koncentracije ovog jedinjenja pronađene u luku. Kvercetin je prisutan u biljkama u raznim glikozidnim formama, a kvercetin-3-ramnoglukozid ili kraće

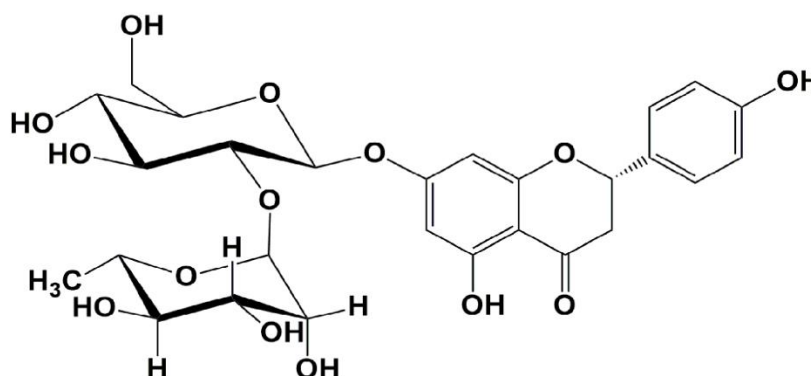
rutin je najrasprostranjenija forma. Pored njega, kvercetin-galaktozid se može naći u jabukama, dok je kvercetin-arabinozid prisutan u bobičastom voću [19]. Pored kvercetina, bitno je spomenuti i druge flavonole, kao što su kaempferol koji se najviše može naći u voću i lisnatom povrću (brokoli), i pojedinim vrstama bobičastog voća, lekovitog bilja, mahunarkama i krtolastom povrću, i miricetin koji je prisutan u kukuruzu, bobičastom voću i čajevima [19, 20]. U voću, flavonoli i njihovi glikozidi se najčešće nalaze u kori.

2.1.2.2. Flavanoni

Flavanoni se javljaju skoro isključivo u citrusnom voću. Najveće koncentracije su pronađene u čvrstim tkivima, ali koncentracije od nekoliko hiljada mg/l su prisutne i u soku. Hesperidin (hesperetin-7-rutinozid) i narirutin (naringenin-7-rutinozid) su glavni flavonoidi pomorandži i mandarina, dok su najviše zastupljeni flavonoidi u grejpfrutu naringin (naringenin-7-*O*-neohesperidozid) (70 %) i narirutin (20 %). Male koncentracije naringenina su takođe pronađene u paradajzu, kao i u raznim produktima na bazi paradajza [19, 20, 24].

2.1.2.2.1. Naringin

Naringin, flavanon-7-*O*-glikozid, sastoji se od naringenina povezanog sa disaharidnom jedinicom, neohesperidozom (slika 2.3). Najzastupljeniji je u grejpfrutu i odgovoran je za njegov gorak ukus. U ljudskom organizmu se razgrađuje do svoje aglikon forme, naringenina.



Slika 2.3 Struktura naringina

Naringin pokazuje razna farmakološka svojstva kao što su antioksidativna aktivnost, anti-inflamatorna aktivnost, smanjenje nivoa masti u krvi, antikancerogenu aktivnost i inhibitornu aktivnost prema određenim citohromalnim P450 enzimima što može dovesti do različitih interakcija sa aktivnim supstancama *in vivo* [25]. Konzumiranje naringina i sličnih flavonoida može uticati na intestinalnu apsorpciju određenih lekova, što može dovesti do povećanja/smanjenja nivoa aktivne komponente u krvi. Uticaj naringina na hiperlipidemiju je

ispitan i pokazano je da suplementacija naringina dovodi do smanjenja povišene koncentracije lipida u plazmi kod miševa koji su konzumirali hranu sa velikim udelom masnoća, kao i do snižavanja koncentracije lipida i holesterola u plazmi miševa čija se ishrana zasnivala na hrani bogatoj holesterolom [26]. Kada je reč o uticaju naringina na rad srca i hipertrofiju, pokazano je da je infarkt miokarda indukovano izoproterenolom kod miševa sprečeno suplementacijom naringina (40 mg/kg na dan). Primena naringina takođe je dovela do smanjenja peroksidacije lipida, povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima, i smanjenja fibroze u srcima miševa tretiranih izoproterenolom [27]. Takođe, hipoglikemijski efekat ovog jedinjenja je veoma poznat [26], a pored toga naringin stimuliše efekat kofeina, pa samim tim može doprineti povećanju njegove aktivnosti prilikom sagorevanja masti i smanjenju celulita. Ren i saradnici su pokazali da naringin može efikasno sprečiti oštećenje kože i apoptozu keratinocita indukovanu UV-B zracima *in vitro* i *in vivo* [28]. Pretpostavlja se da naringin ispoljava svoju ulogu protiv UV-B uzrokovane apoptoze i oštećenja kože inhibicijom aktivacije mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK)/p38.

2.1.2.3. Flavoni

Flavoni se ne nalaze tako često u voću, ali se mogu naći u žitaricama i raznom bilju. Najznačajniji predstavnici iz grupe flavona su apigenin i luteolin. Najznačajniji izvori su crvena paprika i celer [29]. Peršun takođe sadrži apigenin i hrizoeriol. Značajne količine flavona se mogu naći i u ruzmarinu i majčinoj dušici. Flavoni mogu doprineti u izvesnoj meri i razvoju boje biljaka, ako su prisutni u visokim koncentracijama ili ako grade komplekse sa metalnim jonima. Pored toga, mogu uticati i na ukus. Neodiosmin i riofolin smanjuju gorčinu gorkih supstanci, kao što su naringin, kofein, kinin i dr. [19, 20].

2.1.2.4. Katehini

Katehini se obično javljaju u aglikon formi ili su esterifikovani galnom kiselinom. (+)-Katehin i (-)-epikatehin se mogu naći u različitom voću i povrću, kao što su jabuke, kruške, grožđe i breskve. Najveća koncentracija katehina nalazi se u čaju i crnom vinu [30].

2.1.2.5. Antocijanidini

Antocijani ili antocijanidin glikozidi su odgovorni za crvenu, plavu ili ljubičastu boju jestivih plodova kao što su: šljive, jabuke, patlidžan i razno bobičasto voće [19]. Antocijani se često javljaju kao kompleksi. Nivo antocijanina u voću obično raste kako voće sazreva [20]. Najpoznatiji predstavnici grupe antocijanidina su pelargonidin, cijanidin, delfinidin i malvidin. Antocijanini se koriste kao agensi za bojenje pića i drugih prehrambenih proizvoda [31].

2.1.2.6. Izoflavonoidi

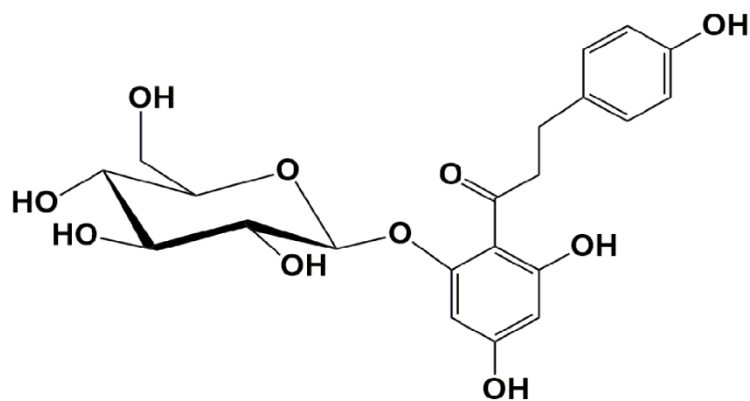
Izoflavonoidi su posebna klasa flavonoida najpoznatiji po estrogenoj aktivnosti. Strukturno se razlikuju od uobičajenih flavonoida u orijentaciji B prstena. Postoje izoflavanoni, izoflavoni i izoflavonoli. Najpoznatiji izoflavonoidi su daidzdein i genistein. Izoflavonoidi se uglavnom nalaze u mahurankama. Soja je glavni izvor daidzdeina i genisteina, koji se takođe mogu naći u crnom pasulju, grašku i klicama deteline. Ostali izoflavonoidi, biohanin A, koumesterol i formononetin su pronađeni u boraniji, grašku, pasulju, klicama lucerke i deteline, semenu suncokreta [19, 20].

2.1.2.7. Ostale grupe flavonoida: halkoni, dihidrohalkoni, auron i kumarini

Halkoni, dihidrohalkoni i auron su tri različite vrste jedinjenja koje obuhvataju više od 900 prirodnih flavonoida prijavljenih u literaturi do 2003. godine [32]. Halkoni i auron su najpoznatiji kao žuto-narandžasti cvetni pigmenti pojedinih vrsta *Coreopsis* i *Asteraceae taxa*. Međutim, raspostranjenost ovih klasa flavonoida nije ograničena samo na cveće, već se oni mogu naći u različitim vrstama biljnih tkiva. Halkoni su strukturno jedna od najrazličitijih grupa flavonoida, s obzirom da formiraju širok spektar dimera, oligomera i konjugata raznih vrsta. Pored toga, njihov veliki značaj ogleda se u činjenici da predstavljaju neposredne prekursore u biosintezi ostalih klasa flavonoida [32]. Osnovna karakteristika koja razlikuje halkone i dihidrohalkone od drugih flavonoida, je prisustvo otvorenog lanca sa tri C atoma koji povezuje A- i B-prsten umesto heterocikličnog C-prstena prisutnog kod ostalih klasa flavonoida (slika 2.2). U biljkama, halkoni prelaze u odgovarajuće (2S) - flavanone u stereospecifičnoj reakciji katalizovanoj enzimom halkon izomerazom. Zbog ovoga, halkoni, dihidrohalkoni i auron se ponekad opisuju zajedno sa flavanonima i dihidroflavonolima [32]. Pored njih tu je i grupa kumarina (1-benzopiran-2-on), hemijska organska jedinjenja u klasi benzopirona koja se nalaze u mnogim biljkama. Kumarini poseduju različite biološke osobine, uključujući antimikrobnu, antivirusnu, antiinflamatornu, antioksidativnu i pokazuju inhibitornu aktivnost različitih enzima [33]. Farmakološki, kao i mnoga druga jedinjenja kumarini i njihovi derivati svrstani su u široku grupu flavonoida [34].

2.1.2.7.1. Floridzin

Floridzin (florelin-2'-O-glukozid) je član klase dihidrohalkona, koji se sastoji iz C₆-C₃-C₆ strukture (dva aromatična prstena povezana preko C3 lanca) povezane sa β-D-glukopiranozom na poziciji 2' (slika 2.4).

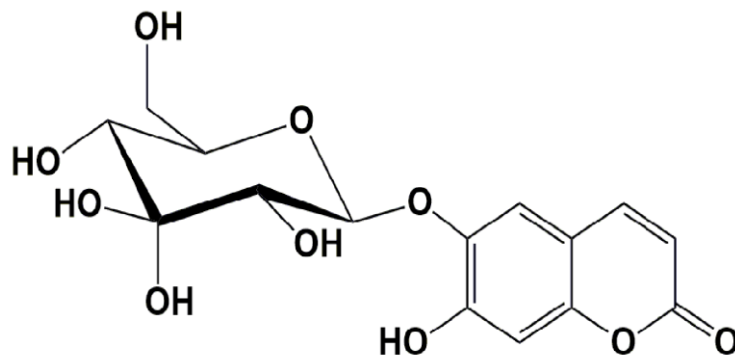


Slika 2.4 Struktura floridzina.

Drvo jabuke (*Malus sp.*) akumulira velike količine floridzina, dok druge vrste sadrže ovo jedinjenje u veoma malim količinama. Obično se dobija ekstrakcijom iz kore jabuke. Tačna fiziološka uloga ovog jedinjenja još uvek nije potpuno razjašnjena, ali njegov blagotvoran uticaj na zdravlje ljudi je dobro poznat. Generalno, kao i većina fenolnih jedinjenja, floridzin ima antioksidativnu aktivnost što pruža mogućnost njegove upotrebe kao prirodnog antioksidanta u hrani i kozmetici. Uočeno je da zahvaljujući svojoj antioksidativnoj aktivnosti, ima ulogu i u zaštiti od kardiovaskularnih bolesti, slično kao estrogen [35]. Pored dobrih antioksidativnih svojstva, floridzin ima još važniju vrlo specifičnu ulogu regulatora transporta glukoze u ljudskom telu. Zbog toga, sve je veće interesovanje za razjašnjenjem regulacionog mehanizma i mogućnosti primene floridzina u farmaceutskim preparatima za lečenje dijabetesa [36, 37]. S obzirom da je utvrđeno da floridzin smanjuje nivo glukoze u krvi bez povećanja telesne mase, predloženo je da može imati ulogu u lečenju dijabetesa tipa 2. Takođe, primećeno je da njegov uticaj na transport glukoze za posledicu ima povećanu potrošnju kalorija, pa bi lečenje floridzinom verovatno rezultiralo gubitkom težine, što ga čini potencijalno zanimljivim za primenu u terapiji protiv gojaznosti [36]. Postoje i indikacije da je floridzin uključen u sprečavanje rasta tumorskih ćelija blokiranjem aktivnost proteinske kinaze C [35]. Nedavno, dermokozmetička primena floridzina koje je rezultirala velikim brojem kozmetičkih proizvoda koji sadrže floridzin, dala je važan doprinos njegovoj povećanoj komercijalnoj primeni [38]. Njegova primena zasnivala se uglavnom na njegovoj zaštitnoj ulozi od štetnih efekata UV zračenja, s obzirom na njegovu mogućnost uklanjanja slobodnih radikala. Ali i pored toga, potvrđeno je da je sposoban da poboljša proizvodnju melanina (melanogeneza) aktivacijom kaskade enzima uključujući tirozinazu, što je kao rezultat imalo povećanu zaštitu od ultraljubičastog zračenja [35].

2.1.2.7.2. Eskulin

Eskulin je kumarin glukozid (slika 2.5) koji se u prirodi može naći u divljem kestenu. Pokazuje dobru antioksidativnu, antiinflamatornu, kao i antihistaminsku aktivnost [39]. Ranije se pretežno koristio za lečenje perifernih venskih bolesti, putem oralne primene [40]. Međutim, prilikom novijih istraživanja ustanovljeno je da eskulin inhibira određene enzime (hijaluronidaza, kolagenaza), da apsorbuje UV-B zrake, kao i da poboljšava mikrocirkulaciju kože, čime postaje pogodan sastojak za različite kozmetičke preparate. Koristi se u lečenju verikoznih veza i hemoroida [39]. Poznata je njegova primena u kremama protiv starenja i gubitka elastičnosti kože, anticelulit emulzijama, losionima protiv opadanja kose, proizvodima za zaštitu od sunca i slično.



Slika 2.5 Struktura eskulina

2.1.3. Biološka aktivnost flavonoida

Što se tiče biološke aktivnosti flavonoida, ova jedinjenja su poznata kao jako dobri antioksidanti. Mađutim, pored njihove antioksidativne aktivnosti, ustanovljeno je da flavonoidi poseduju i druge višestruke biološke aktivnosti kao što su: antivirusna [41], antibakterijska, antialergijska [7, 41], antiinflamatorna, antikancerogena i vazodilatorna [5]. Pored toga, oni su u stanju da inhibiraju lipidnu peroksidaciju [42] kao i agregaciju trombocita [43], i da poboljšaju permeabilnost kapilara [2, 44].

2.1.3.1. Antioksidativna aktivnost flavonoida *in vitro*

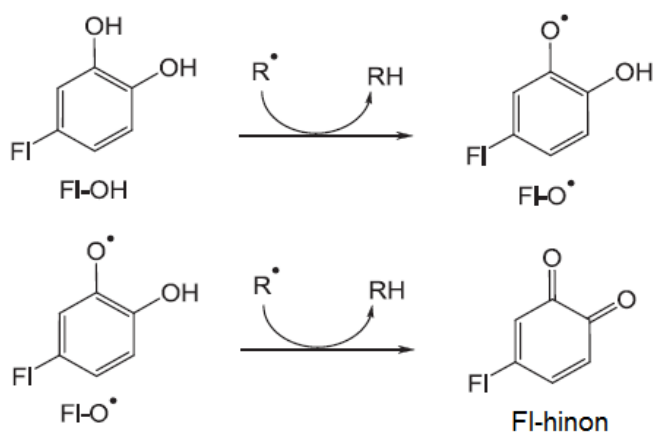
Flavonoidi kao antioksidativna jedinjenja mogu sprečiti oštećenje uzrokovana slobodnim radikalima, pomoću sledećih mehanizama:

- direktnim uklanjanjem reaktivnih radikala kiseonika (ROS, eng. „reactive oxygen species“)

- aktivacijom antioksidativnih enzima
- sposobnošću heliranja metala
- redukcijom α -tokoferil radikala
- inhibicijom oksidaza
- ublažavanjem oksidativnog stresa izazvanog azot-oksidom
- povećanjem nivoa urinske kiseline
- modifikacijom prooksidativnih osobina antioksidanata male molekulske mase [2].

2.1.3.1.1. Direktno uklanjanje reaktivnih radikala kiseonika (ROS)

Flavonoidi su sposobni da uklanjaju slobode radikale, kao što su OH^\bullet , O_2^\bullet , i LOO^\bullet (lipidni peroksidni radikal), direktnim doniranjem atoma vodonika. Radikali se inaktiviraju po mehanizmu prikazanom na slici 2.6, gde je R^\bullet slobodni radikal, a Fl-O^\bullet flavonoid fenoksil radikal [2].



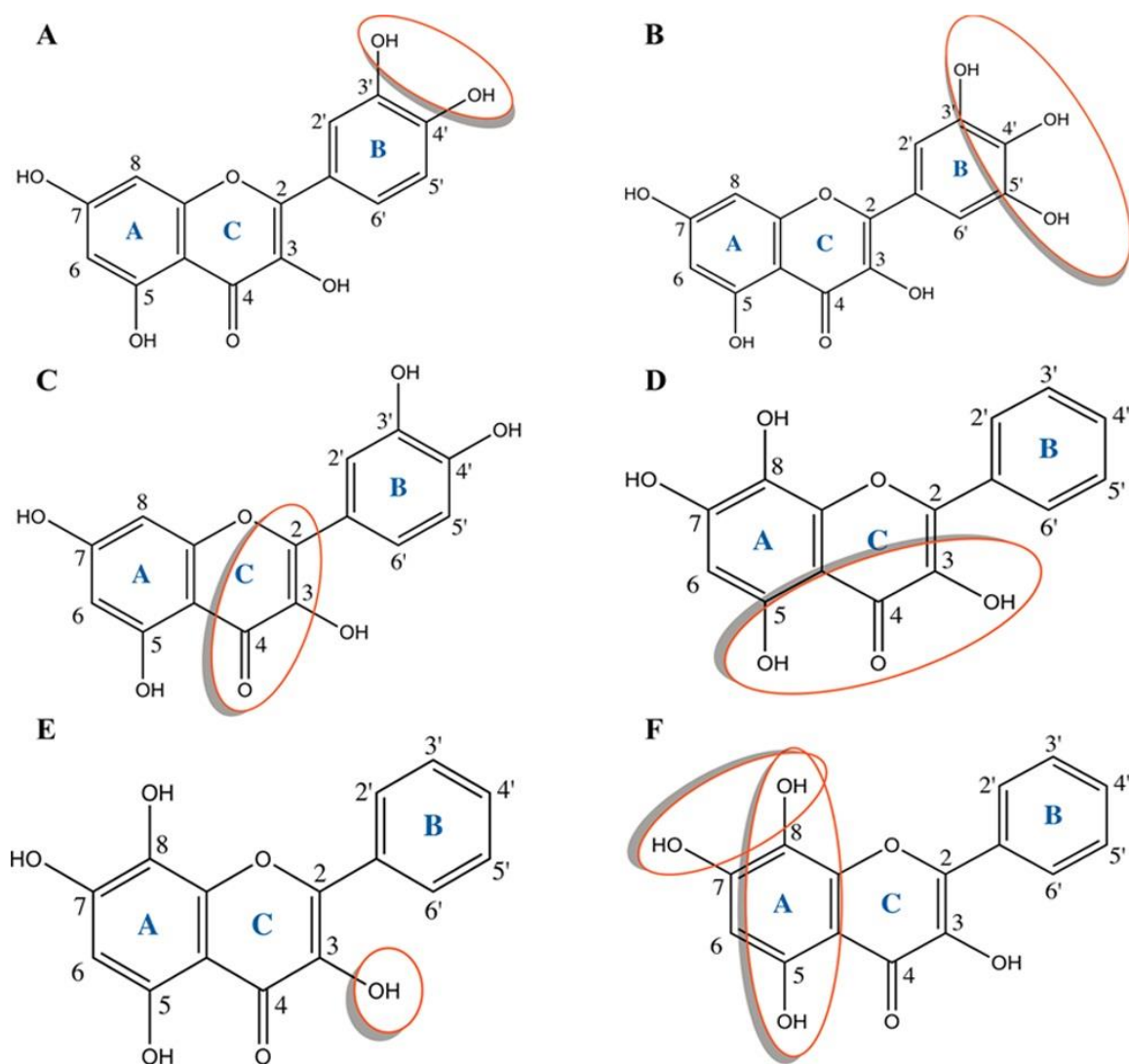
Slika 2.6 Uklanjanje reaktivnih kiseoničnih radikala (R^\bullet) pomoću flavonoida. Slobodni radikal Fl-O^\bullet može da reaguje sa drugim slobodnim radikalom formirajući stabilnu hinonsku strukturu.

Antioksidativna aktivnost flavonoida određena *in vitro* zavisi od rasporeda funkcionalnih grupa na osnovnoj strukturi. I konfiguracija i ukupan broj hidroksilnih grupa značajno utiču na mehanizam antioksidativne aktivnosti [23]. Konfiguracija hidroksilnih grupa na B prstenu najviše utiče na mehanizam uklanjanja ROS, dok supstitucija prstena A i C ima mali uticaj na konstantu brzine uklanjanja superoksid anjonskih radikala [45]. Antioksidativna aktivnost *in vitro* može biti povećana polimerizacijom flavonoid monomera, npr. proantocijanidini (takođe poznati kao kondenzovani tanini) kao i polimeri katehina su odlični *in vitro* antioksidanti zbog velikog broja hidroksilnih grupa u svojim molekulima. Antioksidativni kapacitet proantocijanidina zavisi od dužine lanca oligomera kao i vrste ROS sa kojim reaguju.

Glikozilacija flavonoida smanjuje njihovu antioksidativnu aktivnost *in vitro* u odnosu na aglikon formu. Glikozilacijom kvercetina smanjuje se kako njegova antioksidativna aktivnost tako i sposobnost uklanjanja superoksid i hipohlorit radikala [46]. Glavne strukturne karakteristike flavonoida koje su neophodne za efikasno uklanjanje radikala mogu se sažeti na sledeći način:

- Hidroksilne grupe na B prstenu su važne za doniranja molekula vodonika. *o*-Dihidroksi (katehol) struktura B prstena pruža veću stabilnost strukturi radikala i učestvuje u delokalizaciji elektrona (slika 2.7 A).
- Pirogalol grupa (hidroksilne grupe na 3'-, 4'- i 5'- pozicijama B prstena) povećava antioksidativni kapacitet u poređenju sa flavonoidom sa samo jednom OH grupom na B prstenu (slika 2.7 B).
- Delokalizacija elektrona sa B prstena je omogućena prisustvom C-2, C-3 dvostruke veze u kombinaciji sa 4-okso grupom u prstenu C, što takođe doprinosi antioksidativnom kapacitetu (slika 2.7 C).
- 3-OH grupa C prstena i 5-OH grupa A prstena u blizini 4-okso grupe na C prstenu takođe je odgovorna za visoki antioksidativni kapacitet (slika 2.7 D).
- Prisustvo slobodne 3-OH grupe je važno za ovu aktivnost, s obzirom da dalje modifikacije (npr. 3-*O*-glikozilacije) dovode do smanjenja antioksidativnog kapaciteta (slika 2.7 E)
- U A prstenu, parovi hidroksilnih supstituenata uključujući pozicije 5 i 8 doprinose visokom antioksidativnom kapacitetu. Ovo važi za obe i 5,8- i 7,8-hidroksilacije (slika 2.7 F), dok odgovarajuće grupe na pozicijama 5 i 7 imaju mali uticaj. Prisustvo samo jedne 7-hidroksil grupe takođe ima mali značaj, za razliku od jedne 5-hidroksil grupe (u blizini 4-okso grupe) koja povećava antioksidativni kapacitet [1].

Prema svim prethodno navedenim kriterijumima, flavanoli kvercetin i miricetin treba da budu najefikasniji u uklanjanju radikala u vodenoj sredini, što je i potvrđeno eksperimentalno [46].



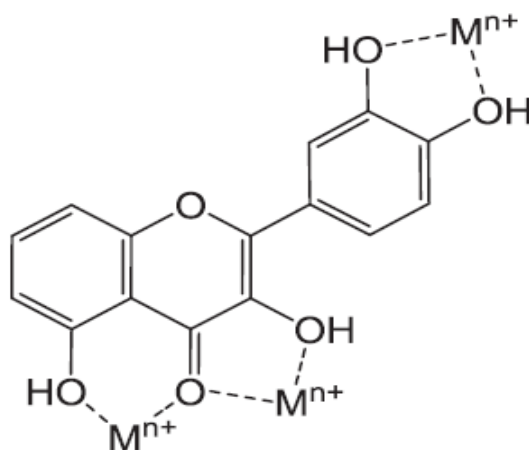
Slika 2.7 Osnovne strukturne karakteristike koje karakterišu antioksidativnu aktivnost polifenola. Oblasti zaokružene crvenom bojom ukazuju na grupe koje su odgovorne za antioksidativnu funkciju. Slova A, B i C označavaju prstene u molekulu flavonoida [1].

2.1.3.1.2. Sposobnost aktivacije antioksidativnih enzima

Drugi mogući mehanizam kojim flavonoidi deluju kao antioksidanti je preko interakcije sa različitim antioksidativnim enzimima. Flavonoidi su sposobni da aktiviraju enzime II faze detoksikacije (npr. NAD(P)H-hinon oksidoreduktaza, glutation S-transferaze i UDP-glukuronozil transferaze), koji su glavni zaštitni enzimi protiv elektrofilnih toksičnih materija i oksidativnog stresa. Regulacija ekspresije ovog zaštitnog gena može biti posredovana elektrofilno reagujućim elementom (EpRE), koji je regulatorna sekvenca većeg broja gena koji kodiraju enzime II faze [2].

2.1.3.1.3. Sposobnost helacije metala

Specifični flavonoidi su poznati kao helatori gvožđa i bakra, čime uklanjaju uzročnike nastajanja slobodnih radikala. Kvercetin je efikasan u sprečavanju oksidativnog procesa u membrani eritrocita indukovano oksidacionim agensima (npr. akrolein i fenilhidrazin) koji dovode do oslobađanja gvožđa u njegovom slobodnom, redoks aktivnom obliku [2]. Pieta je predložio da su vezivna mesta za tragove metala u molekulu flavonoida katehol ostaci u B prstenu, 3-hidroksil i 4-okso grupe u heterocikličnom C prstenu i 4-okso i 5-hidroksil grupe između C i A prstena (slika 2.8) [47].



Slika 2.8 Mesta vezivanja metala u molekulu flavonoida [47].

Pokazano je da je katehol ostatak u B prstenu važan za formiranje Cu²⁺- helata i zbog toga predstavlja glavno mesto koje doprinosi heliranju metala. Kvercetin je posebno poznat kao helator gvožđa kao i po sposobnosti stabilizovanja osobina gvožđa. Prikazano je i da morin i kvercetin formiraju komplekse sa Cd (II) i pokazuju jaku antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uslovima. Njihovi u vodi rastvorni derivati pokazuju nisku toksičnost i stoga se potencijalno mogu koristiti u lečenju trovanja kadmijumom [2].

2.1.3.1.4. Redukcija α -tokoferil radikala

α -Tokoferol je glavni antioksidant u ćelijskim membranama kao i u lipoproteinima male gustine (LDL, *eng. low-density lipoproteins*), koji štiti lipoproteine od oksidativnog oštećenja. Sugerisano je da flavonoidi mogu biti donori vodonika α -tokoferil radikal, koji je potencijalni prooksidans. Osim toga, interakcijom sa α -tokoferil radikalom, oni poseduju veliki potencijal da odlože oksidaciju LDL-a [2]. Flavonoidi (kaempferol, morin, miricetin i kvercetin) su pokazali različitu zaštitnu aktivnost protiv trošenja α -tokoferola u LDL-u, tako da su kaempferol i morin bili manje efikasni od miricetina i kvercetina. Dodavanje ekstrakta

katehina iz zelenog čaja (epigalokatehin, epigalokatehin-galat, epikatehin i epikatehin-galat) pokazano je da dolazi do postepene regeneracije α -tokoferola u ljudskim LDL-u [2].

2.1.3.1.5. Sposobnost inhibicije oksidaza

Flavonoidi inhibiraju enzime odgovorne za produkciju superoksid radikala ($O_2^{\cdot-}$), kao što su ksantin oksidaze i protein kinaze C. Kvercetin i silibin inhibiraju aktivnost ksantin oksidaze što rezultira u smanjenju oštećenja nastalih oksidacijom. Cos i saradnici su sproveli studiju o odnosu strukture i aktivnosti flavonoida, u kojoj je pokazano da luteolin poseduje najveći potencijal za inhibiciju ksantin oksidaze [48]. Pokazano je takođe da flavonoidi inhibiraju ciklooksigenaze, lipoksigenaze, mikrozomalne sukcinoksidaze i NADH-oksidaze [2].

2.1.3.1.6. Ublažavanje oksidativnog stresa izazvanog azot-oksidom

Azot-oksid (NO, *eng. nitrogen oxid*) je važan u održavanju dilatacije krvnih sudova, ali njegove visoke koncentracije mogu dovesti do oksidativnog oštećenja. Azot-oksid nastaje usled oksidacije L-arginina katalizovane azot-oksid sintetazom. Toksičnost azot-oksida je najčešće posredno izražena preko peroksinitrita, koji se formira usled reagovanja NO sa $O_2^{\cdot-}$.

Flavonoidi su ispoljili inhibitornu aktivnost prema produkciji NO u nekoliko ćelijskih linija i kultura aktiviranih lipopolisaharidima. Ovaj efekat je verovatno posledica inhibitornog efekta flavonoida na ekspresiju induktivne azot-oksid sintetaze, a ne inhibicije njegove aktivnosti. Ustanovljeno je da je za ovu aktivnost odgovorna i struktura flavonoida i da su od ključnog značaja dvostruka veza između C-2 i C-3 atoma zajedno sa 4-okso grupom i tri hidroksilne grupe u položaju 3, 5 i 4'. Njihova aktivnost je čak povećana metilovanjem pomenutih hidroksilnih grupa, dok se smanjuje dodavanjem glikozidne grupe kao i kada B prsten ima katehol ili pirogalol strukturu [2].

Kako flavonoidi sprečavaju indukciju azot-oksid sintetaze ili produkciju NO još uvek nije razjašnjeno, ali postoji nekoliko potencijalnih objašnjenja. Kao prvo moguće objašnjenje postavlja se antioksidativna sposobnost flavonoida pomoću koje ova jedinjenja uklanjaju slobodne radikale, dok je druga mogućnost to da flavonoidi mogu delovati kao inhibitori signalnih lipopolisaharidnih molekula. Poznato je da flavonoidi uklanjaju peroksinitrite direktno. Najznačajnija odrednica njihove aktivnosti protiv peroksinitrita je 3',4'-katehol uređenje kao i nesupstituisana 3-hidroksilna grupa. Prividna pozitivna korelacija između broja hidroksilnih grupa, naročito na B prstenu, i antiradikalne aktivnosti je već opisana [23].

2.1.3.1.7. Povećanje nivoa urinske kiseline

Interesantno, postoje mnoge protivrečnosti kada je u pitanju ukupni antioksidativni kapacitet u plazmi ili serumu i ukupna koncentracija flavonoida u plazmi. Lotito i Frei su pretpostavili da veliki porast ukupnog antioksidativnog kapaciteta u plazmi nakon konzumiranja hrane bogate flavonoidima nije uzrokovan samim flavonoidima, ali je verovatno posledica povećanog nivoa urinske kiseline, koja daje glavni doprinos ukupnom antioksidativnom kapacitetu plazme [2, 49]. Nekoliko studija pokazuju da konzumiranje hrane bogate flavonoidima može povećati nivo ureata u plazmi, iako osnovni mehanizam i dalje ostaje nejasan. S druge strane, povećan nivo ureata može biti faktor rizika za neke bolesti, pa navodna „antioksidativna korist“ može biti dovedena u pitanje [50].

2.1.3.1.8. Modifikacija prooksidativnih osobina antioksidanata male molekulske mase

Ispitivane su prooksidativne sposobnosti β -karotena pod određenim uslovima (npr. UV-A zračenje) i predloženo je da njegova kombinacija sa antioksidantom može imati preventivni efekat. Ispitivana je interakcija β -karotena sa naringinom, rutinom i kvercetinom na oštećenja DNK izazvana UV-A zracima u ćelijama fibroblasta embriona miša. Kada je svaki flavanoid kombinovan sa β -karotenom tokom inkubacije, UV-A indukovana oštećenja ćelijske DNK su bila značajno smanjena, a efekti su bili u sledećem redosledu naringin \geq rutin $>$ kvercetin. Na osnovu ovoga, može se doći do zaključka da se kombinacijom β -karotena sa naringinom, rutinom i kvercetinom može povećati bezbednost β -karotena [2].

2.1.3.1.9. Antioksidativna aktivnost flavonoida i njihovih metabolita *in vivo*

Suplementacija proantocijanidina u pacovima (i mlađim i starijim) je pozitivno povezana sa povećanjem antioksidativne aktivnosti u plazmi. Prilikom razmatranja mogućih bioaktivnih mehanizama delovanja flavonoida i njihovih *in vivo* metabolita u ćelijskom sistemu, važno je uzeti u obzir njihov unos i mogući dalji metabolizam u ćeliji. Na primer, (-)-epikatehin i kvercetin uglavnom se akumuliraju kao glukoronidi i konjugati sulfata u krvnoj plazmi nakon oralne primene kod miševa. Nepromenjeni kvercetin nije pronađen u cirkulaciji. Međutim, nakon oralne primene ovih flavonoida, antioksidativna sposobnost plazme pacova je poboljšana što ukazuje na to da i konjugovani metaboliti učestvuju u odbrani od slobodnih radikala [2]. Rasvetljavanje veze između antioksidativnih osobina flavonoida i njihovih metabolita *in vivo* i njihovih strukturnih karakteristika je i dalje izazov. Ograničen je broj dostupnih podataka vezanih za studije sprovedene *in vivo* u ljudima, gde je bio primenjen čist

flavonoid. Umesto toga, hrana bogata flavonoidima (npr. kakao i/ili čokolada, luk) ili pića (npr. kafa i/ili zeleni čaj, sok od nara) se primenjuju u mnogim studijama u ovoj oblasti, i takva hrana sadrži i druge konstituente koji bi mogli da utiču na oksidativno oštećenje i na taj način precene ili potcene realne koristi flavonoida. Pored toga, rezultati ovih studija su dvosmisleni, s obzirom da je u nekima od njih pokazana antioksidativna aktivnost, u drugima nije bilo efekta, dok je u nekima pokazan i blagi prooksidativni efekat [51].

2.1.3.2. Antimikrobno dejstvo flavonoida

Vekovima su preparati koji sadrže flavonoide kao glavni fiziološki aktivni sastojak bili korišćeni prilikom lečenja ljudskih bolesti. Na primer, biljka *Tagetes minuta* (koja sadrži kvercetagetin-7-arabinozil-galaktozid) je bila često korišćena u argentinskoj narodnoj medicini za lečenje zaraznih bolesti [52]. Lekovita svojstva propolisa su odavno poznata, čak je i ovaj melem bio propisan od strane Hipokrata u antičkoj Grčkoj za lečenje rana i čireva. Antimikrobna svojstva propolisa su pripisana visokom sadržaju flavonoida posebno galangina i pinocembrina. *Scutellaria baicalensis* je još jedan primer. Ova lekovita biljka je upotrebljavana hiljadama godina u Kini za lečenje paradontalnih apscesa i inficiranih rana u ustima. Smatra se da je flavonoid baikalein u velikoj meri odgovoran za antimikrobnost aktivnost ove biljke [22].

2.1.3.2.1. Antifungalna aktivnost

Zahvaljujući sposobnosti flavonoida da inhibiraju klijanje spora biljnih patogena, predloženi su i za borbu protiv gljivičnih patogena kod ljudi. Novi flavanon, nedavno izolovan iz žbunja *Eysenhardtia texana* je identifikovan kao 5,7,4'-trihidroksi-8-metil-6-(3-metil-(2-butenil))- (2S)-flavanon i pokazano je da poseduje aktivnost protiv oportunističkog patogena *Candida albicans* [53]. Flavonoid 7-hidroksi-3',4'-(metilendioksi)-flavan, izolovan iz kore voća *Terminalia bellerica*, takođe je pokazao aktivnost protiv *C.albicans*. Dva nova flavonoida izolovana iz *Artemisia giraldi*, identifikovana kao 6,7,4'-trihidroksi-3',5'-dimetoksiflavan i 5,5'-dihidroksi-8,2',4'-trimetoksiflavan, zajedno sa 5,7,4'-trihidroksi-3',5'-dimetoksiflavonom, pokazuju aktivnost protiv *Aspergillus flavus*, vrste gljiva koja izaziva invazivne bolesti kod imunosupresivnih pacijenata [54]. Aktivnost propolisa protiv dermatofita i vrsta iz roda *Candida* je pripisana, barem delimično, visokom sadržaju flavonoida. Za galangin, flavanol koji se obično nalazi u uzorcima propolisa, je pokazano da poseduje inhibitornu aktivnost protiv *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* i *P. italicum* [22].

2.1.3.2.2. Antiviralna aktivnost

Od nedavno, oblast istraživanja koja je od posebnog interesa vezana je za inhibitornu aktivnost nekih flavonoida protiv virusa humane imunodeficijencije (HIV). Do danas većina, ako ne i sva istraživanja, se bave radom sa pandemijskim HIV sojevima i njihovim enzimima. Studije sprovedene *in vitro* su pokazale da baikalin inhibira infekcije tipom HIV-1, inhibirajući replikaciju [55]. Za baikalein, robustaflavon i hinokiflavon takođe je pokazano da inhibiraju HIV-1 reverznu transkriptazu, kao i nekoliko katehina, ali katehini inhibiraju i druge DNK polimeraze i njihova interakcija sa HIV-1 enzimom se stoga smatra da je nespecifična. Pored toga, pokazano je da nekoliko flavonoida uključujući dimetilovani gardenin A i 3,2'-dihidroksiflavon inhibiraju HIV-1 proteinazu. Robinetin, miricetin, baikalein, kvercetagetin i kvercetin 3-*O*-(2''-galol)- α -L-arabinopiranozid inhibiraju HIV-1 integrazu, iako postoji sumnja da je inhibicija HIV enzima kvercetagetinom i miricetinom nespecifična [22]. Takođe je objavljeno da flavonoidi hrizin, acacetin i apigenin sprečavaju HIV-1 aktivaciju preko novog mehanizma koji verovatno podrazumeva inhibiciju transkripcije virusa [56]. Zanimljivo, objavljeno je da hrizin ima najviši terapijski indeks protiv HIV-1 od 21 prirodnih i 13 sintetičkih ispitanih flavonoida.

Flavonoidi takođe poseduju inhibitornu aktivnost protiv niza drugih virusa. Na primer, kvercetin, morin, rutin, dihidrokvercetin, dihidrofisetin, leukocijanidin, pelargonidin-hlorid i katehin poseduju aktivnost protiv čak 7 vrsta virusa, uključujući herpes simpleks virus (HSV), respiratorni sinicijalni virus, poliovirus i Sindbis virus [7]. Predloženi antiviralni mehanizmi delovanja uključuju inhibiciju virusne polimeraze i vezivanje virusne nukleinske kiseline ili proteina kapsida virusa. Pored gore navedenih flavonoida, za tri proantocijanidina iz *Pavetta owariensis* (sa strukturnom sličnošću sa proantocijanidinom A2 i cinataninom B1 i B2) je pokazano da poseduju aktivnost protiv HSV i koksaki virusa tipa B. Takođe je pokazano da dva flavonoida pronađena u propolisu, hrizin i kaempferol, inhibiraju replikaciju HSV virusa, humanog korona virusa i rotavirusa. U skorije vreme, otkriveno je da flavanol galangin pokazuje značajnu antiviralnu aktivnost protiv HSV i koksaki B virusa [22].

Ustanovljeno je da postoji i sinergizam delovanja različitih kombinacija flavona i flavonola. Na primer, kaempferol i luteolin pokazuju sinergizam protiv HSV. Sugerisano je da je zato propolis aktivniji od pojedinačnih njegovih komponenti [57]. Takođe postoji sinergizam između flavonoida i drugih antiviralnih agenasa. Kvercetin, na primer, pospešuje efekte 5-etil-2'-oksiuridina i aciklovira protiv HSV i pseudorabije. Apigenin takođe poboljšava antivirusnu aktivnost aciklovira protiv ovih virusa [22].

2.1.3.2.3. Antibakterijska aktivnost

Rezistentnost na antibiotike je veliki globalni problem i zato postoji hitna potreba za otkrivanjem i razvijanjem novih terapijskih preparata. Flavonoidi, kao metaboliti biljaka, su jedinjenja sa potencijalnom značajnom aktivnošću, uključujući direktnu antibakterijsku aktivnost, sinergizam sa antibioticima i suzbijanje bakterijske virulencije [58]. Unazad nekoliko decenija, u naučnoj literaturi izveštava se o antibakterijskoj ulozi hrane bogate flavonoidima. Nastavilo se i poslednjih nekoliko godina pa je za neke biljne ekstrakte i ekstrakte propolisa otkriveno da je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC, *eng. minimum inhibitory concentrations*) potrebna za antibakterijsku aktivnost bila <100 µg/ml, čak u jednom slučaju i <10 µg/ml. Flavonoidi koji poseduju antibakterijsku aktivnost su bili uspešno izolovani u preko 50 studija, i spisak jedinjenja sa najnižim izračunatim MIC su predstavljena u tabeli 2.2 Jedinjenja sa vrednošću MIC ≤ 100 µg/ml se smatraju vrednim pažnje, dok su ona sa vrednostima MIC ≤ 10 µg/ml veoma interesantna za dalje ispitivanje. Međutim, treba biti oprezan kada se porede MIC vrednosti flavonoida određene u različitim laboratorijama, ali bez obzira na ovo upozorenje neki od flavonoida izolovani od 2005.godine imaju impresivnu antibakterijsku aktivnost [58].

Tabela 2.2 Informacije o 10 prirodnih flavonoida sa najvećom potencijalnom antibakterijskom aktivnošću za koje su podaci pronađeni u studijama sprovedenim u periodu januar 2005. – decembar 2010 [58].

Flavonoidi	Koncentracija ćelija (CFU/ml)	MIC (µg/ml)	
		Gram pozitivne	Gram negativne
Panduratin A	5x10 ⁵	0,06-2,0	N/T
Izobavahalkon	3,75x10 ⁴	0,3-0,6	0,3->39,1
Bartericin A	N/N	0,6-2,4	0,3-39,1
Skandenone	1x10 ⁵	0,5-8	2-32
Kaempferol-3-O-α-L- (2",4"-di-E-p- koumoril)-ramnozid	1x10 ⁵	0,5- >16	>16
Sapicanin A	5x10 ⁵	1,2	N/T
Izolupalbigenin	1x10 ⁵	1,6-3,1	N/T
Flavon	5x10 ⁵	7,8-31,3	1,95-31,3
3'-O-metildiplakol	5x10 ⁵	2-4	>32
Likohalkon A	5x10 ⁵	2-8	N/T

N/N-nije navedena; N/T-nije testirana;

Uticaj strukture na antibakterijsku aktivnost

Strukturne komponente koje poboljšavaju aktivnost flavonoida otvorenog lanca (halkona), generalno poboljšavaju aktivnost i drugih flavonoida. Potvrđeno je da je za antibakterijsku aktivnost halkona bitna hidroksilacija A prstena u poziciji 2', iako se pretpostavlja da ova odlika indirektno utiče na aktivnost pospešivanjem strukturne stabilnosti. Hidroksilacija na drugim pozicijama A prstena, uključujući i položaj 4', takođe poboljšava antibakterijsku aktivnost. Pokazano je da karboksilacija u poziciji 4' čak 60 puta povećava rastvorljivost u vodi sa zanemarljivim gubitkom antibakterijske aktivnosti. Smatra se i da je lipofilnost A prstena veoma važna, međutim halkoni koji poseduju prenil ili geranil grupe u poziciji 3' ne pokazuju zavidnu antibakterijsku sposobnost. Supstitucije koje smanjuju aktivnost halkona uključuju acetoksilacije i metoksilacije u poziciji 2', kao i dodavanje fluora u pozicijama 3' i 5' [58]. Na B prstenu, supstitucija u položaju 4 je važna za antibakterijsku aktivnost. Na primer, halkoni sa alkil lancem od 6 ugljenikovih atoma i piperidinskom grupom u ovom položaju imaju dobru aktivnost. Prisustvo lipofilnih supstituenata, trifluorometil ili bromo grupe u poziciji 3 B prstena takođe poboljšava antibakterijsko dejstvo, sa daljim povećanjem aktivnosti ako je jedna od ove dve grupe prisutna i u poziciji 5 [58]. Što se tiče drugih grupa flavonoida, prisustvo *O*-acil ili *O*-alkilamino grupe u položaju 7 A prstena poboljšava antibakterijsku aktivnost klase flavona. Takođe, veoma je bitna i hidroksilacija u poziciji 5. Prisustvo lipofilne grupe u poziciji 6 ili 8 dovodi do pozitivnog efekta. Kao i kod halkona, i kod flavona, metoksilacijom B prstena dolazi do opadanja aktivnosti, dok hlora i bromo grupe na pozicijama 2',3' i 4' povećavaju antibakterijsku moć flavanona. Što se tiče C prstena, hidroksilacija u poziciji 3 pozitivno utiče na aktivnost flavanona. *O*-alkil i *O*-aril lanci na ovim pozicijama takođe doprinose većoj aktivnosti kod flavanola i flavan-3-ola [58].

Mehanizmi delovanja

U ranijim istraživanjima o flavonoidima (pregled 1987-2004.god.) je predloženo da njihova direktna antibakterijska aktivnost može biti pripisana jednom od sledeća tri mehanizma:

- oštećenju citoplazmatične membrane izazvanom perforacijom i/ili smanjenjem fluidnosti membrane,
- inhibicijom sinteze nukleinske kiseline izazvanom inhibicijom topoizomeraze ili
- inhibicijom energetskog efekta metabolizma izazvanom inhibicijom NADH-citohrom C reduktaze.

U periodu 2005-2010. godina predstavljeni su dodatni dokazi koji podržavaju svaki od tri predložena mehanizma. Rad sa jedinjenjima u klasi flavonola [59], flavan-3-ola [60] i flavolana (proantocijanidina) [61], sugerise da oni oštećuju citoplazmatičnu membranu, verovatno stvaranjem vodonik-peroksida, dok rad sa flavan-3-olima i izoflavonima ukazuje da oni inhibiraju sintezu nukleinske kiseline, putem inhibicije topoizomeraze [62] i/ili dihidrofolat reduktaze [63]. Pored toga, pokazano je da jedinjenja iz grupa flavonola, flavan-3-ola i flavona inhibiraju energiju metabolizma, putem inhibicije ATP sintetaze. Takođe, ukazano je i na postojanje dva nova moguća mehanizma, a to su inhibicija sinteze ćelijskog zida izazvano inhibicijom D-alanin-D-alanin ligaze, i inhibicija sinteze ćelijske membrane, kao posledica inhibicije FabG, FabI, FabZ, Rv0636 i KAS III [58].

2.1.3.3. Antitrombocitna i vazoprotektivna uloga flavonoida

Flavonoidi mogu da deluju na više načina na različite komponente krvi, kao što su trombociti, monociti i lipoproteini male gustine. Trombociti su ključni učesnici u stvaranju ateroma. Flavonoidi mogu da inhibiraju adheziju, agregaciju i lučenje trombocita. Dokazana je antitrombocitna uloga 2',4',4'-trihidroksi-3'-prenilhalkon (izobavahalkon) i 7,4'-dihidroksi-3'-prenil izoflavona (neobavizoflavon) izolovanih iz *Psoralea corylifolia* [64]. Prvi od navedenih pokazuje specifičnu aktivnost protiv agregacije izazvane arahidonskom kiselinom i minimalnu inhibiciju agregacije izazvane kolagenom. Neobavizoflavon, s druge strane inhibira obe vrste agregacije trombocita zeca. Postoje i studije koje izveštavaju o antitrombocitnoj aktivnosti luteolina iz *Gentiana arisanensis* protiv agregacije izazvane arahidonskom kiselinom i agregacije izazvane kolagenom, kao i o značajnim antitrombocitnim efektima na agregaciju indukovanu trombinom i trombocitnim aktivirajućim faktorom (PAF, eng. *platelet activating factor*,) [65]. Slično, za derivate kvercetina i kaempferola, kao i apigenin pokazano je da inhibiraju agregaciju zečijih trombocita izazvanu različitim faktorima [66].

Pri ispitivanju prokoagulantne aktivnosti 65 flavonoida na ljudskim monocitima, kod 18 je pronađeno da inhibiraju interleukin-1 izazvanu ekspresiju tkivnog faktora (Faktor III, tromboplastina), a najaktivniji je bio biflavonoid hinokiflavon. Tkivni faktor je glikoprotein koji inicira koagulaciju krvi, do koje dolazi tek kada su monociti i endotelne ćelije izloženi inflamatornim posrednicima, koji iniciraju prokoagulantna svojstva. Pronađeno je da hinokin inhibira endoksin- i interleukin-indukovanu ekspresiju tkivnog faktora u istom koncentracionom opsegu. Za flavanole kao što su, kvercetin, kaempferol i miricetin pokazano

je da inhibiraju aktivnost adenozin-deaminaze u endotelnim ćelijama aorte, dok su flavoni bili neaktivni [66].

2.1.3.4. Estrogena aktivnost flavonoida

Glavna grupa flavonoida koja je dobro poznata da poseduje estrogenu aktivnost su izoflavoni, posebno genistein. U skorijoj potrazi za fitoestrogenima, izolovan je 8-izopentenilneringenin iz *Anaxagorea lutzonensis*. U testovima sprovedenim *in vitro*, ovi flavanoni su imali aktivnost kao agonisti estrogena veću od aktivnosti genisteina, a posebno važan faktor za vezivanje estrogen receptora bilo je prisustvo 8-izopentenil grupe [66]. Drugi flavoni, flavanoni i flavanoli sa izopentenil grupom na C-8 atomu takođe pokazuju značajni afinitet ka estrogen receptoru, ali 8-pentenilizoflavoni nisu bili aktivni. Pomeranje pentenil grupe sa C-8 na C-6 dovelo je do gubitka aktivnosti, ali nije bilo razlike u aktivnosti između 2(S)- i 2(R)-enantiomera 8-izopentilneringenina [66].

Svi flavonoidi sa estrogenom aktivnošću poseduju hidroksilne grupe u položajima 7 i 4' jezgra flavona ili u položaju 4 i 4' molekula halkona. I za apigenin i za 4, 4'-dihidroksihalkon je pokazano da imitiraju aktivnost β -estradiola kada je ispitivana njihova mogućnost da stimulišu proliferaciju MCF7 ćelija (estrogen zavisne ćelije tumora dojke kod ljudi). U normalnoj ljudskoj ishrani, prisustvo ovih aktivnih flavonoida se obično smatra bezopasnim, jer nijedan fitoestrogen nije prisutan u dovoljnoj količini da ima fiziološke posledice. Međutim, ovo možda nije slučaj kod vegeterijanaca, posebno kod onih čija se ishrana zasniva na visokom procentu leguminoza, koje imaju visok sadržaj izoflavonoida kao što je soja [66].

2.1.3.5. Citotoksična antitumorna aktivnost flavonoida

U potrazi za citotoksičnim sastojcima iz *Ononis natrix ssp. ramosissima* 4,2',6'-trihidroksi-4'-metoksidihidrohalkon, 2',6'-dihidroksi-4'-metoksidihidrohalkon i 2',4'-diacetoksihalkon su identifikovani kao jedinjenja koja imaju umerenu aktivnost protiv mišje leukemije (P-388), karcinoma pluća kod ljudi (A-549) i kancera debelog creva kod ljudi (HT-29). Međutim, najmoćnije jedinjenje je bio 2',6'-dihidroksi-4,4'-dimetoksidihidrohalkon koji je pokazao selektivnu aktivnost za ćelijske linije P-388 [66]. Halkon pedicin (2',5'-dihidroksi-3',4',6'-trimetoksihalkone) iz lišća *Fissistigma languinosum* (Annonaceae), inhibira nakupljanje tubulina u mikrotubulama. Iz iste biljke izolovana su i dva kondenzovana halkona, fisistin i izofisistin, za koje je pokazana citotoksična aktivnost protiv KB (HeLa) ćelija cervikalnog adenokarcinoma. Dvanaest citotoksičnih flavonoida: sedam flavana, tri flavona i dva biflavana, su izolovani iz korena *Muntingia calabura* (Elaeocarpaceae). Na primer, 8,3'-

dihidroksi-7,4',5'-trimetoksiflavon i njegovi dimeri su bili aktivniji protiv P-388 ćelija nego odgovarajući flavon [67].

Nekoliko citotoksičnih flavona je izolovano iz *Scutellaria species* (Labiatae). Jedno od najranijih otkrića bio je skulcapflavon II (5,2'-dihidroksi-6,7,8,6'-tetrametoksiflavon) koji je pokazivao aktivnost *in vitro* protiv L1210 ćelija (ćelije leukemije) [68]. U novijim studijama u kori ekstrakta *S.indica* su identifikovana još dva flavona i tri flavanona, ali samo dva poseduju značajnu citotoksičnu aktivnost, vagonin (5,7-dihidroksi-8-metoksiflavon) i 2(S)-5,2',5'-trihidroksi-7,8-dimetoksiflavanon. Drugo jedinjenje je pokazalo najveću aktivnost protiv L1210 ćelija i veliki spektar aktivnosti protiv drugih ćelijskih linija (HL-60, K562 i SNU) veći od onog kod skulcapflavon II [66].

Još jedinjenja iz grupe flavonoida je izolovano iz raznih izvora sa potencijalnom citotoksičnom aktivnošću, ali u toku su dalja ispitivanja, a u ovom radu su navedeni samo neki od karakterističnih primera.

2.2. Lipaze: osnovne osobine i producenti

Lipaze (triacilglicerol-acil hidrolaze, E.C. 3.1.1.3.) su najčešće korišćene hidrolaze u organskim sintezama. Široko su rasprostranjene u prirodi, ali je i značajan broj komercijalno dostupnih. Njihova primarna funkcija je da katalizuju hidrolizu triacilglicerola, pri čemu nastaju slobodne masne kiseline, di- i monoacilgliceroli i glicerol. S obzirom da nisu usko specifični enzimi, lipaze katalizuju i reakcije hidrolize mnoštva drugih estara, pa stoga imaju široku primenu kako u istraživačkim laboratorijama, tako i u industriji [69]. Pored toga, u sredinama sa niskom aktivnošću vode, lipaze mogu da katalizuju i stvaranje estarske veze između hidroksilne grupe alkohola i karboksilne grupe kiselina, tj. da katalizuju reakciju esterifikacije. Zahvaljujući činjenici da mogu katalizovati i hidrolizu i esterifikaciju, vrlo često se koriste u reakcijama transesterifikacije.

Na osnovu producenata, lipaze mogu biti podeljene u tri velike grupe:

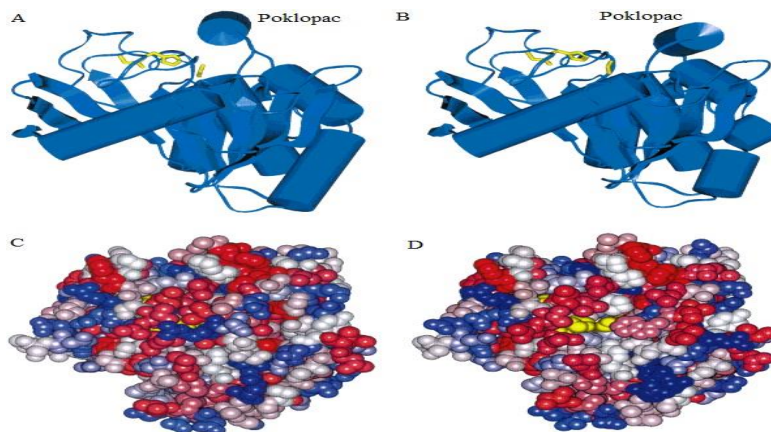
- Lipaze životinjskog porekla, među kojima je najpoznatija lipaza iz svinjskog pankreasa (PPL, *eng. lipase from porcine pancreas*).
- Lipaze iz kvasaca koje su podeljene u dve podgrupe. Prvu podgrupu čini porodica *Candida rugosa*, u koje spadaju lipaze iz *C. rugosa*, *Geotrichum candidum* i pankreasna holesterol esteraza (iako nije fungalnog porekla, sličnost sekvence svrstava je u ovu grupu). Drugu podgrupu čini porodica *Rhizomucor*, u koju spadaju između ostalog, male lipaze kao što su lipaza iz *C. antarctica* (CAL B), lipaza producenta *Rhizomucor miehei* (RML) i one iz *Thermomyces lanuginosus* (TLL) i *Rhizopus oryzae* (ROL).
- I na kraju, lipaze bakterijskog porekla takođe mogu biti podeljene u dve podgrupe: porodice *Staphylococcus* i *Pseudomonas*, koje uključuju lipaze iz *Burkholderia cepacia* (BCL), *Pseudomonas fluorescens* (PFL) i *Chromobacterium viscosum* (CVL) [70].

Generalno, u biotehnološkim procesima najveću primenu i značaj imaju lipaze mikrobnog porekla, s obzirom da upotreba mikroorganizama kao producenata omogućava veliki prinos enzima veće termostabilnosti, izvođenje genetičkih manipulacija, izostanak sezonskih fluktuacija, kao i brz rast mikroorganizama na jeftinim hranljivim podlogama. Što se tiče osnovnih karakteristika lipaza mikrobnog porekla ustanovljeno je da je pH optimum u opsegu 5,6-8,5, dok je temperaturni optimum u opsegu 30-40 °C [71]. Međutim, termostabilne lipaze sa višim temperaturnim optimumom izolovane su iz termofilnih mikroorganizama iz rodova

Pseudomonas, *Mucor*, *Candida*, *Bacillus*. Zbog relativno niske cene i pristupačnosti, najčešće se koriste lipaze produkovane iz kvasaca (rodovi *Candida* i *Torulopsis*) i plesni (rodovi *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus Geotrichum*, *Mucor*) [71].

2.2.1. Struktura i mehanizam delovanja lipaza

Većina lipaza čija je struktura do sada razjašnjena pripadaju grupi „ α/β -hidrolaza“ sa sličnom strukturom koju karakteriše prisustvo specifičnih sekvenci α -heliksa i β -ploča. One hidrolizuju estarske veze pomoću „katalitičke trijade“ sastavljene od nukleofinog ostatka serina aktiviranog ostacima histidina i aspartata ili glutamata povezanih vodoničnim vezama [72]. Lipaze preferiraju supstrate koji sadrže masne kiseline dužeg lanca. Šta više, s obzirom da su prirodni supstrati lipaza, npr. trigliceridi, nerastvorni u vodi, lipaze su sposobne da funkcionišu na granici faza hidrofobno-hidrofilno i pokazuju dobru katalitičku aktivnost. Na ovoj granici faza, lipaze pokazuju fenomen poznat pod nazivom „aktivacija na granici faza“, gde dolazi do značajnog povećanja katalitičke aktivnosti enzima nakon kontakta sa hidrofobnom površinom [69]. Ovaj efekat je posledica prisustva pokretljivog poklopca, izgrađenog iz amfifilnih α -heliks peptidnih sekvenci, koji pokriva aktivno mesto enzima u vodenom rastvoru (zatvorena forma enzima). Lipaze podležu drastičnoj promeni konformacije u prisustvu hidrofobne površine, što dovodi do otvaranja poklopca, čime aktivno mesto postaje dostupno (otvorena forma), slika 2.9.



Slika 2.9 Struktura lipaze iz *Mucor miehei* u zatvorenoj (A,C) i otvorenoj formi (B,D). A i B (bočna perspektiva): „katalitička trijada“ (žuto obojena) i sekundarni strukturni elementi ukazuju na strukturu „ α/β -hidrolaza“ karakterističnu za sve lipaze. C i D (perspektiva odozgo): model obojen po principu opadajuće polarnosti (tamno plava-svetlo plava-bela-svetlo crvena-bordo). Nakon otvaranja poklopca, „katalitička trijada“ (žuto) postaje dostupna (D) i region koji se vezuje za granicu faza postaje značajno nepolaran [72].

Dakle, kada aktivni centar postane dostupan, dalji mehanizam odigravanja reakcije katalizovane lipazama sastoji se iz četiri koraka:

- Supstrat reaguje sa ostatkom serina iz aktivnog centra formirajući tetraedarski intermedijer koji je stabilizovan ostacima histidina i asparaginske ili glutaminske kiseline.
- Oslobađa se alkohol i formira se kovalentni acil-enzim kompleks.
- Napadom nukleofila (vode u reakciji hidrolize, alkohola u reakciji esterifikacije) opet se formira tetraedarski intermedijer.
- Zatim se intermedijer razlaže, formirajući proizvod reakcije i oslobađajući regenerisani slobodni enzim [70].

Sumirano, u tabeli 2.3 navedene su neke od najznačajnijih zajedničkih karakteristika lipaza.

Tabela 2.3 Značajne karakteristike lipaza [72].

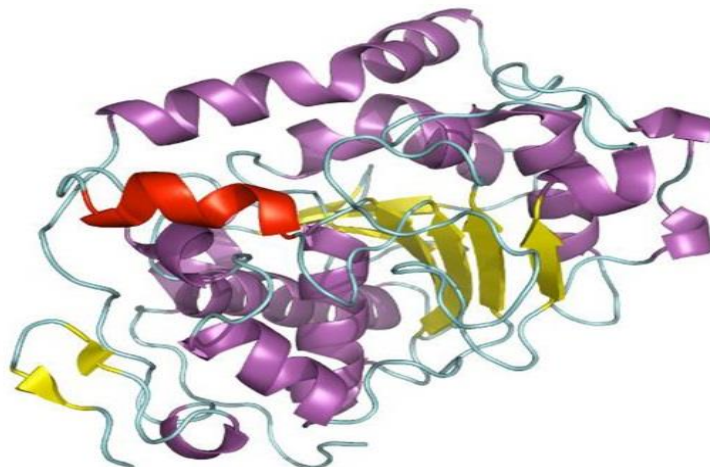
Karakteristike	Detalji	Napomene
Mehanizam baziran na „katalitičkoj trijadi“ sastavljen od nukleofilnog serina, histidina i aspartata ili glutamata	Pronađeno u preko 30 lipaza, uključujući i one iz termofilnih mikroorganizama; jedini izuzetak može biti zamena aspartata glutamatom. Zamena serina cisteinom putem direktne mutageneze dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti.	Slične hidrolaze pokazuju znatno veću varijabilnost u katalitičkom mehanizmu.
Većinu lipaza karakteriše prisustvo „poklopca“	Poklopac se sastoji od amfifilnog peptidnog lanca koji pokriva aktivni centar enzima u neaktivnom stanju.	Poklopac nije primećen kod esteraza i proteaza, mada i neke lipaze nemaju ovu strukturu ili je prisutan jako mali poklopac.
Sve lipaze su članovi grupe „ α/β hidrolaza“	Struktura se sastoji najčešće od jezgra koje čine paralelne β -ploče okružene α -heliksima. Aktivni nukleofilni ostatak serina se nalazi na mestu ukrštanja β -ploče i α -heliksa.	Mnoge druge hidrolaze (esteraze, acetilholin esteraze, serin proteaze, karboksil peptidaze, dehidrogenaze) pokazuju sličnu strukturu, što ukazuje na evolucionu povezanost.

2.2.2. Lipaza tipa B iz *Candida antarctica*

Dva izoenzima, lipaza A (CAL A) i lipaza B (CAL B), sa različitim izoelektričnim tačkama i molekulskom težinom, su izolovani iz kvasca *C. antarctica*. Izoenzim A, iako je termostabilniji od izoenzima B, mnogo manje se koristi u biotehnologiji zbog mnogo manje specifične aktivnosti. Za istraživače mnogo zanimljiviji je drugi izoenzim, lipaza tipa B. Izoenzim B lipaze iz *C. antarctica* odlikuje se velikom termostabilnošću, a ima i veliku aktivnost i na temperaturama iznad 70 °C [71]. Pored izuzetno velike aktivnosti, ovaj enzim pokazuje i veliku stereospecifičnost, kako u reakcijama hidrolize, tako i u reakcijama organske sinteze. Molekulska masa ovog izoenzima je 33 kDa, a ima dimenzije 30×40×50 Å. To je globularni α/β tip proteina koji se sastoji od 317 aminokiselinskih ostataka i ima izoelektričnu tačku na pH 6,0. Još jedna bitna razlika između ova dva izoenzima je to što, kao i većina lipaza, izoenzim A podleže aktivaciji na granici faza, dok kod izoenzima B ne dolazi do ove aktivacije, i u vodenim medijumima je sličniji esterazama nego lipazama [73]. Takođe, kod CAL B aktivni centar je oko 12 Å udaljen od površine enzima, što je značajno duboko u poređenju sa drugim lipazama [74].

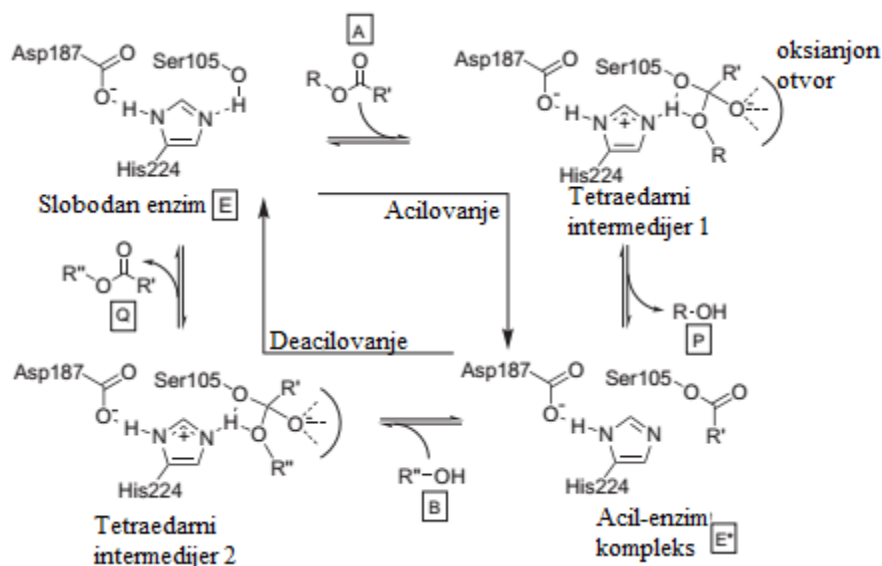
Primenom rendgenske kristalografije, 1994. godine Upenberg i saradnici su odredili trodimenzionalnu strukturu lipaze B iz kvasca *C. antarctica*. Molekuli serina (u položaju 105), histidina (u položaju 224) i asparaginske kiseline (u položaju 187) čine katalitička trijadu ovog enzima koja je smeštena u oblik levka dimenzija 9,5×4,5 Å. S obzirom na prisustvo serina iz katalitičke trijade i ostatka asparaginske kiseline (134), dno ovog otvora je hidrofilne prirode i predstavlja mesto vezivanja karboksilne grupe, a okružen je manje hidrofilnim delom (sadrži dva ostatka treonina (40 i 138) i po jedan glicin (157), izoleucin (189) i valin (190)). Deo koji okružuje region molekula od C₇-C₁₃ je hidrofoban, jer ga formiraju hidrofobne alifatične aminokiseline: dva ostatka valina (49 i 154), po jedan ostatak leucina (144) i izoleucina (285). Širina otvora se sužava u ovom delu i dostiže minimum na mestu gde se vezuje 13. ugljenikov atom acil-donora [73]. U nekoliko istraživanja je ustanovljeno da ovaj enzim ima veliki afinitet prema masnim kiselinama kratkog i srednjeg lanca, a da afinitet opada sa povećanjem broja ugljenikovih atoma preko 14 [75, 76], što može biti direktna posledica suženja otvora u kojem se nalazi katalitička triada enzima, što dovodi do otežanog vezivanja većih acil-donora. U aktivnom centru se nalazi i deo, koji se naziva „stereospecifični džep“, odgovoran za enantioselektivnost ovog enzima prema hirlnim sekundarnim alkoholima [71, 73]. CAL B karakteriše i prisustvo malog poklopca (slika 2.10) i u ranijim istraživanjima, simulacijom u vodi, pokazano je da samo mali deo ovog poklopca

podleže neznatnim konformacijskim promenama [77]. Pored toga, zbog male veličine poklopca i ne dolazi do zatvaranja aktivnog mesta. Tako da, za razliku od većine lipaza, na „ulazu“ do aktivnog centra CAL B ne postoji prepreka, pa ovaj enzim ne podleže aktivaciji na granici faza [78].



Slika 2.10 Trodimenzionalni model lipaze B iz C. antarctica. Struktura je obojena u skladu sa sekundarnom strukturom, ljubičasta boja predstavlja α-helikse, svetlo plava β-naborane listove, a poklopac je obojen crvenom bojom [77].

Katalitički ciklus CAL B (slika 2.11) je opisan u literaturi [74] i pokazano je da započinje reverzibilnim vezivanjem prvog supstrata za enzim formirajući tako tzv. Michaelis-Mentenov kompleks. Nakon pravilnog pozicioniranja supstrata odigrava se nukleofilni napad serina (105) na karbonilnu grupu supstrata što dovodi do formiranja prvog tetraedarnog intermedijara. Negativno naelektrisan kiseonik iz karboksilne grupe supstrata stabilizovan je trostrukom vodoničnom vezom sa oksianjon otvorom, dok je pozitivno naelektrisan histidin (224) stabilizovan interakcijom sa asparaginom (187). Zatim se proton sa histidina u položaju 224 prenosi na kiseonik, a formirani molekul vode napušta aktivni centar. Na kraju se, kao proizvod ovog stupnja, formira acil-enzim kompleks. Drugi tetraedarni intermedijar nastaje napadom nukleofila (vode, alkohola ili amina) na acil-enzim kompleks. Najpre se proton sa nukleofila prenosi na histidin (224), pri čemu nastaje alkoksidni anjon. Ovaj anjon zatim napada karbonilni ugljenikov atom, što vodi nastajanju drugog tetraedarnog intermedijarnog oksianjona (takođe stabilisan vodoničnim vezama). Nakon toga, proton sa histidina (224) prelazi na alkil-kiseonik serina (105). Tada se formira karboksilna veza u supstratu i nastaje labavo vezan enzim-proizvod kompleks, iz koga se oslobađa proizvod i regeneriše slobodan enzim [74].



Slika 2.11 Katalitički mehanizam delovanja lipaze B iz *C. antarctica*. A i B predstavljaju dva supstrata, dok su P i Q dva proizvoda reakcije. E i E* se odnose na slobodan i kovalentno modifikovan enzim, redom [74].

Zbog svoje efikasnosti i velike selektivnosti, ovaj enzim se koristi u mnogobrojnim industrijskim procesima kao biokatalizator reakcija aminolize, esterifikacije, transesterifikacije, hidrolize u vodi, esterifikacije u organskim rastvaračima, reakcijama enantio- i regioselektivne transformacije različitih supstrata. Za razliku od drugih lipaza, CAL B nije toliko efikasana u reakciji hidrolize triglicerida; međutim, veoma je stereospecifična i u reakciji hidrolize i reakciji sinteze estara, verovatno zbog ograničenog prostora u svom hidrofobnom džepu. Vrlo često se koristi u reakcijama organske sinteze, kako zbog svoje sposobnosti da prihvata različite supstrate, tako i zbog svoje stabilnosti u medijumim bez vode i izuzetne temperaturne stabilnosti. Takođe, ima i važnu ulogu u sintezi glukolipida [79].

Pregledom literature, utvrđeno je da je CAL B najčešće korišćena lipaza u reakcijama enzimske sinteze estara flavonoida i to komercijalno dostupni imobilisani enzimski preparat, Novozym[®] 435 (tabela 2.4). Izoenzim B iz kvasca *C. antarctica* je u ovom preparatu imobilisan na makroporoznu smolu (umreženi polimer metakrilata sa divinil-benzenom - Lewatit VP OC 1600, Bayer), a postupak imobilizacije nije dostupan [80].

2.3. Imobilizacija enzima

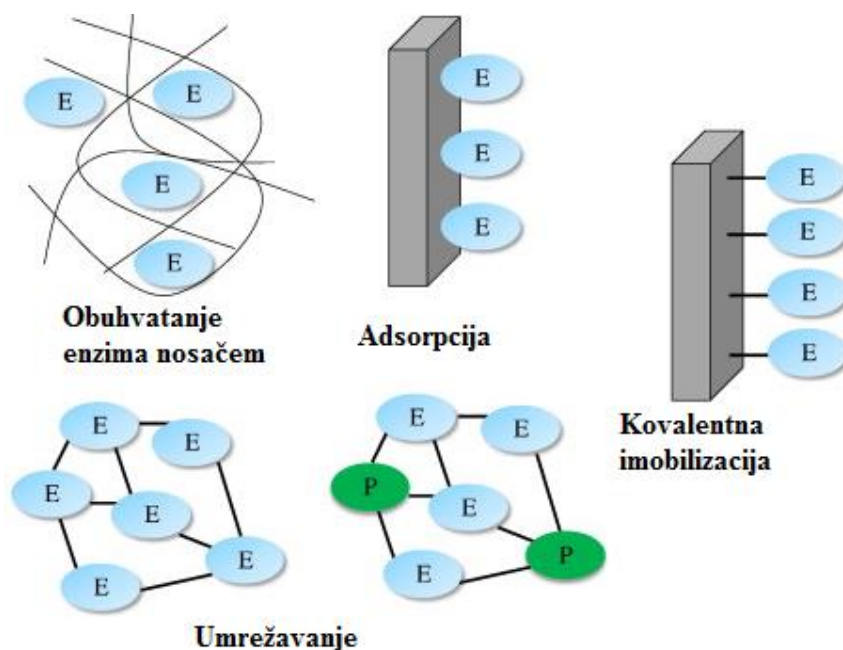
Sve češći zahtevi za održivom, zelenom tehnologijom doveli su do povećanja primene enzima kao biokatalizatora u industrijskim procesima, s obzirom na njihovu biodegradabilnost, katalitičku aktivnost i mogućnost izvođenja procesa pod blagim reakcionim uslovima. Međutim, primena slobodnih enzima u industrijskim uslovima je vrlo često ograničena s obzirom na nedostatak dugoročne operativne stabilnosti i veoma komplikovanog procesa odvajanja i ponovne upotrebe enzima [81]. U cilju rešavanja ovog problema i radi povećanja upotrebe ovih katalizatora u biotehnološkim procesima, vrlo često se izvodi imobilizacija enzima. To je postupak fizičkog ili hemijskog zadržavanja enzima u određenom prostoru uz zadržavanje njegove katalitičke sposobnosti, tako da se mogu koristiti kontinuirano u više ciklusa [82, 83]. Na ovaj način se ograničava slobodno kretanje enzima u određenom prostoru, barijerom propustljivom za supstrate i proizvode, koji se po završetku reakcije mogu lako odvojiti od reakcione smeše. Imobilizacijom enzima izbegavaju se problemi koji su se javljali prilikom upotrebe slobodnih enzima kao što su gubitak određenog stepena enzimske aktivnosti ili otežano uklanjanje iz reakcione smeše, čime enzimi postaju potencijalni kontaminanti finalnih proizvoda.

Imobilisani enzimi su mnogo stabilniji u odnosu na native s obzirom da postaju manje podložni negativnim uticajima sredine (pH, temperatura, aktivnost vode itd.) [84, 85]. Ovim postupkom omogućava se jednostavno i efikasno uklanjanje katalizatora iz reakcione smeše, kao i upotreba enzima u više ciklusa, što samim tim otvara mogućnost šireg izbora bioreaktora, izvođenje šaržnih ili kontinualnih procesa [79, 84, 85]. S druge strane, imobilizacija može da izazove smanjenje ili gubitak aktivnosti enzima (posledica pretrpljenog hemijskog tretmana, uticaja površine nosača, sternih smetnji) ili pak promene svojstava biokatalizatora (promene specifičnosti). Pored toga, kao i u svim heterogenim katalizama, limitacije u prenosu mase mogu prouzrokovati smanjenje specifične aktivnosti enzima [69].

Imobilizacija enzima je jako složen proces, koji zahteva optimizaciju velikog broja parametara, pa tako metoda imobilizacije, vrsta nosača, priroda rastvarača, raznovrsnost reaktora, kao i uslovi pod kojima se izvodi imobilizacija jako utiču na svojstva imobilisanih enzima [79, 82]. Do danas, razvijen je veliki broj različitih metoda imobilizacije kao što su:

- **adsorpcija enzima na čvrstim nosačima** - zasniva se na uspostavljanju slabih privlačnih sila između molekula enzima i nosača (dipol-dipol, elektrostatička privlačenja, vodonične veze, hidrofobne interakcije);

- **kovalentna imobilizacija** - zasniva se na formiranju najmanje jedne hemijske veze između molekula enzima i nosača;
- **obuhvatanje enzima nosačem**- razlikujemo dva oblika:
 - a) smeštanje enzima u polimerne gelove – enzim se smešta u mrežu gusto isprepletanih polimernih lanaca koji stvaraju gel;
 - b) umrežavanje enzima – zasniva se na intra- i intermolekulskom vezivanju molekula enzima i bifunkcionalnih agenasa;
- **smeštanje enzima u/iza čvrste membrane** - enzim se smešta iza čvrste polupropustljive barijere (tj. unutar kapsula sfernog oblika) koja propušta supstrat i proizvode reakcije, a zadržava enzim (inkapsulacija) ili se enzim nalazi mehanički zarobljen, adsorbovan ili kovalentno vezan u porama membrane (imobilizacija enzima u membranama) [82].



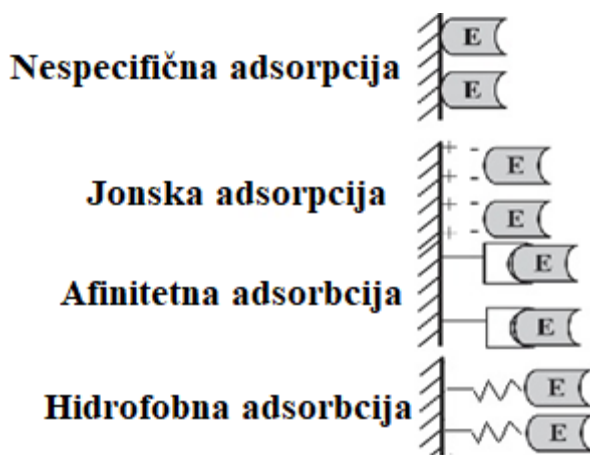
Slika 2.12 Šematski prikaz metoda imobilizacije enzima [86].

Što se tiče lipaza, generalno one mogu biti imobilisane korišćenjem većine metoda koje su razvijene za imobilizaciju enzima uopšte. Glavni tipovi imobilizacije lipaze prikazani su na slici 2.12. Što se tiče CAL B, pregledom literaturnih podataka, dve najčešće metode za imobilizaciju ovog enzima su adsorpcija i kovalentna imobilizacija [79]. Treba napomenuti i da kombinovanje metoda imobilizacije može biti izuzetno korisno. Jedan takav primer je i adsorpcija praćena umrežavanjem adsorbovane lipaze, u cilju smanjenja „curenja“ enzima sa nosača [69].

2.3.1. Adsorpcija enzima na čvrstim nosačima

Metoda adsorpcije enzima se može definisati kao jednostavna reverzibilna metoda imobilizacije koja uključuje vezivanje enzima za površinu nosača. Adsorbovanje biokatalizatora na spoljašnjoj površini čvrstog nosača obezbeđeno je slabim nespecifičnim interakcijama kao što su Van der Valsove, hidrofobne, elektrostatičke interakcije i vodonične veze između molekula biokatalizatora i nosača [81]. Različite vrste materijala mogu biti pogodni nosači za ovu vrstu imobilizacije. Na osnovu interakcija između enzima i nosača, njihove jačine i specifičnosti, adsorpcija se može razvrstati u nekoliko grupa:

- nespecifična fizička adsorpcija (konvencionalna), koja je zasnovana na interakcijama tipa disperzionih, vodoničnih, hidrofilnih i dr.;
- jonska adsorpcija, bazirana na jonskim vezama između naelektrisanog nosača i enzima;
- afinitetna adsorpcija, gde su u nosač prethodno uvedeni ligandi (metali, boje, inhibitori, supstrati), tako da su interakcije sa enzimom znatno specifičnije i
- hidrofobna adsorpcija, zasnovana na hidrofobnim interakcijama, posebno kod enzima sa velikim brojem ostataka hidrofobnih aminokiselina (slika 2.13) [82, 83].



Slika 2.13 Različite vrste adsorpcije enzima na nosač.

Prednosti ove metode su niski troškovi, jednostavnost i brzina izvođenja metode, reverzibilnost, kao i regeneracija i ponovna upotreba nosača. Takođe, ne dolazi do hemijskih promena na nosaču i enzimu, a samim tim ne dolazi do smanjenja aktivnosti enzima denaturacijom. Ova metoda omogućava direktan kontakt supstrata i enzima što rezultuje povećanjem brzine prenosa mase i toplote, ali ne omogućava zaštitu biokatalizatora. Sa druge strane, nedostatak ove metode može biti i laka desorpcija adsorbovanog enzima, potencijalni

gubitak kao i kontaminacija finalnog proizvoda slobodnim biokatalizatorom ili proteinskim komponentama, a teška je i standardizacija ovakvog enzimskog sistema.

U slučaju lipaza, hidrofobne interakcije su najčešće, mada jonske interakcije sa jonoizmenjivačkim materijalima takođe mogu biti korisne [69]. S obzirom da se lipaze iz vodenog rastvora spontano brže adsorbuju od većine drugih proteina, ovaj metod se može koristiti za simultano prečišćavanje i imobilizaciju enzima. Zanimljivo, adsorpcija na hidrofobnim nosačima često dovodi do povećanja katalitičke aktivnosti lipaza. Smatra se da se ovo može objasniti hidrofobnom interakcijom između nosača i dela molekula lipaze, koja izaziva pomeranje poklopca i oslobađanja aktivnog centra (otvorena konformacija enzima), analogno kao aktivacija na granici faza uzrokovana hidrofobnom fazom [69]. Pored povećanja katalitičke aktivnosti, autori su prijavljivali i povećanje operativne i termalne stabilnosti enzima, ali su podaci o desorpciji enzima, koja dovodi do kontaminacije proizvoda i poskupljenja samog procesa, ostali nezabeleženi.

U literaturi su dostupni podaci o adsorpciji CAL B na različite organske i neorganske nosače. Neorganski nosači imaju određene prednosti, kao što su otpornost na mikrobnu razgradnju, bolja temperaturna stabilnost i niže cene [79]. Hidrofobni nosači na bazi divinil benzena pokazali su se kao vrlo pogodni nosači za adsorpciju CAL B, s obzirom da dobijeni rezultati pokazuju da su pripremljeni imobilisani preparati uporedivi sa komercijalno najviše korišćenom imobilisanom lipazom, Novozym[®] 435 (u smisli aktivnosti, stabilnosti, specifičnosti), a vrlo često pokazuju i značajno bolje karakteristike. Pripremljeni imobilisani preparati su vrlo uspešno korišćeni u reakcijama sinteze različitih estara, butil-acetata [87], etil-butirata [88]), kao i u sintezi triglicerida bogatih ω -3 polinezasićenim masnim kiselinama [89].

2.3.2. Kovalentna imobilizacija

Kovalentna imobilizacija na čvrstim nosačima je najčešći način imobilizacije enzima i mnoge varijacije ove metode su opisane [69]. Ova vrsta imobilizacije predstavlja formiranje kovalentnih veza između funkcionalnih grupa enzima (amino, karboksilnih, sulfhidrilnih, imidazolnih, hidroksilnih) i funkcionalnih grupa na površini nosača [90]. Ovakvim postupkom ostvaruje se čvrsta veza između enzima i nosača i smanjuje se spiranje enzima sa nosača, što je bitno kako sa finansijskog stanovišta tako i tehnološkog, jer je omogućena lakša kontrola procesa [83]. Hemijskim vezivanjem enzima za nosač moguće je stabilizovati njegovu konformaciju i postići očuvanje aktivnosti na duži vremenski period [91]. Ovaj način

vezivanja često uključuje tri glavna koraka, a to su aktivacija nosača, modifikacija aktivirane površine nosača i na samom kraju vezivanje enzima. Neke od najčešće korišćenih metoda za aktivaciju nosača su:

- aktivacija nosača sa hidroksilnim grupama reakcijom sa bromcijanom, hlortriazinima ili trezil-hloridom,
- aktivacija nosača sa amino grupama reakcijom sa glutaraldehydom i pomoću reakcije diazotovanja.
- aktivacija nosača uvođenjem epoksidnih grupa reakcijom sa epihlorhidrinom [82, 83].

Razne varijacije ove metode opisane i za druge enzime, mogu biti primenjene i sa lipazama. Kao i svaka metoda, i kovalentno vezivanje enzima ima svojih prednosti i mana. Tako, enzimi vezani na ovaj način mnogo teže se mogu ukloniti sa nosača pa se tako izbegava kontaminacija proizvoda. Difuzione limitacije uzrokuju relativno male gubitke aktivnosti, a što se tiče reakcija koje mogu biti katalizovane, nema ograničenja vezanih za veličinu molekula supstrata. Ipak, kovalentna imobilizacija zahteva velike količine skupih reagenasa, komplikovane postupke aktivacije nosača, uglavnom dolazi do velikog pada aktivnosti u samom postupku, a i regeneracija nosača je uglavnom skupa i složena [82]. Silva i saradnici su detaljno opisali kovalentnu imobilizaciju CAL B na hitozan i smeše hitozan-alginat prethodno aktivirane na tri načina, upotrebom glicidola, gluteraldehyda i etilendiamina (EDA), pri čemu su dobijeni imobilisani enzimski preparati zapažene enzimске aktivnosti u poređenju sa komercijalnim preparatom Novozym[®] 435, kao i dobre termalne i operativne stabilnosti [92]. Štaviše, dva odabrana imobilisana enzimska preparata ispitana su u reakciji sinteze butiloleata i postignute su molarne konverzije od 100 % nakon 12 h trajanja reakcije.

Pregledom dostupne literature, izuzev komercijalnog preparata Novozym[®] 435, nisu pronađeni podaci o primeni lipaze tipa B imobilisane na različite nosače u reakciji sinteze estara flavonoida. Shodno tome, u ovom radu biće optimizovana imobilizacija CAL B na LifeTech[™] nosače ECR serije sa različitim funkcionalnim grupama. Odabrani imobilisani preparati biće ispitani u reakciji sinteze estara flavonoida.

2.4. Enzimaska sinteza estara flavonoida

Flavonoidi su prirodni antioksidanti, koji zaslužuju sve veću pažnju kao molekuli koji se dobijaju iz obnovljivih resursa, a koji mogu biti korišćeni kao aditivi u mnogim tipovima proizvoda, počevši od hrane i farmaceutskih proizvoda, do kozmetičkih preparata. Međutim, širu komercijalnu primenu ovih jedinjenja ograničava njihova slaba rastvorljivost, kako u hidrofilnoj, tako i u lipofilnoj sredini, kao i nedovoljna stabilnost. Imajući u vidu da flavonoidi obuhvataju veoma heterogenu grupu kompleksnih jedinjenja (pojavljuju se i u aglikonskoj i u glikozilovanoj formi), razlike u hidrofilnosti ovih jedinjenja su veoma velike, pa su tako aglikon flavonoidi obično slabo rastvorljivi u vodi, a glikozilovani flavonoidi u lipofilnim medijima. Često, hidrofilnost molekula flavonoida ograničava njihovu komercijalnu primenu kada se koriste u lipofilnoj hrani i kozmetičkim formulacijama, a vrlo često predstavlja i ograničavajući faktor prodiranju kroz ćelijsku membranu i prolasku do određenih ciljanih tkiva [3]. Da bi se prevazišli ovi problemi, proučavana je strukturna modifikacija ovih jedinjenja, hemijskim, hemo-enzimskim i enzimskim postupkom [15]. Reakcija acilovanja predstavlja najčešće korišćen metod za strukturno modifikaciju flavonoida prilikom koje se povećava njihova hidrofobnost vezivanjem ovih molekula sa ostacima masnih kiselina, a samim tim i poboljšava njihova rastvorljivost u lipofilnom okruženju [12, 15, 93, 94]. Hemijski postupak acilovanja flavonoida je patentiran [95], ali je pokazano da ovaj metod i nije toliko efikasan, s obzirom da ova reakcija nije regioselektivna, te dolazi do neželjene funkcionalizacije fenolnih hidroksilnih grupa koje su odgovorne za antioksidativnu aktivnost ovih jedinjenja. Pored toga, da bi se obezbedila selektivna funkcionalizacija, upotreba hemijskog postupka zahteva mnogo koraka zaštite određenih grupa, pa zatim uklanjanje zaštitnih grupa, kao i izvođenje reakcije pod drastičnim operativnim uslovima, što dodatno komplikuje ovaj postupak [15, 96]. Zbog svega navedenog, enzimski postupak, koji uključuje upotrebu hidrolitičkih enzima (lipaza, esteraza i proteaza) kao biokatalizatora reakcije acilovanja flavonoida je nesumnjivo povoljniji metod, imajući u vidu dostupnost, nisku cenu, hemo-, regio- i enantioselektivnost ovih enzima, kao i blage uslove izvođenja reakcije [96]. Upotreba enzima kao katalizatora dovodi do većih prinosa, boljeg kvaliteta proizvoda, a samo izvođenje reakcije pod blagim uslovima temperature i pritiska, dovodi do nižih troškova celokupnog postupka [97, 98].

U mnogim studijama koje se bave ovom tematikom, najčešće je proučavana enzimaska esterifikacija/transesterifikacija glikozilovanih flavonoida, dok je u samo nekoliko studija reakcija izvođena sa aglikon formom flavonoida [12, 14, 97, 99-102]. Selektivno acilovanje

flavonoida različitim alifatičnim i aromatičnim kiselinama, ne samo da poboljšava fizičko-hemijske osobine ovih molekula [100], već takođe dovodi i do pojave novih blagotvornih osobina početnih jedinjenja. Ovo uključuje prodiranje kroz ćelijsku membranu [8, 9], povećanja antioksidativne aktivnosti [10, 14, 75, 103], antimikrobnog [13, 14], antiproliferatnog [12] i citogenetskog [9] efekta, kao i poboljšanje termostabilnosti i svetlosne rezistentnosti određenih flavonoida.

2.4.1. Faktori koji utiču na enzimsku esterifikaciju flavonoida

Ključni faktori koji utiču na regioselektivnost i izvođenje enzimski katalizovane reakcije acilovanja flavonoida uključuju vrstu i koncentraciju enzima, vrstu reakcije (esterifikacija/transesterifikacija), temperaturu, rastvarač, strukturu i koncentraciju supstrata (acil-donor, acil-akceptor i njihov molarni odnos) i sadržaj vode u medijumu [15, 93].

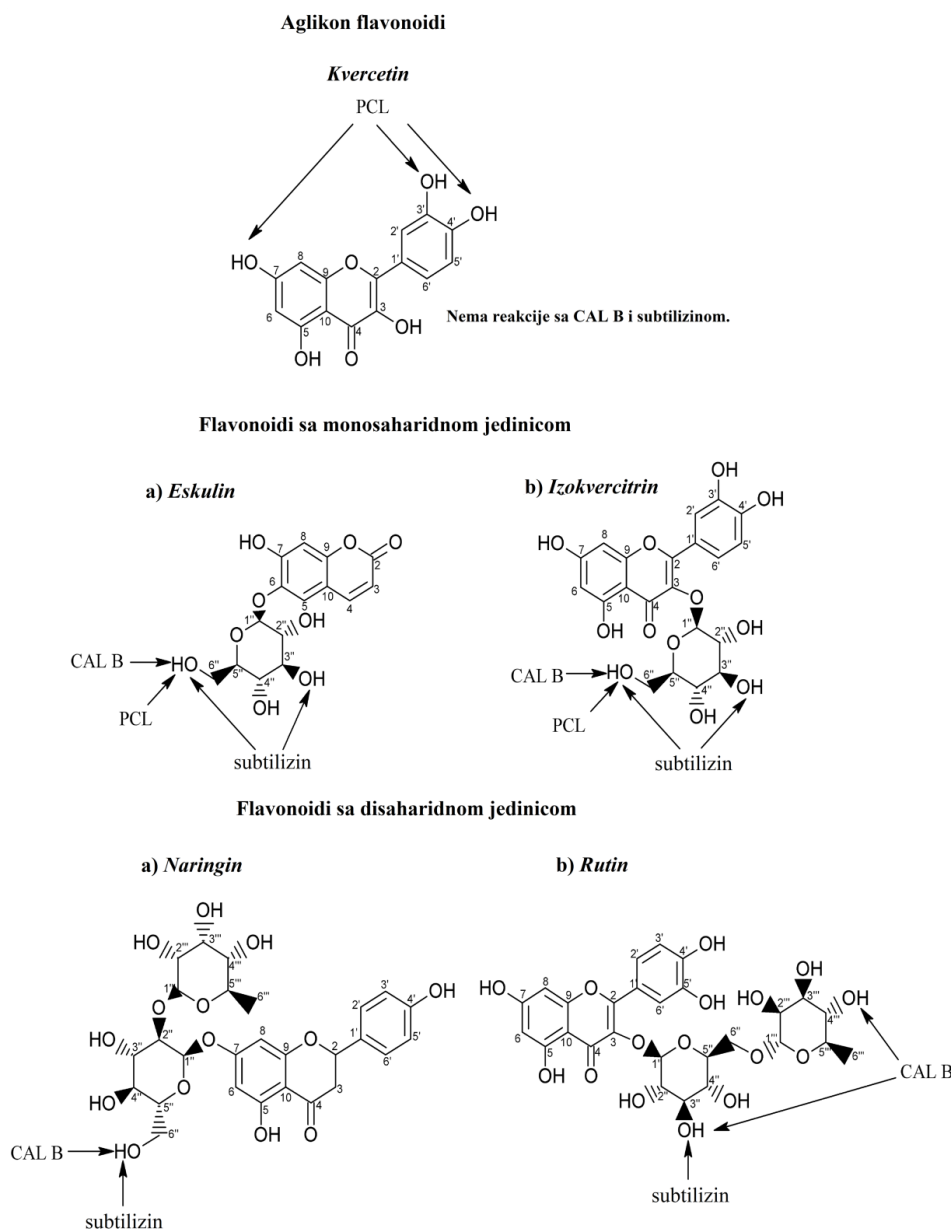
2.4.1.1. Uticaj vrste i koncentracije enzima

S ciljem da se pronade najpodesniji katalizator za reakciju esterifikacije flavonoida, do danas je ispitano više vrsta enzima kao što su proteaze, esteraze, acil-transferaze i lipaze [96]. U ovim reakcijama, najčešće se koristi imobilisana forma enzima, jer se imobilizacijom poboljšava stabilnost enzima i omogućava ponovna upotreba biokatalizatora.

U prirodi, acilovanje ovih molekula je katalizovano različitim acil-transferazama koje su odgovorne za transfer alifatičnih i aromatičnih acil grupa sa CoA-donor molekula do hidroksilne grupe šećernog ostatka molekula [104]. Međutim, primena ovih katalizatora u laboratorijskim uslovima je prilično skupa i komplikovana, s obzirom da zahteva prisustvo odgovarajućeg acil-koenzima A u stehiometrijskim količinama ili da se regeneriše *in situ*.

Prvi enzim upotrebljen kao katalizator reakcije esterifikacije flavonoida bio je subtilizin. Ispitana je reakcija acilovanja kvercetina, izokvercitrina i luteolin-7-glikozida sa aktiviranim acil-donorom, trifluoroetil-butanoatom, koristeći subtilizin Carlsberg kao biokatalizator u anhidrovanom piridinu [105]. Nakon 48 h u reakciji sa kvercetinom nije detektovan proizvod, dok je stepen konverzije u reakciji sa izokvercitrinom i luteolin-7-glikozidom bio 86% i 76%, redom [105]. Kasnije, subtilizin je korišćen za selektivno acilovanje rutina u organskom rastvaraču [9]. Međutim, ustanovljeno je da upotreba subtilizina kao biokatalizatora dovodi do manjih prinosa, a takođe je primećen i nizak stepen regioselektivnosti [106]. Isti autori su objavili i da vrsta šećernog ostatka utiče na regioselektivnost korišćenih biokatalizatora (slika 2.14). Pokazali su da acilovanje izokvercitrina (kvercetin-3-glukozida) i luteolin-7-glukozida

sa trifluoroetil-butanoatom kao acil-donorom pomoću subtilizina kao biokatalizatora dovodi do nastajanja mono- i diestra, esterifikacijom hidroksilnih grupa u položaju 6"-OH i 3"-OH molekula glukoze. Praktična primena esteraza u reakciji enzimske modifikacije flavonoida i nije tako atraktivna, s obzirom da ovi katalizatori omogućavaju uvođenje molekula kratkog alifatičnog lanca kao što su acetat, propionat i butirat. Pored toga, komercijalna upotreba ovih enzima u organskim sintezama je ograničena, imajući u vidu da za razliku od lipaza pokazuju manju enantioselektivnost i manju otpornost na organske rastvarače [107].



Slika 2.14 Regioselektivnost acilovanja flavonoida sa proteazama (subtilizin) i lipazama (CAL B: lipaza iz *Candida antarctica*; PLC: lipaza iz *Pseudomonas cepacia*).

Pregledom literature pokazano je da su lipaze najčešće korišćeni biokatalizatori u reakcijama organske sinteze, pa tako i u sintezi estara flavonoida, pri čemu najviše pažnje privlači CAL B zbog svoje dobre katalitičke aktivnosti i visokog stepena regioselektivnosti [97, 99, 103, 108-111]. Lipaza iz *Pseudomonas cepacia* (PCL) korišćena je za sintezu katehin estara sa vinil-butiratom kao acil-donorom i nakon 48h stepen konverzije za smešu proizvoda katehin-7-*O*-acetata i katehin-5-*O*-acetata, iznosio je oko 70 % [112]. Petnaest različitih lipaza i proteaza je ispitano u reakciji transesterifikacije bergenina sa vinil-butiratom i najbolje rezultati su ostvareni sa preparatima Chirazyme L-2 (lipazom iz *C. antarctica*), Chirazyme L-6 (lipazom iz *Pseudomonas sp.*), lipase PS30 (lipazom iz *Burkholderia cepacia*) i FAP-15 (lipazom iz *Rhizopus oryzae*) [113]. U tabeli 2.4 su predstavljeni karakteristični primeri ispitanih reakcija acilovanja flavonoida u kojima su kao biokatalizatori korišćene različite vrste lipaza.

U literaturi je dostupan podatak da samo dve vrste enzima, lipaza iz *P. cepacia* i karboksil esteraze imaju sposobnost da aciluju aglikon flavonoide, s tim da prvi enzim aciluje C-5 i C-7 hidroksilne grupe katehina [112], dok karboksil-transferaza pokazuje regioselektivnost i acilovanje se dešava u C-3 hidroksilnoj grupi molekula [107].

Tabela 2.4 Karakteristični primeri reakcije acilovanja flavonoida katalizovane subtilizinom i različitim lipazama.

Enzim	Acil-donor	Acil-akceptor	Rastvarač	Reakcioni uslovi	Prinos proizvoda	Ref.
Slobodna lipaza iz <i>Pseudomonas cepacia</i>	Vinil-acetat	Katehin	Acetonitril	15.3 g/L flavonoida, 50 g/L enzima, molarni odnos flavonoid/acil-donor 1/20.5, 45 °C, 48 h	Smeša katehin 5- <i>O</i> -acetata (40%) i 7- <i>O</i> -acetata (32%)	[112]
Immobilisana lipaza iz <i>C. antarctica</i> SP 435	Kaprnska (C6) Enantinska (C7) Pelargonska (C9) Laurinska (C12) Miristinska (C14) Palmitinska (C16) Stearinska (C18) Oleinska kiselina (C18:1)	Eskulin, rutin, hesperidin, kvercetin	2-metil-2-butanol	5 g/l flavonoida, 20 ml 2-metil-2-butanol, flavonoid:kiselina 1:1, 60 °C, 12 h mešanja. 10 g/l lipaze, 150 g/l molekulskih sita (sadržaj vode <300 ppm)	38-80%, ne dolazi do sinteze proizvoda u reakciji sa kvercetinom	[97]
Novozym® 435	Oleinska, stearinska, linolna, α-linoleinska, Eikozapentaenoinska (EPA), Dokozaheksaenoinska (DHA)	Izokvercitrin, floridzin	Aceton	1.15 mmol flavonoida, 5.72 mmol acil-donora, 1.30 g enzima, 5 ml rastvarača, smeša je mešana i zagrevana na 45 °C u toku 12–24 h.	81–98%	[114]
Novozym® 435	Oleinska, stearinska, linolna, α-linoleinska, Eikozapentaenoinska (EPA), Dokozaheksaenoinska (DHA) ili njihovi estri	Izokvercitrin, floridzin	Aceton i sistem bez rastvarača	1.08 mM acil-donora, 0.22 mM acil-akceptora, 300 mg enzima, 4 mL osušenog acetona, 4 Å molekulska sita, 45–60 °C, mikrotalasno zračenje 120–160 s i 75-105 s	84-98 %	[115]

				(sistem bez rastvarača) u 12-16 intervala, operativna frekvencija 2.5 GHz i maksimalna snaga 300 W).		
Novozym [®] 435	Oleinska kiselina γ-linoliinska kiselina	Rutin	Aceton 2-Metil-2-butanol 2-Metil-2-propanol Tetrahidrofuran Acetonitril	55 mg rutina, 9 mL acetona, flavonoid/acil-donor molarni odnos 1/5, 100 mg imobilisane lipaze, 50 °C, mešanje tokom 96 h na 175 o/min i 100 mg/mL of molekulski sita	71% 45% 37% <1% 63%	[12]
Novozym [®] 435 Lipozyme RM IM	Vinil-laurat	Prunin	Aceton, acetonitril, tetrahidrofuran i <i>t</i> -butanol	20 mmol prunina, 400 mmol vinil laurata, 67mg/mL molekulskih sita i 17mg/mL enzima na 50 °C; 200 o/min, 8h	60-100% sa Novozym [®] 435 30-80% sa Lipozyme RMIM	[116]
Novozym [®] 435	Palmitinska kiselina	Naringin	<i>t</i> -amil alkohol	29 g/L naringina, flavonoid/acil-donor molarni odnos 1/5, 10 g/L lipaze, 60 °C, 45 h, molekulska sita od 0 do 100 g/L	24–43% sa različitim sadržajem vode)	[110]
Novozym [®] 435	Etil-cinamat	Floridzin	sistem bez rastvarača	23 mg floridzina rastvorenog u 5 mL acil-donora, 100 mg enzima, 40 o/min, redukovani pritisak (200 mbar), 60 °C, 15 h	100%	[117]
Novozym [®] 435	Palmitinska kiselina	Eskulin	DMSO aceton <i>t</i> -butanol toluen	15 mM eskulina; 60 mM palmitinske kiseline, 7.5 mg/mL enzima; 75 mg/mL molekulskih sita; mešanje na 150 o/min; 2 mL	0% 78.2% 1.26% 2.22	[111]

			heksan [MeBuPy] ₃ [N(CN) ₂] smeša jonskih tečnosti i acetona	rastvarača; 40 °C, 96h	0% 39.30% 0-78,2 %	
Novozym [®] 435; Imobilisana lipaza iz <i>Thermomyces lanuginosus</i> (lipozyme TLIM); Imobilisana lipaza iz <i>R. miehei</i> (Lipozyme RMIM); Lipaza iz <i>C. rugosa</i>	Vinil-butirat	Naringin	[bmim]BF ₄ [bmim]PF ₆	Naringin 50 mM, Vinil butirat 500 mM;80 mg/mL lipaze; 0.5 mL jonske tečnosti; mešanje 240 o/min na 60 °C;	[bmim]BF ₄ [bmim]PF ₆ 61.6% 63.0% 49.5% 50.0% 76.9% 37.5% traces < 5 %	[75]
[bmim]BF ₄ .1-butil-3-metilimidazolium		tetrafluoroborat;		[bmim]PF ₆ .1-butil-3-metilimidazolium		heksafluorofosfat

2.4.1.2. Uticaj acil-akceptora (flavonoida)

Flavonoidi su velika grupa strukturno različitih jedinjenja i njihova struktura igra važnu ulogu u reakciji acilovanja, s obzirom da broj i pozicija hidroksilnih grupa, priroda šećerne jedinice, kao i pozicija glikozidne veze utiče na rastvorljivost flavonoida i ukupan stepen konverzije. Kao što je već napomenuto, u većini istraživanja koji se bave ovom tematikom, ispitana je enzimska esterifikacija flavonoid glikozida. Za glikozilovane flavonoide u reakcijama katalizovanim i lipazama i subtilizinom, acilovanje se dešava na hidroksilnoj grupi šećernog ostatka.

Pregledom literature ustanovljeno je da su naringin i rutin najčešće korišćeni flavonoidi u ovoj vrsti reakcije. Za naringin, koji je glikozilovani flavonoid sa disaharidnom jedinicom i poseduje slobodnu primarnu hidroksilnu grupu na glukozi, acilovanje se dešava na 6"-OH grupi kada se kao katalizator koristi CAL B, s obzirom da ovaj enzim favorizuje primarnu hidroksilnu grupu [12, 75, 101, 102, 110, 118, 119]. U saglasnosti sa ovim rezultatima su i mnogi do danas dobijeni rezultati sa različitim flavonoidima koji poseduju slobodnu primarnu OH grupu na šećernom ostatku kao što su: floridzin [114, 115, 117, 120], eskulin [97, 111], izokvercitrin [76, 114], prunin [116], potvrđujući tako regioselektivnost reakcije kada je u pitanju ovaj enzim. Međutim, za rutin, koji nema slobodnu primarnu hidroksilnu grupu, neke studije su objavile da, u reakcijama katalizovanim CAL B, dolazi do acilovanja u 3"-OH grupi glukoze [118, 121], dok pak drugi autori navode da se reakcija odigrava na 4"-OH grupi ramnoze [12, 99, 103, 122], a kada se kao biokatalizator koristi subtilizin, dolazi do sinteze rutin-3"-O-estra [106]. Dodatno, kada su rutin i naringin ispitivani kao supstrati u reakciji transesterifikacije, utvrđeno je da lipaza iz *C.antarctica* katalizuje reakciju acilovanja naringina mnogo brže nego rutina [119].

Struktura šećernog dela, kao i pozicija glikozilacije utiče na reaktivnost enzima, i pokazalo se da se najveće početne brzine ostvaruju kada se kao acil-akceptori koriste monoglikozilovani flavonoidi [123]. Aradhaoui i saradnici su dobili slične rezultate kada su upoređivali početne brzine i postignute stepene konverzije tokom esterifikacije eskulina, rutina, hesperidina i kvercetina sa palmitinskom kiselinom u kojem je kao katalizator korišćena CAL B [99]. Naglašeno je da je eskulin najreaktivniji supstrat, s obzirom da je

reakcija bila najbrža, a i ostvaren je najveći stepen konverzije u reakciji sa tim jedinjenjem. Ovakav rezultat može biti objašnjen prisustvom slobodne primarne hidroksilne grupe, kao i manjim sternim smetnjama (poseduje monosaharidnu šećernu jedinicu), u poređenju sa disaharidnim ostatkom i prisustvom manje reaktivnih sekundarnih OH grupa u molekulu rutina i hesperidina. Do reakcije nije došlo kada se kao supstrat koristio aglikon flavonoid, kvercetin.

Na performanse reakcije acilovanja može da utiče i koncentracija flavonoida. Povećanje koncentracije flavonoida dovodi do povećanja početnih brzina i ostvarenih stepena konverzije. Međutim, imajući u vidu slabu rastvorljivost flavonoida, za primenu visoke koncentracije acil-akceptora rastvorljivost predstavlja limitirajući faktor [93, 104].

2.4.1.3. Uticaj acil-donora

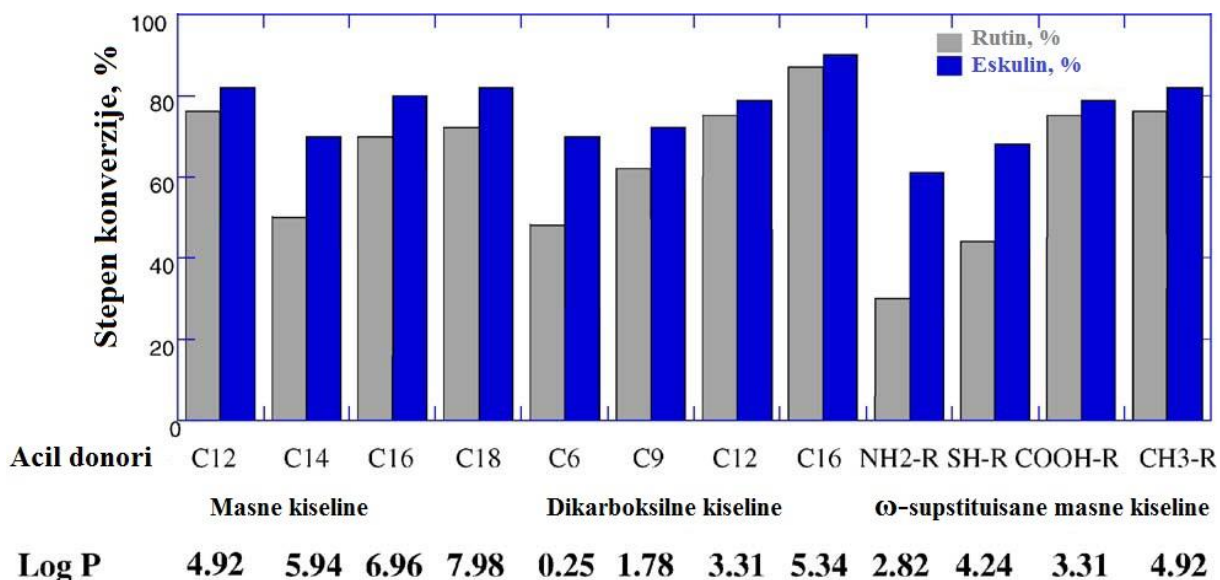
Priroda acil-donora je važan faktor koji utiče na izvođenje reakcije acilovanja flavonoida kao i na fizičko-hemijske i biološke osobine sintetisanih estara. Estri flavonoida mogu biti sintetisani enzimskim putem koristeći dva osnovna pristupa, esterifikaciju i transesterifikaciju. Za modifikaciju flavonoida testirani su različiti acil-donori kao što su aromatične i alifatične kiseline, supstituisane ili ne. Aromatične kiseline su uglavnom interesantne zbog svojih fizioloških svojstava [46, 117]. S druge strane, značajna pažnja se pridaje i masnim kiselinama koje se najčešće koriste da poboljšaju stabilnost i rastvorljivost ovih jedinjenja u lipofilnim sredinama [76, 97, 102, 120]. Generalno, viši stepeni konverzije i najviše početne brzine su dobijene sa čistim masnim kiselinama kao acil-donorima.

Pri upotrebi aromatičnih kiselina, stepen konverzije zavisi od dužine supstituentske alifatične grupe i položaja hidroksilnih grupa [15]. U reakciji acilovanja izokvercitrina sa kofeinskom, *p*-kumarnom, ferulnom i cimетnom kiselinom, katalizovanoj ćelijskom kulturom iz *Ipomoea batatas* (bogatoj enzimom antocijanin 3-aromatičnom acil-transferazom) pokazano je da je najveći stepen konverzije postignut sa kofeinskom kiselinom, 100 %, dok proizvod nije detektovan u reakciji sa cimетnom kiselinom [124]. Što se tiče uticaj aromatičnih acil-donora na esterifikaciju floridzina katalizovanu

Novozym[®] 435, primećen je sledeći redosled u reaktivnosti: metil-cinamat > benzoat \approx salicilat > *p*-hidroksifenilacetat \approx *p*-hidroksifenilpropionat [117]. Pored toga, ispitan je uticaj različitih acil-donora na acilovanje rutina i eskulina u prisustvu CAL B kao katalizatora i ustanovljeno je da su aromatične kiseline najpodesniji acil-donori, s obzirom da su najveće početne brzine i konverzije postignute sa ovim kiselinama, a nakon njih slede aril-alifatične kiseline [108]. Do formiranja proizvoda ne dolazi u reakciji sa benzoevom kiselinom. Za aromatične kiseline koje poseduju barem jedan alkil ili alkenil most između karboksilne grupe i aromatičnog jezgra, proces acilovanja zavisi od stepena nezasićenosti supstituenta i/ili prisustva drugih supstituenata na aromatičnom prstenu [108].

Kada su u pitanju alifatične kiseline, širok opseg masnih kiselina, C₂-C₂₂, je ispitan u reakcijama acilovanja flavonoida. Proučavanjem mesta vezivanja acil-donora kod CAL B, ustanovljeno je da je enzim selektivan prema masnim kiselinama kratke i srednje dužine lanca [125]. Upoređivanjem rezultata dobijenih u različitim studijama o uticaju dužine lanca masnih kiselina na reakciju acilovanja flavonoida, ustanovljena su određena neslaganja. Kontogiani i saradnici su tvrdili da dužina lanca masnih kiselina nema značajnog uticaja na stepen konverzije kada su u reakciji korišćene masne kiseline srednje dužine lanca [102]. Takođe, ispitan je uticaj dužine lanca masnih kiselina (C₁₂-C₁₈), kao i dikarboksilnih kiselina (C₆-C₁₆) na stepen konverzije i početnu brzinu esterifikacije rutina i eskulina i primećeno je da kada su korišćene masne kiseline ne dolazi do značajnog uticaja dužine lanca na reakciju, s obzirom da su stepeni konverzije i početne brzine u približno istom rangu za sve testirane kiseline (slika 2.15) [97]. Kada se kao supstrati koriste dikarboksilne kiseline, u tim reakcijama dolazi do značajnijeg uticaja dužine lanca, imajući u vidu da stepen konverzije raste sa povećanjem broja C atoma u lancu od C₆ ka C₁₆. S druge strane, kada su masne kiseline u opsegu dužine lanca od C₄ do C₁₈ korišćene kao acil-donori u reakciji acilovanja izokvercitrina katalizovanoj istim enzimom, objavljeno je da stepen konverzije zavisi od dužine lanca upotrebljene masne kiselina, i opada sa povećanjem broja C atoma [76]. Sličan trend je pokazan i prilikom reakcije acilovanja naringina i rutina katalizovanoj imobilisanom lipazom iz *C. antarctica*, koristeći slobodne masne kiseline i njihove vinil estre u jonskim tečnostima, jer su veći stepeni konverzije

dobijeni sa acil-donorima kratkog lanca (do 4 C atoma u molekulu) [75]. Kada su u pitanju masne kiseline dugog lanca, ispitan je uticaj C₁₈-C₂₂ masnih kiselina na reakciju esterifikacije floridzina i izokvercitrina i primećen je blagi pad stepena konverzije sa povećanjem dužine lanca kiseline, pa može biti zaključeno da acil-donori dugog lanca imaju uticaja na aktivno mesto enzima [114].



Slika 2.15 Stepen konverzije flavonoida tokom acilovanja rutina i eskulina različitim acil-donorima u prisustvu Novozym® 435 kao biokatalizatora u terc-amil alkoholu pri sadržaju vode manjem od 200 ppm [97].

Pregledom dostupne literature, primećeno je da je u većini istraživanja enzimaska sinteza estara flavonoida izvođena korišćenjem čistih masnih kiselina ili njihovih estara kao acil-donora. Jedino su Almeida i saradnici opisali primenu ricinusovog ulja za acilovanje naringina [126]. Pokazano je da je nakon 120 h trajanja reakcije, naringin-6"-ricinolat bio glavni proizvod u oba sistema, i kada je ricinusovo ulje i kada je čista ricinolna kiselina korišćena kao acil-donor, ostvarujući stepen konverzije od 33 % i 24 %, redom.

2.4.1.4. Uticaj molarnog odnosa supstrata

Acilovanje flavonoida predstavlja ravnotežnu reakciju, u kojoj je količina sintetisanog estra uslovljena samom ravnotežom reakcije. Jednostavan način da se poveća brzina reakcije i

stepen konverzije je upotreba viška acil-donora, pri čemu se termodinamička ravnoteža pomera u smeru sinteze proizvoda. S ciljem dobijanja najvećeg stepena konverzije, mnogi autori su pokušali da odrede optimalni molarni odnos flavonoid:acil-donor; stoga ispitani su molarni odnosi (acil-donor/akceptor) u opsegu od 1:1 do 1:40. Za većinu autora, najpogodniji molarni odnos je 1:5 [12, 110, 114, 118]. S ciljem određivanja minimalnog potrebnog molarnog odnosa supstrata za postizanje visokog stepena konverzije u reakciji transesterifikacije prunina katalizovanoj sa CAL B, ispitan je molarni odnos prunina i vinil-laurata u opsegu 1:1 do 1:40 [116]. Pokazano je da uticaj molskog odnosa supstrata zavisi od upotrebljenog rastvarača, s obzirom da je molarni odnos 1:10 bio optimalan za postizanje konverzije od skoro 100 % u reakcijama izvođenim u acetonu i acetonitrilu, dok je za reakciju u tetrahidrofuranu i *t*-butanolu odnos 1:40 bio optimalan. U drugoj studiji pokazano je da molarni odnos supstrata ima veliki uticaj na transesterifikaciju naringina sa vinil-palmitatom, s obzirom da su početne brzine rasle od 0,05 g/l/h do 1,26 g/l/h za reakcije izvođene pri molskom odnosu 1:1 i 1:7, redom, dok su stepeni konverzije nakon 48 h porasli sa 5 % na 98 % [119].

2.4.1.5. Uticaj reakcionog medijuma

S obzirom na veoma osetljivu prirodu enzima, izbor odgovarajućeg medijuma za reakciju enzimske sinteze estara flavonoida je od posebnog značaja. Cilj prvih istraživanja je bio pronalaženje organskog rastvarača koji će omogućiti dobru rastvorljivost polarnog acil-akceptora (flavonoid glikozida) i nepolarnog acil-donora, kao i omogućiti najveću moguću aktivnost enzima. U zavisnosti od krajnje upotrebe sintetisanog molekula (primena u farmaciji, kozmetici ili hrani), pri samom izboru rastvarača njegova toksičnost je jedan od najbitnijih kriterijuma [101]. To je kasnije dovelo i do primene drugih reakcionih medijuma, kao što su sistemi bez rastvarača, jonske tečnosti ili eutektičke smeše rastvarača.

2.4.1.5.1. Uticaj vrste organskog rastvarača

Generalno, lipaze poseduju veliku stabilnost i aktivnost u većini organskih rastvarača. Nekoliko istraživanja je pokazalo da lipaze imaju najbolje osobine u organskim rastvaračima visoke log P vrednosti; hidrofobniji rastvarači su poželjniji [127, 128]. Međutim, ova generalizacija nije odgovarajuća za sve reakcije katalizovane lipazama, jer

pored nepolarnih i mnogi polarni rastvarači su bili testirani kao medijumi za odigravanje reakcije acilovanja flavonoida. Chabil i saradnici su u svom revijalnom radu sumirali podatke prethodnih istraživanja, i na osnovu tih podataka može se zaključiti da su najčešće ispitivani rastvarači za reakciju esterifikacije ovih prirodnih jedinjenja zapravo aceton, acetonitril, *t*-butanol, *t*-amil alkohol i tetrahidrofuran (THF) [15]. U tabeli 2.5 su sumirana najznačajnija istraživanja koja su se bavila ovom problematikom.

Tabela 2.5 Ispitani rastvarači u reakciji acilovanja flavonoida.

Flvonoid/acil-donor	Enzim	Testirani rastvarači	Najbolji rastvarač	Ref.
Katehin/vinil-acetat	Lipaza PS	Acetonitril, aceton, tetrahidrofuran, <i>t</i> -amil alkohol	Acetonitril	[112]
Izokvercitrin, kvercetin i rutin/vinil acetat	Novozym [®] 435	Heksan, aceton, acetonitrile, <i>t</i> -amil alkohol, <i>t</i> -butanol, dioksan, DMF, N-metilpirolidon, 3-pentanon, piridine, tetrahidrofuran (THF), smeša rastvarača	Heksan, aceton, acetonitril, <i>t</i> -amil alkohol, <i>t</i> -butanol, dioksan, 3-pentanon, THF, THF/piridin (7/3, v/v), THF/piridin (5/5, v/v), THF/piridin (3/7, v/v), dioksan/piridin (5/5, v/v) i acetonitril/piridin (5/5, v/v)	[109]
Izokvercitrin, kalistefin, hrizantemin i rutin/vinil-cinamat i <i>p</i> -kumarat	Novozym [®] 435 i Amano PS	Acetonitril, aceton, hlormetan, dihlormetan, 1,4-dioksan, DMSO, THF i DMF	Acetonitril i aceton	[121]
Naringenin, izokvercitrin, luteolin-7-glukozid, katehin-7- α -D-glukozid/vinil cinamat, kofeat	Novozym [®] 435	<i>t</i> -butanol/piridin (9/1, v/v) acetonitril/piridin (9/1, v/v)	<i>t</i> -butanol/piridin (9/1, v/v) acetonitril/piridin (9/1, v/v)	[123]
Rutin, naringenin/oktanska, dekanska, dodekanska kiselina	Novozym [®] 435	Aceton, tetrahidrofuran, <i>t</i> -butanol	Aceton i <i>t</i> -butanol	[101]

Polarni aprotični rastvarači kao što su dimetilsulfoksid (DMSO), dimetilformamid (DMF), tetrahidrofuran (THF) i piridin su prvi rastvarači koji su bili ispitani za ovu vrstu reakcije, ali je pokazano da dolazi do naglog opadanja enzimске aktivnosti u ovim rastvaračima [109, 121]. Čini se da za date supstrate uticaj rastvarača najviše zavisi od upotrebljenog biokatalizatora (subtilizin, PCL, CAL B). Nekoliko istraživača je ispitivalo uticaj različitih vrsta organskih rastvarača na reakciju acilovanja flavonoida katalizovanu lipazom iz *P.cepacia* (PCL) i ustanovljeno je da su pod datim uslovima izvođenja reakcije najbolji rastvarači aceton i acetonitril [93, 112, 121]. Kada se kao katalizator koristi CAL B nekoliko studija je pokazalo da je najbolji rastvarač aceton i smeša acetonitrila i piridina [14, 101, 102, 109, 123]. Slični rezultati su dobijeni i prilikom ispitivanja reakcije esterifikacije izokvercitrina i floridzina masnim kiselinama dugog lanca katalizovanoj CAL B, s obzirom da su aceton i acetonitril bili uspešno primenjeni kao rastvarači [114]. Prilikom ispitivanja uticaja polarnosti rastvarača na CAL B katalizovanu sintezu floridzin-laurata koristeći acetonitril, aceton, *t*-butanol i *t*-amil alkohol kao rastvarače, ustanovljeno je da je stepen konverzije drastično manji u *t*-butanolu i *t*-amil alkoholu, u poređenju sa onim dobijenim u acetonu i acetonitrilu [129]. U saglasnosti sa ovim rezultatima su i rezultati koje su dobili Céliz i Daz, koristeći kao biokatalizatore CAL B i RML za sintezu alkil estara prunina, jer su od testiranih rastvarača, acetona, acetonitrila, tetrahidrofurana i *t*-butanola, u prva dva ostvareni daleko veći stepeni konverzije [116]. S druge strane, *t*-amil alkohol se pokazao kao odgovarajući rastvarač za CAL B katalizovanu esterifikaciju naringina [110]. Imajući u vidu ova neslaganja u dobijenim rezultatima, može se zaključiti da uticaj rastvarača zavisi i od korišćenih supstrata u reakciji. U saglasnosti sa tim, Kontogiani i saradnici su objavili da koristeći isti enzim (CAL B) u reakciji esterifikacije rutina i naringina, gde je oktanska kiselina korišćena kao acil-donor, najviši stepen konverzije je postignut u acetonu, dok je sa dekanskom kiselinom bolji stepen konverzije postignut u *t*-butanolu [101, 102]. Pored toga, isti istraživači su naglasili da THF nije kompatibilan za lipaze, s obzirom da je ostvaren stepen konverzije od samo 4 %.

2.4.1.5.2. Sistemi bez rastvarača

Glavni problem kod primene organskih rastvarača kao reakcionog medijuma je njihova toksičnost, koja predstavlja značajni nedostatak s obzirom na oblasti primene većine estara (prehrambeni, kozmetički i farmaceutski proizvodi) u kojima se čak ni tragovi organskog rastvarača u finalnom proizvodu ne mogu tolerisati. S ciljem dobijanja proizvoda veće čistoće, pristup bez korišćenja organskog rastvarača, u kome acil-donor ima ulogu i supstrata i rastvarača, je uveden kao alternativa konvencionalnim rastvaračima.

Tako su Enaud i saradnici naveli da prilikom acilovanja floridzina etil-cinamatom, koji je imao i ulogu rastvarača, pod sniženim pritiskom i korišćenjem Novozym[®] 435 kao katalizatora, dolazi do potpune konverzije floridzina već nakon 15 h trajanja reakcije, a pritom je i reakcija bila brža u poređenju sa reakcijom u konvencionalnim rastvaračima [117]. Međutim, u drugoj studiji pokazano je da su korišćenjem sistema bez rastvarača u reakciji esterifikacije flavonoida masnim kiselinama katalizovane lipazama ostvareni stepeni konverzije bili značajno niži nego oni dobijeni kada je reakcija izvođena u rastvaračima kao što su aceton i *t*-butanol [101]. Iako je ovaj postupak veoma atraktivan, ipak nije univerzalan jer lipaze mogu biti inaktivirane velikim viškom nekog supstrata, s obzirom da je ustanovljeno da za uspešnu reakciju log P vrednost reakcione smeše treba da bude približno jednaka log P vrednosti odgovarajućeg rastvarača za tu reakciju. Dodatni nedostatak predstavlja i neophodnost eliminacije velikog viška acil-donora radi dobijanja proizvoda dobrog kvaliteta.

2.4.1.5.3. Jonske tečnosti

Poslednju deceniju, jonske tečnosti dobijaju sve veću pažnju kao zamena organskim rastvaračima koji se koriste za enzimске transformacije različitih vrsta jedinjenja. Njihove specifične fizičko-hemijske osobine kao što su neisparljivost, nezapaljivost, termička stabilnost i dobra rastvorljivost kako polarnih, tako i manje polarnih jedinjenja u njima - predstavljaju glavni razlog za sve veću primenu ovih „zelenih rastvarača“ kao reakcionih medijuma [75, 104]. Iako se u mnogim slučajevima jonske tečnosti koriste samo kao zamena organskim rastvaračima, vrlo često njihova upotreba dovodi i do poboljšanja samih performansi procesa, pa tako, enzimski katalizovane reakcije u jonskim tečnostima su se

pokazale kao dosta brže, sa višom selektivnošću i većom stabilnošću enzima [130]. Jedna od najvećih prednosti upotrebe ovih „zelenih rastvarača“ je njihova primena u prehrambenim, farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima, zahvaljujući njihovoj smanjenoj toksičnosti [131].

S obzirom na mnoge prednosti jonskih tečnosti, njihova upotreba u reakciji acilovanja flavonoida, naringina i rutina, je prvi put opisana od strane Katsoura i saradnika [75]. Oni su objavili da, izuzev lipaze iz *C.rugosa*, sve ostale testirane lipaze, Novozym[®] 435, lipaza iz *T. lanuginosus* (Lipozyme TLIM) i lipaza iz *R. miehei* (Lipozyme RMIM), efikasno katalizuju acilovanje naringina u obe testirane jonske tečnosti, 1-butil-3-metilimidazolium tetrafluoroborat ([bmim]BF₄) i 1-butil-3-metilimidazolium heksafluorofosfat ([bmim]PF₆), s obzirom da su ostvarene velike reakcione brzine i značajne konverzije. Isti autori ispitivali su efikasnost i selektivnost acilovanja eskulina i rutina u jonskim tečnostima, [bmim]BF₄ i [bmim]PF₆, gde je kao katalizator korišćena lipaza iz *C.antarctica* i ukazali su na veoma dobru aktivnost enzima u oba medijuma [98]. Pored toga, u drugoj studiji ispitan je uticaj 14 različitih jonskih tečnosti u reakciji esterifikacije eskulina i rutina sa različitim masnim kiselinama, i [TOMA].[Tf₂N] se pokazao kao idealan za sintezu eskulin estara, dok je 1-metil-3-oktil tetrafluoroborat (OMIM·BF₄) bio najbolji za modifikaciju rutina [132]. Sa druge strane, prilikom ispitivanja 17 jonskih tečnosti kao medijuma za esterifikaciju eskulina palmitinskom kiselinom, autori su pokazali da su ostvareni drastično niži stepeni konverzije u poređenju sa onim dobijenim u acetonu kao rastvaraču, iako je rastvorljivost eskulina u svih 17 jonskih tečnosti bila značajno bolja nego u acetonu [111].

2.4.1.6. Uticaj temperature

Temperatura je važan faktor u svakoj enzimski katalizovanoj reakciji, s obzirom da utiče na viskoznost medijuma, stabilnost i aktivnost enzima, kao i na rastvorljivost supstrata i proizvoda. Do danas, enzimsko acilovanje flavonoida je bilo izvođeno u opsegu temperatura od 30 °C do 100 °C [14, 75, 94, 99, 114, 117-119, 121, 133]. Izbor optimalne temperature za datu reakciju zavisi od enzima i upotrebljenog rastvarača. Za acilovanje flavonoida gde je kao katalizator korišćena CAL B, mnogi autori su ustanovili da je

optimalna temperatura oko 60 °C, imajući u vidu maksimalnu aktivnost enzima, dobru rastvorljivost supstrata i proizvoda i postignuti visok stepen konverzije [75, 94, 99, 103, 108, 133].

Ispitivanjem uticaja temperature na Novozym[®] 435 katalizovanu reakciju transesterifikacije floridzina u sistemu pod sniženim pritiskom bez rastvarača korišćenjem vinil-cinamata kao acil-donora, pokazano je da je floridzin bio potpuno preveden u estar nakon 15 h, 4 h i 2 h, na temperaturama od 60 °C, 80 °C i 100 °C, redom, što znači da povećanje temperature omogućava kraće vreme trajanja reakcije [117]. Drugim eksperimentom potvrđeno je da je ipak optimalna temperatura 80 °C zbog jako brze potpune konverzije supstrata u proizvod, a enzim je sačuvan od termičke inaktivacije. S ciljem ispitivanja uticaja temperature na reakciju transesterifikacije naringina i vinil-butirata, katalizovanoj istim enzimom, u jonskim tečnostima ([bmim]BF₄ i [bmim]PF₆) kao reakcionim medijumima, izvođeni su eksperimenti na četiri različite temperature, 30 °C, 40 °C, 50 °C i 60 °C [98]. Prema dobijenim rezultatima, pokazano je da i u jonskim tečnostima povećanje temperature dovodi do povećanja brzine i prinosa reakcije, jer je najveći stepen konverzije postignut na 60 °C u obe jonske tečnosti. Pored toga, ispitan je i uticaj viših temperatura (preko 60 °C) na CAL B katalizovanu reakciju sinteze eskulin estara u različitim jonskim tečnostima; rezultati su pokazali da su najveća konverzija, kao i odgovarajuća najveća aktivnost enzima postignuti na 90 °C [132].

Kako na aktivnost, temperatura utiče i na stabilnost enzima. U sintezi estara floridzina u sistemu bez rastvarača pri sniženom pritisku na temperaturi od 80 °C, Novozym[®] 435 gubi oko 30 % od svoje početne aktivnosti tokom jednog dana inkubacije [117]. S druge strane, kada je ispitivana stabilnost istog enzima u reakciji sinteze prunin 6''-O-laurata na 50 °C u četiri različita rastvarača (aceton, acetonitril, THF i *t*-butanol), i nakon 12 ciklusa, stepen konverzije je ostao nepromenjen u svim rastvaračima [116].

2.4.1.7. Uticaj sadržaja vode

Sadržaj vode je jedan od najbitnijih faktora u reakcijama katalizovanim lipazama, imajući u vidu da utiče na termodinamičku ravnotežu i u zavisnosti od ovog faktora, reakcija se

pomera u smeru reakcije hidrolize ili sinteze. Međutim, uticaj ovog faktora nije isti za sve enzime i za dati enzim on zavisi od forme katalizatora (slobodan ili imobilisan), osobina nosača i prirode rastvarača [15, 104].

Tokom sinteze naringin estara katalizovane lipazom iz *C.antarctica* u *t*-butanolu, najveći stepen konverzije je postignut kada je aktivnost vode bila 0,11 ili manja [101]. U drugoj studiji, koristeći isti katalizator za esterifikaciju rutina u *t*-amil alkoholu, najbolji rezultati su dobijeni pri sadržaju vode manjem od 200 ppm [97]. Gajot i saradnici su naglasili da je za maksimalnu aktivnost CAL B, optimalna vrednost vode u organskim rastvaračima 0,5 % (v/v) [110]. S obzirom na rezultate prethodnih istraživanja o sadržaju vode u reakciji acilovanja flavonoida, kasnija istraživanja mnogih autora su sprovedena u prisustvu molekulskih sita [14, 93, 115, 116].

2.4.2. Uticaj acilovanja flavonoida na biološku aktivnost, rastvorljivost i stabilnost

2.4.2.1. Acilovanje flavonoida aromatičnim kiselinama

Aromatične kiseline, zajedno sa flavonoidima, pripadaju grupi fenolnih jedinjenja, proizvodima sekundarnog metabolizma živih organizama. U ovoj grupi sekundarnih metabolita, postoji veliki broj biološki aktivnih jedinjenja, sa različitim biološkim aktivnostima. Stoga, može se pretpostaviti da fizičko-hemijske i biološke osobine početnih flavonoida mogu biti poboljšane acilovanjem flavonoida sa aromatičnim kiselinama. Međutim, ovom reakcijom novo jedinjenje može dobiti i neke nove osobine, aktivnosti, karakteristične za aromatične kiseline [104].

Acilovanjem flavonoida sa aromatičnim kiselinama ustanovljeno je da dolazi do poboljšanja fizioloških aktivnosti, kao što su kapacitet UV-apsorpcije, sposobnost uklanjanja slobodnih radikala [66, 100, 134], stabilizacija pigmenta (posebno antocijanina) [100]. Estri flavonoida acilovanih *p*-kumarnom kiselinom povećavaju antioksidativnu [135] i antiinflamatornu aktivnost [66], kao i antiproliferativni i citotoksični efekat na različite ćelijske linije kancera. Pored toga, objavljeno je da *p*-kumaril estri kvercetina i kaempferola

imaju pozitivan uticaj na kardiovaskularne poremećaje [136]. Slično, flavonoid estri esterifikovani cimetnom kiselinom pokazali su da imaju antiproliferativnu aktivnost protiv nekoliko ćelijskih linija ljudskog kancera [137].

Pored uticaja na biološku aktivnost, derivatizacija flavonoida može imati uticaja i na fizičko-hemijske osobine tih jedinjenja, imajući u vidu da acilovanje može dodatno povećati stabilnost i rastvorljivost. Iako mehanizam još uvek nije poznat, utvrđeno je da uvođenje acil grupa povećava termostabilnost flavonoida. U studiji Ishihare i Nakajime, *in vitro* monoacilovanje kvercetin-3-*O*-glukozida preko hidroksilne grupe šećera, sa svih devet različitih aromatičnih karboksilnih kiselina dovodi do poboljšanja termostabilnosti i fotorezistentnosti u odnosu na početno jedinjenje [100]. Pretpostavljeno je, da razlog povećane stabilnosti nakon acilovanja mogu biti intra- i intermolekulske interakcije između skeleta molekula flavonoida i aromatičnog prstena kiselina koje bi trebalo da spreče degradaciju molekula.

2.4.2.2. Acilovanja flavonoida alifatičnim kiselinama

Biološka aktivnost alifatičnih kiselina i nije tako značajna u poređenju sa aromatičnim kiselinama. Ova jedinjenja imaju biološku ulogu „skladišta“ energije i strukturne komponente nekoliko ćelijskih membrana i emulgatora.

Hidroksilne grupe šećernog dela flavonoid glikozida su najčešće pozicije acilovanja i generalno to dovodi do smanjenja njihove antioksidativne aktivnosti, iako je primećeno da rezultati variraju u zavisnosti od izabrane metode za određivanje antioksidativne aktivnosti. Tako npr. acilovanje kvercetin-3-*O*-glukozida sa masnim kiselinama rezultuje povećanjem sposobnosti novonastalog estra u uklanjanju ABTS radikala, ali smanjuje se sposobnost uklanjanja DPPH i superoksid radikala [76]. Štaviše, antioksidativni kapacitet estara kvercetin-3-*O*-glukozida zavisi i od dužine lanca acil-donora, pa tako antioksidativni kapacitet opada sa povećanjem broja C atoma u lancu masnih kiselina.

Alifatično acilovanje antocijanina sa malonskom kiselinom je važno zbog povećanja rastvorljivosti ovog prirodnog pigmenta u vodi, zaštite glikozida od enzimske degradacije i stabilizacije strukture antocijanina [138]. Objavljeno je da estri katehina sa alifatičnim

kiselinama pokazuju antitumornu, antibakterijsku i 5- α -reduktaza inhibitornu aktivnost [139], a pored toga i antioksidativnu aktivnost [107]. Takođe, u literaturi se navodi i o antiaterogenoj aktivnosti naringenin-7-*O*-oleata [140]. U tabeli 2.6 predstavljene su odabrane, do sada testirane, biološke aktivnosti različitih estara flavonoida

Tabela 2.6 Biološke osobine lipofilnih derivata flavonoida [8].

Flavonoid	Acil-donor	Biološka aktivnost	Ref.
Rutin	Oleinska kiselina	↑Antioksidativna	[75]
Rutin, naringin	Oleinska, linolna, linolenska kiselina i etil-linoleat	↑Antiangeonska, ↑Antikancerogena	[12]
Silibin	Buterna i laurinska kiselina	↑Antiangeonska, ↑Antikancerogena	[141]
Izokvercitrin	Etil-butirat, kapronat, kaprilat, dekanolat, laurat, palmitat, stearat i oleat.	↑Inhibicija ksantin oksidaze, ↑Antikancerogena ↑Antioksidativna (ABTS radikal) ↓Antioksidativna (DPPH i superoksid radikal)	[76]
Rutin	Buterna, kapronska, kaprilska, dekanoinjska, laurinska, miristinska, palmitinska, stearinska, oleinska, linolna i linolenska kiselina.	↔ Antioksidativna (DPPH i β -karoten linoleat metoda)	[103]
Silibin	Dikarboksilna kiselina	↑Antiangeonska, ↑Antikancerogena	[142]
Izoramnatin-3- <i>O</i> -glukozid	Etil-butirat, etil-laurat	↑Inhibicija ksantin oksidaze, ↑Antikancerogena ↓Antioksidativna (DPPH i superoksid radikal)	[143]
Prunin	Laurinska	↔ Antioksidativna	[116]
Floridzin, izokvercitrin	Oleinska, stearinska, linolna, linolenska, Eikozapentaenoinska i dokozaheksaenoinska kiselina	↑Inhibicija tirozinaze, ↓Antioksidativna (DPPH radikal, FRAP i ORAC metoda)	[114]
Rutin, floridzin, eskulin	Buterna, kapronska, kaprilska, dekanoinjska, laurinska, miristinska, palmitinska, stearinska, oleinska, linolna, linolenska i arahidonska kis.	↑Inhibicija serinskih proteaza, tripsin, trombin, elastaza i urokinaza	[104]

Rutin	Laurinska i palmitinska kiselina	↑Antioksidativna (LDL- oksidacija), ↓Antioksidativna (DPPH radikal, Fe ³⁺ helatna aktivnost)	[144]
Izokvercitrin	Stearinska, linolna, linolenska, Eikozapentaenoinska i dokozaheksaenoinska kiselina	↑Antioksidativna (riblje ulje i LDL-oksidacija)	[10]
Izoorentin, izoviteksin	Laurinska, miristinska i palmitinska kiselina	↓Antioksidativna (DPPH radikal i uklanjanje superoksid radikala)	[145]
Izoorentin, izoviteksin	Palmitinska kiselina	↓ Antioksidativna (DPPH radikal)	[146]
(-)- epigalokatehin-3- O-galat	Vinil-acetat	↑Antioksidativna	[147]
Izokvercitrin	Stearinska, oleinska, linolna, linolenska, Eikozapentaenoinska i dokozaheksaenoinska kiselina	↑Antikancerogena	[148]
Izokvercitrin	Stearinska, oleinska, linolna, linolenska, Eikozapentaenoinska i dokozaheksaenoinska kiselina	↑Antikancerogena	[149]
Izokvercitrin	Linolenska, Eikozapentaenoinska i dokozaheksaenoinska kiselina	↑Antikancerogena, ↑Antioksidativna ↑Anti-inflamatorna	[150]
Izokvercitrin	Eikozapentaenoinska kiselina	↑Anti-inflamatorna	[151]
Floridzin	Dokozaheksaenoinska kiselina	↑Anti-inflamatorna	[11]
Kvercetin	Acil grupe (C2-C14)	↔Antimikrobna, ↑Inhibicija lipaza, ↑Anti-HIV	[152]
Rutin	Palmitinska, linolna, linolenska, arahidonska i eruikinska kiselina	↑Antioksidativna, ↑inhibicija Ca ²⁺ - ATPaze sarkoplazmičnog retikuluma	[153]
Floridzin	Masne kiseline dugog lanca (C18- C22)	↑Inhibicija renina, ↑Inhibicija angiotenzin konvertujućeg enzima	[154]

Simboli: ↑ - povećanje aktivnosti; ↓ - smanjenje aktivnosti; ↔ - bez uticaja na aktivnost

Acilovanjem molekula flavonoida sa polinezasićenim masnim kiselinama uvode se i potencijalne antitumorne i antiangiogenetske osobine [12]. Antikancerogeni efekat je

takođe primećen i kod estara nastalih acilovanjem silibina buternom i laurinskom kiselinom [141]. Takođe, objavljeno je da acilovanje rutina sa nezasićenim masnim kiselinama, kao što su oleinska, linolna i α -linolenska, povećava antioksidativni potencijal polaznog jedinjenja [12, 75, 103]. Esterifikacija kvercetina sa kiselinama kratkog lanca, kao što su sirćetna i propionska, može dovesti do poboljšanja kretanja jedinjenja kroz vodenu sredinu, kao i unaprediti interakciju ili prodiranje kroz fosfolipidne membrane [155]. Pored toga, eksperimentalna istraživanja pokazuju da acilovanjem flavonoida može doći do povećanja njihove inhibitorne aktivnosti prema određenim enzimima. Tako je primećeno povećanje inhibicije 5- α -reduktaze nakon acilovanja (-)-epigalokatehina [156]. Drugo istraživanje je pak pokazalo, da su lipofilni estri rutina i naringina jaki inhibitori transportnih enzima, kao što su Ca^{2+} -ATPaza sarkoplazmičnog retikuluma i plazmeno membranska Ca^{2+} -ATPaza, što može biti veoma značajno za regulaciju kalcijuma u ćeliji [96]. Pretpostavlja se da možda postoji opšti mehanizam kojim dolazi do povećanja inhibitorne aktivnosti acilovanih flavonoida prema različitim klasama enzima, i da je ta aktivnost posledica dodavanja masnih kiselina srednjeg i dugog lanca [104].

2.4.3. Mogućnosti primene acilovanih flavonoida

Postoji niz različitih preparata koji sadrže flavonoide, a koji su dostupni u proizvodima različitih sektora industrije. Do danas, u literaturi je prisutno nekoliko različitih patenata, koji opisuju metode pripreme lipofilnih derivata flavonoida, kao i njihovu primenu u hrani, farmaceutskim proizvodima i kozmetičkoj industriji [94, 157-161].

2.4.3.1. Primena u prehrambenoj industriji

Glavni doprinos primene acilovanih flavonoida u prehrambenoj industriji leži u povećanju rastvorljivosti i stabilnosti početnog molekula, smanjenju lipidne oksidacije u hrani bogatoj uljima/mastima i poželjnoj modifikaciji neželjenih senzornih svojstava polaznih flavonoida koristeći prednosti stabilizacije pigmenta acilovanih flavonoida. Štaviše, selektivno acilovanje flavonoida može dovesti do značajnih promena u njihovoj dostupnosti i biološkoj aktivnosti, tako da pri konzumaciji mogu igrati značajnu ulogu u sprečavanju određenih bolesti [104].

Acilovanje flavonoida je koristan metod modifikacije senzornih karakteristika hrane. Dok flavonoidi povoljno utiču na zdravlje, hrana bogata flavonoidima je obično gorkog ukusa. Utvrđeno je da određeni postupci glikozilacije i acilovanja početnih jedinjenja, mogu efikasno da neutrališu uzroke ovih loših ukusa u hrani, farmaceutskim proizvodima i sredstvima za higijenu usta [162]. I intenzitet i profil percepcije ukusa su poboljšani primenom novih jedinjenja. Goul i saradnici su uveli postupak selektivnog acilovanja flavonoid glikozida, koji dovodi do poboljšane rastvorljivosti i stabilnosti u različitim preparatima, a da je pri tome antioksidativna aktivnost u odnosu na početno jedinjenje nepromenjena ili čak i poboljšana [94]. Druga značajna praktična prednost dobijena pomoću ovih modifikovanih flavonoida je bifunkcionalna priroda ovih molekula sa visokom biološkom aktivnošću. Slobodne nezasićene masne kiseline predstavljaju potencijalni rizik jer su veoma reaktivne i stvaranjem slobodnih radikala uzrokuju neželjene oksidativne procese i kvarenje hrane. Utvrđeno je da je enzimaska sinteza estara flavonoida sa nezasićenim masnim kiselinama korisno rešenje za stabilizaciju ovih oksidaciji podložnih kiselina [12, 103]. Veoma značajna prednost acilovanih antocijanina leži u njihovoj primeni kao prehrambene boje, pa mogu poslužiti kao korisna alternativa raznim sintetičkim dodacima. Otkriće acilovanih antocijanina sa povećanom stabilnošću je pokazalo da ovi pigmenti mogu da obezbede poželjne boje prehrambenih proizvoda kao i stabilnost tih boja u širokom opsegu pH [163-165].

2.4.3.2. Primena u kozmetici

Većina kozmetičkih i dermofarmaceutskih preparata pored vodene faze u sebi sadrže i masnu fazu, odnosno uljane komponente koje imaju tendenciju da oksidišu čak i na sobnoj temperaturi. Posledica oksidacije može biti menjanje suštinskih svojstava ovih preparata, što može dovesti do njihove neupotrebljivosti nakon određenog vremenskog perioda [104]. S obzirom na dejstvo flavonoida na kožu (štite i čiste kožu), kao i njihov uticaj protiv starenja i promene boje kože, oni se koriste kao konstituenti kozmetičkih i dermofarmaceutskih preparata. Takođe, utiču i na mehanička svojstva kose [94]. Mousou i saradnici su otkrili da estri flavonoida sa ω -supstituisanim C_6 do C_{22} masnim kiselinama imaju sposobnost da zaštite ćelije kože od oštećenja uzrokovanog UV zračenjem [166].

Pokazano je da ovi estri flavonoida štite ćelije kože od UV-A i UV-B zračenja bolje nego sami flavonoidi. Pored toga, ovi estri su pokazali i sposobnost da stimuliraju metabolizam glutaciona u ćelijama kože nakon UV-A zračenja, tj. da stimuliraju njihovu sopstvenu ćelijsku odbranu. Poseduju takođe i antiinflamatorna i umirujuća svojstva, koja ispoljavaju tako što inhibiraju protein-kinazu PGE2 koja se oslobađa nakon dejstva UV-B zračenja. Zbog svega navedenog, ovi estri mogu da se koriste za zaštitu kože i glave, i/ili kao zaštita protiv UV zračenja i oštećenja nastalih od sunca: crvenila na koži, opekotina nastalih od sunca, oštećenja mitohondrijalne DNK. Pored toga estri flavonoida mogu da štite kožu od preranog starenja koje je najčešće indukovano UV zračenjem i pomažu kod uklanjanja znakova starenja kože kao što su bore, gubitak elastičnosti i smanjenje debljine kože [166]. Pokazano je da lipofilizacija osnovnog skeleta flavonoida poboljšava njihova svojstva prilikom zaštite kože, prvenstveno zbog lakšeg prodiranja u ćelije kože, pa tako kao sastojci raznih preparata ova jedinjenja mogu služiti u prevenciji raka kože, sprečavanju formiranja bora i starenja kože [158]. Perier i saradnici su otkrili da su specifični estri flavonoida stabilniji u odnosu na sam flavonoid, a pored toga su sačuvali svoje najznačajnije osobine kao što su uklanjanje slobodnih radikala i inhibicija određenih enzima. Imajući u vidu ove osobine, mogu se primenjivati u raznim preparatima: za vene, za jačanje zidova krvnih kapilara, za tretiranje osetljive kože, sa diuretičkim efekto, za mršavljenje, protiv bora, za poboljšanje elastičnosti kože, protiv starenja, a mogu se koristiti i kao inhibitori hemijskih, fizičkih i akutnih eritema (crvenila na koži), i kao stimulatori sinteze komponenata ekstracelularnog matriksa [160]. Postupak enzimskog acilovanja flavonoid glikozida u kojem su ulogu acil-donora imali različiti molekuli polinezasićenih masnih kiselina, arilalifatične karboksilne kiseline, njihovi estri kao i aktivirani estri masnih kiselina je patentiran [159]. Autori su pokazali da predstavljeni derivati pokazuju inhibitornu aktivnost prema proteazama kože, usporavajući proces starenja kože. Sintetisani derivati takođe pokazuju antioksidativni efekat, a pospešuju i nastajanje kolagena, pa su ovi derivati sastojci različitih šampona, gelova za tuširanje, krema i dezodoranasa [159].

2.5. Enzimska kinetika bisupstratnih reakcija

U biološkim sistemima, enzimi deluju kao katalizatori i igraju ključnu ulogu u ubrzavanju biohemijskih reakcija, a pri tome se u samoj reakciji ne troše. Ovaj efekat postižu vezivanjem za molekul supstrata i stvaranjem kompleksa, čime smanjuju Gibsovu energiju aktivacije koja je potrebna za prevođenje u proizvod. Enzimska kinetika je oblast koja se bavi proučavanjem brzine hemijske reakcije katalizovane enzimima, ispitivanjem uticaja različitih faktora kao što su koncentracija enzima, koncentracije supstrata i proizvoda, temperature, pH i drugih na sam tok reakcije. Osnovni cilj enzimske kinetike predstavlja određivanje mehanizma po kojem se odvijaju ove reakcije, tj. određivanje zakona brzine enzimske reakcije na osnovu koga se mogu dobiti najbitniji podaci potrebni za projektovanje bioreaktora i optimizaciju enzimskih procesa, kao što su vreme odigravanja reakcije i očekivani prinosi proizvoda pod određenim uslovima [82]. Reakcije sinteze estara katalizovane lipazama, predstavljaju bisupstratne reakcije, a uopšteni prikaz ovih reakcija može biti predstavljen sledećim izrazom:



gde A i B predstavljaju supstrate, a P i Q proizvode reakcije.

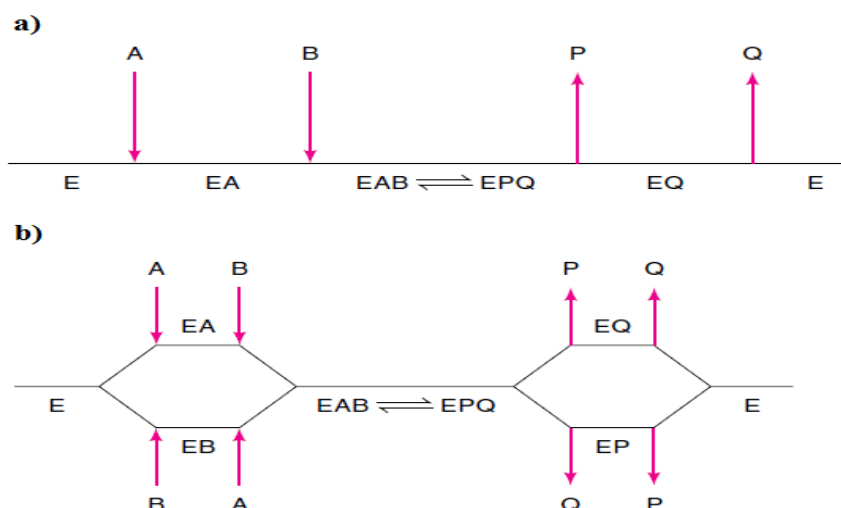
Sve bisupstratne reakcije, prema redosledu dodavanja supstrata i otpuštanja proizvoda, po Klilendu dele se na:

- sekvencijalne i
- Ping-Pong bi bi reakcije [167].

Kod sekvencijalnih reakcija za enzim se vežu oba supstrata, formira se ternarni kompleks (ES_2), pre nego što dođe do reakcije i otpuštanja prvog proizvoda. Sekvencijalni mehanizam može biti:

- pravilan - vezivanje supstrata i otpuštanje proizvoda uvek istim redosledom i
- nepravilan - nasumično vezivanje supstrata i otpuštanje proizvoda.

Na slici 2.16 dat je šematski prikaz vezivanja supstrata i otpuštanja proizvoda u bisupstratnim reakcijama koje se odvijaju po sekvencijalnom mehanizmu. Enzim i enzim-supstrat kompleksi su predstavljeni horizontalnim linijama, a sukcesivno dodavanje supstrata i oslobađanje proizvoda je predstavljeno vertikalnim strelicama, pri čemu svaka vertikalna strelica predstavlja povratnu reakciju.



Slika 2.16 Šematski prikaz vezivanja supstrata i otpuštanja proizvoda u bisupstratnim reakcijama koje se odvijaju po: a) pravilnom i b) nepravilnom sekvencijalnom mehanizmu.

Prema Segelu [168], ukoliko se posmatra samo period početnih brzina i usvoji aproksimacija stacionarnog stanja brzina reakcije pri sekvencijalnom mehanizmu se izračunava prema jednačini:

$$v = \frac{v_{max}[A][B]}{[A][B] + K_A[B] + K_B[A] + K_A K_B} \quad (2.2)$$

gde je v -brzina reakcije, v_{max} -maksimalna brzina reakcije, $[A]$ i $[B]$ - koncentracije supstrata A i B, a K_A i K_B – konstante koje imaju isti značaj kao Mihaelis-Mentenove konstante za svaki supstrat.

Prema Ping-Pong bi bi mehanizmu za enzim se prvo veže jedan supstrat, enzim se modifikuje i oslobađa se prvi proizvod. Za modifikovani enzim vezuje se drugi supstrat, nakon čega se oslobađa drugi proizvod i enzim se vraća u prvobitno stanje (slika 2.17).



Slika 2.17 Šematski prikaz vezivanja supstrata i otpuštanja proizvoda u bisupstratnim reakcijama koje se odvijaju po Ping-Pong bi bi mehanizmu.

Uz prethodno navedene pretpostavke, jednačina za brzinu pri ovom mehanizmu glasi:

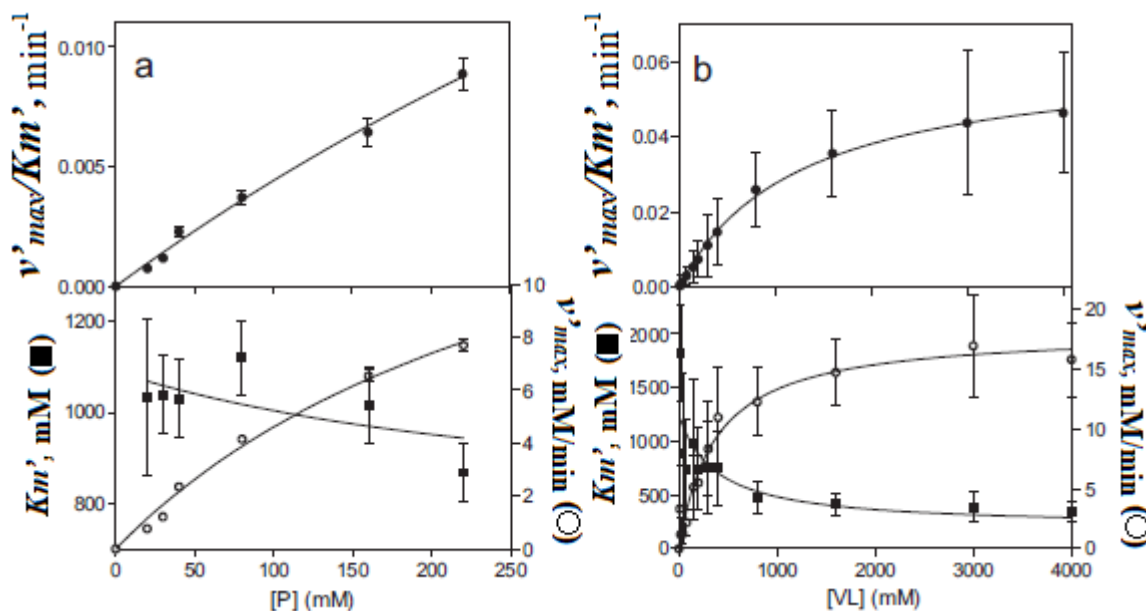
$$v = \frac{v_{max}[A][B]}{K_A[B] + K_B[A] + [A][B]} \quad (2.3)$$

Za reakcije esterifikacije je utvrđeno da prvi korak u sintezi uključuje vezivanje acil-donora za enzim, čime se formira acil-enzim kompleks. Stoga, nepravilni sekvencijalni mehanizam je odbačen kao mogući kinetički model ove reakcije [169]. Preostala dva mehanizma, i Ping Pong i pravilni sekvencijalni, su opisivani kao mogući za bisupstratne esterifikacije katalizovane lipazama, ali većina autora pretpostavlja Ping Pong mehanizam [170-172].

U literaturi je dostupan mali broj podataka vezanih za kinetiku sinteze estara flavonoida. Iako se za većinu reakcija katalizovanih lipazama pretpostavlja Ping Pong bi bi mehanizam, kada je u pitanju reakcija acilovanja flavonoida, Celiz i saradnici su došli do drugačijih zaključaka. Oni su ispitali kinetiku reakcije sinteze alkil flavonoid estera prunin-6"-O-laurata u acetonu katalizovanom lipazom B iz *C. antarctica*. Prilikom određivanja mehanizma, autori su eksperimente izvodili varirajući koncentraciju jednog supstrata bisupstratne reakcije održavajući istovremeno koncentraciju jednog od supstrata konstantnom i rezultate predstavljali Mihaelis-Mentenovom jednačinom sa prividnim parametrima (v'_{max} i K'_m) (jednačina 2.4).

$$v_0 = \frac{v'_{max}[S]}{K'_m + [S]} \quad (2.4)$$

Analizom grafika (slika 2.18) ustanovljeno je da postoji hiperbolička zavisnost v'_{max} od koncentracije supstrata koja se održava konstantnom, što je u skladu i sa sekvencijalnim i sa Ping Pong bi bi mehanizmom. Međutim, Km' opada sa povećanjem koncentracije i jednog i drugog supstrata i prisutna je hiperbolička zavisnost v'_{max}/Km' od koncentracije oba supstrata pa se eksperimentalni podaci podudaraju jedino sa pravilnim sekvencionalnim mehanizmom. Na taj način ustanovljeno je da se reakcija odigrava po pravilnom sekvencijalnom mehanizmu bez inhibicije supstratom [169].



Slika 2.18 Zavisnost prividnih Mihaelis-Mentenovih parametara (v'_{max} i Km') i njihovog odnosa (v'_{max}/Km') od koncentracije a) prunina i b) vinil-laurata u reakciji sinteze prunin-laurata [169].

Kada je jedan od supstrata prisutan u velikom višku, promene u njegovoj koncentraciji su zanemarljive u odnosu na drugi supstrat, i može se smatrati da je koncentracija tog supstrata konstantna. Tada bisupstratne reakcije mogu pratiti mehanizam monosupstratnih reakcija, pa se jednačina za brzinu ovih reakcija onda svodi na klasičnu Mihaelis-Mentenovu jednačinu (jednačina 2.5):

$$v_0 = \left(\frac{dP}{dt}\right)_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.5)$$

gde v_{max} predstavlja maksimalnu brzinu odigravanja enzimske reakcije, a K_m Mihaelisovu konstantu koja opisuje afinitet enzima prema supstratu, a definisane su kao:

$$v_{max} = k_2[E]_0 \quad (2.6)$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (2.7)$$

Klasičan primer ovih reakcija su reakcije koje se izvode u sistemima bez rastvarača, gde jedan od supstrata ima ulogu i rastvarača. Pa tako, u ovoj doktorskoj disertaciji, dva stupnja reakcija acilovanja floridzina u sistemu bez rastvarača u kojem triacetin ima ulogu i acil-donora i rastvarača biće modelovana klasičnom Mihaelis-Mentenovom kinetikom.

2.6. Transdermalni prenos bioaktivnih komponenti

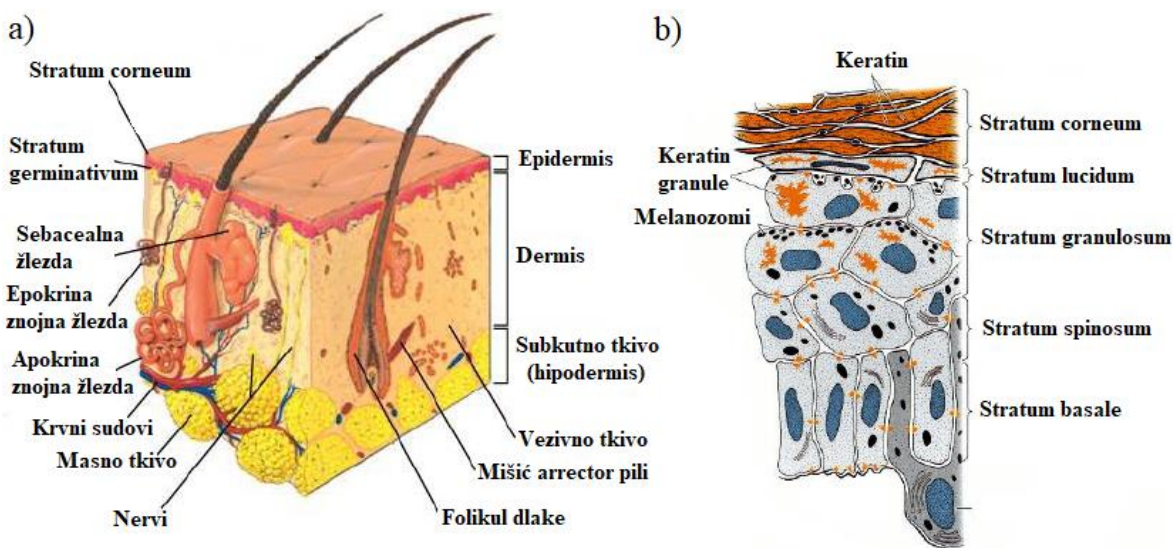
Kontrolisano otpuštanje bioaktivnih komponenti kroz kožu nalazi sve veću primenu u farmaceutskoj industriji, s obzirom da se na ovaj način značajno smanjuju štetni efekti koji nastaju oralnom primenom aktivnih jedinjenja i pojednostavljuje se njihova primena [173]. Pored toga, koža predstavlja najveću barijeru difuziji komponente, pa se na taj način može kontrolisati količina supstance koja dospeva u krvotok [173]. S obzirom da je ova metoda neinvazivna i jednostavna, a mogu se eliminisati potencijalne nus-pojave, danas sve više raste interesovanje za razvojem odgovarajućih preparata za lokalnu primenu koji će omogućiti zadovoljavajući prenos aktivnih komponenti kroz kožu (transdermalno) do ciljanog mesta [174].

2.6.1. Koža kao biološka barijera

Koža predstavlja najveći organ na površini tela i deluje kao zaštitna barijera između organizma i spoljašnjeg okruženja štiteći ga od propuštanja ultravioletnog zračenja, hemikalija, alergena, mikroorganizama i gubitka vlage. Pored toga, veoma je značajna njena uloga u regulaciji telesne temperature [175]. Koža se sastoji iz tri osnovna sloja (slika 2.19a):

- a) *hipodermis* (potkožno tkivo) – sloj u kojem su smeštene lojne i znojne žlezde. Sastoji se pretežno od masnog tkiva, tako da ima ulogu izolatora organizma i štiti kožu od mehaničkih oštećenja. Pored toga, u ovom sloju su skladištena lako dostupna visokoenergetska jedinjenja [174].
- b) *dermis* – ovaj sloj kože je najdeblji i sastoji se uglavnom od vezivnog tkiva. Mehanički je stabilizovan prepletenom mrežom vlaknastih proteina (kolagen, elastin i retikulin). U ovom sloju takođe se nalaze krvni i limfni sudovi, nervni završeci, lojne i znojne žlezde, kao i folikuli kose. Štaviše, ovaj deo kože je odgovoran za biohemijsku i biološku razgradnju jedinjenja koja se transportuju kroz kožu [174].
- c) *epidermis* – debljina ovog sloja iznosi 20-200 μm i u stalnom je kontaktu sa okolinom. Struktura ovog sloja je kompleksna i sastoji se od pet histološki različitih

slojeva ćelija (*stratum corneum, lucidum, granulosum, spinosum i basale*) (slika 2.19b)



Slika 2.19 Šematski prikaz građe a) ljudske kože i b) građe epidermisa.

Veoma tanak površinski sloj epidermisa (10-15 μm) – *stratum corneum*, predstavlja prvu barijeru i najveći otpor prenosu aktivne komponente kroz kožu. Sastoji se od nekoliko slojeva gotovo nepropustljivih, gusto pakovanih rožnatih ćelija koje se delimično preklapaju, tzv. korneocita ispunjenih keratinom [175]. Međućelijski prostor sadrži multilamelarne lipidne slojeve sa promenljivom strukturom koji su vezani za membranu korneocita kovalentnim vezama. U *stratum corneum*-u se nalaze razni nepolarni lipidi, više od 50 % ukupne mase čine ceramidi, zatim slobodne masne kiseline, trigliceridi, holesterol i estri holesterola [174]. S obzirom na veoma složenu strukturu kože, veoma je značajno odrediti na koji način i u kojoj meri se različite aktivne komponente mogu preneti kroz kožu.

2.6.1.1. Putevi prenosa aktivne komponente kroz kožu

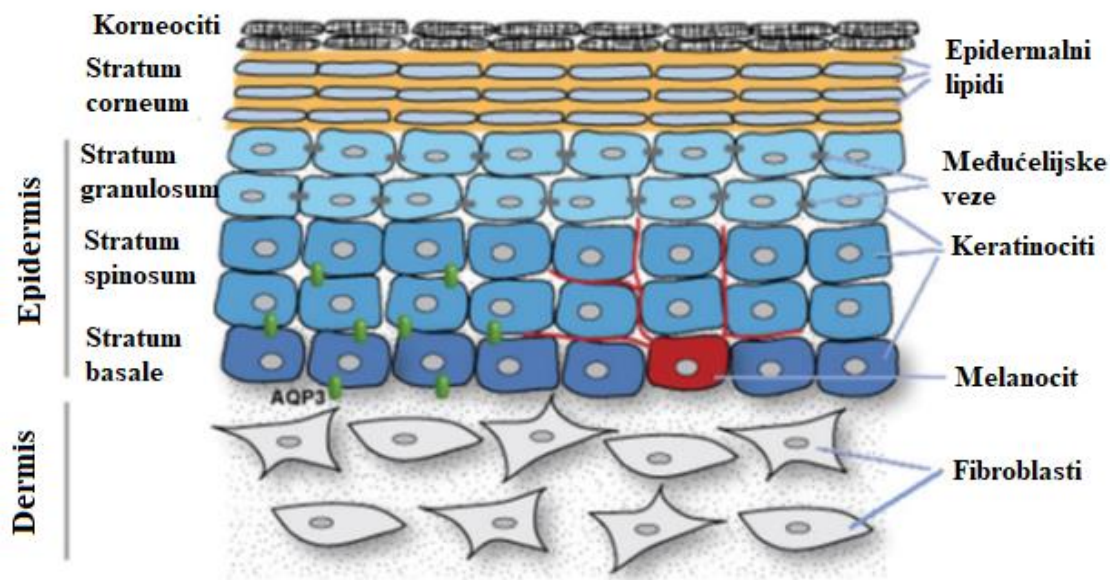
Koža je organ koji je direktno dostupan za topikalnu primenu aktivnih komponenti. Međutim, to ne podrazumeva da se komponente koje su inkorporirane u različite formulacije (kreme, emulzije itd.) prenose u optimalnoj koncentraciji do prave ciljane strukture u koži. Način transdermalnog prenosa bioaktivne supstance, tj. difuzija

komponente kroz *stratum corneum* još uvek nije potpuno razjašnjen, mada je danas usvojen model po kome se difuzija aktivne komponente odvija preko tri različite putanje (slika 2.20):

- a) kroz kanale koje čine folikule dlake
- b) kroz kanale koje čine znojne žlezde
- c) kroz sloj *stratum corneum* (transepidermalni prenos) [176].

S obzirom da kanali koje čine folikule dlaka i znojnih žlezda predstavljaju samo 0,1 % ukupne površine kože, može se smatrati da je prenos aktivnih komponenti ovim načinom veoma mali, tako da se uglavnom sav prenos vrši direktno kroz epidermis [174]. Imajući u vidu strukturu *stratum corneum*, aktivne komponente mogu proći kroz ovaj sloj na dva načina:

- a) intercelularno – prolazak između ćelija korneocita i
- b) transcelularno – prolazak kroz korneocite i epidermalne lipide (slika 2.20).



Slika 2.20 Prikaz osnovnih načina prolaska kroz *stratum corneum* [173].

2.6.1.2. Uticaj fizičko-hemijskih svojstava bioaktivne komponente na put apsorpcije

Jasno je da od prirode same aktivne supstance zavisi kojim od tri ponuđena puta će komponenta proći kroz kožu. Međutim, treba napomenuti da se i pored različitih fizičko-hemijskih svojstava supstanci, očekuje da aktivne komponente bar u nekoj meri prolaze kroz kožu na sva tri moguća načina [177]. Tri glavne karakteristike aktivne supstance koje utiču na put prenosa su:

- **koeficijent raspodele ($\log P_{\text{oktanol-voda}}$)** - glavni faktor koji određuje kojim putem će se odvijati prenos komponente kroz kožu je vrednost logaritma koeficijenta raspodele supstance u dvofaznom sistemu oktanol-voda ($\log P$). Generalno pravilo je da jedinjenja koja pokazuju određenu rastvorljivost i u vodenoj i u uljanoj fazi, tj. čiji je $\log P$ u opsegu 1 do 3, najčešće prolaze kroz membranu intercelularnim putem. Za mnogo hidrofobnije molekule ($\log P > 3$) intercelularni put je i jedini mogući za prolazak kroz *stratum corneum*. Sa druge strane, za hidrofilne molekule ($\log P < 1$) transcelularni put postaje jako bitan, iako i na tom putu treba proći kroz lipidne dvosloje između keratinocita. U slučaju jako hidrofilnih (i naelektrisanih) molekula sporedni putevi kroz kanale folikula dlaka znojnih žlezda postaju dominantni kao mogući putevi transdermalnog prenosa [177].
- **oblik i veličina molekula** - u mnogim studijama pokazano je da mali molekuli prolaze kroz ljudsku kožu brže nego veliki molekuli [177, 178]. Međutim, opseg molekulskih masa većine konvencionalnih terapijskih komponenti (mali organski molekuli) koji se biraju kao kandidati za transdermalni prenos je veoma uzak (100-500 Da). U tako uskom opsegu, uticaj molekulske mase na fluks komponente je praktično zanemarljiv, ali ako se kao aktivna komponenta izabere molekul mnogo veće molekulske mase, uticaj tog faktora na transdermalni fluks će biti i više nego očigledan [177].
- **rastvorljivost** - s obzirom na već opisane činjenice o intercelularnom transdermalnom prenosu, jasno je da lipofilni molekuli imaju tendenciju da prolaze kroz ljudsku kožu brže nego hidrofilni molekuli. Pa tako, rastvorljivost u

intercelularnom lipidnom sloju (obično opisana preko log P) može biti povezana sa koeficijentom permeabilnosti za seriju sličnih jedinjenja. Međutim, iako je lipofilnost poželjna karakteristika komponenti za transdermalni prenos, takođe je neophodno da molekuli poseduju i određeni stepen rastvorljivosti u vodenoj fazi s obzirom da se kao nosači komponente za topikalnu primenu obično koriste hidrofilne formulacije. Iako lipofilne komponente mogu obezbediti relativno visoki koeficijent permeabilnosti, njihova lipofilnost će smanjiti rastvorljivost u vodenoj fazi, što će imati velikog uticaja na fluks komponente kroz kožu [177].

Danas je uglavnom prihvaćeno da je za većinu aktivnih komponenti primaran intercelularni prolaz, s obzirom da se ovaj put sastoji od različitih hidrofilnih i lipofilnih regija. Na taj način omogućeno je da hidrofilne supstance prolaze kroz hidrofilne regije, a one hidrofobnije komponente prolaze nađu kroz lipofilne regije [146].

2.6.2. Kozmetičke formulacije kao sistemi za kontrolisano otpuštanje

Generalno, bioaktivne komponente se vrlo retko primenjuju na koži kao čiste hemijske supstance. Umesto toga, obično se inkorporiraju u složenije sisteme, kozmetičke formulacije. Prilikom transdermalne difuzije uloga nosača u koji je inkorporirana aktivna supstanca je maksimiziranje protoka kroz kožu. Po prirodi različiti nosači se razlikuju u fizičko-hemijskim karakteristikama, a najčešće forme za primenu aktivnih komponenti preko kože su: masti, emulzije i gelovi. U daljem tekstu biće opisane različite vrste emulzija kao sistemi za transdermalni prenos različitih estara flavonoida. Pored toga, biće navedene i teorijske osnove lipozoma, kao sistema za kontrolisano otpuštanje bioaktivnih komponenti koji je u ovoj disertaciji primenjen za otpuštanje acetyl-derivata florigidina.

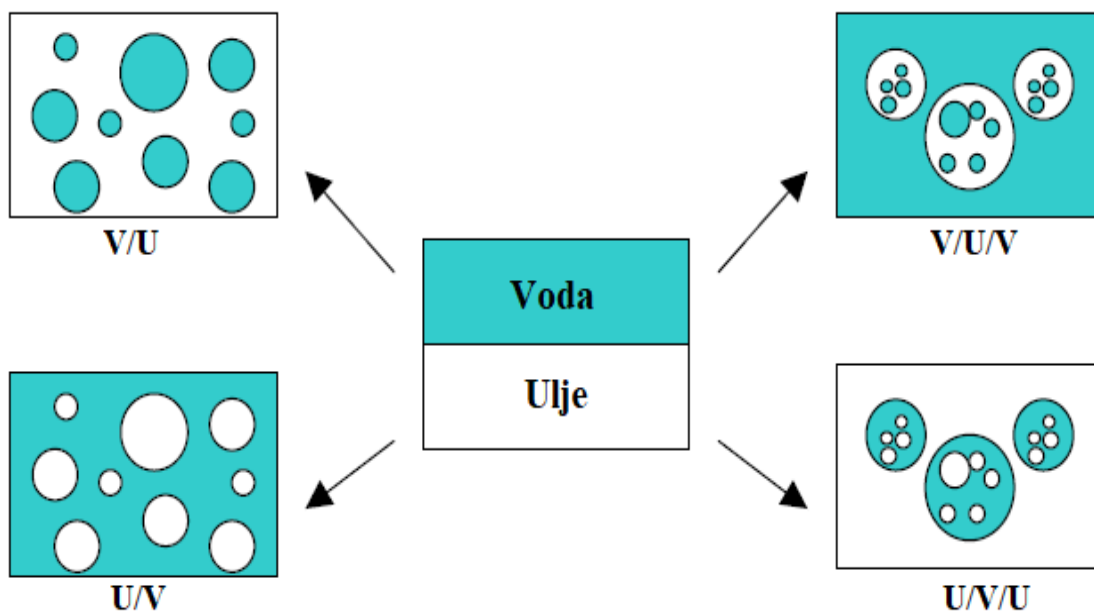
2.6.2.1. Emulzije

Emulzije su sistemi koji se sastoje od dve ili više tečnih faza koje se ne mešaju, hidrofilne i lipofilne faze, tj. ulja. Kapi jedne tečnosti (unutrašnja, dispergovana faza) su dispergovane u tečnom medijumu (spoljašnja, kontinualna faza ili disperziono sredstvo) [179]. S obzirom da su emulzije termodinamički nestabilni sistemi, definitivno je utvrđeno da je za formiranje stabilne emulzije, pored pomenute dve faze (hidrofilne i hidrofobne), neophodna

i treća faza, odnosno emulgator [180]. Emulgatori predstavljaju površinski aktivne materije koje imaju dvostruku ulogu: da smanje međupovršinski napon između dve faze i da stabilizuju dispergovanu fazu formiranjem tankog filma oko kapljica dispergovane faze [180]. S obzirom da i dispergovana i tečna faza mogu biti različite konzistencije, od tečnosti do polučvrstih sistema, tako i emulzije variraju od losiona (niska viskoznost) do krema (visoka viskoznost). U zavisnosti od postupka kojim se priprema emulzija, veličina čestica dispergovane faze se obično kreće od 0,1 do 100 μm [180, 181].

U zavisnosti od toga šta je dispergovana, a šta kontinualna faza, klasične emulzije se mogu podeliti na: emulzije tipa ulje u vodi (U/V) i emulzije tipa voda u ulju (V/U). Faktor koji kontroliše tip emulzije, bilo da je voda ili ulje spoljašnja faza, je priroda emulgatora. Ako je površinski napon između vodene faze i emulgatora niži od površinskog napona između uljane faze i emulgatora, onda će voda biti kontinualna, a ulje dispergovana faza. S obzirom da emulgator najčešće predstavlja koloidnu česticu, može se reći da će hidrofilni koloidni emulgator emulgovati ulje u vodi, dok će hidrofobni emulgovati vodu u ulju [179].

Pored ova dva osnovna tipa emulzija, u poslednje vreme sve više se primenjuju višestruke emulzije koje se sastoje od kapljica jedne tečnosti dispergovane u većim kapljicama druge tečnosti koje su zatim dispergovane u kontinualnoj fazi. Takvi sistemi mogu biti voda u ulju u vodi (V/U/V), gde su unutrašnje i spoljne faze hidrofilne, ili ulje u vodi u ulju (U/V/U), gde je obrnuta situacija [175]. Na slici 2.21 su šematski predstavljeni osnovni tipovi emulzija.



Slika 2.21 Osnovni tipovi emulzija [175].

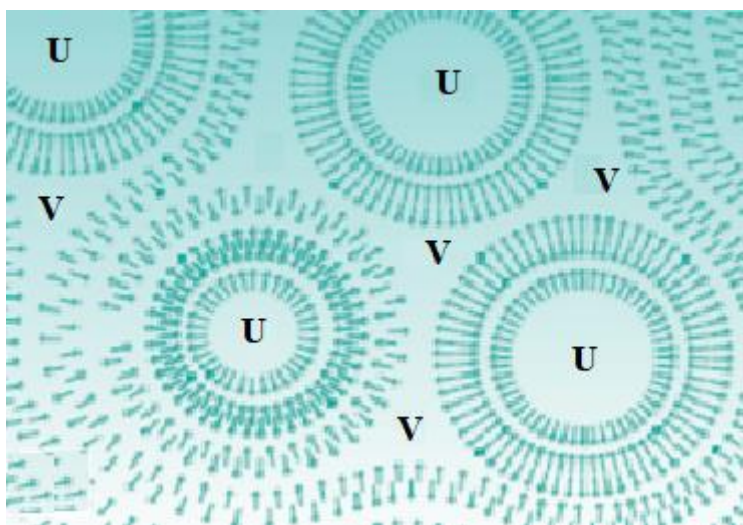
2.6.2.1.1. Emulzije tipa ulje u vodi (U/V)

Kod emulzija tipa ulje u vodi (U/V) kapljice ulja su dispergovane u vodenoj kontinualnoj fazi. U praksi uljana faza ima udeo od 10 do 40 %. Ove vrste emulzija mogu biti formulisane i proizvedene od tečne do kremaste konzistencije. Zbog isparavanja vode, ove emulzije daju efekat hlađenja tokom aplikacije [180]. Stabilnije su od V/U emulzija, kako na višim tako i na nižim temperaturama. Široko se primenjuju u kozmetičkim i farmaceutskim preparatima, s obzirom da se lako razmazuju po koži, brzo se apsorbuju i manje su lepljive [180]. Posebno su pogodne za tip normalne i masne kože. U/V emulzije pokazuju srednje performanse što se tiče nege kože. Zbog mogućeg isparavanja vode, moraju se čuvati u odgovarajućim pakovanjima.

2.6.2.1.2. Emulzije sa tečnim kristalima

Posebna vrsta U/V emulzija koje se veoma razlikuju od tradicionalnih emulzija su emulzije sa tečnim kristalima. Tečni kristali su visoko anizotropne tečnosti koje nastaju kao rezultat orijentacionog uređivanja među molekulima konstituentima. Pokazuju osobine i čvrstih supstranci, kao što su na primer optička anizotropija, a sa druge strane imaju i karakteristike

tečnosti s obzirom da su kristali delimično rotaciono i translatorno slobodni [182]. Karakteristične strukture za ove emulzije su oleozomi (slika 2.22) koji se sastoje od dispergovane kapljice ulja okružene višestrukim slojevima koji se sastoje od vode, emolijensa i emulgatora. Emulzije sa tečnim kristalima imaju niz prednosti u odnosu na tradicionalne emulzije i to u pogledu stabilnosti (prisustvo uređenih trodimenzionih struktura), kontrolisanog otpuštanja i hidrantnosti [176, 183]. Ovaj tip emulzija se odlikuju povećanom vodootpornošću, pa tako nakon aplikacije na kožu, ove emulzije mogu poslužiti za produženu hidrataciju imajući u vidu činjenicu da je voda zarobljena u slojevima tečnih kristala. Značajna primena ovakvih sistema može takođe biti i u kontrolisanom otpuštanju aktivnih supstanci rastvorljivih u vodi. Brzina oslobađanja aktivne supstance će biti smanjena u znatnoj meri u odnosu na obične emulzije tipa ulje u vodi koje ne sadrže tečne kristale.



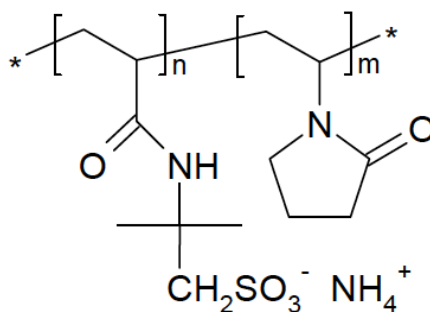
Slika 2.22 Struktura oleozoma.

2.6.2.1.3. Emulzije na bazi akril-auratnih kopolimera

Akrilni polimeri su našli primenu u pripremi emulzija pri čemu deluju kao stabilizatori i modifikatori viskoziteta samih emulzija. Pored toga što učestvuju u stabilizaciji emulzija, akril-auratni kopolimeri se mogu koristiti i kao primarni emulgatori, pri čemu se izbegava upotreba klasičnih emulgatora koji predstavljaju površinski aktivne supstance [184]. Za razliku od klasičnih emulgatora sa kojima se proces emulgovanja izvodi na povišenim

temperaturama, primena ovih polimera omogućava pripremu emulzija na hladno. Kao glavni predstavnici iz grupe akril-tauratnih polimera koji se mogu koristiti kao emulgatori izdvajaju se akrilo-di-metiltaurat vinil-pirolidon i amonijum akrilo-di-metiltaurat behenet-25 metakrilat kopolimer. Najčešće se koriste za pripremu emulzija tipa ulje u vodi.

Amonijum akrilo-di-metiltaurat vinil-pirolidon kopolimer (Aristoflex[®] AVC) je novi sintetički polimer koji se koristi kao gelirajuće sredstvo za vodene sisteme i kao stabilizator za emulzije tipa ulje u vodi. Aristoflex[®] AVC je komercijalni, neutralizovani polimer sulfonske kiseline (slika 2.23). Formulacije sa ovim polimerom imaju dobre senzorne karakteristike, prijatne su za kožu i nisu lepljive. Aristoflex[®] AVC je kompatibilan sa organskim rastvaračima (etanol, aceton), stabilan pod uticajem dejstva UV zračenja i sila smicanja i može se koristiti u širokom opsegu pH vrednosti. U formulacijama se koristi u količinama od 0,5 % do 1,2 %, u zavisnosti da li mu je svrha stabilizacija ili emulgovanje [184].



Slika 2.23 Strukturna formula amonijum akrilo-di-metiltauratvinil-pirolidon kopolimera.

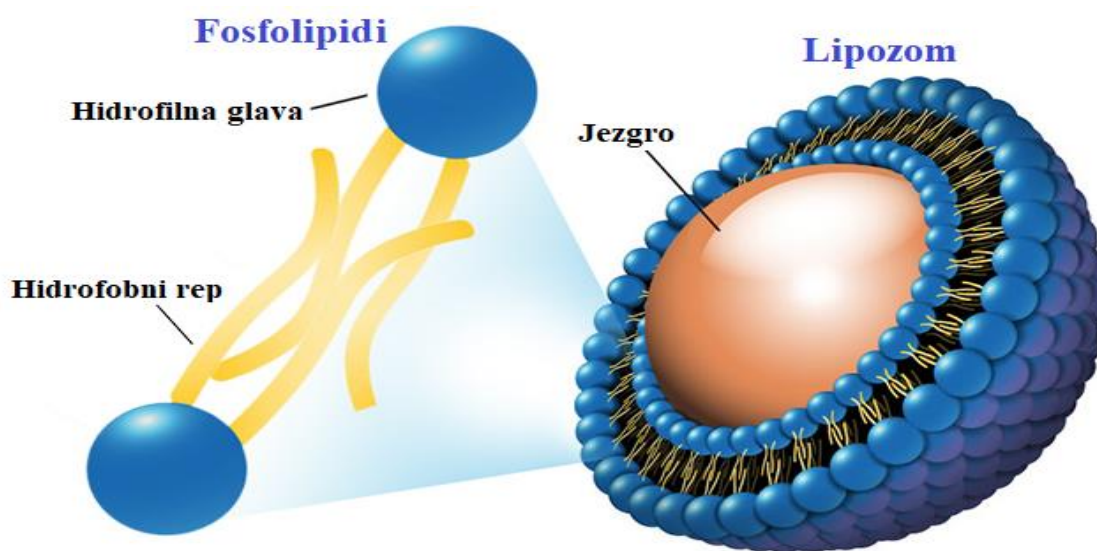
2.6.2.1.4. Emulzije tipa voda u ulju (V/U)

Sistem u kojem su kapljice vode raspršene u uljanoj kontinualnoj fazi nazivaju se emulzije tipa voda u ulju (V/U). Veličina čestica dispergovane faze se kreće u opsegu od 0,5 μm do 2 μm , dok zapreminski udeo uljane faze može ići od 18 do 40 %. Emulzije V/U se apsorbuju sporije od U/V emulzija i ostavljaju utisak lepljivosti nakon nanošenja. Takođe, pokazuju okluzivni efekat hidratacijom *stratum corneum* sprečavajući isparavanje sekreta epokrinih znojnih žlezda. Ove vrste emulzija su korisne za primenu u čišćenju kože od

nečistoća rastvorljivih u uljima, mada njena masna tekstura nije uvek kozmetički prihvatljiva. Ove emulzije su masne i ne ispiraju se vodom, pokazuju visoke performanse sto se tiče nege kože, i pogodne su za suhu kožu. Priprema je dosta komplikovanija nego kod U/V emulzija, obično je potrebno uložiti više energije tokom procesa mešanja [180].

2.6.2.2. Lipozomi kao sistemi za kontrolisano otpuštanje

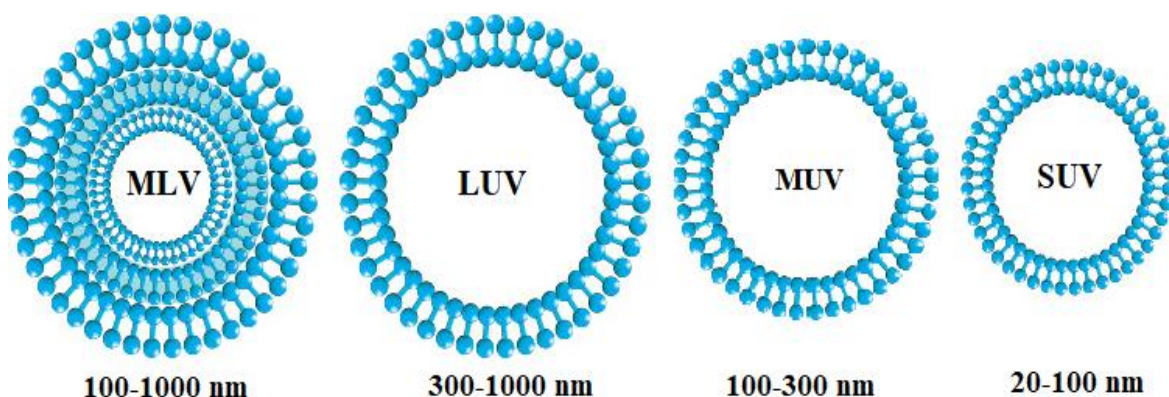
Lipozomi su koloidne mikroskopske vezikule koje se sastoje od jednog ili više lipidnih dvosloja i vodenog jezgra koje ti slojevi okružuju. Lipozome formiraju molekuli fosfolipida koji predstavljaju amfifilne molekule sastavljene od polarne grupe tj. glave molekula i nepolarnog para masnih kiselina, repa molekula, koji su međusobno povezani preko ostatka molekula glicerola [185]. Upravo zbog takve strukture, u zavisnosti od sredine u kojoj se nalaze, molekuli fosfolipida imaju mogućnost da se međusobno grupišu na različite načine, pa tako u prisustvu polarnih rastvarača formiraju karakterističan dvosloj u obliku ploče ili u obliku micela, koja se pod uticajem dodatne mehaničke energije u vidi mešanja ili pritiska može prevesti u dvoslojne fosfolipidne sferične čestice – lipozome (slika 2.24). Vrlo često se kao dodatna komponenta u sastavu membrane lipozoma uključuje holesterol, radi poboljšanja mehaničkih osobina membrane, kao što su povećanje uređenosti i smanjenje propustljivosti membrane [186].



Slika 2.24 Struktura molekula fosfolipida i lipozoma [185].

Veličina lipozoma je direktno povezana sa načinom pripreme ovih vezikula i kreće se od 20 nm do nekoliko mikrometara. Prema veličini lipozomi se dele na:

- a) Multilamelarne vezikule (MLV, *eng. multilamellar vesicles*) – sastoje se od velikog broja bliskih, koncentričnih lipidnih dvosloja, prečnik čestice $> 0,5 \mu\text{m}$.
- b) Unilamelarne vezikule (UV, *eng. unilamellar vesicles*) - čini ih jedan lipidni dvosloj koji okružuje vodeno jezgro. Prema veličini ove vezikule se dalje dele na:
 - Male unilamelarne vezikule (SUV, *eng. small unilamellar vesicles*) - 20–100 nm
 - Srednje unilamelarne vezikule (MUV, *eng. medium unilamellar vesicles*) - 100-300 nm
 - Velike unilamelarne vezikule (LUV, *eng. large unilamellar vesicles*) - >300 nm (slika 2.25) [187].



Slika 2.25 Klasifikacija lipozoma prema veličini.

Veliki broj sistema za inkorporiranje bioaktivnih supstanci i njihovo kontrolisano otpuštanje bazirano je na mikročesticama, ali kao najinteresantniji i danas se izdvajaju lipozomi. Prednosti ovih sistema u odnosu na ostale je da mogu biti izgrađeni od prirodnih konstituenata pošto formirani dvosloj ima sličnu strukturu kao lipidni dvosloj prirodne ćelijske membrane. S obzirom na njihovu biodegradibilnost, a pored toga i činjenicu da mogu da oponašaju prirodne ćelijske membrane, ove vezikule predstavljaju veoma bezbedna i efikasna sredstva za primenu u medicini, kozmetici itd. [187]. Razlog velike popularnosti lipozoma je svakako i činjenica da se zahvaljujući njihovoj specifičnoj

strukturi u njih može inkorporirati veliki broj aktivnih supstanci različitih fizičko-hemijskih svojstava, kako hidrofилne, tako i lipofilne prirode [173, 187]. S obzirom na navedene prednosti i činjenicu da je kao jedna od metoda za poboljšanje dermalnog i transdermalnog prenosa aktivne supstance predložena primena aktivnih supstanci u sistemima na bazi vezikula, lipozomi predstavljaju odličan izbor jer se mogu koristiti kao nosači aktivnih komponenti ili kao pospešivači brzine prenosa aktivne supstance kroz kožu [187]. Kada je reč o prolaska lipozoma kroz kožu, opisana su tri moguća načina:

- difuzijom kroz *stratum corneum*
- preko transepidermalnog osmotskog gradijenta (lipozomi se uvlače u epidermis)
- preko pilosebacealnih jedinica [185].

Kao i različite vrste emulzija, tako i lipozomi mogu biti nosači različitih bioaktivnih supstanci. U cilju karakterisanja različitih formulacija kao nosača za transdermalni prenos bioaktivnih komponenti neophodno je odrediti mehanizam i brzinu prenosa mase aktivne komponente iz pomenutih formulacija kroz membranu koja simulira transdermalni prenos.

2.6.3. Prenos mase

Da bi aktivna komponenta koja je sadržana u kozmetičkim formulacijama ispoljila svoje pozitivno dejstvo na mestu delovanja, najpre mora doći do njenog prenosa u organizam. Prilikom izvođenja eksperimenata, aktivna komponenta se u sistemima prvo prenosi kroz membranu vezikule (ukoliko je inkorporirana), zatim kroz nosač/formulaciju (gel, emulziju i sl.) i na kraju kroz membranu uređaja koji se koristi za praćenje prenosa komponente [185]. Otpuštanje aktivne komponente iz različitih sistema najčešće je kontrolisano molekulskom difuzijom.

2.6.3.1. Molekulska difuzija

Molekulska difuzija predstavlja spontano kretanje molekula u nepokretnim sistemima ili fluidima koji struje laminarno, izazvano koncentracionim gradijentom. Molekuli se uvek kreću iz oblasti veće ka oblasti manje koncentracije sve dok se ne postigne ravnotežno stanje uniformne koncentracije po celom posmatranom prostoru. Difuzija se opisuje prvim

Fikovim zakonom po kome je brzina prenosa aktivne komponente A po jedinici površine (fluks komponente, J_A) proporcionalna koncentracionom gradijentu komponente (jednačina 2.8):

$$J_A = -D \frac{\partial C_A}{\partial X} \quad (2.8)$$

gde je C_A - koncentracija komponente A koja difunduje, a z - rastojanje u pravcu prenosa. Veličina D se naziva koeficijent difuzije i predstavlja karakteristiku sistema u kome se odvija proces difuzije. Znak minus u prvom Fikovom zakonu pokazuje da je smer ostvarenog fluksa nasuprot gradijentu koncentracije. Osnovno ograničenje primene prvog Fikovog zakona zapravo predstavlja činjenica da je koeficijent difuzije konstantna veličina, što važi samo u veoma razblaženim sistemima. Za koncentrovane sisteme, koeficijent difuzije može značajno da zavisi od koncentracije, pa je neophodno definisati odgovarajući zakon koji opisuje difuziju u takvim sistemima [173].

Generalno, svi prenos masi se mogu opisati diferencijalnim bilansom:

$$\frac{DC_A}{Dt} = D\nabla^2 C_A + r \quad (2.9)$$

ili ukoliko nema strujanja bilansom:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D\nabla^2 C_A + r \quad (2.10)$$

gde je r brzina nastajanja komponente koja se prenosi, a t vreme. Ukoliko se bilans (jednačina 2.10) primeni na nestacionarni, jednodimenzioni prenos u nepokretnom sistemu u kojem ne dolazi do generisanja supstance, dobija se sledeći oblik:

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2} \quad (2.11)$$

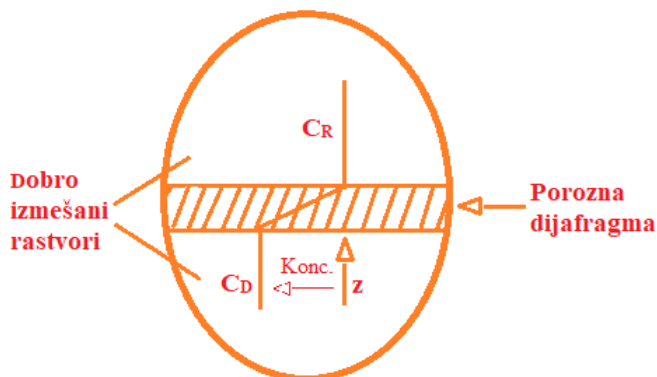
Jednačina 2.11 predstavlja drugi Fikov zakon prema kome je promena koncentracije komponente A u toku vremena proporcionalna gradijentu koncentracije, a koeficijent proporcionalnosti predstavlja koeficijent difuzije D .

2.6.3.1.1. Stacionarna difuzija

Kod stacionarne difuzije koncentracija komponente koja se prenosi ne menja se u toku vremena što znači da je tokom vremena pogonska sila konstantna.

Jednodimenzionalna difuzija kroz dijafragmu

Jedan od primera jednodimenzione stacionarne difuzije predstavlja difuzija komponente kroz dijafragmu. Sistem u kojem se prati difuzija komponente predstavlja ćeliju koja se sastoji iz dva dela u kojima se nalaze rastvori koji se mešaju, a međusobno su razdvojeni poroznom dijafragmom (slika 2.26). Ove ćelije se najčešće koriste za određivanje koeficijenta difuzije. Donji deo ćelije je ispunjen rastvorom poznate koncentracije, dok se u gornjem nalazi rastvarač komponente. U određenim vremenskim intervalima uzimaju se uzorci iz oba dela ćelije i meri se koncentracija komponente u rastvorima.



Slika 2.26 Šematski prikaz ćelije sa dijafragmom

S obzirom da je zapremina dijafragme mnogo manja od zapremine rastvora smatra se da je profil koncentracija unutar dijafragme linearan, tj. da je difuzija stacionarna. Iako je rešenje drugog Fikovog zakona za ovaj sistem veoma komplikovano, uz pretpostavku da je ova difuzija stacionarna i da fluks kroz dijafragmu veoma brzo dostiže vrednost fluksa pri stacionarnim uslovima, bez obzira što se koncentracije u oba segmenta ćelije menjaju sa vremenom, dobija se znatno jednostavnije rešenje. S obzirom na pseudo-stacionarno stanje drugi Fikov zakon se može napisati u obliku:

$$D \frac{\partial^2 C_A}{\partial z^2} = 0 \quad (2.12)$$

pri sledećim graničnim uslovima:

$$z = 0 \quad C_{A,d1} = K C_{A,D}$$

$$z = \delta \quad C_{A,d2} = K C_{A,R}$$

gde su $C_{A,d1}$ i $C_{A,d2}$ koncentracije u dijafragmi, a K koeficijent raspodele koji predstavlja ravnotežni odnos koncentracije komponente A u dijafragmi i koncentracije komponente A u rastvoru uz dijafragmu.

Profil koncentracije u ovom slučaju je:

$$C = K C_{A,D} + K(C_{A,R} - C_{A,D}) \frac{z}{\delta} \quad (2.13)$$

dok je fluks komponente kroz membranu jednak:

$$J_A = \frac{DK}{\delta} (C_{A,D} - C_{A,R}) \quad (2.14)$$

gde član (DK/δ) predstavlja koeficijent permeabilnosti.

Na osnovu bilansa mase može se napisati da je:

$$V_D \frac{dC_{A,D}}{dt} = -A \cdot J_A \quad (2.15)$$

$$V_R \frac{dC_{A,R}}{dt} = A \cdot J_A \quad (2.16)$$

gde A predstavlja površinu dijafragme. Na osnovu jednačina 2.14, 2.15 i 2.16 dobija se izraz:

$$\frac{d}{dt} (C_D - C_R) = D\beta (C_D - C_R) \quad (2.17)$$

U ovoj jednačini β predstavlja geometrijsku konstantu i karakteristika je određenog sistema (ćelije) koji se koristi:

$$\beta = \frac{AK}{\delta} \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_R} \right) \quad (2.18)$$

Početni uslov za ovaj sistem je:

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

Ako je gornji deo ispunjen čistim rastvaračem, onda je početna koncentracija u tom delu jednaka nuli ($C_{A,R}^0=0$). Integracijom jednačine 2.17 za navedeni početni uslov dobija se jednačina za određivanje koeficijenta difuzije:

$$\frac{C_{A,D} - C_{A,R}}{C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0} = e^{-\beta Dt} \quad (2.19)$$

odnosno:

$$D = \frac{1}{\beta t} \ln \left(\frac{C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0}{C_{A,D} - C_{A,R}} \right) \quad (2.20)$$

Dobijena jednačina ukazuje na to da se praćenjem koncentracije komponente A u različitim delovima ćelije u toku vremena može odrediti koeficijent difuzije pomenute supstance. U slučaju da geometrijski faktor ćelije nije poznat, on se može odrediti kalibracijom ćelije sa rastvorom koji ima poznat koeficijent difuzije.

Ova jednačina se najčešće koristi za određivanje koeficijenata difuzije komponente koje difunduju iz rastvora. U slučaju difuzije komponente iz polučvrstih formulacija, neophodno je primeniti neki drugi, odgovarajući model.

2.6.3.1.2. Nestacionarna difuzija

U realnom sistemu, većina procesa predstavlja nestacionarnu difuziju. Nestacionarna difuzija je definisana drugim Fikovim zakonom čijim se rešavanjem za određene početne i granične uslove mogu odrediti profili koncentracija i fluks za različite nestacionarne procese [173].

Nestacionarna difuzija kroz konačnu ravnu površinu

Da bi se došlo do jednačine za određivanje koeficijenta difuzije u ovom slučaju, drugi Fikov zakon (jednačina 2.11) se rešava za sledeće granične i početne uslove:

$$t = 0, \quad 0 \leq z \leq \infty, \quad C_A = C_{A0}$$

$$t > 0, \quad z = \frac{\delta}{2}, \quad C_A = C_{A1}$$

$$t > 0, \quad z = 0 \quad \frac{dC_A}{dz} = 0$$

gde je δ debljina površine kroz koju se odvija proces difuzije. Koristeći materijalni bilans, raspodela koncentracija u ovom slučaju data je jednačinom:

$$\frac{C_A - C_{A0}}{C_{A1} - C_{A0}} = 1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \exp\{-D(2n+1)^2\pi^2 t/4L^2\} \cos \frac{(2n+1)\pi z}{2L} \quad (2.21)$$

gde L predstavlja poludebljinu sloja ($\delta/2$) kroz koju komponenta A difunduje.

Ako se ukupna masa komponente A koja difunduje u ili iz ravne površine obeleži sa M_t , a sa M_∞ masa koja bi profundovala posle beskonačnog vremena, kada se dostigne ravnoteža u ovom sistemu, dobija se:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(\frac{8}{\pi^2}\right) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left[\frac{-\pi^2 Dt(2n+1)^2}{4L^2}\right] \quad (2.22)$$

Za kraće vreme difuzije ($M_t/M_\infty \leq 0,5$), jednačine 2.21 i 2.22 se svode na oblike:

$$\frac{C_A - C_{A0}}{C_{A1} - C_{A0}} = \sum_{n=0}^{\infty} (-1)^n \operatorname{erfc} \frac{(2n+1)L - z}{2\sqrt{Dt}} + \sum_{n=0}^{\infty} (-1)^n \operatorname{erfc} \frac{(2n+1)L + z}{2\sqrt{Dt}} \quad (2.23)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 2 \left(\frac{Dt}{L^2}\right)^{1/2} \left\{ \pi^{-1/2} + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \operatorname{ierfc} \frac{nL}{\sqrt{Dt}} \right\} \quad (2.24)$$

Gde $erfc$ i $iercf$ predstavljaju funkciju greške i integrisanu funkciju greške po x . Za kratka vremena jednačina može biti aproksimirana jednačinom:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 2 \left(\frac{Dt}{\pi L^2} \right)^{1/2} \quad (2.25)$$

ili jednostavnije:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2} \quad (2.26)$$

poznatijom kao Higučijevom jednačinom za određivanje koeficijenata difuzije [188]. Ova jednačina opisuje otpuštanje aktivne komponente iz nerastvornog inertnog matriksa kada je proces otpuštanja isključivo kontrolisan difuzijom.

Dakle, korišćenjem koeficijenta k iz jednačine 2.26 i jednačine 2.25 sledi da je efektivni koeficijent difuzije (D_{ef}) komponente:

$$D_{ef} = \frac{k^2 \pi L^2}{4} \quad (2.27)$$

Kasnije je Higučijeva jednačina modifikovana kako bi uzela u obziri različite geometrijske oblike kao i različitu strukturu matriksa, uključujući i porozne matrikse [189].

Otpuštanje komponente iz sistema koji bubre

Ukoliko je nosač aktivne komponente polimer može doći do apsorpcije vode i povećanja njegove zapremine, što za posledicu ima promenu strukture i poroznosti polimera, a samim tim i promenu brzine difuzije. U ovakvim slučajevima dolazi do relaksacije polimera pa je difuzija aktivne komponente iz polimera znatno brža. Transport komponente iz ovakvih sistema koji bubre vrlo često se ne slaže sa profilima koje opisuju Higučijeva ili Fikova jednačina. Veliki broj matematičkih modela je izveden da opiše profile otpuštanja iz matriksa, ali najjednostavniji i model koji se najviše koristi je onaj koji su izveli Korsmajer i Pepas [190]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2.28)$$

gde M_t/M_∞ predstavlja udeo prodifundovale komponente, t vreme otpuštanja, k kinetička konstanta karakteristična za sistem aktivna supstanca-polimer, a n je karakteristični eksponent koji opisuje mehanizam prenosa aktivne komponente. Jednačina 2.28 je validna za slučajeve kada je udeo prodifundovale komponente do 60 %. U slučaju kada je otpuštanje kontrolisano samo difuzijom (Fikova difuzija), vrednost eksponenta n je 0,5, dok u drugom graničnom slučaju, kada je prenos komponente uslovljen samo relaksacijom polimera eksponent n ima vrednost jednaku 1. Ovakav vid prenosa mase naziva se „Case II” mehanizam otpuštanja. Anomalnim prenosom komponente (ne-Fikovom difuzijom) se naziva transport komponente koji se ne može opisati ni Fikovom difuzijom ni „Case II“, tj. onaj prenos kod kojeg je vrednost eksponenta n u opsegu $0,5 < n < 1$ (tabela 2.7). U tabeli 2.7 pokazano je da za različite geometrije, eksponent n ima druge granične vrednosti, u zavisnosti od toga da li je prenos komponente uslovljen samo difuzijom ili relaksacijom polimera [188].

Tabela 2.7 Vrednosti eksponenta n i mehanizmi prenosa aktivne komponente iz polimernih nosača za različite geometrije.

Vrednost eksponenta n			Mehanizam otpuštanja
Film	Cilindar	Sfera	
0,5	0,45	0,43	Fikova difuzija
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Anomalni prenos
1	0,89	0,85	„Case-II“ prenos

Jednačina 2.28 je modifikovana od strane Forda i saradnika [191] za slučajeve kada proces otpuštanja kreće sa zakašnjenjem, tj. postoji neko vreme odlaganja transporta komponente (t_{lag}):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k(t - t_{lag})^n \quad (2.29)$$

Radi bližeg opisivanja anomalnog transporta komponente, Pepas i Salin [192] su razvili model koji opisuje združene efekte Fick-ove difuzije i „Case II“ prenosa. Njihova jednačina opisuje brzinu otpuštanja aktivne komponente kao proces kontrolisan molekulskom difuzijom i proces kontrolisan relaksacijom polimera i glasi:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^{0,5} + k_2 t \quad (2.30)$$

gde k_1 predstavlja konstantu Fikove difuzije, a k_2 konstantu koja opisuje mehanizam i uticaj relaksacije polimera.

U slučajevima kada je proces otpuštanja komponente počinje sa nekim periodom zakašnjenja, jednačina 2.30 može biti modifikovana:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 (t - t_{lag})^{0,5} + k_2 (t - t_{lag}) \quad (2.31)$$

Izvedene jednačine korišćene su za fitovanje ekperimentalno dobijenih podataka vezanih za prenos različitih vrsta estara flavonoida iz različitih kozmetičkih formulacija kako kroz celuloznoacetatnu membranu u preliminarnim eksperimentima, tako i kroz membranu koja simulira transdermalni prenos.

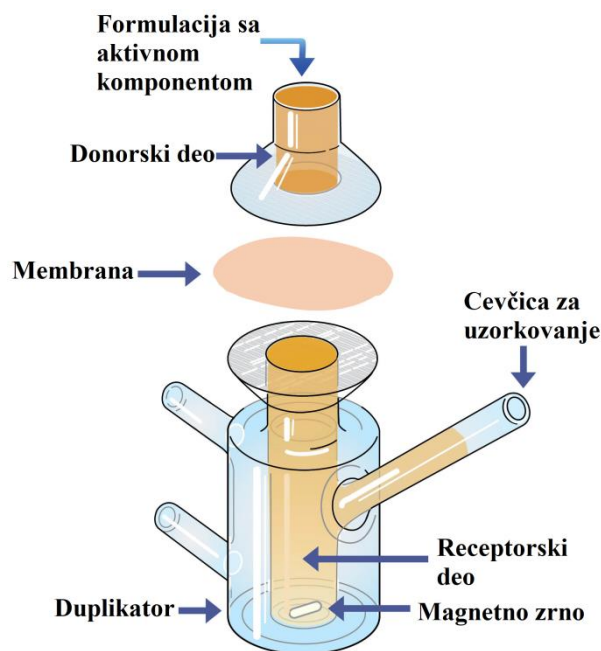
2.6.3.2. Sistemi za eksperimentalno određivanje koeficijenata difuzije

Eksperimentalno određivanje količine aktivne komponente koja se prenese u toku vremena iz određenog polučvrstog sistema, kao i potencijalni put prenosa su ključni za opisivanje postupka transdermalnog prenosa komponente. *In vitro* postupak određivanja koeficijenata difuzije korišćenjem određenih difuzionih ćelija se pokazao kao vrlo pouzdan. Difuzione ćelije koje se koriste u ovim eksperimentima mogu biti različite konstrukcije pa tako razlikujemo:

- statičke difuzione ćelije
- ćelije sa protokom receptorskog rastvora [186].

Zbog svoje jednostavnosti, ekonomičnosti i činjenice da eksperimentalni uslovi mogu biti lako kontrolisani u skladu sa postavljenim zahtevima, Francova ćelija (slika 2.27)

predstavlja najpoznatiju i najčešće korišćenu ćeliju za *in vitro* eksperimentalna određivanja koeficijenta difuzije bioaktivnih komponenti iz različitih sistema [193].



Slika 2.27 Šematski prikaz Francove ćelije.

Ova ćelija se sastoji iz donorskog i receptorskog dela i membrane koja ih razdvaja. Različite sintetičke membrane, kao i uzorci ljudske i životinjske kože se mogu koristiti za eksperimentalna određivanja [193]. Jako je bitno da odabrana membrana bude hemijski inertna prema receptorskom fluidu i aktivnoj komponenti. Takođe, veoma je važno da može lako da se kvasi (apsorbuje tečnost), jer samo kada je potpuno nakvašena moguće je uklanjanje vazduha iz njenih pora i precizno merenje difuzije. U donorski deo, iznad membrane, nanosi se određena formulacija koja sadrži aktivnu supstancu čiji se prenos prati. U donjem delu nalazi se receptorski rastvor koji se sve vreme meša pomoću magnetnog zrna. Receptorski rastvor u *in vitro* ispitivanjima treba da oponaša *in vivo* uslove i da obezbedi stalan maksimalni koncentracioni gradijent. Ovaj rastvor, fiziološke pH i konstantne temperature, u zavisnosti od karakteristika ispitivane komponente može biti: čista voda (za hidrofilne i blago lipofilne supstance), smeša vode i alkohola (za lipofilne i slaborastvorne supstance) ili pufer (za jonizovane supstance). Aktivna

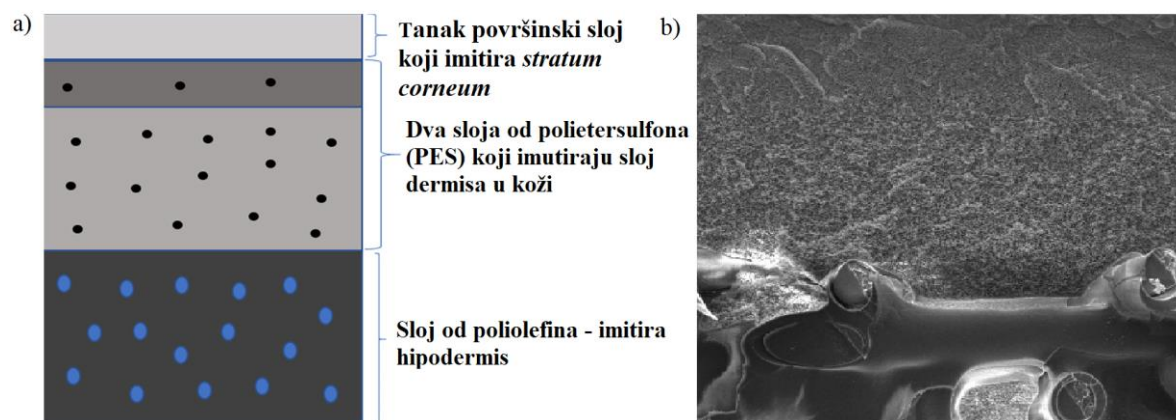
komponenta u rastvoru treba da bude stabilna tokom trajanja *in vitro* testa i naknadnih analiza [194]. Iz receptorskog dela se uzimaju uzorci za analizu u određenim vremenskim intervalima. Nakon svakog uzimanja uzorka u receptorski deo se ubacuje ista zapremina svežeg receptorskog rastvora kako bi se zapremina održavala konstantnom. Analiza uzoraka se najčešće vrši korišćenjem tačne hromatografije visokih performansi (HPLC, *eng. high performance liquid chromatography*), čime se određuje količina aktivne komponente koja prolazi kroz membranu u određenom vremenskom periodu. Na osnovu tih podataka i korišćenjem određenog matematičkog modela moguće je odrediti koeficijente difuzije posmatrane komponente [195].

2.6.3.3. Sintetičke membrane koje se koriste za ispitivanje transdermalnog prenosa

Prilikom razvoja i optimizacije efikasne formulacije za topikalnu/transdermalnu primenu aktivnih supstanci, jedno od najvažnijih pitanja je u kojoj meri aktivne komponente prodiru kroz kožu. Ljudska koža je porozna, vodootporna, čvrsta, ali ipak fleksibilna što je čini dobrom i složenom membranom za difuziju. U cilju određivanja transdermalnog prenosa različitih aktivnih komponenti do sada su se za eksperimentalna ispitivanja uglavnom koristili modeli od ljudske i životinjske kože, ali uz mnogobrojne prepreke za precizno i lako predviđanje difuzionih karakteristika. Uzorci ljudske kože pokazuju visok stepen varijabilnosti, njihova količina i dostupnost su ograničeni s obzirom da se mogu nabaviti isključivo kao ostaci nakon operacija plastične hirurgije, a pored toga osetljivi su i na uslove skladištenja [196]. Zbog lake dostupnosti, jednostavnog rukovanja i relativno niske cene, koža miševa je najčešće korišćen model prilikom ispitivanja transdermalnog prenosa različitih komponenti [197]. Glavni nedostaci upotrebe kože miševa kao model membrane su prisustvo velikog broja dlaka na površini kože koja se moraju ukloniti što može dovesti do oštećenja površinskog dela *stratum corneum*, a samim tim dati i lažne rezultate prilikom ispitivanja prenosa komponente. Štaviše, smatra se da je koža miševa poroznija od ljudske kože, pa samim tim postoje bitne razlike u prenosu komponente u odnosu na ljudsku kožu [197]. Imajući u vidu ove nedostatke, tragalo se za novim modelom membrane, koji će pokazati bolja slaganja sa ljudskom kožom. S tim u vezi, koža svinja je izabrana kao

odgovarajuća za eksperimente prenosa komponenti kroz kožu, s obzirom da je debljina, kao i folikularna struktura kože svinje veoma slična ljudskoj koži [197]. Međutim, glavni nedostatak upotrebe ovih bioloških membrana, uključujući i ljudsku kožu, je varijabilnost koja se često javlja, čak i kod uzoraka ljudske kože, s obzirom na to da svaka vrsta ima različitu brzinu difuzije koja zavisi od velikog broja faktora kao što su rasa, starost, zdravlje i nepravilnosti kože i broj folikula vlasi [196].

Imajući u vidu nedostatke bioloških membrana, razvijeni su novi, sintetički modeli membrana u cilju olakšanja *in vitro* ispitivanja transdermalne difuzije. Jedna od njih je i Strat-M[®] membrana koja predstavlja sintetički model za ispitivanje transdermalne difuzije za veliki broj lipofilnih i hidrofilnih komponenti bez uticaja stepena varijabilnosti. Predstavlja dobru i jeftinu alternativu prirodnoj koži jer je jednostavna za korišćenje, ne zahteva prethodni tretman, ima dug rok upotrebe bez posebnih uslova skladištenja i lako je dostupna. Kao i ljudska koža, Strat-M[®] membrana ima više slojeva sa različitim svojstvima, poroznošću i difuzivnošću što se može videti na slici 2.28.



Slika 2.28 Struktura Strat-M[®] membrane: a) šematski prikaz i b) mikroskopski presek [198]

Na njenoj površini se nalazi čvrst, tanak sloj koji imitira kompaktni, spoljašnji epitel (epidermis). Ispod njega nalaze se dva sloja od polietersulfona (PES) koji imaju slične karakteristike kao rastresito vezivno tkivo (dermis) i čija građa pruža veći otpor difuziji molekula. Oni naležu na poslednji sloj od poliolefina, sa većim porama i povećanom difuzivnošću, koji imitira masno vezivno tkivo (hipodermis) [198, 199]. Ovi višestruki,

polimerni slojevi su raspoređeni tako da se njihova debljina, veličina pora i difuzivnost ravnomerno povećavaju čineći poroznu strukturu slične morfologije kao i ljudska koža. Radi bolje imitacije kože membrana je prožeta mešavinom lipida, koja uključuje ceramid, holesterol, različite slobodne masne kiseline i druge [198].

U poređenju sa eksperimentima izvedenim na ljudskoj koži, pokazano je da Strat-M[®] membrana adekvatno simulira performanse same kože, pa se može smatrati pogodnom alternativom ljudskoj i životinjskoj koži prilikom praćenja transdermalnog prenosa aktivnih supstanci širokog opsega molekulskih masa [196-198]. Štaviše, Brunauer-Emmett-Teller (BET) metoda merenja specifične površine, skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), kao i transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) su pokazale veoma slične morfološke karakteristike (debljina, veličina pora, morfologija površine i prečnik) ove sintetičke membrane sa ljudskom kožom [197].

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

Kao acil-akceptori u reakciji esterifikacije korišćeni su sledeći flavonoidi:

- floridzin (>97 %, TCI Evropa N.V., Zvijndreht, Belgija)
- naringin (>90 %, TCI Evropa N.V., Zvijndreht, Belgija)
- eskulin (>97 %, Acros Organics, Nju Džersi, SAD)

Kao acil-donori u sintezi estara flavonoida korišćeni su sledeći supstrati:

- oleinska kiselina (Ph Eur, NF čistoće), Appli Chem, Darmštad, Nemačka
- sirćetna kiselina (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- kapronska kiselina (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- kaprinska kiselina (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- miristinska kiselina (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- palmitinska kiselina (95%), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- stearinska kiselina (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- linolna kiselina (60 %), Acros Organics, Nju Džersi, SAD
- anhidrid sirćetne kiseline (97%), Merk-Alkaloid, Skoplje, Makedonija
- triacetin (99 %) Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- laneno ulje, Suncokret d.o.o., Hajdukovo, Srbija
- kokosovo ulje, Beyond, Niš, Srbija
- suncokretovo ulje, Dijamant a.d., Zrenjanin, Srbija

Kao biokatalizatori reakcije esterifikacije flavonoida korišćeni su:

- Novozym[®] 435, Novozymes, Bagsvard, Danska
- Lipaza tipa B iz *C. antarctica* produkovana od strane genetski modifikovane plesni *A. niger*, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka

Sinteze estara flavonoida izvođene su u sledećim rastvaračima:

- acetonitril (p.a.), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- aceton (99,5 %), Zorka Pharma, Šabac, Srbija
- izooktan (99,5 %), Centrohem, Stara Pazova, Srbija

- dodekan (99 %), Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Štajnhajm, Nemačka
- *t*-butanol (99 %), Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Štajnhajm, Nemačka

Za HPLC analizu korišćene su sledeće supstance:

- metanol (HPLC), J.T. Baker, SAD
- acetonitril (HPLC), Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Štajnhajm, Nemačka
- mravlja kiselina (HPLC), Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Štajnhajm, Nemačka
- izopropanol (HPLC) Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Štajnhajm, Nemačka
- demineralizovana voda

Kao nosači za imobilizaciju lipaze korišćeni su:

- LifetechTM nosači i to: ECR8305F, ECR8309F, ECR8404F, ECR8409F, ECR8285F, ECR1508, ECR1604 i ECR8806.

Za određivanje hidrolitičke aktivnosti lipaze korišćene su sledeće supstance:

- *p*-nitrofenil-butirat (98 %), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- dioksan (≥ 99 %), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD

Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćen je:

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH), Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Štajnhajm, Nemačka

Difuzija estara flavonoida praćena je kroz sintetičke membrane:

- celuloznoacetatna membrana (veličine pora 0,2 μ m, prečnika 47 mm), Vatman, Dassel, Nemačka
- Strat-M[®] membrana (debljine 300 μ m), Merk Milipore, Frankfurt, Nemačka

Za pripremu različitih kozmetičkih formulacija korišćene su sledeće supstance:

- Aristoflex[®] AVC (amonijum akrilo-di-metiltaurat vinil-pirolidon kopolimer), Clariant International Ltd., Bazel, Švajcarska
- Tegin pellets (glicerol-stearat), Evonik Industries, Dortmund, Nemačka
- Lanette O (cetostearilalkohol), BASF Care Creations, Ludvigšafen, Nemačka
- Easynov TM (oktildodekanol, oktildodecil ksilozid i PEG-30 dipolihidroksi-stearat), SEPPIC, Pariz, Francuska
- Bridge S2 (polietilenglikol oktadecil etar), Croda, Kovik Hol, Velika Britanija
- Bridge S721 (polioksietilen (21) steril etar), Croda, Kovik Hol, Velika Britanija

- Sabowax FL 65K (glicerol stearat, PEG-100 stearat) Sabo, Levate, Italija
- Emulmetik[®] 950, Lucas Meyer Cosmetic, Francuska
- Natapide[®] II, Lipoid, Štajnhauzen, Švajcarska
- Holesterol, Croda, Kovik Hol, Velika Britanija
- Eumulgin-a[®] HPS (Koket-7 i PPG-1-PEG-9 lauril glikol etar i PEG-40 hidrogenizovano ricinusovo ulje) BASF, Monhajm, Nemačka

Za testove iritabilnosti korišćeni su sledeće supstance:

- Zea majs protein, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- natrijum dodecil sulfat (SDS, *eng. sodium dodecyl sulphate*) (98 %), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- izopropil-miristat (98%), BASF, Ludvigshafen, Nemačka
- Myritol 318 (kaprilno-kaprinski trigliceridi), BASF, Ludvigshafen, Nemačka

Tokom eksperimentalnog rada korišćeni su sledeći uređaji:

- analitička vaga, Mettler AJ100, Mettler Toledo, Švajcarska
- centrifuga, MiniSpin eppendorf, Eppendorf, SAD
- magnetna mešalica, IKA, SAD
- roler mikser, Stuart, Pariz, Francuska
- pH metar (inoLab pH 720 WTW, Nemačka)
- UV-spektrofotometar, Ultrospec[™] 3300 pro, Biochrom Ltd., Frajburg, Nemačka
- termostat sa orbitalnim mešanjem, IKA KS 4000i Control, Štaufen, Nemačka
- tresilica sa orbitalnim mešanjem (Edmund Buhler GmbH SM-30, Bodelšauzen, Nemačka)
- vakuum uparivač, Rotavapor[®] R-210, BÜCHI Labortechnik AG, Flavil, Švajcarska
- HPLC, Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific, Voltam, SAD
- NMR spektrometar, Bruker Avance III 500, Bruker, Karlsruhe, Nemačka
- Francova ćelija, PermeGear, Inc., SAD
- uređaj za merenje srednje veličine čestica i zeta potencijala, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Velika Britanija

3.2. Metode

3.2.1. Enzimaska sinteza estara flavonoida

Reakcije sinteze estara izvođene su u šlifovanim erlenmajerima zapremine 100 mL. Reakciona smeša se sastojala iz različitih količina flavonoida (floridzina, naringina ili eskulina) i acil-donora, karboksilnih kiselina (sirćetne, kapronske, kaprinske, miristinske, palmitinske, stearinske, oleinske ili linolne) ili alternativnih acil-donora (anhidrida sirćetne kiseline, triacetina ili različitih biljnih ulja, kokosovog, lanenog ili suncokretovog), rastvarača i enzima (količine definisane za svaki eksperiment pojedinačno), tako da je ukupna zapremina reakcione smeše iznosila 5 ili 25 ml u slučaju sinteze estara za difuzione eksperimente. U erlenmajere su prvo odmeravani supstrati, zatim je smeša dopunjena rastvaračem do određene zapremine i nakon termostatiranja u trajanju od 30 min na temperaturi izvođenja reakcije, proces esterifikacije je iniciran dodavanjem enzima. Tokom trajanja reakcije, uzorci su termostatirani na orbitalnoj mešalici pri 150 o/min u toku definisanog vremenskog perioda. Uzorkovanje smeše (50 µl) vršeno je u određenim vremenskim intervalima, a kvantitativna analiza uzoraka vršena je primenom reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi (RP-HPLC, *eng. reverse-phase high-performance liquid chromatography*). Proizvod nije detektovan u kontrolnim uzorcima (bez enzima) pripremanim na isti način. Esterifikacija flavonoida u sistemu bez rastvarača izvođena je na isti način s tim da je umesto organskog rastvarača acil-donor imao ulogu i rastvarača.

3.2.2. HPLC kvantitativna analiza uzoraka

Za kvantitativnu analizu uzoraka korišćena su dva sistema: Akta Purifier HPLC sistem (Amersham Pharmacia Biotech, Piskatavej, SAD) sa reverzno-faznom kolonom Waters Spherisorb ODS 2-C18 250 mm × 4,6 mm, 5 µm (Waters, Milford, SAD) i Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific (Voltam, SAD) HPLC sistem sa reverzno faznom kolonom Hypersil gold C18, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm istog proizvođača. Za analizu uzoraka reakcione smeše u kojoj su karboksilne kiseline imale ulogu acil-donora, reakcione

smeše su razblažene 10 puta metanolom, a injekciona zapremina uzorka iznosila je 10 μ l. Korišćena je izokratska elucija, a kao mobilna faza korišćena je smeša MeOH/H₂O/H₃PO₄ i to u odnosu 70–100/30–0/0.1 % (v/v) u zavisnosti od korišćene karboksilne kiseline. Pa je tako smeša 70/30 % korišćena za floridzin-acetat, 80/20 % za floridzin-kaproat, 90/10 % za floridzin-kaprat, i 100/0 % za floridzin-miristat, palmitat, oleat i linolat. Protok mobilne faze iznosio je 1,5 ml/min. Za analizu uzoraka reakcione smeše nastale u reakcijama acetilovanja korišćene su sledeće mobilne faze (A) H₂O:HCOOH = 100:0.1 % (v/v) i (B) MeOH:HCOOH = 100:0.1 % (v/v), a elucija je izvedena na sledeći način: 0–15 min gradijent od 30 % do 100 % B, zatim 15–20 min 100 % B, 20–20,1 min gradijent od 100 % do 30 % B, i 20,1–25 min izokratski 30 % B. Protok mobilne faze bio je 1 ml/min, a kolona je termostatorirana na 30 °C. U zavisnosti od uzorka, reakcione smeše su bile razblažene 10 do 20 puta, a injekcione zapremine su bile u opsegu 5 do 15 μ l. I na kraju, za analizu uzoraka reakcione smeše nastale u reakciji transesterifikacije primenom biljnih ulja korišćene su sledeće mobilne faze (A) MeOH:H₂O:HCOOH = 80:20:0.1 % i (B) 100 % izopropanol, i za uzorke nastale u reakciji sa lanenim i suncokretovim uljem sprovedena je gradijentna elucija na sledeći način: 0-10 min 0 % B, zatim 10-15 min 0-50 % B, 15-20 min 50 % B, 20-20,1 min gradijent od 50 do 0 % B, 20,1-25 min 0 % B, dok je za uzorke dobijene u reakciji sa kokosovim uljem korišćena nešto kraća metoda: 0-10 min 0 % B, zatim 10-15 min 0-50 % B, 15-15,1 min 50 % B, 15,1-20 min izokratski 0 % B. Protok mobilne faze bio je 1 ml/min, a kolona je termostatorirana na 30 °C. U zavisnosti od uzorka, reakcione smeše su bile razblažene 0 do 20 puta, a injekcione zapremine su bile u opsegu 10 do 50 μ l. U svim eksperimentima detekcija floridzina, naringin i njihovih estara vršena je na 280 nm dok su eskulin i njegovi derivati detektovani na 346 nm. Koncentracije proizvoda preračunate su korišćenjem sledeće jednačine:

$$C_{estra}(mM) = \frac{A_{estra} \cdot V_{standarda}}{nagib \cdot V_{estra}} \cdot R \quad (3.1)$$

u kojoj A (mAU*min) predstavlja površinu pika proizvoda na HPLC hromatogramu, V_{estra} i $V_{standarda}$ su injekcione zapremine uzorka estra i standarda (floridzina, naringina, eskulina prilikom konstruisanja standardne prave), redom, a R predstavlja razblaženje. Nagibi su

izračunati za sva tri flavonoida korišćenjem konstruisanih standardnih pravi za svaku od korišćenih metoda.

3.2.3. HPLC-MS analiza

HPLC-MS spektralna analiza odabranih analita izvršena je korišćenjem Dionex UltiMate® 3000 LC system (Thermo Scientific, Waltham, USA) vezanog za linearni jonski trap LTQ XL (Thermo Scientific). Hromatografsko razdvajanje izabranih jedinjenja postignuto je na Hypersil gold C18 koloni, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm istog proizvođača. Svi analiti su uspešno jonizovani tehnikom elektrosprejne jonizacije (ESI, *eng. electrospray ionization*) u negativnom modu, formirajući deprotonirane molekularne jone. Maseni hromatogrami su dobijeni korišćenjem gradijentne elucije primenjene i za UV detekciju i korišćenjem moda za praćenje pojedinačnih jona (SIM, *eng. selected ion monitoring*) za detekciju analita od interesa.

3.2.4. Prečišćavanje proizvoda

Prečišćavanje proizvoda izvršeno je korišćenjem dva pomenuta HPLC sistema. Prečišćavanje floridzin-oleata izvršeno je primenom Akta Purifier HPLC sistema sa frakcionim kolektorom, dok je prečišćavanje acetil-derivata floridzina izvršeno primenom Dionex Ulti-mate 3000 Thermo Scientific HPLC sistema (Voltam, SAD). Korišćena je semi-preparativna reverzno-fazna C18 kolona (HYPERASIL GOLD 5 µm ODS, 10 × 250 mm) proizvođača Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD, prethodno prekondicionirana mobilnom fazom. Pre same analize reakcione smeše su prvo filtrirane pod vakuumom i uparene na rotacionom vakuum uparivaču pod sniženim pritiskom. Nakon toga, reakcione smeše su razblažene 10 puta u acetonitrilu i razblaženi uzorci su nanošeni na HPLC sistem u cilju odvajanja proizvoda. U postupku prečišćavanja floridzin-oleata, injekciona zapremina iznosila je 1 ml, a elucija je vršena izokratski primenom mobilne faze koja se sastojala od 95 % acetonitrila sa 0,1 % (v/v) mravlje kiseline. Protok mobilne faze iznosio je 6 ml/min, a detekcija je vršena na 280 nm. Frakcioni kolektor je korišćen za prikupljanje frakcija čistog proizvoda (zapremine 0,5 ml). Prilikom prečišćavanja acetil-derivata floridzina primenjen je sledeći elucioni sistem A – H₂O:HCOOH = 100:0.1%(v/v) i B –

MeOH:HCOOH = 100:0.1%(v/v) a elucija je sprovedena na sledeći način: 0–30 min gradijent od 30 do 100 % B, zatim 30–36 min 100 % B, 36–36,1 min gradijent od 100 do 30 % B, i 36,1–46 min izokratski 30 % B. Kolona je termostansirana na 30 °C, protok mobilne faze bio je 1 ml/min. Detekcija je vršena na 280 nm, a prikupljane su frakcije čistog proizvoda od po 0,5 ml. Nakon toga, čistoće prikupljenih jedinjenja su ponovo testirane na analičkoj koloni, a zatim čista jedinjenja su uparena do konstantne mase.

3.2.5. Spektralne analize

NMR spektri floridzin-oleata dobijeni su korišćenjem Varian Gemini 200 (1H NMR na 200 MHz, 13C NMR na 50 MHz) uređaja (Varian Medical Systems, Palo Alto, SAD). Hemijska pomeranja izražena su u ppm (δ , *eng. parts per million*) korišćenjem dimetilsulfoksida (DMSO) kao rastvarača i natrijumove soli 2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonata kao internog standarda. NMR spektri acetil-derivata floridzina dobijeni su korišćenjem Bruker Avance III 500 NMR spektrometra (Bruker, Karlsruhe, Nemačka) koji radi na proton NMR frekvenciji od 500,26 MHz. Za ^1H , ^1H - ^1H COSY, HSQC i HMBC eksperimente korišćene su standardne Bruker-ove impulsne sekvence. ^{13}C NMR pomeranja dobijena su iz HSQC i HMBC 2D NMR eksperimenata. Rezidualni signali rastvarača korišćeni su za referenciranje hemijskog pomeranja (3,31 ppm i 49,15 ppm, za proton i ugljenik, redom). Sirovi NMR podaci su podvrgnuti Furijeovoj transformaciji i procesuirani korišćenjem Topspin softvera ver. 3.5 pl7 (Bruker), a za konačnu analizu i prezentaciju dobijenih rezultata korišćen je MestReNova softver ver. 6.0.2 (MestrelabResearch).

3.2.6. Centralni kompozitni rotatibilni plan i metoda odzivnih površina

Statističko planiranje eksperimenata upotrebljeno je za ispitivanje uticaja i optimizaciju procesnih parametara tokom izrade ove doktorske disertacije, a metoda odzivnih površina (RSM, *eng. response surface methodology*) korišćena je za analizu dobijenih rezultata. Uticaj pet (u slučaju optimizacije sinteze floridzin-oleata) i četiri (u slučaju optimizacije esterifikacije eskulina u reakciji sa lanenim uljem) eksperimentalnih faktora ispitan je pomoću centralnog kompozitnog rotatibilnog dizajna (CCRD, *eng. central composite*

rotatable design) na pet nivoa vrednosti ispitivanih faktora. Rotabilni planovi su veoma česti u eksperimentalnom istraživanju, modelovanju i adaptivnom upravljanju višefaktornim procesima. Osnovna karakteristika ovih planova je da je disperzija modela dobijenog pomoću ovog plana konstantna u svim tačkama hipersfere radijusa, i da ne zavisi, dakle, od pravca u višefaktornom eksperimentalnom prostoru, već samo od radijusa faktornog prostora. To znači da sve tačke koje su jednako udaljene od centralne tačke eksperimentalnog plana imaju istu količinu informacija koje sadrži model dobijen na osnovu ovog plana [71]. Dobijeni rezultati su modelovani jednačinom drugog reda koja uključuje članove koji opisuju interakciju između različitih faktora:

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^n \beta_{ki}X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{kii}X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{kij}X_iX_j \quad (3.2)$$

gde je n broj faktora, Y odzivna veličina, β_{k0} , β_{ki} , β_{kii} i β_{kij} koeficijenti za odsečak, linearni, kvadratni i interaktivni koeficijenti regresije, X_i i X_j nezavisne promenljive, a k je broj pojedinačnih faktora. Vrednosti koeficijenata i njihova statistička značajnost određeni su metodom najmanjih kvadrata primenom MATLAB 7.0 (Mathworks Inc., Natick, SAD) programa. Adekvatnost dobijenog modela testirana je disperzionom analizom modela korišćenjem Fišerovog testa, dok je Studentov t-test korišćen za procenu signifikantnosti koeficijenata [71]. Samo signifikantni članovi ($p \leq 0,05$) su uključeni u krajnji, redukovani model.

3.2.7. Kinetička studija sinteze acetil-derivata flavonoida

Za ispitivanje kinetike reakcije acetilovanja flavonoida triacetinom u sistemu bez rastvarača korišćen je COPASI softver (verzija 4.16) [200]. Kinetički parametri za pretpostavljeni model su određeni primenom nelinearne regresione analize korišćenjem genetičkog logaritma u okviru paketa COPASI softvera. Metoda najmanjih kvadrata objektivne funkcije $f(x)$ koja je korišćena za procenu parametara može biti predstavljena sledećim jednačinama:

$$f(k) = \sum_{i,j} \omega_j \cdot (x_{i,j} - y_{i,j}(k))^2 \quad (3.3)$$

$$\omega_j = \frac{1}{\langle x_j^2 \rangle} \quad (3.4)$$

gde k , x i y predstavljaju trenutno testirani set parametara, eksperimentalnih podataka i podataka simulacije, redom. Reakcione promenljive (flavonoid, flavonoid-acetat i flavonoid-diacetat) su predstavljene korišćenjem supskripta i i eksperimentalne tačke reakcije i -te promenljive su predstavljene supskriptom j . ω_j predstavlja korišćenu metodu najmanjeg kvadrat. U samom početku reakcije nije bilo estara u reakcionoj smeši, pa su početne koncentracije estara bile jednake nuli.

Za validaciju eksperimentalnih podataka, vremenska simulacija modela je sprovedena korišćenjem dobijenih kinetičkih parametara. Proces simulacije je izvođen primenom determinističkog LSODA programa u okviru COPASI paketa za druge eksperimentalne uslove. Statistička analiza je sprovedena određivanjem koeficijenta determinacije (R^2) za set podataka svih vrsta, učesnika u reakciji, korišćenjem Pirsonove jednačine (jednačina 3.5), u kojoj su x_j i y_j prethodno definisane promenljive, a n predstavlja broj eksperimentalnih tačaka.

$$r = \frac{n \cdot \sum x_j y_j - (\sum x_j)(\sum y_j)}{\sqrt{n \cdot (\sum x_j^2) - (\sum x_j)^2} \cdot \sqrt{n \cdot (\sum y_j^2) - (\sum y_j)^2}} \quad (3.5)$$

3.2.8. Imobilizacija lipaze na LifeTech™ ECR nosače

Smeša u kojoj je izvođena imobilizacija sastojala se od 10 mg nosača i različitih količina lipaze, a smeša je dopunjavana odgovarajućim puferom do ukupne zapremine od 1 ml i inkubirana na 25 °C na roler šejkeru. Korišćeni su acetatni pufer pH 5, natrijum-fosfatni puferi različitih pH vrednosti (6, 7 i 8) i natrijum-karbonatni pufer pH 10 definisanih molariteta za svaki eksperiment. Nakon definisanog vremena, imobilisani enzim je odvajan od supernatanta, ispran tri puta sa po 1 ml pufera u kojem je vršena imobilizacija i sušen do konstantne mase na 37 °C.

3.2.9. Imobilizacija lipaze na Purolite[®] MN102

Imobilizacija CAL B na Purolite[®] MN102 izvedena je prema proceduri prethodno ustanovljenoj na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju i opisanoj u literaturi [201]. Smeša u kojoj je izvođena imobilizacija sastojala se od 20 mg nosača i tečnog enzimskog preparata lipaze (početna koncentracija proteina u smeši iznosila je 18,75 mg/g_{nosača}), a smeša je dopunjavana 1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7 do ukupne zapremine 350 µl. Imobilizacija je izvođena na 25 °C na roler šejkeru i nakon 5 h, imobilisani enzim je odvojen od supernatanta, ispran tri puta sa po 1 ml pufera u kojem je vršena imobilizacija i sušen do konstantne mase na 37 °C.

3.2.10. Imobilizacija lipaze na Eupergit[®] C250L

Imobilizacija lipaze na Eupergit[®] C250L izvedena je prema proceduri prethodno ustanovljenoj na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju i opisana u literaturi [201]. Imobilizacija je izvođena korišćenjem 50 mg nosača i tečnog enzimskog preparata lipaze (početna koncentracija proteina iznosila je 19,6 mg/g_{nosača}) u zapremini od 1 ml koja je podešavana dodavanjem 1 M natrijum-fosfatnog pufera pH=7. Proces je vođen na 25 °C u toku 20 h na orbitalnoj mešalici. Imobilisani enzim je odvojen od supernatanta, ispran tri puta sa po 1 ml pufera u kojem je vršena imobilizacija i sušen do konstantne mase na 37°C.

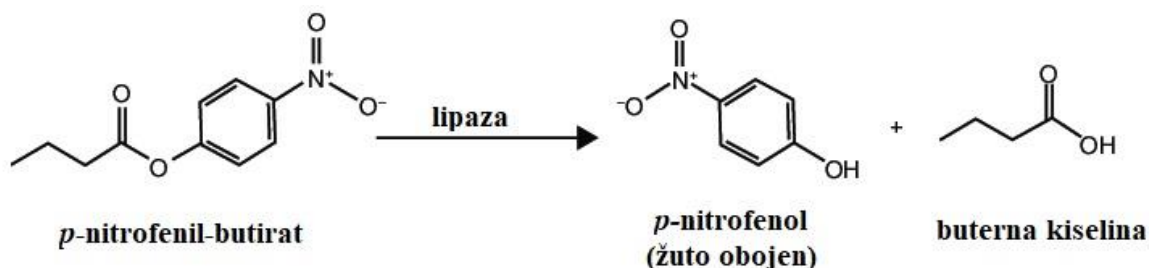
3.2.11. Imobilizacija lipaze na nanočestice SiO₂

Imobilizacija lipaze vršena je na nemodifikovane nanočestice SiO₂, kao i na nanočestice koje su modifikovane tretiranjem sa dva silana (3-aminopropiltrimetoksisilana (APTMS) i trimetoksi(2-fenilpropil)silana (PAPMS)). Postupak modifikacije čestica, kao i procedura izvođenja imobilizacije enzima je optimizovna prethodno na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju i opisana u literaturi [202]. Smeša se sastojala iz 10 mg nanočestica SiO₂ i tečnog enzimskog preparata lipaze (početna koncentracija proteina u smeši iznosila je 24,68 mg/g_{nosača}), a dopunjavana je do 1 ml 50 mM ili 1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7. Imobilizacija je trajala 1 h kada su korišćeni nosač aktiviran PAPMS-om i neaktivirana silika, dok je u ostalim slučajevima proces trajao 24 h. Proces se

odigravao na sobnoj temperaturi uz orbitalno mešanje, nakon čega je imobilisani enzim odvajan centrifugiranjem u toku 10 min pri 13000 o/min. Nakon toga je imobilizat ispiran 3 puta sa po 1 ml pufera u kome je vršena imobilizacija, a posle svakog ispiranja ponavljan je postupak centrifugiranja. Na kraju je CAL B imobilisana na nano-čestice SiO₂ sušena pod vakuumom i korišćena u reakciji esterifikacije floridzina.

3.2.12. Određivanje hidrolitičke aktivnosti lipaze

Za određivanje hidrolitičke aktivnosti kako imobilisanih preparata tako i slobodne lipaze korišćena je metoda koja se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju koncentracije žuto obojenog *p*-nitrofenola nastalog u reakciji hidrolize *p*-nitrofenil-butirata (*p*-NPB, eng. *p*-nitrophenyl butyrate) katalizovane lipazom (slika 3.1)



Slika 3.1 Hidroliza *p*-nitrofenil-butirata katalizovana lipazom.

Stok rastvor *p*-NPB-a u dioksanu (50 mM) pripremljen neposredno pre upotrebe razblaživan je 25 mM fosfatnim puferom pH=8 125 puta do finalne koncentracije od 0,4 mM. Kada je određivana aktivnost imobilizata smeša se sastojala iz različitih masa biokatalizatora i 3 mL razblaženog supstrata, dok se pri određivanju aktivnosti slobodnog enzima smeša sastojala od 10 µl enzima i 2,99 ml razblaženog supstrata. U toku merenja, smeša je mešana magnetnim zrnom (6 mm) na magnetnoj mešalici pri 1000 o/min. Pri ovakvim uslovima nisu primećene nikakve promene mehaničkih karakteristika čestica nosača. Merenja su vršena spektrofotometrijski na 410 nm u toku 2-5 min na svakih 10-30 s na 25 °C. Aktivnosti enzima izračunate su pomoću formule:

$$AKT. = \frac{dA}{\varepsilon \cdot l \cdot dt} \quad (3.6)$$

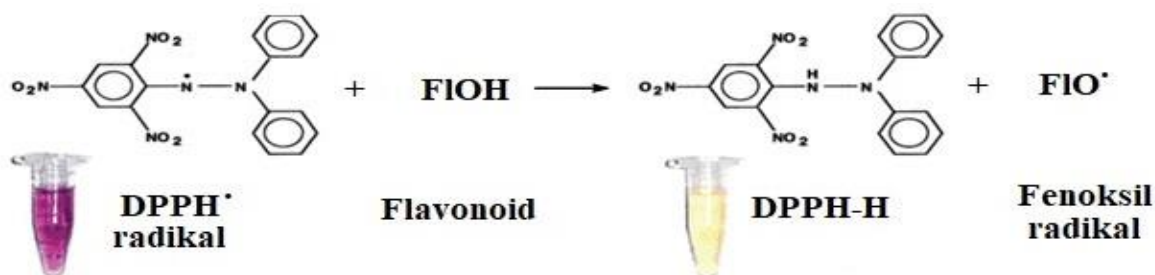
gde *AKT.* (IU) predstavlja aktivnost enzima; *A* – apsorbanacija; *t*-vreme (min); ε (1/cm/M) – molarni ekstinkcioni koeficijent; *l* (cm) – dužina puta;

3.2.13. Određivanje sadržaja proteina metodom po Bredfordu

Za određivanje koncentracija proteina u enzimskom preparatu CAL B, kao i u supernatantu, pre i nakon imobilizacije, korišćena je metoda po Bredfordu. Kao prvo, pripremljen je Bredfordov reagens po sledećem principu: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rastvori se u 50 ml 95 % etanola i doda se 100 ml 85 % ortofosforne kiseline. Nakon rastvaranja boje, smeša se razblaži destilovanom vodom do ukupne zapremine od 1 l. Pripremljeni rastvor se filtrira kroz filter papir neposredno pre upotrebe. Za određivanje koncentracija proteina u uzorku pripremljena je reakciona smeša koja se sastojala od 2 ml Bredfordovog reagensa i 40 μ l uzorka, smeša je vorteksirana i nakon 5 min merena je apsorbanca na 595 nm. Za svaku novu količinu pripremljenog Bredfordovog reagensa konstruisana je standardna prava primenom albumina iz goveđeg seruma (BSA, *eng. bovin albumin serum*) u opsegu koncentracija 0,1-1 mg/ml i korišćena je za određivanje koncentracije proteina u uzorku.

3.2.14. Određivanje antioksidativne aktivnosti estara floridzina

Antioksidativna aktivnost floridzina kao i njegovih derivata određena je DPPH metodom, najrasprostranjenijom metodom za ispitivanje antioksidativne aktivnosti verovatno zbog svoje jednostavnosti, ekonomičnosti i tačnosti [203]. Određivanje antioksidativne aktivnosti flavonoida bazirano je na sposobnosti ovih jedinjenja da doniraju vodonik, pri čemu stabilni azotni DPPH \cdot radikal prelazi u redukovani neutralni DPPH-H oblik, a nastaje manje reaktivni fenoksil radikali (FIO \cdot) (slika 3.2). Ova reakcija praćena je promenom boje ljubičasto obojenog DPPH \cdot radikala do žuto obojene redukovane forme DPPH-H.



Slika 3.2 Redukcija DPPH radikala u reakciji sa flavonoidom ili derivatima flavonoida.

Za izvođenje ove metode pripremljen je rastvor DPPH radikala u metanolu koncentracije 0,115 mM. Određivanje antioksidativne aktivnosti floridzina i estara izvođeno je dodavanjem u epruvetu 200 µl rastvora DPPH, 200 µl uzorka i 600 µl metanola, zatim su uzorci mešani na vorteksu 2 min i ostavljeni na sobnoj temperaturi u mraku da odstoje 30 minuta. Kontrolni uzorak pripremljen je dodavanjem 200 µl rastvora DPPH i 800 µl metanola, koji je takođe nakon vorteksiranja ostavljen 30 min zajedno sa ostalim uzorcima. Nakon propisanog vremena, merena je apsorbancu svakog uzorka na spektrofotometru na 517 nm. Kapacitet za vezivanje slobodnih radikala izračunavan je u procentima na sledeći način:

$$\text{Kapacitet vezivanja, \%} = \frac{A_k - A_u}{A_k} \cdot 100 \quad (3.7)$$

pri čemu je A_k apsorbancu kontrolnog uzorka, a A_u apsorbancu ispitivanog uzorka. Krajnji rezultat iskazivan je kao IC50 (*eng. half minimal inhibitory concentration*) vrednost koja predstavlja koncentraciju antioksidanta potrebnu da smanji početnu koncentraciju DPPH radikala za 50 %.

3.2.15. Priprema kozmetičkih formulacija

Nakon završene reakcije esterifikacije različitih flavonoida u reakciji sa biljnim uljima, iz reakcione smeše je izdvojen enzim, nakon čega je rastvarač uparen na rotacionom vakuum uparivaču. Dobijene uparene smeše estara korišćene su direktno ili su inkorporirane u različite kozmetičke formulacije u cilju izvođenja difuzionih eksperimenata.

Za pripremanje kozmetičkih formulacija sa acetil-derivatima flavonoida, nakon uklanjanja biokatalizatora korišćena je kompletna reakciona smeša nastala u reakciji esterifikacije floridzina triacetinom u sistemu bez rastvarača.

3.2.15.1. Priprema gel-emulzija

Za pripremu gel-emulzija korišćen je prethodno pripremljen 1% rastvor komercijalnog polimera Aristoflex[®] AVC u koji je dodavana uparena smeša estara flavonoida ili smeša floridzin-acetata tako da udeo uljane faze u gel-emulziji bude 10 %. Mešanje estara i gela izvršeno je pomoću magnetnog zrna na magnetnoj mešalici pri 800 o/min u toku 5 min.

3.2.15.2. Priprema emulzija tipa ulje u vodi

Prilikom pravljenja ove vrste emulzija korišćeno je 5 % emulgatora (PEG 100 stearat-glicerol stearat), 2 % koemulgatora (Lanette O), 10 % smeše estara i 85 % demineralizovane vode. U prvom koraku se do tačke topljenja na 70 °C zagreje uljana faza koju čine emulgator, koemulgator i estri. Nakon toga, uljanoj fazi se dodaje voda (zagrejana na 70 °C), a paralelno se u tom trenutku intenzivira mešanje (1500 o/min) u trajanju od 3 min. Smeša se zatim ostavi da se meša (800 o/min) dok se ne ohladi do sobne temperature.

3.2.15.3. Priprema emulzija tipa gel u ulju

Za pripremu emulzija tipa gel u ulju korišćeno je 1,5 % polimera Aristoflex[®] AVC, 3 % emulgatora (Easynov), 10 % smeše estara i 85,5 % demineralizovane vode. U prvom koraku pripremljen je gel intenzivnim mešanjem polimera i vode, a nakon toga u smešu se dodaju estri i emulgator. Mešanje je izvedeno pomoću magnetnog zrna na magnetnoj mešalici pri 800 o/min u toku 5 min.

3.2.15.4. Priprema emulzija sa tečnim kristalima

Prilikom pravljenja ove vrste emulzija korišćeno je 4 % emulgatora (Bridge S2), 1 % koemulgatora (Bridge S721), 10 % smeše acetata floridzina i 85 % demineralizovane vode. U prvom koraku se do tačke topljenja na 70 °C zagreje uljana faza koju čine emulgator, koemulgator i estri. Nakon toga, uljanoj fazi se dodaje voda (zagrejana na 70 °C), a

paralelno se u tom trenutku intenzivira mešanje (1500 o/min) u trajanju od 3 min. Smeša se zatim ostavi da se meša (800 o/min) dok se ne ohladi do sobne temperature.

3.2.15.5. Priprema lipozoma prolipozomnom metodom

Lipozomi sa inkorporiranim estrima flavonoida dobijenim u reakciji sa kokosovim uljem pripremljeni su pro-lipozomnom metodom, koja podrazumeva rastvaranje fosfolipida u smeši vode i alkohola, pri čemu nastaju dvoslojevi fosfolipida. Dodavanjem veće količine vode ili vodenih rastvora uz mešanje dolazi do zatvaranja dvoslojeva u sferne strukture – lipozome. Prilikom pripreme lipozoma korišćena je smeša zasićenih fosfolipida (Emulmetik[®] 950) koja sadrži minimalno 95 % hidrogenovnog fosfatidil-holina. Zasićenim fosfolipidima (5 %) dodaje se 5 % demineralizovane vode, 20 % estara i 10 % etanola koji služi samo kao rastvarač. Smeša se zagreva do 70 °C meša na magnetnoj mešalici (1500 o/min), pri čemu korišćeni etanol ispari. Ostatak vode (75 %) dodaje se smeši fosfolipida i estara u manjim porcijama uz intenzivirano mešanje. Nakon dodatka vodene faze mešanje se nastavlja 20 minuta (1000 o/min), na temperaturi od 70 °C, u cilju dobijanja što uniformnije veličine čestica. Za pripremu lipozoma sa inkorporiranim acetil-derivatima floridzina korišćeno je 20 % komercijalne lipidne smeše (Natapide[®] II), 20 % estara i 60 % vode. Mešanje je izvršeno na 1500 o/min u toku 20 min.

3.2.15.6. Priprema lipozoma sa holesterolom metodom tankog filma

Za pripremu lipozoma sa holesterolom korišćene su sledeće supstance: 6 % smeše fosfolipida (Emulmetik[®]), 1,25 % holesterola, 20 % smeše acetata floridzina i 72,75 % vode. U prvom koraku fosfolipidi, holesterol i estri su rastvoreni u 10 ml hloroforma nakon čega je izvršeno kompletno uklanjanje rastvarača do nastajanja tankog filma na vakuum uparivaču na temperaturi od 45 °C i pritisku od 175 mbar u toku sat vremena. Tanak film koji se obrazuje na zidovima balona dalje je sušen 15 minuta nakon čega je izvršena hidratacija lipidnog filma dodatkom vode i smeša je ostavljena da se meša još dodatnih sat vremena na 200 o/min. Hidrogelovi sa lipozomima su pripremljeni mešanjem lipozoma sa inkorporiranim estrima, pripremljenih na oba načina, i hidrogela (2 % rastvora polimera Aristoflex[®] AVC) u odnosu 1:1.

3.2.16. Difuzioni eksperimenti

Difuzioni eksperimenti izvedeni su u standardnoj Francovoj difuzionoj ćeliji sa omotačem, zapremine receptorskog dela 20 ml i površine membrane 4,91 cm² (PermeGear, Inc. SAD) (slika 3.3). Eksperimenti su izvedeni na sobnoj temperaturi uz stalno mešanje receptorskog rastvora pomoću magnetnog zrna na magnetnoj mešalici brzinom od 750 o/min u svim eksperimentima. Prilikom izvođenja preliminarnih eksperimenata u kojima je korišćena celuloznoacetatna membrana, pre početka svakog eksperimenta Francova ćelija je termostatirana na sobnoj temperaturi korišćenjem receptorskog rastvora, u ovom slučaju smeše etanola i vode u odnosu 1:1, koji se unosi i u donorski deo ćelije, tokom 30 min. Korišćena celuloznoacetatna membrana ima period prilagođavanja uslovima u kojima se nalazi (*lag faza*), pa se termostatiranje izvodi kako bi se izbegao ovaj period i membrana navlažila, a pored toga uklonili i mehurovi vazduha, koji se mogu nakupljati ispod membrane i tako smanjivati površinu za difuziju. Prilikom ispitivanja transdermalnog prenosa korišćena je Strat-M[®] membrana i nije bilo potrebno izvoditi bilo kakve pripreme radnje, a kao receptorski rastvor u ovim eksperimentima korišćena je smeša koja se sastojala od 5 % Eumulgin-a[®] HPS, 10 % etanola i 85 % 0,01 M fosfatnog pufera (PBS) pH 7,4.



Slika 3.3 Francova difuziona ćelija

U svim difuzionim eksperimentima u donorski deo unošeno je oko 2 g uparene smeše estara ili pripremljenih formulacija sa inkorporiranim estrima. U određenim vremenskim intervalima iz receptorskog dela uzimano je 0,5 ml uzorka kroz cevčicu za uzorkovanje. Nakon uzimanja uzoraka ista zapremina svežeg receptorskog restvora vraćana je u ćeliju. Prilikom uzimanja uzoraka i vraćanja svežeg receptorskog rastvora vodilo se računa da mehur vazduha ne uđe u ćeliju kroz cevčicu za uzorkovanje i tako smanji površinu za difuziju. Kvantitativna analiza uzoraka vršena je korišćenjem HPLC uređaja i metoda opisanih u poglavlju 3.2.2.

3.2.17. Određivanje stabilnosti emulzija

Procena stabilnosti emulzija vršena je na osnovu izmerenih vrednosti površinskog *zeta* potencijala (elektrokinetičkog potencijala) kapljica dispergovane faze, kao mere stabilnosti koloidnog sistema. Merenje *zeta* potencijala izvođeno je primenom uređaja Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija), a na osnovu elektroforetske pokretljivosti čestica, primenom Smoluhovski jednačine: $\xi = \mu\eta/\varepsilon$, gde je ξ -*zeta* potencijal, μ -pokretljivost, η -viskoznost suspenzije, a ε -dielektrična konstanta rastvarača. Svi uzorci pre merenja razblaženi su 1000 puta demineralizovanom vodom. Merenja su vršena u duplikatu i ponavljana 15. i 60. dana od trenutka pripreme emulzija u cilju definisanja stabilnosti emulzija. Između merenja, uzorci su čuvani na temperaturi od 4 °C.

3.2.18. Ispitivanje efekta hidratacije

Test koji se zasniva na merenju transepidermalnog gubitka vlage (TEWL, *eng. transepidermal water loss*) korišćen je u cilju ispitivanja efekta hidratacije pripremljenih kozmetičkih formulacija. TEWL je meren korišćenjem uređaja Aquaflux Biox System Ltd, London, Velika Britanija, zatvorenog tipa. Ova metoda se koristi za merenje brzine isparavanja vode (jednačina 3.8) sa površine kože ili model sistema koji simulira fizičko-hemijske procese koji postoje u živom sistemu:

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dp}{dx} \quad (3.8)$$

U jednačini 3.8 d_m/d_t predstavlja brzinu isparavanja vode, D je konstanta difuzije, A je površina, p je pritisak vodene pare, a x je rastojanje mernih tačaka. U našim eksperimentima korišćena je Teflon polupropustljiva membrana debljine 1 mm i merena je promena pritiska vodene pare na površini membrane bez nanošene kreme (kontrolni uzorak), kao i na površini membrane sa primenjenom kozmetičkom formulacijom na svakih 2 sata tokom 24 h. Obrada rezultata vršena je u skladu sa modelom površinskog isparavanja-sorpcione izoterme, a rezultati se preračunavaju kao vremenska kriva fluksa isparavanja ($\text{g/m}^2/\text{h}$).

3.2.19. Ispitivanje iritabilnosti - Zein test

Zein test je jedan od devet preporučenih metoda za ispitivanje iritabilnosti kože i izvršen je prema INVITOX protokolu br. 26 [204]. Prema ovoj proceduri 1 g Zea majs proteina je rastvoren u uzorku kozmetičke formulacije koncentracije 10 g/l (prethodno rastvorene u demineralizovanoj vodi). Mešanje proteina i kozmetičke formulacije izvršeno je na tresilici sa orbitalnim mešanjem (Edmund Buhler GmbH SM-30, Bodelšauzen, Nemačka) tokom 60 min pri 100 o/min. Količina proteina rastvorenog u uzorku određena je metodom po Kjeldalu korišćenjem uređaja UDK 159 Automatic Kjeldahl Analyzer Velp Scientifica, Ulmat, Italija. Rezultati testa su izraženi kao mg azota u 100 ml uzorka (Zein broj). Vrednosti Zein broja treba da budu manje od 200 za tečne deterdžente, ispod 165 za proizvode za negu kose i tela, manje od 5 za kozmetiku za negu kože i samo proizvodi koji pokazuju veoma nisku iritabilnost imaju Zein broj manji od 1 [205].

3.2.20. RBC test

RBC (*eng. red blood cells*) test sproveden je prema protokolu opisanom u literaturi (INVITOX protokol br. 37) [206]. Crvene krvne ćelije su izolovane centrifugiranjem iz uzoraka citrirane krvi miševa. Koncentracija ćelija bila je oko $7 \cdot 10^9$ ćelija/ml. Različiti alikvoti RBC ćelija i testirani uzorci koncentracije 9,5 g/l (prethodno rastvoreni u fosfatnom puferu pH 7,4) su inkubirani tokom 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani (1 min na 9000 o/min). Kao interni standard korišćen je rastvor natrijum dodecil sulfata (SDS) u koncentraciji od 0,75 g/l. Procenat hemolize je

određen upoređivanjem apsorbance supernatanta na 560 nm sa kontrolnim uzorcima potpuno hemoliziranim destilovanom vodom. Polovina maksimalne koncentracije (H50) izračunata je korišćenjem standardne krive. Kao indikator denaturacije proteina, oslobađanje hemoglobina kvantifikovano je spektrofotometrijski. Apsorbanca je merena u opsegu talasnih dužina od 450 do 700 nm. Odnos između hemolitičkog (H50) i denaturacionog potencijala (DI) nazvan L/D odnos korišćen je za klasifikaciju iritabilnosti proizvoda kao: neiritirajući >100, slabo iritirajući >10, umereno iritirajući >1, iritirajući >0,1 i vrlo iritirajući <0,1 [206].

4. REZULTATI I DISKUSIJA

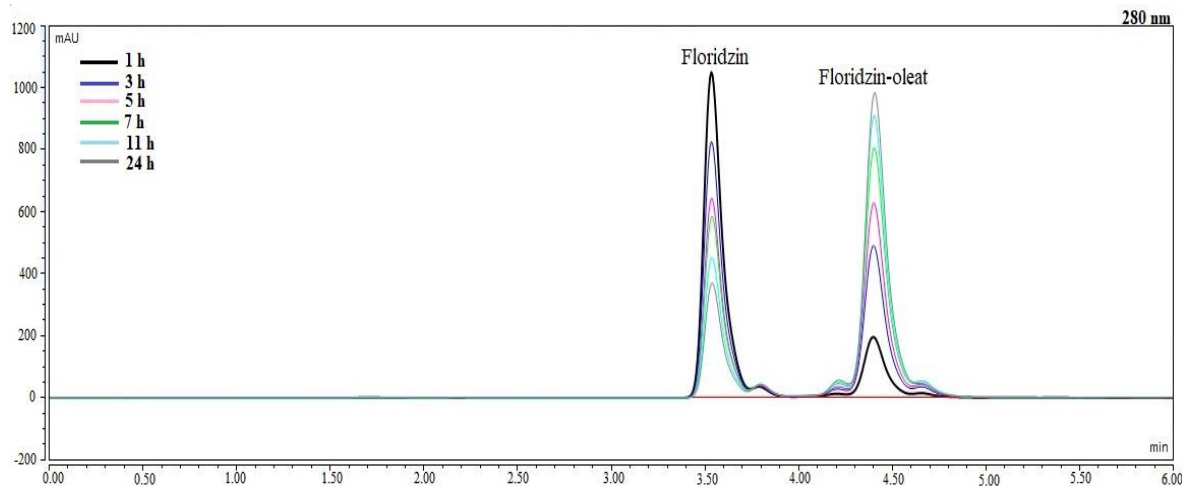
Glavni cilj istraživanja u okviru ove disertacije bio je da se ostvari doprinos u razvoju efikasnog i ekonomičnog enzimskog postupka sinteze estara flavonoida, kao i doprinos u proširenju polja primene sintetisanih proizvoda u različitim kozmetičkim formulacijama. S tim u vezi, u okviru prvog dela izvršena je optimizacija postupka esterifikacije predstavnika različitih klasa flavonoida, kako sa čistim masnim kiselinama tako i sa jeftinijim, alternativnim acil-donorima (triacetin, biljna ulja). Pored toga, u cilju razvijanja ekonomičnog postupka sinteze estara, kao zamena veoma skupom komercijalnom preparatu Novozym[®] 435, pripremljeni su novi imobilisani preparati visoke aktivnosti i stabilnosti i primenjeni u reakciji esterifikacije. U drugom delu disertacije različite smeše estara flavonoida su inkorporirane u veliki broj kozmetičkih formulacija. Ispitan je transdermalni prenos estara flavonoida iz odabranih formulacija, određeni su njihovi difuzioni profili i izračunati odgovarajući efektivni koeficijenti difuzije. Takođe, pripremljene kozmetičke formulacije sa sintetisanim estrima kao bioaktivnim jedinjenjima ispitane su sa stanovišta stabilnosti, efekta hidratacije i dermatološke kompatibilnosti.

4.1. Enzimska sinteza estara flavonoida sa masnim kiselinama kao acil-donorima

Kao što je već naglašeno u teorijskom delu, glavnu prepreku široj upotrebi flavonoida kao biološki aktivnih jedinjenja u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji predstavlja njihova slaba rastvorljivost kako u hidrofilnoj, tako i u lipofilnoj sredini. S obzirom na razne nedostatke hemijskog postupka sinteze estara flavonoida, glavni fokus prvog dela disertacije bio je na razvijanju i optimizovanju enzimskog postupka sinteze estara tri strukturno različita flavonoida, korišćenjem različitih acil-donora i primenom komercijalnog imobilisanog enzimskog preparata Novozym[®] 435.

4.1.1. Enzimska sinteza floridzin-oleata: HPLC i spektralna analiza proizvoda

U početnoj fazi istraživanja, kao preliminarni eksperiment izvođena je reakcija esterifikacije floridzina u kojoj je oleinska kiselina imala ulogu acil-donora, a kao biokatalizator reakcije korišćena je komercijalni preparat imobilisane lipaze, Novozym[®] 435. Uslovi pod kojima je izvođena reakcija (koncentracija floridzina 0,05 M, molski odnos floridzin:oleinska kiselina 1:10, koncentracija enzima 1 % (w/v), temperatura 60 °C i rastvarač aceton) odabrani su na osnovu podataka o sintezi estara flavonoida prisutnih u naučnoj literaturi. Oleinska kiselina izabrana je kao donor acil ostatka s obzirom na rezultate ostavarene u prethodnim istraživanjima na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju prilikom esterifikacije jedinjenja slične polarnosti [201]. HPLC analizom reakcione smeše dobijene nakon završetka reakcije, utvrđeno je da je reakcija esterifikacije floridzina regioselektivna, s obzirom da se samo jedan novi pik, koji nije prisutan u kontrolnom uzorku, pojavljuje na hromatogramu (slika 4.1).



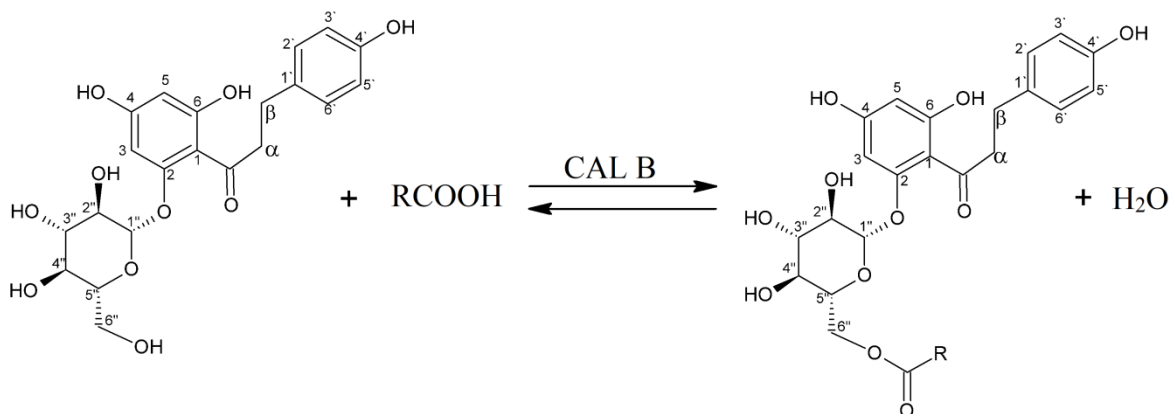
Slika 4.1 Karakterističan hromatogram sinteze floridzin-oleata katalizovane lipazom tipa B iz *C. antarctica*.

Prisustvo monoestra kao jedinog proizvoda reakcije je u saglasnosti sa literaturno dostupnim podacima o CAL B katalizovanoj esterifikaciji flavonoida [101, 114, 115, 119, 207]. Floridzin-oleat, sintetisan u preliminarnom eksperimentu je izolovan korišćenjem

semipreparativne HPLC kolone i urađen je NMR spektar dobijenog proizvoda, kako bi se potvrdila struktura sintetisanog jedinjenja i odredio položaj esterifikacije u molekulu floridzina.

Dobijen je sledeći NMR spektar: ^{13}C (125 MHz, DMSO): 204.62 (CO), 172.77 (OCO), 165.43 (C-4'), 164.47 (C-6'), 160.62 (C-2'), 155.28 (C-4), 131.47 (C-1), 129.60 (C-9'''), 129.57 (C-10'''), 129.09 (C-2, C-6), 114.94 (C-3, C-5), 105.13 (C-1'), 100.60 (C-1''), 96.92 (C-3'), 94.50 (C-5'), 76.42 (C-3''), 73.89 (C-5''), 73.10 (C-2''), 69.80 (C-4''), 63.06 (C-6''), 44.98 (C α), 33.39 (C-2'''), 31.29 (C β), 29.11 (C-7'''), 29.07 (C-12'''), 28.85 (C-15'''), 28.70 (C-4''', C-5'''), 28.60 (C-14'''), 28.52 (C-6'''), 28.49 (C-13'''), 28.43 (C-16'''), 26.59 (C-8'''), 26.57 (C-11'''), 24.37 (C-3'''), 22.10 (C-17'''), 13.92 (C-18'''). ^1H (500MHz, DMSO): 7.02 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-2', H-6'), 6.63 (d, 2H, J = 8.6 Hz, H-3', H-5'), 6.09 (s, 1H, H-3), 5.94 (s, 1H, H-5), 5.32–5.25 (m, 2H, H-9''', H-10'''), 4.96 (d, 1H, J = 7.3 Hz, H-1''), 4.30 (br d, 1H, J = 9.9 Hz, H-6''a), 4.10 (dd, 1H, J = 12 Hz i 6.6 Hz, H-6''b), 3.59 (br t, 1H, J = 7.1 Hz, H-4''), 3.48–3.28 (m, 5H, 2xH α , H-2'', H-3'', H-5''), 2.77 (br t, 2H, J = 7.3 Hz, 2xH β), 2.26 (br t, 2H, J = 7.4 Hz, 2xH-2'''), 1.98–1.91 (m, 4H, 2xH-8''', 2xH-11'''), 1.47–1.45 (m, 2H, 2xH-3'''), 1.22–1.17 (m, 20 H, 10(CH $_2$)), 0.83 (br t, 3H, J = 6.7 Hz, CH $_3$).

NMR spektralna analiza pokazala je da sintetisani proizvod ima istu strukturu kao i izolovani i okarakterisan estar sa masnom kiselinom vezanom za C6'' primarnu hidroksilnu grupu glukozne jedinice molekula floridzina [114], pa se može potvrditi da nastalo jedinjenje predstavlja floridzin-6''-O-oleat. Ovakvi rezultati su bili i očekivani s obzirom na podatke dostupne u literaturi o regioselektivnosti CAL B, koji pokazuju da se reakcija acilovanja flavonoid glikozida odigrava isključivo na slobodnoj primarnoj OH grupi šećernog ostatka molekula [114, 115, 207]. Regioselektivna esterifikacija floridzina je prikazana na slici 4.2.



Slika 4.2 Regioselektivno acilovanje flavidzina katalizovano lipazom iz *C. antarctica*.

4.1.2. Optimizacija faktora enzimske sinteze flavidzin-oleata

Estri flavonoida masnih kiselina su antioksidanti sa visokim potencijalom za prehrambenu, farmaceutsku i kozmetičku industriju. Međutim, njihova primena još uvek nije široko rasprostranjena zbog niske selektivnosti i efikasnosti tradicionalnih hemijskih katalizovanih esterifikacija, kao i neophodnosti sveobuhvatne optimizacije parametara za enzimsku sintezu radi povećanja ekonomske održivosti takvog proizvodnog procesa. Imajući to u vidu, u ovoj disertaciji biće ispitan uticaj ključnih reakcionih faktora na sintezu estara tri strukturno različita flavonoida, flavidzina, eskulina i naringina u reakciji sa oleinskom kiselinom kao acil-donorom, pri čemu će se odrediti optimalni uslovi za sintezu estara predstavnika različitih klasa flavonoida. Nakon preliminarnog eksperimenta i određene strukture sintetisanog proizvoda, uticaj ključnih reakcionih parametara, kao što su izbor medijuma, temperatura, koncentracija biokatalizatora, koncentracije supstrata i njihov molski odnos, na sintezu flavidzin-oleata je ispitan.

4.1.2.1. Izbor reakcionog medijuma

Kako bi se odredio najpovoljniji reakcioni medijum za odigravanje reakcije sinteze flavidzin-oleata u kojima je kao biokatalizator korišćena komercijalna lipaza Novozym[®] 435, reakcije acilovanja su izvođene u organskim rastvaračima širokog opsega log P vrednosti od -0,36 do 6,82 (tabela 4.1).

Tabela 4.1 Uticaj organskog rastvarača na sintezu floridzin-oleata.

Rastvarač	Log P	Stepen konverzije, %
Acetonitril	-0,36	54,65
Aceton	-0,16	28,98
<i>t</i>-Butanol	0,58	15,72
Izooktan	4.37	0,46
Dodekan	6.82	0,32

*Reakcije su izvođene na 55 °C u toku 4 dana, pri koncentracija enzima 1,5 (w/v), molskom odnosu supstrata 1:11 i koncentraciji floridzina 0,09 M. Dodavanjem rastvarača zapremine reakcionih smeša su podešene na 5ml.

Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da se acetonitril pokazao kao najbolji rastvarač za odigravanje reakcije esterifikacije floridzina, s obzirom na ostvaren najveći stepen konverzije (54,65 %), mada se značajan stepen konverzije ostvaruje i u reakcijama izvođenim u acetonu i *t*-butanolu (tabela 4.1). Sa druge strane, u reakcijama u kojima su izooktan i dodekan korišćeni kao rastvarači, vrlo male količine floridzin-oleata su detektovane u reakcionoj smeši, što se može objasniti slabom rastvorljivošću ovih hidrofilnih molekula u tako hidrofobnim medijumima.

Iako su za upotrebu lipaza u reakcijama esterifikacije poželjniji hidrofobniji rastvarači [127], dobra aktivnost CAL B u acetonitrilu, acetonu i piridin/acetonitril smeši je primećena i u prethodnim istraživanjima o esterifikaciji flavonoida [101, 109, 114, 121, 123], što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Nešto niža aktivnost CAL B u sintezi estara floridzina u *t*-butanolu je donekle iznenađujuća, pošto su visoki prinosi estara drugih flavonoida ranije postignuti u istom rastvaraču [93], kao i zbog činjenice da je to rastvarač koji se najčešće koristi u reakcijama esterifikacije molekula sličnih polariteta, kao što su estri vitamina C [208, 209]. Do sada izuzetak je bilo samo istraživanje Vatanabea i saradnika gde je drastično niži stepen konverzije detektovan u *t*-amil alkohol i *t*-butanolu nego u acetonitrilu [129]. Prema literaturi, niska esterifikaciona aktivnost u *t*-butanolu se može pripisati činjenici da se floridzin, zbog prisustva brojnih hidroksilnih grupa, vezuje za tercijarne alkohole mnogo jače nego za nitrilnu grupu acetonitrila [129]. Prema tome, iako je rastvorljivost floridzina u tercijarnim alkoholima visoka, mobilnost od medija do

aktivnog mesta katalizatora može biti niska. Pa tako, s obzirom na ostvarene rezultate, acetonitril je izabran kao najpogodniji medijum za odigravanje esterifikacije floridzina i svi naredni eksperimenti izvedeni su u ovom rastvaraču.

4.1.2.2. Optimizacija reakcionih faktora metodom odzivnih površina

Nakon odabranog odgovarajućeg organskog rastvarača, uticaj najvažnijih reakcionih faktora, kao što su temperatura, reakciono vreme, molski odnos supstrata, koncentracija floridzina i koncentracija biokatalizatora, na sintezu floridzin-oleata je ispitan. Za razliku od konvencionalne metode optimizovanja reakcionih uslova u kojoj se varira parametar po parametar pri fiksiranim vrednostima ostalih parametara i koja ne pruža informacije o interakcijama između istih, za optimizaciju kompleksnih procesa centralni kompozitni rotabilni plan (CCRD) i metoda odzivnih površina (RSM) se smatraju pogodnim statističkim metodama. Korišćenjem statističkih metoda planiranja, moguće je dobiti informaciju o postojanju i prirodi interakcija između parametara, a osim toga ovaj pristup pojednostavljuje ispitivanje, smanjuje se broj eksperimenata neophodnih za nalaženje optimalnih uslova reakcije, čime se direktno smanjuju troškovi istraživanja. Uspešna primena ovih metoda u optimizaciji sinteze estara katalizovanih lipazama [210, 211] je zapažena, a primećena je i primena ovih metoda planiranja u sintezi različitih estara flavonoida [98, 212]. Zbog toga, optimizacija ključnih reakcionih faktora sinteze floridzin-oleata je izvedena primenom ovih metoda.

Prilikom optimizacije sinteze floridzin-oleata, primenjen je centralni kompozitni plan koji uključuje 32 eksperimentalne tačke (16 faktorskih, 10 aksijalnih i 6 centralnih), pri čemu je pet pomenutih reakcionih faktora varirano na pet nivoa vrednosti. U tabeli 4.2 su prikazane stvarne i kodirane vrednosti eksperimentalnih faktora. Izbor eksperimentalnih faktora i opsega vrednosti baziran je na osnovu literaturno dostupnih podataka iz prethodnih studija koje su se bavile problematikom enzimske sinteze estara različitih flavonoida [93, 101, 119].

Tabela 4.2 Kodirane i stvarne vrednosti parametara primenjene u eksperimentalnom planu.

Faktori	Kodirane vrednosti				
	-2	-1	0	1	2
Vreme, X_1 (dan)	1,0	2,5	4,0	5,5	7,0
Temperatura, X_2 (°C)	35	45	55	65	75
Koncentracija enzima, X_3 (% w/v)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Molski odnos supstrata, X_4	1:3	1:7	1:11	1:15	1:19
Koncentracija floridzina, X_5 (M)	0,01	0,05	0,09	0,13	0,17

Metoda odzivnih površina korišćena je za određivanje regresionog modela drugog reda, opisujući pojedinačne i kombinovane uticaje reakcionih parametara na dva odabrana odziva: stepen konverzije limitirajućeg supstrata (Y_1 , %) i specifični prinos proizvoda (Y_2 , mmol estra/g_{enzima}), određujući optimalne vrednosti ispitanih faktora. Svi eksperimenti su izvođeni pri molarnom višku oleinske kiseline pa je stoga kao izlazna veličina računat stepen konverzije floridzina kao limitirajućeg supstrata. Specifični prinos proizvoda kao izlazni parametar je korišćen s obzirom da je visoka cena enzima značajan ograničavajući faktor koji utiče na razvoj ekonomski efikasnog postupka sinteze estara floridzina katalizovanog lipazama, kao i zbog činjenice da je u prethodnim studijama pokazano da optimalne vrednosti reakcionih parametara variraju u zavisnosti od odabrane izlazne veličine [210]. Eksperimentalni plan kao i ostvareni rezultati prikazani su u tabeli 4.3. Najveći stepen konverzije (76,20 %) ostvaren je u eksperimentu 17 pri maksimalnoj vrednosti reakcionog vremena (2) i centralnim vrednostima (0) ostalih faktora. Sa druge strane, maksimalni specifični prinos proizvoda (5,15 mmol/g_{enzima}) postignut je u eksperimentu 22 pri najmanjoj koncentraciji biokatalizatora (-2) i centralnim vrednostima (0) ostalih parametara, što ukazuje na činjenicu da postoji značajna razlika u uticaju faktora na različite izlazne veličine.

Regresioni modeli drugog reda koji opisuju uticaj faktora na izlazne veličine dobijeni su nakon Fišerovog testa adekvatnosti modela i Studentovog testa značajnosti ispitivanih parametara.

Tabela 4.3 Eksperimentalni plan i ostvareni rezultati.

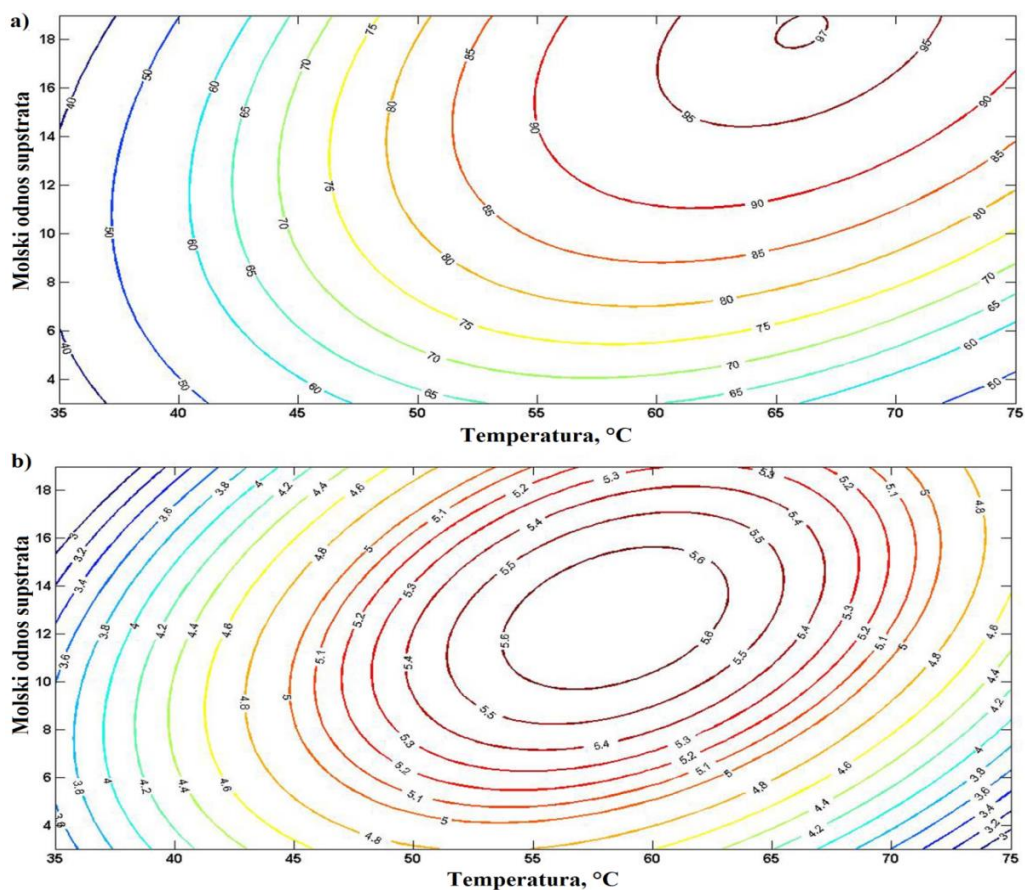
Eksp.	Reak. vreme X_1 [dan]	Temperatura X_2 [°C]	Konc. enzima X_3 [% (w/v)]	Molski odnos supstrata X_4	Koncentracija floridzina X_5 [M]	Stepen konverzije Y_1 [%]	Specifični prinos Y_2 [mmol/ genzima]
1	1	1	1	1	1	30,96	2,01
2	1	1	1	-1	-1	55,40	1,38
3	1	1	-1	1	-1	60,80	3,04
4	1	1	-1	-1	1	19,08	2,48
5	1	-1	1	1	-1	51,60	1,29
6	1	-1	1	-1	1	13,48	0,87
7	1	-1	-1	1	1	14,66	1,90
8	1	-1	-1	-1	-1	44,50	2,22
9	-1	1	1	1	-1	58,10	1,45
10	-1	1	1	-1	1	9,48	0,61
11	-1	1	-1	1	1	17,80	2,31
12	-1	1	-1	-1	-1	36,70	1,84
13	-1	-1	1	1	1	10,97	0,71
14	-1	-1	1	-1	-1	31,55	0,79
15	-1	-1	-1	1	-1	17,10	0,86
16	-1	-1	-1	-1	1	10,88	1,41
17	2	0	0	0	0	76,20	4,57
18	-2	0	0	0	0	18,20	1,09
19	0	2	0	0	0	14,30	0,86
20	0	-2	0	0	0	13,90	0,84
21	0	0	2	0	0	61,60	2,22
22	0	0	-2	0	0	28,60	5,15
23	0	0	0	2	0	30,44	1,82
24	0	0	0	-2	0	31,52	1,89
25	0	0	0	0	2	7,75	0,87
26	0	0	0	0	-2	56,25	0,37
27	0	0	0	0	0	33,80	2,02
28	0	0	0	0	0	43,28	2,60
29	0	0	0	0	0	39,30	2,36
30	0	0	0	0	0	42,00	2,52
31	0	0	0	0	0	33,50	2,01
32	0	0	0	0	0	37,60	2,25

Nakon eliminacije članova koji nisu bili statistički značajni predstavljeni su konačni regresioni modeli drugog reda koji opisuju uticaj reakcionih faktora na stepen konverzije floridzina, Y_1 (jednačina 4.1) i na specifični prinos proizvoda, Y_2 (jednačina 4.2).

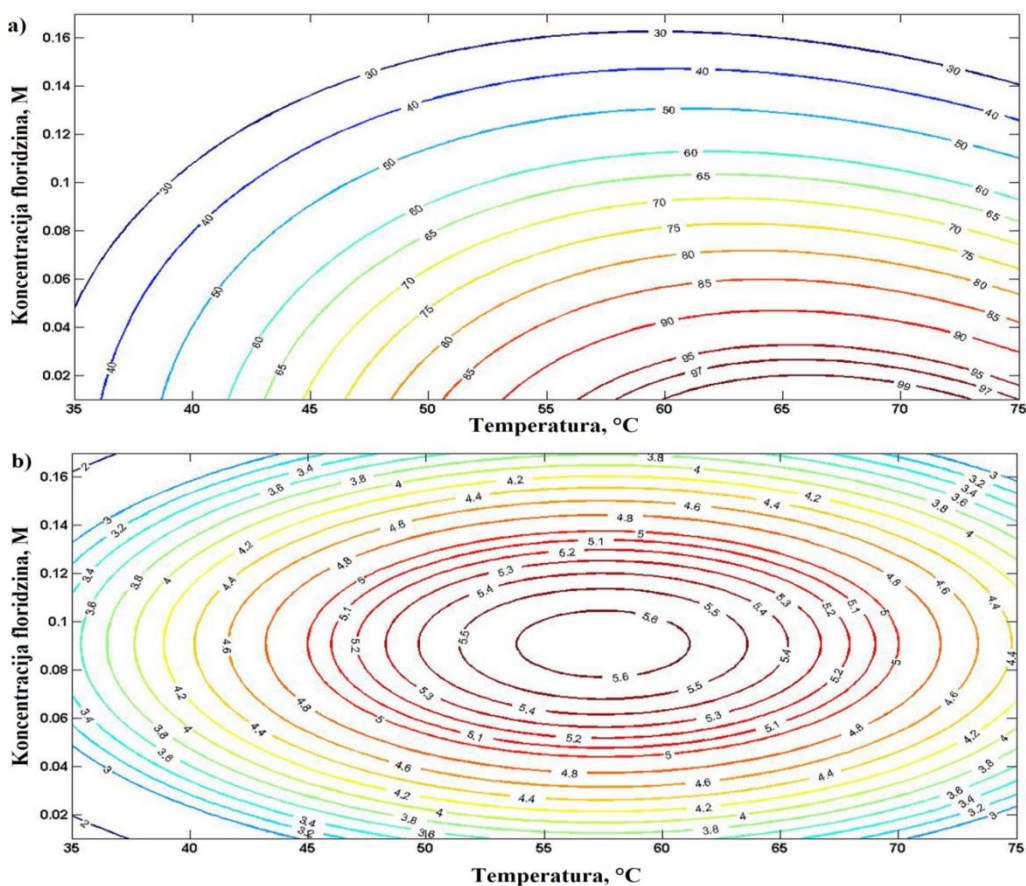
$$Y_1 (\%) = 41,5 + 8,91X_1 + 3,93X_2 + 4,42X_3 + 1,62X_4 - 13,6X_5 - 2,49X_1X_5 + 3,32X_2X_4 - 2,43X_2X_5 + 2,66X_3X_4 - 6,74X_2^2 - 2,52X_4^2 - 2,26X_5^2 \quad (4.1.)$$

$$Y_2 (\text{mmol}/g_{\text{enzima}}) = 2,43 + 0,51X_1 + 0,21X_2 - 0,53X_3 + 0,076X_4 + 0,02X_5 + 0,19X_2X_4 - 0,42X_2^2 + 0,28X_3^2 - 0,17X_4^2 - 0,48X_5^2 \quad (4.2)$$

Svi ispitani reakcioni faktori su značajni i uključeni su u oba regresiona modela. Takođe, u oba modela, temperatura (X_2), molski odnos supstrata (X_4) i koncentracija floridzina (X_5) učestvuju sa negativnim kvadratnim koeficijentima, pa se njihov uticaj na obe izlazne veličine može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom (slike 4.3 i 4.4).

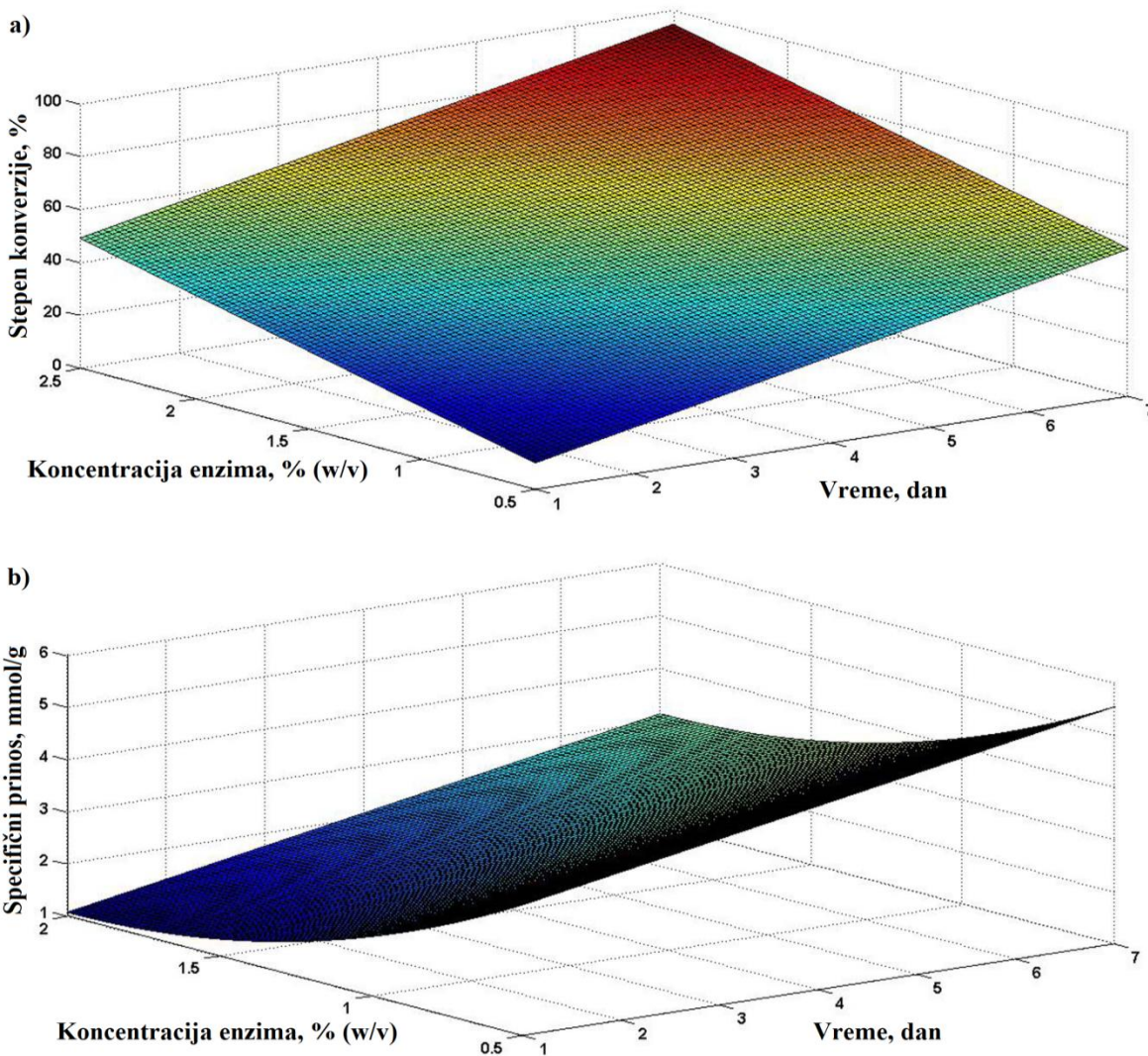


Slika 4.3 Konturni dijagrami uticaja molskog odnosa supstrata i temperature na: a) stepen konverzije floridzina i b) specifični prinos proizvoda. Reakciono vreme je bilo fiksirano na 6,25 (a) i 7 (b) dana, koncentracija enzima na 2,25 (a) i 0,5 % (w/v) (b) i koncentracija floridzina na 0,01 (a) i 0,09 M (b).



Slika 4.4 Konturni dijagrami uticaja koncentracije floridzina i temperature na: a) stepen konverzije floridzina i b) specifični prinos proizvoda. Reakciono vreme je bilo fiksirano na 6,25 (a) i 7 (b) dana, koncentracija enzima na 2,25 (a) i 0,5 % (w/v) (b) i molski odnos supstrata na 1:19 (a) i 1:11 (b).

Najveću razliku između dva dobijena regresiona modela čini uticaj koncentracije lipaze (X_3) što je prikazano na slici 4.5, koja prikazuje efekat koncentracije lipaze i reakcionog vremena na obe izlazne veličine. Može se primetiti da stepen konverzije i specifični prinos rastu sa povećanjem vremena trajanja reakcije. Sa druge strane, sa porastom koncentracije lipaze stepen konverzije floridzina linearno raste (slika 4.5a), dok specifični prinos proizvoda naglo opada (slika 4.5b). Ovo jasno ukazuje na činjenicu da korišćenje visokih koncentracija enzima nije potpuno opravdano, s obzirom da povećanje stepena konverzije nije bilo srazmerno povećanju koncentracije biokatalizatora, a značajno doprinosi povećanju troškova proizvodnje.



Slika 4.5 Odzivna površina uticaja koncentracije enzima i reakcionog vremena na: a) stepen konverzije floridzina i b) specifični prinos proizvoda. Temperatura je bila fiksirana na 65 °C (a i b), koncentracija floridzina na 0,05 (a) i 0,09 M (b) i molski odnos supstrata na 1:19 (a) i 1:11 (b).

Uticaj temperature (X_2) na dve izlazne veličine takođe je različit. Regresioni model za stepen konverzije (jednačina 4.1) uključuje dva koeficijenta koji opisuju interakciju između temperature i drugih faktora, pa tako koeficijent β_{25} (-2,43) ukazuje na negativnu interakciju između temperature i koncentracije floridzina, dok koeficijent β_{24} (3,32) ukazuje na pozitivnu interakciju između temperature i molskog odnos supstrata. Kao posledica ovih

interakcija, temperaturni optimum se pomera ka većim vrednostima sa povećanjem molskog odnosa supstrata (slika 4.3a) i smanjenjem koncentracije floridzina (slika 4.4b), ukazujući da je optimalna temperatura za dobijanje maksimalnog stepena konverzije floridzin-oleata zapravo 66 °C. Sa druge strane, model koji opisuje uticaj reakcionih faktora na specifični prinos proizvoda (jednačina 4.2) uključuje samo jednu, manje intenzivnu interakciju između temperature i molskog odnosa supstrata β_{24} (0,19), što za posledicu ima nešto niži temperaturni optimum (58 °C) slika 4.3b i 4.4b.

Optimalne koncentracije floridzina (X_5) se takođe razlikuju u zavisnosti od analizirane izlazne veličine, s obzirom da je najveći stepen konverzije ostvaren pri najmanjoj početnoj koncentraciji floridzina (0,01 M, slika 4.4a), dok je najveći specifični prinos estera postignut pri koncentraciji floridzina od 0,09 M (slika 4.4b). Što se tiče optimalnih vrednosti za molski odnos supstrata (X_4), primećena su manja odstupanja, pa su tako molski odnosi flavonoid:oleinska kiselina 1:18 i 1:13 bili optimalni za postizanje maksimalnog stepena konverzije i specifičnog prinosa, redom (slika 4.3).

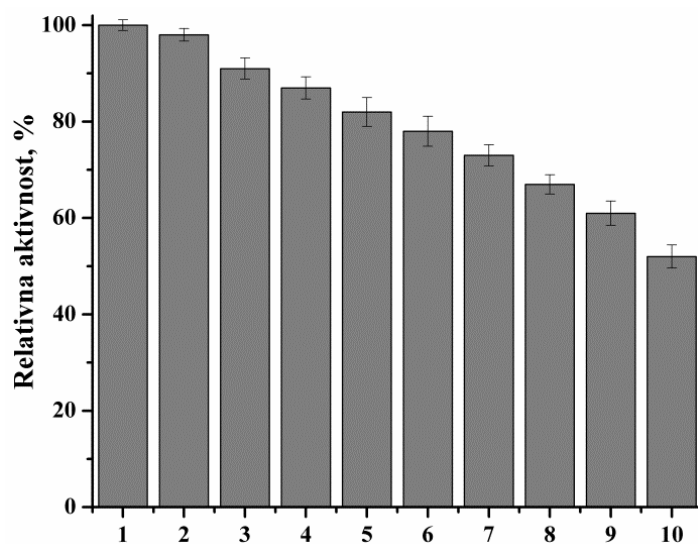
Očigledno je da optimizacija zasnovana samo na stepenu konverzije kao izlaznoj veličini, koja se koristi u većini studija o reakcijama katalizovanim lipazama, može dati pogrešne informacije, s obzirom da veoma visoka potrošnja enzima pri niskim koncentracijama supstrata dovode do postizanja visokih stepena konverzije [115, 129]. Već je primećeno da optimizacija zasnovana na specifičnom prinosu proizvoda kao izlaznoj veličini daje mnogo bolji uvid u produktivnost enzimskog procesa, a samim tim i povećanju ekonomičnosti procesa [210]. Naravno, treba napomenuti da će realni prinosi biti uvećani višestrukom upotrebom enzima ili primenom u kontinualnim procesima. Značaj optimizacije metodom statističkog planiranja pokazuje činjenica da su vrednosti specifičnih prinosa dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji značajno veće u poređenju sa prinosima objavljenim u studijama sinteze estera floridzina i masnih kiselina dugog lanca (0,73 mmol/g) [115], kao i u istraživanju o esterifikaciji floridzina sa laurinskom kiselinom (1,25 mmol/g) [129], koji su izvedeni bez ove vrste optimizacije.

4.1.2.2.1. Provera adekvatnosti modela

U cilju ocene adekvatnosti dobijenih modela, izvedeni su dodatni eksperimenti pod optimalnim vrednostima ispitivanih parametara dobijenih za obe izlazne veličine. U reakciji izvedenoj pri optimalnim uslovima za prvu izlaznu veličinu (vreme 7 dana, temperatura 66 °C, koncentracija lipaze 2,5 % (w/v), molski odnos supstrata 1:18 i koncentracija floridzina 0,01 M), ostvaren je stepen konverzije od 95,2 %, što predstavlja relativnu grešku modela od 2,8 %. Pri ovim uslovima produktivnost procesa sinteze iznosi 1,36 mM/danu. Sa druge strane, u reakciji izvedenoj pri optimalnim uslovima za specifični prinos proizvoda (vreme 7 dana, temperatura 58 ° C, koncentracija lipaze 0,5 % (w/v), molski odnos supstrata 1:13 i koncentracija floridzina 0.09 M), dobijeno je 5,45 mmol proizvoda po g enzima, što odgovara produktivnosti od 3,89 mM/dan, a predstavlja samo 3,2 % odstupanja od predviđene vrednosti. Postignuti rezultati u ovim eksperimentima ukazuju da modeli (jednačine 4.1 i 4.2) obezbeđuju dobro predviđanje i da je primena statističkog planiranja pri optimizaciji reakcionih parametara sasvim opravdana.

4.1.2.2.2. Operativna stabilnost Novozym® 435

Nakon završene optimizacije reakcije sinteze floridzin-oleata bilo je potrebno ispitati operativnu stabilnost i aktivnost korišćenog imobilisanog enzima, Novozym® 435 u pomenutoj reakciji. Esterifikacija floridzina sprovedena je pri prethodno optimizovanim reakcionim uslovima (65 °C, koncentraciji floridzina 0,01 M, molskom odnosu supstrata 1:18 i koncentraciji enzima 2,5 % (w/v)), a pomenuta količina enzima korišćena je u 10 uzastopnih reakcionih ciklusa. Nakon svakog ciklusa određen je relativni prinos proizvoda i dobijeni rezultati predstavljeni su na slici 4.6. Može se primetiti skoro linearan pad relativne aktivnosti korišćenog biokatalizatora tokom niza uzastopnih reakcija, pa je na kraju desetog ciklusa zadržano oko 50 % početne aktivnosti.

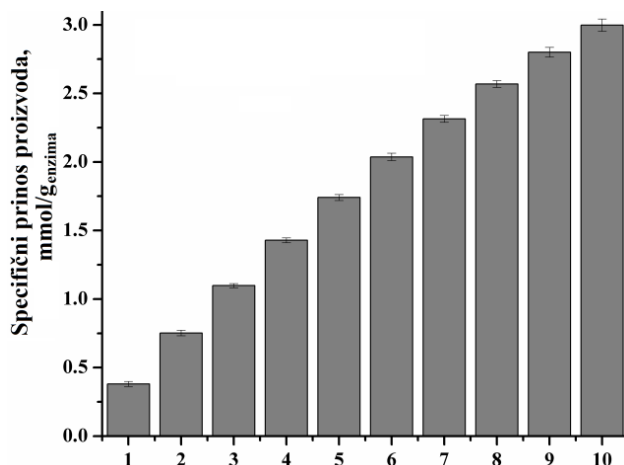


Slika 4.6 Operativna stabilnost Novozym® 435.

Pored toga, nakon svakog ciklusa esterifikacije, ispitan je sadržaj proteina u reakcionoj smeši i proteini nisu detektovani u medijumu, što ukazuje na to da tokom reakcije sinteze nije došlo do desorpcije lipaze sa nosača. Imajući to u vidu, pretpostavlja se da je do gubitka aktivnosti lipaze došlo usled kombinovanog efekta visoke temperature i polarnosti korišćenog rastvarača. Ovi rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima objavljenim od strane više autora koji su koristili isti biokatalizator u reakcijama esterifikacije na istim temperaturama i u sistemima slične hidrofobnosti [210, 213]. Na primer, Zeng i saradnici su pokazali da je Novozym® 435 zadržao ~ 50 % početne aktivnosti nakon 7 ciklusa sinteze flavonoid estra, rutin-linoleata, izvođenog u smeši rastvarača aceton:*t*-amil alkohol 2:1 na 50 °C [213]. Može se pretpostaviti da je polarnost korišćenog rastvarača najbitniji faktor koji utiče na smanjenje aktivnosti imobilisane lipaze, s obzirom da je to više puta i u literaturi naglašavano [127, 214]. Novozym® 435 sadrži CAL B adsorbovanu na jonoizmenjivačku smolu, a enzimi adsorbovani na taj način su podložniji konformacijskim promenama.

Takođe, izračunat je i kumulativni specifični prinos floridzin-oleata nakon svakog ciklusa (slika 4.7). Primećuje se rast specifičnog prinosa, pri čemu se nakon desetog ciklusa

ostvaruje ukupan prinos od 2,99 mmol/g_{enzima}, dok je ukupna produktivnost korišćenog biokatalizatora tokom ispitivanja operativne stabilnosti iznosila 0,213 mmol/g/h.

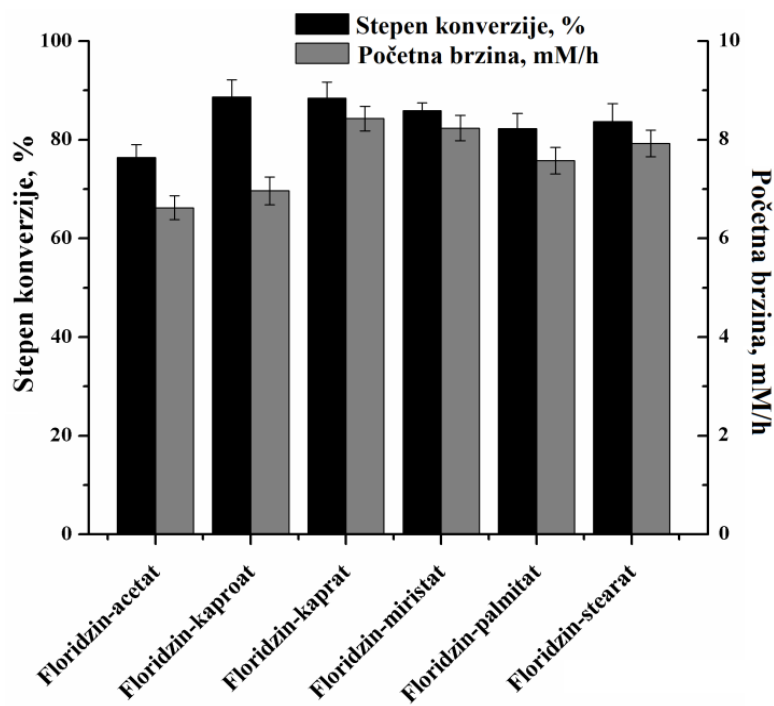


Slika 4.7 Specifični prinos floridzin-oleata ostvaren tokom korišćenja Novozym[®] 435 u deset uzastopnih reakcija esterifikacije.

4.1.2.3. Uticaja dužine lanca karboksilnih kiselina na esterifikaciju floridzina

Estri floridzina i različitih masnih kiselina mogu biti sintetisani korišćenjem velikog broja acil-donora, pri čemu se dobijaju proizvodi različite lipofilnosti što ih čini pogodnim za različite primene. Zbog toga, ispitan je veliki broj karboksilnih kiselina kao acil-donora, s ciljem utvrđivanja uticaja dužine i stepena nezasićenosti ugljovodoničnog lanca na sintezu estara floridzina.

U prvom delu eksperimenta, radi ispitivanja uticaja dužine lanca acil-donora na stepen konverzije limitirajućeg supstrata, korišćene su različite zasićene masne kiseline: sirćetna (etanska), kapronska (heksanska), kaprinska (dekanska), miristinska (tetradekanska), palmitinska (heksadekanska) i stearinska (oktadekanska) kiselina. Reakcije su izvedene pri prethodno utvrđenim optimalnim uslovima. Ostvareni rezultati su pokazali da dužina lanca masne kiseline nema velikog uticaja na stepen konverzije s obzirom da su ostvareni visoki stepeni konverzije, iznad 75 %, u reakcijama sa svim masnim kiselinama, što ih čini dobrim supstratima za sintezu estara (slika 4.8).



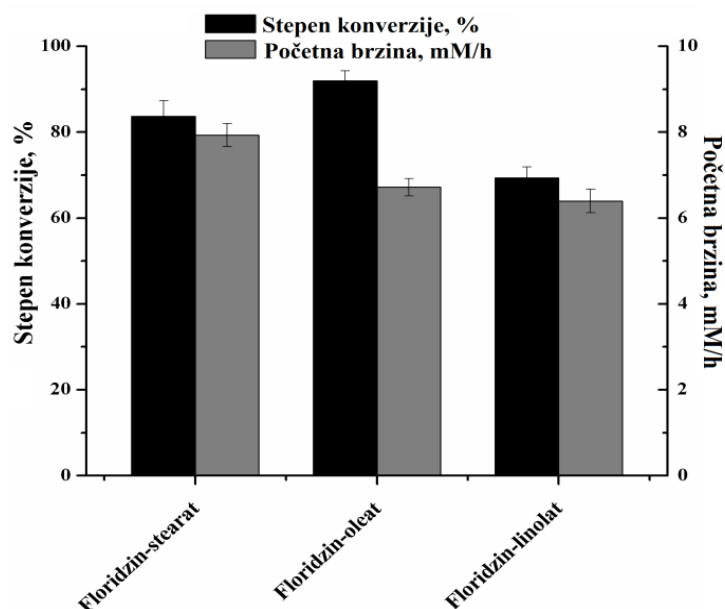
Slika 4.8 Uticaj dužine lanca masne kiseline na stepen konverzije i početnu brzinu esterifikacije floridzina. Reakcije su izvođene na 65 °C tokom 7 dana, pri koncentraciji floridzina 0,01 M, molskom odnosu supstrata 1:15 i koncentraciji enzima 1,5 % (w/v).

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u studiji prilikom ispitivanja uticaj karboksilnih kiselina srednje dužine lanca (C₈-C₁₂) na esterifikaciju dva flavonoida, naringina i rutina, katalizovanu istim enzimskim preparatom [101]. Aradhaou i saradnici takođe su pokazali da dužina lanca masne kiseline (C₁₂-C₁₈) nema značajnog uticaja na stepen konverzije i početne brzine u reakciji esterifikacije eskulina i rutina [97]. Međutim, u drugoj studiji prilikom ispitivanja uticaja dužine lanca masne kiseline (C₄-C₁₈) na esterifikaciju izokvercitrina, pokazano je da stepen konverzije limitirajućeg supstrata opada sa povećanjem broja C atoma u lancu masne kiseline [76]. Sa slike 4.8 može se uočiti da je najmanji stepen konverzije ostvaren u reakciji sa sirćetnom kiselinom. Nešto manji afinitet Novozym[®] 435 ka sirćetnoj kiselini je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima i može biti pripisan padu pH vrednosti u mikrookruženju biokatalizatora [215] ili „dead-end“ inhibiciji [216] do koje dolazi korišćenjem početnih koncentracija sirćetne kiseline sličnim kao u našim eksperimentima.

Bolji uvid u afinitet enzima ka različitim supstratima se ipak može dobiti analizom početnih brzina reakcije sinteze estara. Može se primetiti (slika 4.8) da CAL B pokazuje najveći afinitet ka masnim kiselinama sa više od 6 C atoma, s obzirom da su početne brzine u reakcijama sa sirćetnom i kaprionskom kiselinom bile značajno manje u poređenju sa početnim brzinama ostvarenim sa ostalim kiselinama. Ovi rezultati su iznenađujući, s obzirom da je već pomenuto da CAL B ima visok afinitet ka masnim kiselinama kratkog i srednjeg lanca (do C₇) usled prisustva vrlo uskog pojasa za vezivanje u aktivnom centru CAL B oblika levka [125]. Međutim, dobijeni rezultati mogu biti objašnjeni razlikama u hidrofobnosti reakcionog medijuma, što sa jedne strane može uticati na aktivnost pomenutog enzima, a sa druge strane na rastvorljivost floridzina (log P 0,44) i njegovu raspoloživost [217]. Očigledno je da hidrofobniji sistem u kojem su prisutne masne kiseline srednjeg i dugog lanca (preko 6 C atoma), omogućava postizanje većih početnih brzina u odnosu na sistem u kojem su korišćene kiseline kratkog lanca.

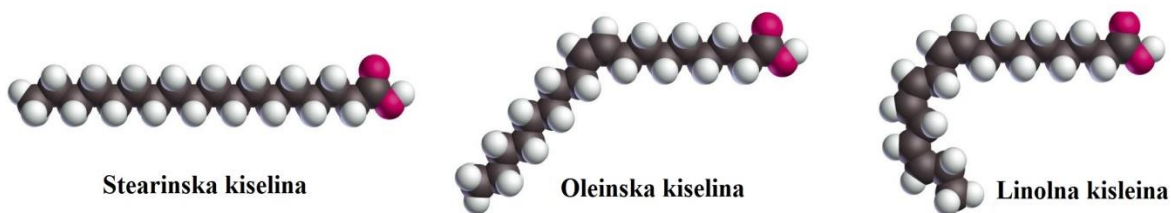
4.1.2.4. Uticaja stepena nezasićenosti lanca masne na esterifikaciju floridzina

Dodatno, ispitan je uticaj stepena nezasićenosti lanca masne kiseline na sintezu estara floridzina. Kao acil-donori korišćene su masne kiselina sa 18 C atoma i to zasićena stearinska kiselina, zatim mononezasićena oleinska kiselina i linolna kiselina koja sadrži dve dvostruke veze. Rezultati pokazuju (slika 4.9) da su ostvareni veoma visoki stepeni konverzije floridzina kao limitirajućeg supstrata u svim reakcijama, od 70 do 90 %, pa se stearinska, oleinska i linolna kiselina mogu svrstati u odgovarajuće acil-donore, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u studiji sprovedenoj od strane Ziulaha i saradnika [114].



Slika 4.9 Uticaj stepena nezasićenosti lanca masne kiseline na stepen konverzije i početnu brzinu esterifikacije floridzina. Reakcije su izvođene na 65 °C tokom 7 dana, pri koncentraciji floridzina 0,01 M, molskom odnosu 1:15 i koncentraciji enzima 1,5 % (w/v).

Poređenjem dobijenih stepena konverzije, može se uočiti da primena mononezasićene oleinske kiseline obezbeđuje stepen konverzije od 90 %, što je rezultat koji obezbeđuje čvrstu osnovu za dalji razvoj enzimskog postupka i potvrđuje činjenicu da je izbor oleinske kiseline kao model kiseline u reakciji optimizacije bio opravdan. Sa druge strane, može se primetiti da sa povećanjem broja dvostrukih veza u molekulu acil-donora dolazi do smanjenja početnih brzina reakcije esterifikacije. Ovo se može pripisati oteženom pristupu oleinske i linolne kiseline aktivnom centru lipaze, s obzirom na njihovu glomaznu nelinearnu konformaciju koja je posledica *cis*-konformacije dvostruke veze, koja delimično otežava formiranje acil-enzim kompleksa (slika 4.10).



Slika 4.10 Prostorne konformacije korišćenih masnih kiselina.

4.1.3. Antioksidativna aktivnost sintetisanih estara floridzina

U prethodnom poglavlju opisano je da se enzimaska sinteza estara floridzina može uspešno izvesti korišćenjem karboksilnih kiselina sa različitim brojem C atoma (C_2 - C_{18}) i različitog stepena nezasićenosti. Za dalju primenu sintetisanih estara, veoma je bitno ispitati i fiziološka svojstva sintetisanih proizvoda. U cilju određivanja antioksidativne aktivnosti ispitana je mogućnost uklanjanja slobodnih radikala sintetisanim estrima i upoređena sa aktivnošću polaznog molekula, floridzina. U tu svrhu, korišćen je DPPH metod i dobijeni rezultati predstavljeni su u tabeli 4.4.

Tabela 4.4 Sposobnost uklanjanja DPPH radikala floridzina i njegovih estara

Jedinjenje	IC ₅₀ , mM
Floridzin	1,148±0,038
Floridzin-acetat	4,768±0,148
Floridzin-kaproat	3,162±0,072
Floridzin-kaprinat	2,640±0,110
Floridzin-miristat	2,214±0,074
Floridzin-palmitat	3,136±0,086
Floridzin-stearat	4,434±0,124
Floridzin-oleat	2,372±0,072
Floridzin-linoleat	3,913±0,093

Kada je reč o uticaj dužine lanca masne kiseline sintetisanih estara na sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, primećeno je da generalno svi ispitani estri floridzina imaju manju antioksidativnu aktivnost (više IC₅₀ vrednosti) u poređenju sa polaznim molekulom floridzinom, čija je IC₅₀ vrednost 1,15. Najveći kapacitet uklanjanja slobodnih radikala pokazao je floridzin-miristat čija IC₅₀ vrednost iznosi 2,21 mM, dok floridzin-acetat i floridzin-stearat pokazuju najniže antioksidativne aktivnosti. Pored toga, kada je ispitan uticaj stepena zasićenosti acil-donora (stearinska, oleinska i linolna kiselina) na antioksidativnu aktivnost estara, pokazano je da floridzin-oleat ima najbolje antioksidativne osobine sa IC₅₀ vrednošću 2,37 mM.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je sposobnost uklanjanja slobodnih radikala floridzina delimično očuvana nakon reakcije esterifikacije sa različitim masnim kiselinama i da većina estara pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost. Iako su estri slabiji antioksidanti u poređenju sa čistim floridzinom, oni su takođe i lipofilniji što ih čini efikasnijim u hidrofobnom mediju. Pored toga, pretpostavlja se i da je konverzijom polaznog molekula flavonoida u amfifilne molekule pomoću reakcije esterifikacije, njegova interakcija sa membranskim proteinima ili receptorima poboljšana i da je apsorpcija kroz ćelijsku membranu olakšana, što povećava njegovu bioraspoloživost i mogućnost primene u različitim kozmetičkim proizvodima [114].

4.1.4. Optimizacija enzimske sinteze estara naringina i eskulina

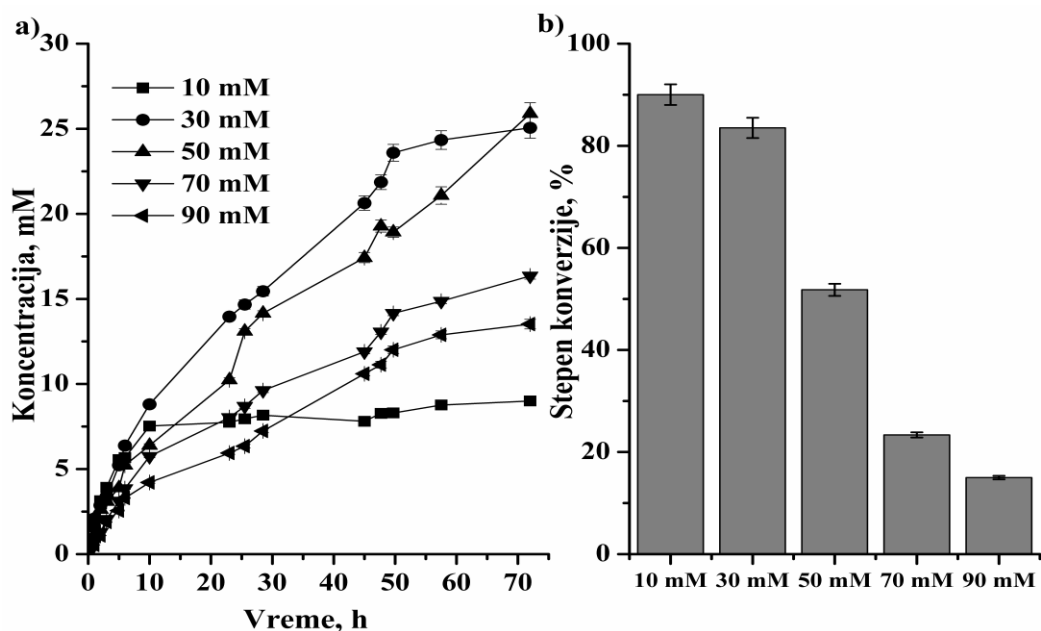
Nakon detaljno sprovedene optimizacije reakcije esterifikacije floridzina kao model flavonoida korišćenjem statističkih metoda planiranja, dalji plan istraživanja se zasnivao na ispitivanju uticaja različitih reakcionih parametara na reakciju esterifikacije druga dva flavonoida, naringina i eskulina, radi utvrđivanja uticaja različite strukture acil-akceptora na tok reakcije. S obzirom na rezultate dobijene prilikom optimizacije sinteze floridzin-oleata, jasno je da koncentracija flavonoida i molski odnos supstrata imaju najviše uticaja na sintezu estara. Shodno tome, ispitan je uticaj ova dva reakciona faktora na reakciju acilovanja naringina i eskulina i određene su optimalne vrednosti za maksimalni prinos sintetisanih estara.

4.1.4.1. Uticaj koncentracije flavonoida

Važan parametar koji utiče na reakciju esterifikacije je koncentracija flavonoida, s obzirom da je količina ovog supstrata uslovljena njegovom rastvorljivošću u reakcionom medijumu. Reakcije acilovanja eskulina i naringina su opisane od strane drugih autora [12, 14, 97, 99, 119], ali podaci o uticaju početne koncentracije flavonoida na tok reakcije nisu pronađeni. Shodno tome, ispitan je uticaj početnih koncentracija flavonoida, naringina i eskulina, na stepen konverzije limitirajućeg supstrata i prinos sintetisanog estera u reakciji sa oleinskom kiselinom kao acil-donorom. S obzirom na rezultate dobijene prilikom optimizacije sinteze floridzin-oleata, reakcija esterifikacije naringina i eskulina izvođene su takođe u

acetonitrilu kao reakcionom medijumu, dok su koncentracije flavonoida varirane u opsegu od 10 do 90 mM. Korišćen molski odnos flavonoid:oleinska kiselina tokom ovih eksperimenata bio je 1:13 s obzirom da taj odnos predstavlja optimalni molski odnos dobijen u reakciji sinteze floridzin-oleata za specifični prinos kao izlaznu veličinu.

Kada je reč o reakciji esterifikacije naringina, na slici 4.11a predstavljeni su koncentracioni profili sintetisanog estra, naringin-oleata, pri različitim početnim koncentracijama flavonoida. Može se primetiti da je nakon 72 h trajanja reakcije najveći prinos proizvoda, oko 25 mM, ostvaren u eksperimentima pri početnoj koncentraciji naringina od 30, odnosno 50 mM, dok se pri drugim ispitanim početnim koncentracijama naringina ostvaruju znatno niži prinosi.



Slika 4.11 Uticaj koncentracije naringina na a) prinos proizvoda i b) stepen konverzije.

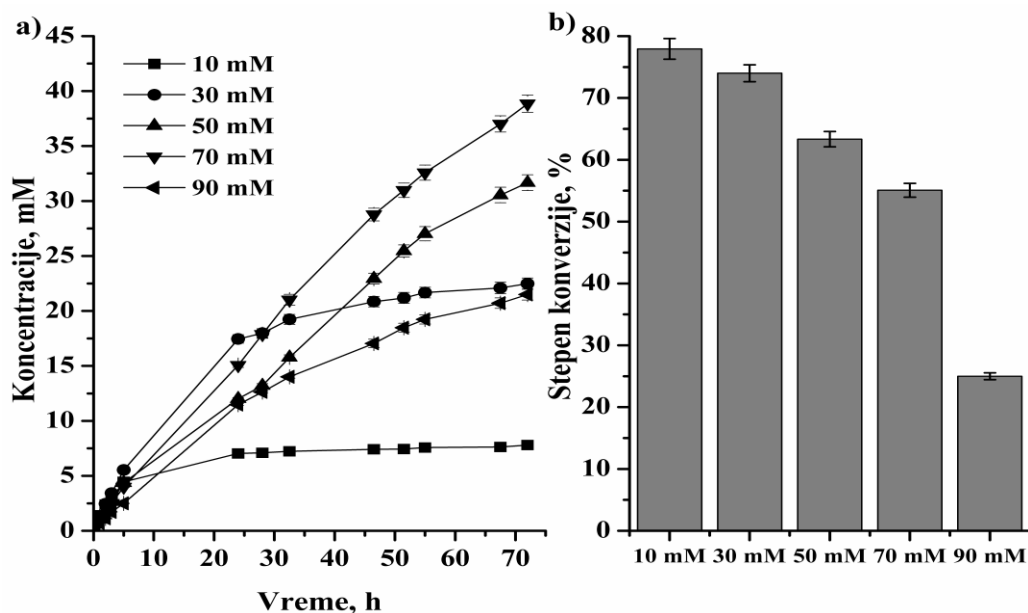
Sa druge strane, ukoliko se posmatra uticaj početne koncentracije naringina na stepen konverzije limitirajućeg supstrata, može se primetiti pad ostvarenog stepena konverzije sa povećanjem početne koncentracije acil-akceptora, pa tako pri manjim koncentracijama naringina, ostvaruje se stepen konverzije preko 80 %, dok u slučaju kada je početna koncentracija naringina 90 mM, ostvaren stepen konverzije iznosi samo 15 % (slika 4.11b). Slični rezultati pronađeni su i u literaturi gde je pokazano da su pri malim početnim

koncentracijama naringina (10, 20 mM) ostvareni stepeni konverzije ~ 80 % , bilo da je kao acil-donor korišćena oleinska kiselina [12] ili vinil ester laurinske kiseline [14]. Ovakvi rezultati mogu biti pripisani slaboj rastvorljivosti flavonoida što dovodi do slabije dostupnosti ovog supstrata aktivnom centru biokatalizatora, pa samim tim i sporijem odigravanju reakcije esterifikacije.

Optimalna koncentracija supstrata treba da omogući kompromis između postizanja visokog prinosa proizvoda, ali i visokog stepena konverzije jer se time smanjuje koncentracija neproreagovalog supstrata i pojednastavljaju separacioni procesi. S obzirom na ostvarene rezultate, može se zaključiti da je optimalna početna koncentracija naringina u reakciji esterifikacije sa oleinskom kiselinom kao acil-donorom 30 mM, imajući u vidu da je pri toj početnoj koncentraciji acil-akceptora ostvaren visok prinos proizvoda (25,05 mM) kao i visok stepen konverzije limitirajućeg supstrata (83,5 %).

Kada je reč o uticaju početne koncentracije eskulina na prinos proizvoda i ostvareni stepen konverzije u reakciji esterifikacije sa oleinskom kiselinom, dobijeni su nešto drugačiji rezultati. Na slici 4.12a predstavljeni su koncentracioni profili sintetisanog eskulin-oleata pri različitim početnim koncentracijama acil-akceptora. Može se primetiti da sa povećanjem početne koncentracije eskulina od 10 do 70 mM, prinos proizvoda takođe raste ostvarajući maksimalnu koncentraciju proizvoda, 39 mM, nakon 72 h trajanja reakcije u eksperimentu u kojem je početna koncentracije eskulina bila 70 mM. Zanimljivo, daljim povećanjem početne koncentracije eskulina, 90 mM, primećen je značajan pad prinosa sintetisanog estera, s obzirom da je koncentracija eskulin-oleata u reakcionoj smeši nakon 72h iznosila 21,5 mM, što se takođe može pripisati slaboj rastvorljivosti ovog hidrofilnog molekula u umereno hidrofobnoj sredini. Ukoliko se posmatra uticaj početne koncentracije eskulina na ostvareni stepen konverzije u reakciji esterifikacije (slika 4.12b), primećuje se da sa povećanjem koncentracije eskulina od 10 do 70 mM dolazi do blagog pada ostvarenog stepena konverzije sa 77 na 55 %, dok je značajno niži stepen konverzije (25%) ostvaren u eksperimentu kada je početna koncentracija eskulina bila 90 mM. Imajući u vidu dobijene rezultate, može se zaključiti da se pri početnoj koncentraciji eskulina od 70 mM ostvaruje visok prinos sintetisanog proizvoda, kao i visok stepen konverzije limitirajućeg

supstrata, što implicira da pomenuta koncentracija predstavlja optimalnu koncentraciju eskulina za izvođenje reakcije esterifikacije.

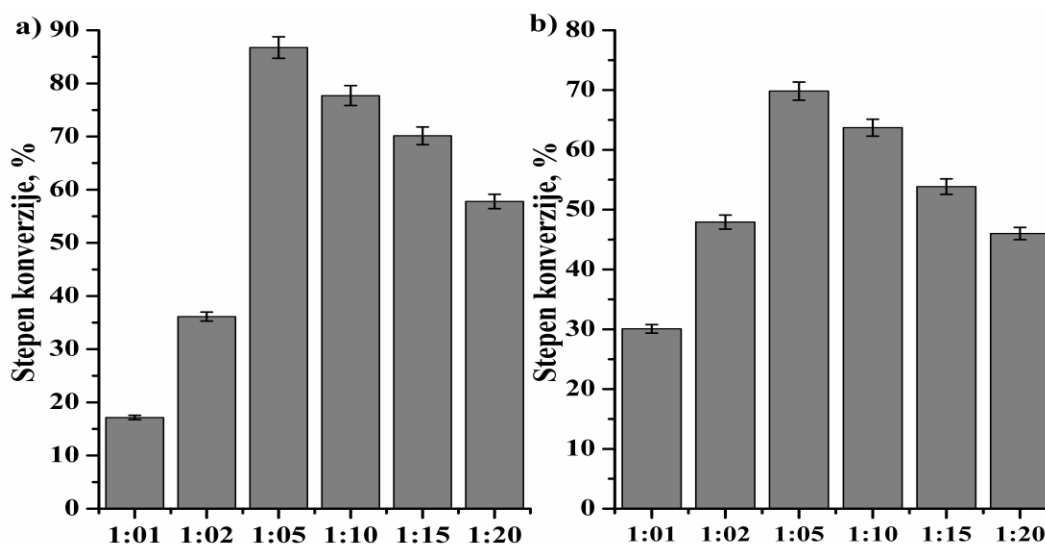


Slika 4.12 Uticaj početne koncentracije eskulina na a) prinos proizvoda i b) stepen konverzije.

4.1.4.2. Uticaj molskog odnosa supstrata

Već je poznato da se reakcije esterifikacije flavonoida najčešće izvode u višku acil-donora, s obzirom da je to jednostavan način za pomeranje ravnoteže reakcije ka sintezi proizvoda. Radi utvrđivanja optimalnog molskog odnosa supstrata za postizanje najvećeg stepena konverzije limitirajućeg supstrata ispitan je molski odnos flavonoid:oleinska kiselina u opsegu 1:1 do 1:20 (slika 4.13). U reakcijama esterifikacije oba flavonoida primećen je sličan trend s obzirom da je povećanje molskog odnosa supstrata sa 1:1 na 1:5 dovelo do povećanja stepena konverzije naringina sa 17 na 86 % (slika 4.13a), kao i stepena konverzije eskulina sa 30 na 70 % (slika 4.13b), pri čemu su maksimalne postignute koncentracije proizvoda, 26 mM naringin-oleata i 48 mM eskulin-oleata nakon 72 h trajanja reakcije. Daljim povećanjem molskog odnosa supstrata primećen blagi pad stepena konverzije u oba eksperimenta, što ukazuje na činjenicu da je molski odnos

flavonoid:oleinska kiselina 1:5 optimalan za acilovanje oba flavonoida. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturno dostupnim podacima o esterifikaciji flavonoida [12, 110, 118].



Slika 4.13 Uticaj molskog odnosa supstrata na stepen konverzije a) naringina i b) eskulina.

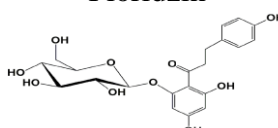
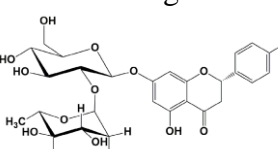
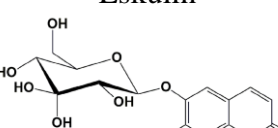
4.1.5. Optimalni uslovi sinteze estara tri različita flavonoida

Analizom dobijenih rezultata optimizacije reakcija esterifikacije tri strukturno različita flavonoida, utvrđeno je da su koncentracija flavonoida i molski odnos supstrata dva najbitnija parametra koja utiču na proces sinteze estara. Pored toga, može se zaključiti da dobijeni optimalni uslovi veoma zavise od primenjenog acil-akceptora u reakciji sinteze kao i od odzivne veličine koja se ispituje.

Kada je reč o uticaju početne koncentracije flavonoida na stepen konverzije limitirajućeg supstrata, utvrđeno je da je u sve tri reakcije najmanja ispitana koncentracija flavonoida, 10 mM, ujedno i optimalna za postizanje visokih stepena konverzije (tabela 4.5). Sa druge strane prilikom ispitivanja maksimalnog prinosa proizvoda, pokazano je da se optimalni uslovi razlikuju u odnosu na optimalne uslove za postizanje maksimalnog stepena konverzije i veoma zavise od korišćenog acil-akceptora. Tako, prilikom optimizacije sinteze floridzin-oleata, pokazano je da se najveći prinos proizvoda ostvaruje pri početnoj

koncentraciji floridzina od 90 mM, što je ujedno i optimalna koncentracija za postizanje maksimalnog specifičnog prinosa floridzin-oleata (slika 4.4b). Sa druge strane, 30 mM naringina i 70 mM eskulina predstavljaju optimalne početne koncentracije ova dva flavonoida za postizanje maksimalnih prinosa proizvoda. Optimalne koncentracije za postizanje maksimalnog prinosa proizvoda su značajno veće od optimalnih koncentracija za konverziju limitirajućeg supstrata.

Tabela 4.5 Poređenje optimalnih vrednosti reakcionih parametara esterifikacije flavonoida.

Flavonoid	Stepen konverzije, %		Specifični prinos, mmol/g _{enzima} /Prinos, mg/ml	
	Koncentracija flavonoida, mM	Molski odnos supstrata	Koncentracija flavonoida	Molski odnos supstrata
Floridzin 	10	1:18	90	1:13
Naringin 	10	1:5	30	1:5
Eskulin 	10	1:5	70	1:5

Pri optimalnim koncentracijama korišćenog acil-akceptora, pokazano je da je za sintezu i naringin- i eskulin-oleata optimalna pet puta veća koncentracija acil-donora u odnosu na koncentraciju acil-akceptora u reakcionoj smeši. Sa druge strane, maksimalan stepen konverzije floridzina ostvaruje se pri molskom odnosu supstrata 1:18, dok se maksimalan specifični prinos floridzin-oleata dobija pri molskom odnosu floridzin:oleinska kiselina 1:13, što ukazuje da reakciji esterifikacije floridzina pogoduje veliki višak oleinske kiseline u reakcionoj smeši (tabela 4.5).

Iako je kao rastvarač u reakcijama esterifikacije korišćen acetonitril ($\log P -0,36$), što bi trebalo da više pogoduje naringinu ($\log P -0,36$) i eskulinu ($\log P -0,99$) kao supstratima, evidentno je da prisutvo oleinske kiseline povećava hidrofobnost reakcionog medijuma, što dovodi do smanjenja rastvorljivosti ova dva flavonoida i pri većim udelu oleinske kiseline u reakcionom medijumu konverzija limitirajućeg supstrata pri optimalnoj koncentraciji opada. S druge strane, prisustvo velikog viška oleinske kiseline omogućava veću rastvorljivost floridzina ($\log P 0,44$) i pri značajno većim početnim koncentracijama.

4.2. Primena alternativnih acil-donora u reakciji sinteze estara flavonoida

Nakon završene detaljne optimizacije esterifikacije tri flavonoida (floridzina, naringina i eskulina) sa oleinskom kiselinom kao acil-donorom, cilj naredne faze istraživanja bio je na pronalaženju alternativnih acil-donora koji obezbeđuju veću ekonomičnost proizvodnog postupka i/ili povećanu efikasnost. Izabrano je nekoliko acil-donora sa ciljem da se obuhvati što veći broj masnih kiselina, posledično i finalnih proizvoda. Pa tako, za sintezu flavonoid-acetata, kao alternativni supstrati ispitani su anhidrid sirćetne kiseline i triacetin, dok su za sintezu estara viših masnih kiselina kao acil-donori ispitana različita biljna ulja, kao što su kokosovo, laneno i suncokretovo ulje.

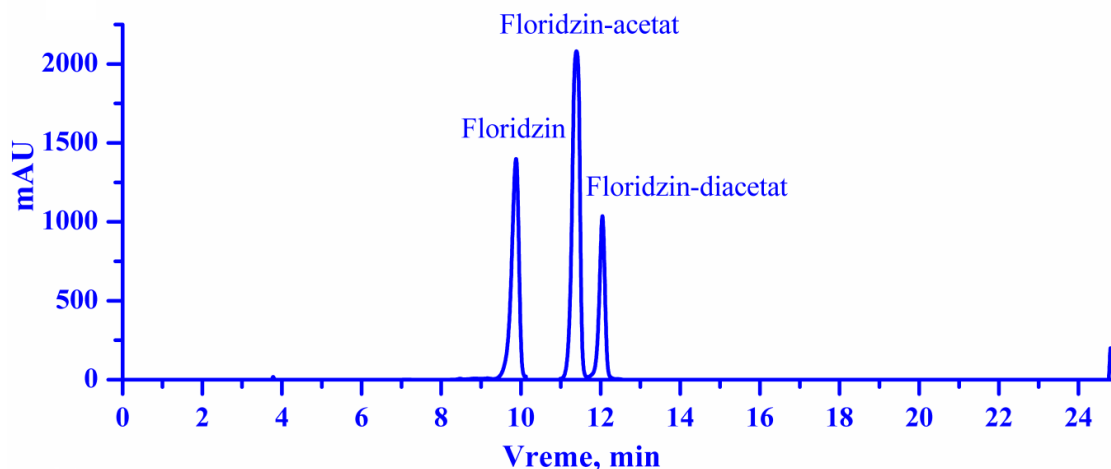
4.2.1. Primena alternativnih acil-donora za sintezu flavonoid-acetata

Masne kiseline srednjeg i dugog lanca su najčešće korišćeni supstrati u reakciji acilovanja flavonoida [97, 102, 218], dok su reakcije esterifikacije sa kiselinama kratkog lanca (do 4 C atoma) slabo ispitane. S obzirom da acetati predstavljaju najčešće estre bioaktivnih jedinjenja koji se koriste u kozmetici, a često i u prehrambenoj industriji, značaj acil-donora kratkog lanca za reakciju esterifikacije flavonoida raste sa pojavom perspektivne primene estara ovih polifenolnih jedinjenja kao aktivnih supstanci u kozmetičkim formulacijama [94, 160, 166]. Imajući u vidu da je utvrđeno da su aktivne supstance sa molekulskom težinom manjom od 500 Da i log P vrednosti u opsegu od 1 do 3,5 efikasne za transdermalnu difuziju [177] i činjenice da su vrednosti ova dva parametra za većinu estara flavonoida viših masnih kiselina izvan preporučenog opsega, acil-donori kratkog lanca postaju sve zanimljiviji supstrati za reakcije acilovanja. S obzirom na prethodno dobijene rezultate o uticaju dužine lanca karboksilne kiseline na prinos proizvoda, i činjenice da je najmanji stepen konverzije floridzina ostvaren u reakciji sa sirćetnom kiselinom kao acil-donorom (poglavlje 4.1.2.3), u ovoj fazi istraživanja biće ispitana mogućnost primene alternativnih supstrata, anhidrida sirćetne kiseline i triacetina, u reakciji esterifikacije floridzina kao model flavonoida, sa ciljem povećanja prinosa proizvoda. Ove dve supstance su izabrane kao potencijalni supstrati s obzirom da obezbeđuju manju kiselost u okolini

enzima nego kada se koristi sirćetna kiselina što bi moglo pozitivno uticati na stabilnost enzima, uz mogućnost razvoja postupka bez organskog rastvarača koji je mnogo prihvatljiviji sa aspekta zaštite životne sredine.

4.2.1.1. Acetilovanje floridzina u organskom rastvaraču

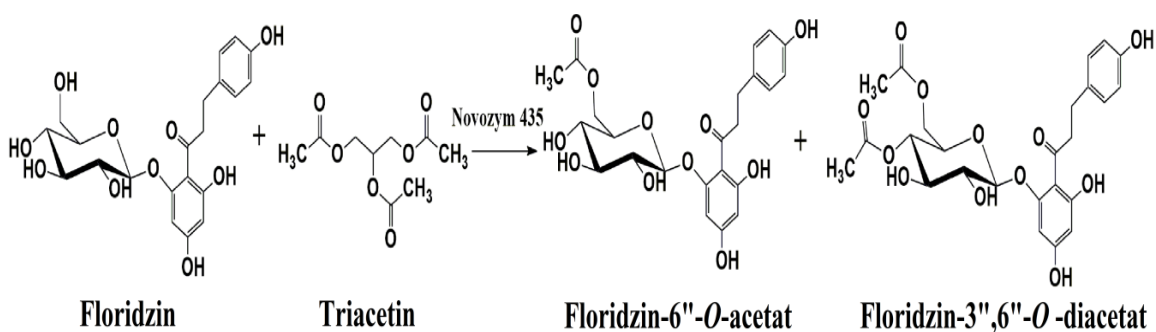
U prvoj fazi istraživanja ispitana je reakcija acetilovanja floridzina, kao model flavonoida, katalizovana komercijalnim preparatom Novozym[®] 435, korišćenjem tri različita acil-donora, sirćetne kiseline, anhidrida sirćetne kiseline i triacetina. U cilju pronalaženja najboljeg reakcionog sistema za sintezu estara, prva serija eksperimenata izvedena je u acetonitrilu kao reakcionom medijumu, s obzirom da je u prethodnim eksperimentima (poglavlje 4.1.2.1.) ustanovljeno da je acetonitril odgovarajući rastvarač za odigravanje reakcije esterifikacije floridzina. Rezultati su pokazali prisustvo dva proizvoda u svim reakcijama, bez obzira na vrstu upotrebljenog acil-donora, s obzirom da su nakon HPLC analize reakcionih smeša, na hromatogramima, pored pika floridzina, uočena još dva pika sa različitim retencionim vremenima (slika 4.14)



Slika 4.14 Karakterističan hromatogram sinteze acetil-derivata floridzina u reakciji sa triacetinom kao acil-donorom.

Analizom dva sintetisana proizvoda masenom spektrometrijom, utvrđeno je da mase od 479 m/z i 521 m/z odgovaraju $[M+H]^+$ oblicima mono- i diacetilovanog floridzina, redom. Međutim, s obzirom da i dalje nije bilo jasno na kojim pozicijama u molekulu floridzina se

vezuju pomenute acetil grupe, neophodno je bilo sprovesti dodatne analize. U tu svrhu, razdvajanje sintetisanih proizvoda je izvedeno primenom HPLC uređaja i semi-preparativne reverzno-fazne C₁₈ kolone, nakon čega su frakcije čistih supstanci uparene do konstantne mase i izvršena je NMR spektralna analiza proizvoda. Proton NMR podaci samog floridzina [219] pokazuju četiri različita spin-sistema: dva aromatska prstena A i B, C-3 skelet sa dve metilenske grupe (α i β) i glukozu (*Glu*). U slučaju da je bilo koja od sedam različitih OH grupa esterifikovana, podaci NMR-a biće izmenjeni. Oba jedinjenja imaju slične protone karakteristične za *para* supstituciju u aromatičnom prstenu B (spin sistem AA'KSKS izgleda slično kao dva dubleta sa konstantom kuplovanja oko 8,5 Hz) i dva dubleta (približno $J = 2$ Hz) karakteristična za dva *meta* protona u asimetričnom tetra supstituisanom prstenu A (Prilog 1 - slike 1-5). Male razlike u hemijskom pomeranju protona glukoze bile su veoma važne za određivanje strukture. Monoacetil-derivat ima dve HMBC korelacije velikog opsega između protona glukoze H-6a i H-6b i karbonilne grupe estra na δ C 172.9. Ove korelacije snažno potvrđuju da je hemijska struktura prvog derivata halkona floridzin-6''-O-acetat. Drugo jedinjenje ima HMBC korelaciju između protona glukoze H-6a i H-6b sa ugljenikom acetil grupe na δ C 172,8 i između H-3 i C atoma na δ C 172,6 iz druge acetil grupe. Identifikacija protona H-3, H-6a i H-6b je snažno podržana s obzirom na COZI, HSKC i HMBC korelacije (Prilog 1 - slike 6-11), koje su potvrdile da je drugi proizvod reakcije floridzin-3'',6''-O -diacetat (slika 4.15).



Slika 4.15 Šematski prikaz reakcije acetilovanja floridzina triacetinom katalizovane Novozym[®] 435.

Za sintetisane derivate floridzina dobijen su sledeći NMR spektri:

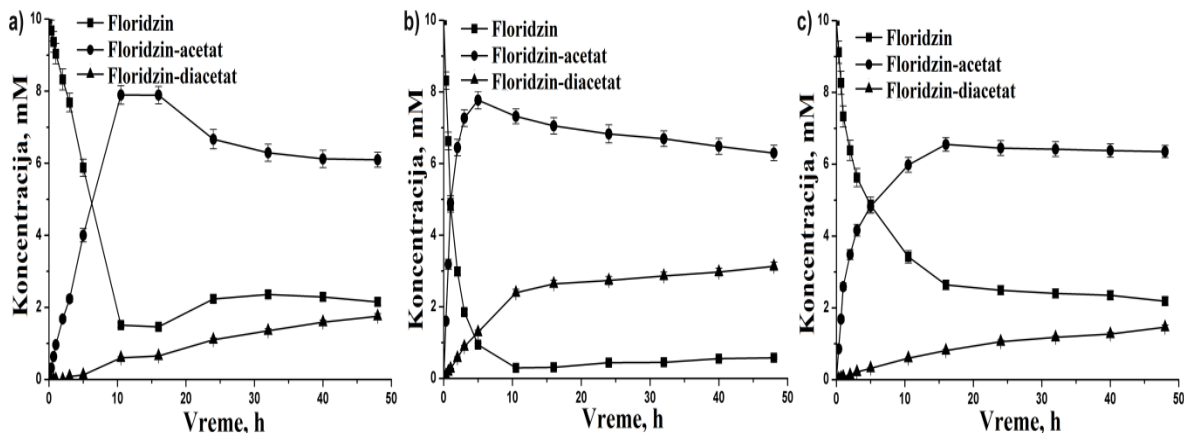
floridzin-6"-*O*-acetat: ^1H NMR (500 MHz, metanol- d_4 , ppm) δ_{H} 7.06 (2H, d, $J= 8.5$ Hz, H-2 i H-6), 6.68 (2H, d, $J= 8.5$ Hz, H-3 i H-5), 6.14 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-3'), 5.98 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-5'), 5.03 (1H, d, $J=7.5$ Hz, Glu H-1), 4.39 (1H, dd, $J=2.0, 12.0$ Hz, Glu H-6_a), 4.26 (1H, dd, $J=6.5, 12.0$ Hz, Glu H-6_b), 3.65 (1H, ddd, $J=2.0, 6.5, 12.0$ Hz, Glu H-5), 3.43-3.52 (3H prikriveno Glu H-2, H α i Glu H-3 ^1H pomeranje je određeno iz COSY, HSQC i HMBC 3.48, 3.47 i 3.45, redom), 3.34-3.42 (2H prikriveno, H α' i Glu H-4, ^1H pomeranje je određeno iz HSQC 3.39 i 3.37, redom), 2.87 (2H, t_{br}, $J=7.5$ Hz, H β), i 2.02 (3H, s, Glu 6-OAc). ^{13}C NMR (^{13}C pomeranja su dobijena iz HSQC i HMBC na 500 MHz, metanol- d_4 , ppm) δ_{C} 206.7 (C=O), 172.9, (C=O, Glu-6''-OAc), 167.1 (C-6'), 165.8 (C-4'), 162.1 (C-2'), 156.5 (C-4), 133.6 (C-1), 130.4 (C-2 i C-6), 116.0 (C-3 i C-5), 106.8 (C-1'), 102.1 (Glu C-1''), 98.4(C-5'), 95.8(C-3'), 78.3 (Glu C-3''), 75.5 (Glu C-5''), 74.7 (Glu C-2''), 71.3 (Glu C-4''), 66.4 (Glu C-6''), 46.8 (C- α), 30.8 (C- β), i 20.5 (CH₃, Glu-6''-OAc).

floridzin-3",6"-*O*-diacetat: ^1H NMR (500 MHz, metanol- d_4 , ppm) δ_{H} 7.07 (2H, d, $J= 8.5$ Hz, H-2 i H-6), 6.69 (2H, d, $J= 8.5$ Hz, H-3 i H-5), 6.15 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-3'), 5.99 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-5'), 5.13 (1H, d, $J=8.0$ Hz, Glu H-1), 5.03 (1H, t, $J= 9.4$ Hz Glu H-3), 4.39 (1H, dd, $J=2.2, 12.0$ Hz, Glu H-6_a), 4.28 (1H, dd, $J=6.3, 12.0$ Hz, Glu H-6_b), 3.75 (1H, ddd, $J=2.2, 6.3, 10.0$ Hz, Glu H-5), 3.58 (1H, dd, $J=8.0, 9.4$ Hz, Glu H-2), 3.53 (1H, t_{br} $J=9.4$ Hz, Glu H-4 prikrivena nečistoćama), 3.47 (1H, dt, $J=7.5, 16.5$, H α), (1H, dt, $J= 7.5, 16.5$, H α' prikriveno pikom rastvarača), 2.87 (2H, t_{br}, $J=7.5$ Hz, H β), 2.13 (3H, s, Glu 3-OAc) i 2.03 (3H, s, Glu 6-OAc). ^{13}C NMR (^{13}C pomeranja su dobijena iz HSQC i HMBC na 500 MHz, metanol- d_4 , ppm) δ_{C} 206.6 (C=O), 172.8 (C=O, Glu-6''-OAc), 172.6 (C=O, Glu-3''-OAc), 167.7 (C-6'), 165.9 (C-4'), 162.0 (C-2'), 156.6 (C-4), 133.9 (C-1), 130.4 (C-2 i C-6), 116.0 (C-3 i C-5), 106.8 (C-1'), 101.9 (Glu C-1''), 98.5(C-5'), 95.7(C-3'), 79.0 (Glu C-3''), 75.3 (Glu C-5''), 72.9 (Glu C-2''), 69.5 (Glu C-4''), 64.1 (Glu C-6''), 46.7 (C- α), 30.8 (C- β), 20.9 (CH₃, Glu-3''-OAc) i 20.4 (CH₃, Glu-6''-OAc).

Prisustvo dva proizvoda, mono- i diacetata, kao i pozicije acetilovanja floridzina, su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u dve studije koje su se bavile acilovanjem flavonoida (izokvercitrina i prunina), koji poseduju istu šećernu jedinicu kao floridzin, sa vinil-

acetatom katalizovanom CAL B u acetonu kao rastvaraču, s obzirom da su autori objavili da se kao proizvodi reakcija dobijaju flavonoid-6"-*O*-acetat i flavonoid-3",6"-*O*-diacetat [109, 116]. Sa druge strane, u drugoj studiji prilikom acetilovanja izokvercitrina vinil-acetatom u acetonu korišćenjem CAL B kao biokatalizatora, objavljeni su nešto drugačiji rezultati, s obzirom da su kao proizvodi reakcije dobijeni izokvercitrin-diacetat i izokvercitrin-triacetat, dok izokvercitrin-monoacetat nije primećen [93]. Ovo može biti posledica upotrebe velikog viška vinil-acetata, imajući u vidu da je molarni odnos flavonoid:acil-donor bio 1:40, što znači da je koncentracija acetil grupa bila više nego četiri puta veća u poređenju sa koncentracijom korišćenom u našem eksperimentu. Pored toga, isti autori su objavili da upotrebom drugog enzima, lipaze iz *Pseudomonas cepacea* (PSL-C), kao biokatalizatora reakcije transesterifikacije izokvercitrina vinil-acetatom, do reakcije dolazi na primarnoj 6"-OH grupi šećera i 4'-OH grupi na B prstenu [93].

Na slici 4.16 predstavljeni su koncentracioni profili sintetisanih proizvoda tokom reakcije acetilovanja floridzina sa tri različita acetil-donora u acetonitrilu kao rastvaraču. Može se uočiti da koncentracije proizvoda pokazuju isti trend u svim eksperimentima, s obzirom da na početku reakcije, koncentracija prvog proizvoda raste dosta brže u odnosu na koncentraciju drugog proizvod, dok se kasnije primećuje blagi pad koncentracije prvog proizvoda, praćeno rastom drugog. Ovakav trend se može objasniti pretpostavkom da u prvom koraku reakcije dolazi do acetilovanja primarne OH grupe šećernog ostatka u molekulu floridzina, što je karakteristično za slične reakcije katalizovane ovim enzimom, pri čemu nastaje prvi proizvod floridzin-acetat. Dalje, tokom vremena, sinteza monoacetata se nastavlja sve dok je u reakcionoj smeši prisutan floridzin, a paralelno dolazi i do trošenja ovog jedinjenja s obzirom da postaje supstrat druge reakcije acetilovanja pri čemu nastaje novi proizvod, floridzin-diacetat.



Slika 4.16 Koncentracioni profili dobijenih proizvoda tokom reakcije acetilovanja floridzina sa: a) sirćetnom kiselinom, b) anhidridom sirćetne kiseline i c) triacetinom. Reakcije su izvođene sa 10 mM floridzina i 90 mM acetil grupe, pri koncentraciji enzima 1 % (w/v) na 70 °C i 150 o/min.

Ako se uporede rezultati dobijeni u acetonitrilu sa različitim acetil-donorima, može se zaključiti da je nakon 48 h trajanja reakcije, najveći stepen konverzije (94 %) ostvaren u reakciji sa anhidridom sirćetne kiseline kao acil-donorom, dok su u preostala dva eksperimenta, nakon 48 h maksimalni stepeni konverzije limitirajućeg supstrata bili oko 80%. Tokom ispitanog vremenskog perioda, floridzin-monoacetat je bio glavni proizvod reakcije u svim eksperimentima (tabela 4.6). Pored toga, najveće početne brzine sinteze kako monoacetata, tako i diacetata postignute su u reakciji floridzina sa anhidridom sirćetne kiseline, dok je u reakciji sa triacetinom, formiranje estara bilo nešto sporije.

Tabela 4.6 Uticaj acetil-donora na stepen konverzije (48 h), početne brzine i udeo proizvoda u reakcionoj smeši nakon reakcije acetilovanja floridzina (10 mM) u acetonitrilu.

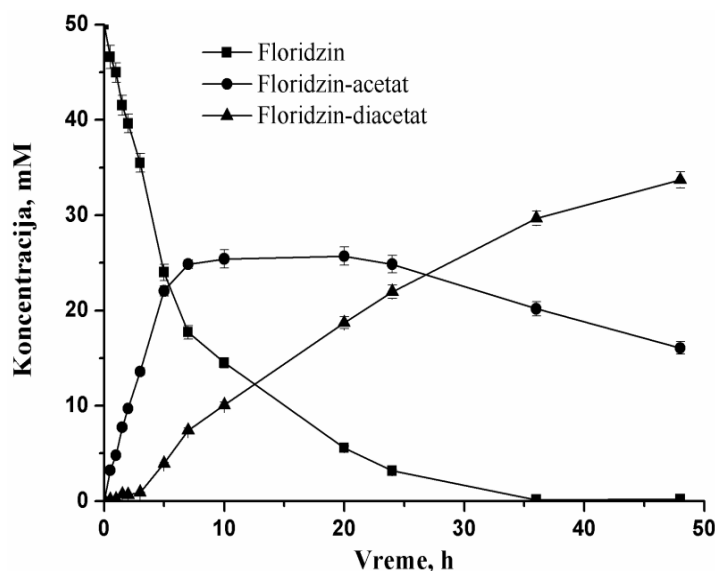
Acetil-donor	Stepen konverzije, %	Početne brzine sintetisanog monoacetata/diacetata		Udeo sintetisanog estara, %	
		mM h^{-1}	mM h^{-1}	Monoacetat	Diacetat
Sirćetna kiselina	79,91	0,958	0,0258	79,54	20,46
Anhidrid sirćetne kiseline	94,25	4,853	0,274	66,78	33,22
Triacetin	78,13	2,569	0,0788	81,32	18,68

4.2.1.2. Acetilovanje floridzina u sistemu bez rastvarača

Količina sintetisanog proizvoda u reakciji esterifikacije kontrolisana je ravnotežom same reakcije. Prisustvo jednog od supstrata u višku pomera ravnotežu reakcije ka sintezi proizvoda i dovodi do povećanja ukupnog prinosa proizvoda. Stoga, postupak sinteze u sistemu bez rastvarača, u kojem acil-donor ima ulogu i rastvarača acil-akceptora, predstavlja pogodan sistem za reakciju acilovanja flavonoida. Pored toga, ovaj pristup predstavlja ekološki prihvatljivu alternativu za klasične hemijske i biokatalitičke sinteze u organskim rastvaračima [220], dok sa druge strane doprinosi i poboljšanju proizvodnog postupka sa ekonomskog aspekta, s obzirom na veće prinose sintetisanih proizvoda. Zbog toga, u ovoj fazi istraživanja ispitana je mogućnost reakcije acetilovanja floridzina u sistemu u kojem će sirćetna kiselina, anhidrid sirćetne kiseline i triacetin imati istovremeno ulogu acetil-donora i rastvarača. Rezultati su pokazali da je samo triacetin pogodan acetil-donor za ovu vrstu reakcije s obzirom da su u reakcijama sa sirćetnom kiselinom i anhidridom sirćetne kiseline sintetisane neznatne količine estara. Loši rezultati postignuti u reakcijama sa ova dva acetil-donora mogu se objasniti deaktivacijom enzima usled velike kiselosti reakcionog medijuma u prisustvu velikog viška ova dva supstrata [215, 216].

Generalno, analizom rezultata postignutih u sistemu bez rastvarača uočeno je da koncentracioni profili proizvoda prate sličan trend kao i oni dobijeni u eksperimentima izvedenim u acetonitrilu, s obzirom da na početku reakcije dolazi do dosta brže sinteze floridzin-acetata u odnosu na formiranje floridzin-diacetata, da bi u daljem toku reakcije došlo do blagog pada koncentracije floridzin-acetata i rasta prinosa floridzin-diacetata (slika 4.17). Međutim, glavna razlika u odnosu na tok reakcije dobijen prilikom sinteze u organskom rastvaraču, gde je u ispitanom vremenskom opsegu floridzin-acetat bio glavni proizvod reakcije, u reakciji izvedenoj bez rastvarača uočava se prisustvo dva perioda reakcije. Tako je u prvom periodu floridzin-acetat takođe bio glavni proizvod reakcije, dok je u drugom periodu koncentracija floridzin-diacetata bila veća od koncentracije monoacetata, a koncentracije dva proizvoda su se izjednačile nakon 28 h trajanja reakcije. Ovakav trend se može objasniti činjenicom da je u sistemu bez rastvarača korišćena pet puta veća koncentracija floridzina i da je prisutna mnogo veća koncentracija acetil-donora u

odnosu na eksperimente u organskom rastvaraču. Prisustvo velikog viška acetil-donora pomera obe reakcije ka sintezi proizvoda, floridzin-acetata i floridzin-diacetata, s tim da se proizvod prve reakcije troši kao supstrat u drugoj reakciji. Pa tako, nakon 30 h dolazi do totalne konverzije floridzina u acetil-derivate, dok daljim tokom reakcije dolazi samo do promene u sastavu sintetisanih estara, pri čemu se favorizuje sinteza floridzin-diacetata što je očekivano jer reakciona smeša sadrži visoku koncentraciju monoacetata, supstrata neophodnog za ovu sintezu.



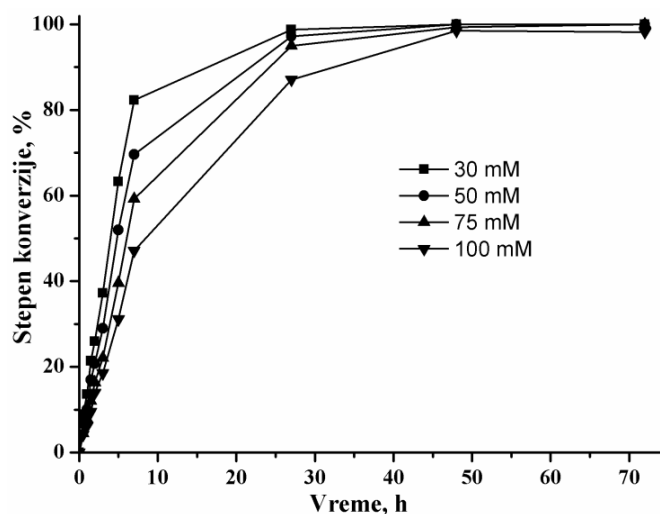
Slika 4.17 Tok sinteze estara floridzina u sistemu bez rastvarača. Reakcije su izvođeni na 70 °C pri 150 o/min, sa 1 % (w/v) enzima i koncentracijom floridzina 50 mM u 5 ml triacetina.

S obzirom na rezultate postignute u preliminarnim eksperimentima izvođenim u sistemu bez rastvarača, može se zaključiti da je takav sistem, korišćenjem triacetina i kao acetil-donora i kao rastvarača, povoljan za reakciju acetilovanja floridzina, pa će u narednoj fazi istraživanja fokus biti na optimizaciji postupka sinteze i kinetičkom modelovanju reakcije acetilovanja u pomenutom sistemu.

4.2.1.2.1. Optimizacija procesa u sistemu bez rastvarača: uticaj koncentracije floridzina

Imajući u vidu da izvođenje reakcija u sistemu bez rastvarača omogućava primenu većih koncentracija supstrata, u prvom koraku optimizacije postupka biće ispitan uticaj koncentracije floridzina na sintezu estara u reakciji sa triacetinom. U skladu sa tim, početne koncentracije floridzina su varirane u opsegu od 30 do 100 mM.

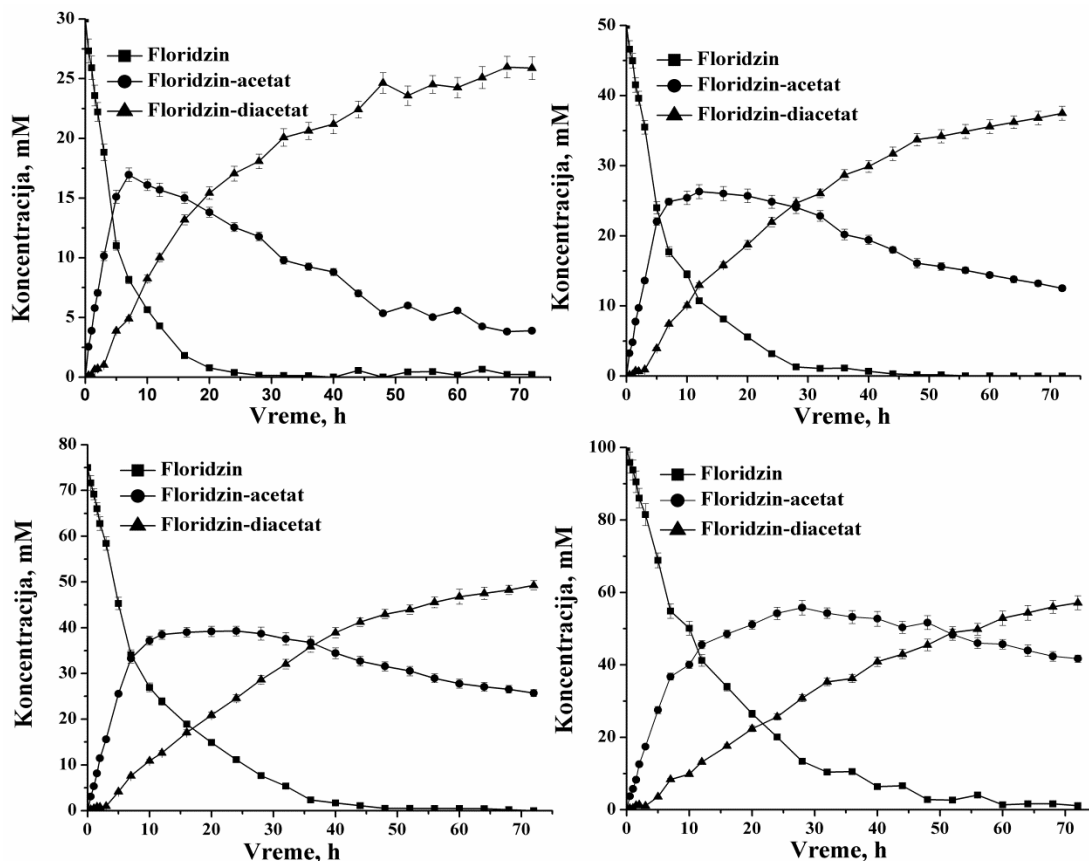
Na slici 4.18 prikazan je uticaj početne koncentracije floridzina na stepen konverzije limitirajućeg supstrata. Može se uočiti da je u toku 72 h u svim eksperimentima floridzin potpuno preveden u acetil-derivate. Kao što se i očekivalo, do najbrže konverzije floridzina dolazi u eksperimentu sa najmanjom početnom koncentracijom ovog supstrata, a primećeno je i da sa povećanjem početne koncentracije acil-akceptora raste i vreme potrebno za potpunu konverziju (slika 4.18).



Slika 4.18 Uticaj početne koncentracije floridzina na stepen konverzije. Reakcije su izvođene na 70 °C pri 150 o/min, u 5 ml triacetina sa 1 % (w/v) enzima i različitim koncentracijama floridzina.

Pored toga, posmatranjem kinetičkih profila sintetisanih proizvoda (slika 4.19) može se uočiti i da sa povećanjem početne koncentracije floridzina dolazi do povećanja vremena neophodnog za postizanje ravnotežne koncentracije proizvoda, pa je tako pri najnižoj ispitanoj početnoj koncentraciji floridzina (30 mM) diestar postao glavni proizvod već

nakon 18 h trajanja reakcije (slika 4.19a), dok je, sa druge strane, pri početnoj koncentraciji floridzina od 100 mM diacetat preuzeo primat tek nakon 52 h (slika 4.19d).

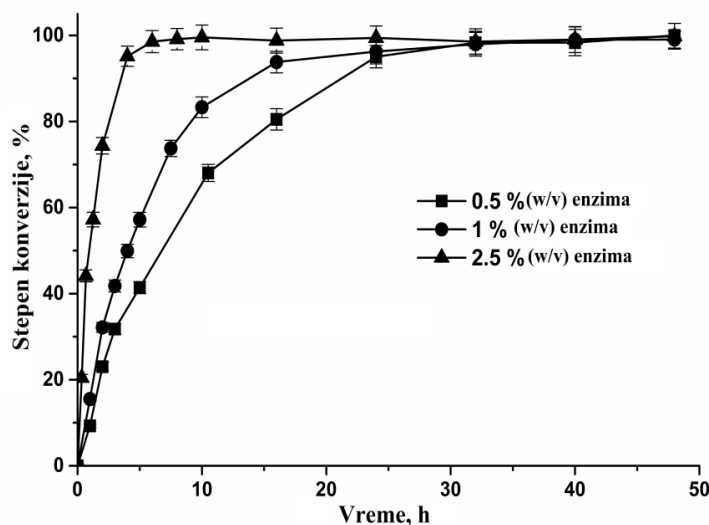


Slika 4.19 Koncentracioni profili sintetisanih proizvoda dobijenih nakon reakcije acetilovanja floridzina izvođenim u sistemu bez rastvarača pri različitim početnim koncentracijama limitirajućeg supstrata: a) 30 mM, b) 50 mM, c) 75 mM i d) 100 mM. Reakcije su izvođene na 70 °C pri 150 o/min, u 5 ml triacetina sa 1 % (w/v) enzima.

4.2.1.2.2. Optimizacija procesa u sistemu bez rastvarača: uticaj koncentracije enzima

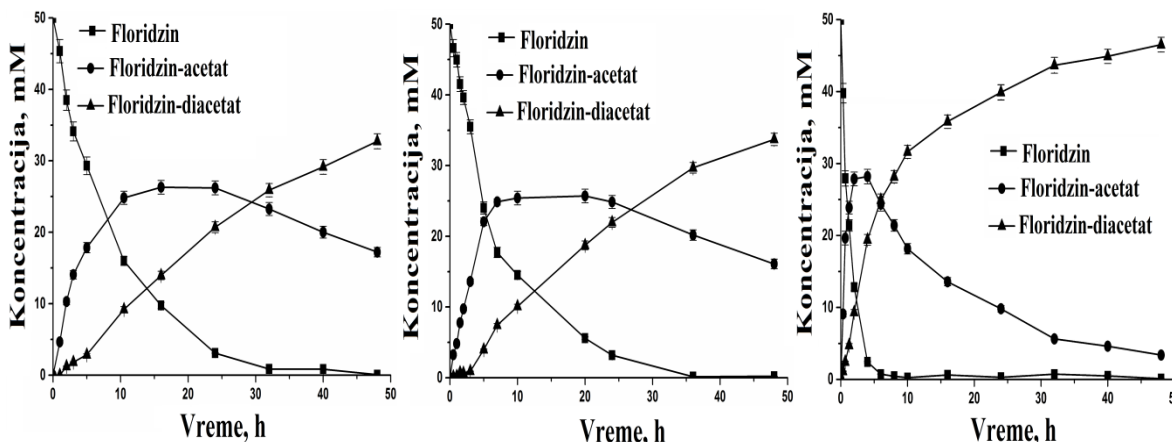
Da bi odredili minimalnu količinu biokatalizatora neophodnu za postizanje visokih stepena konverzije limitirajućeg supstrata, reakcije acetilovanja floridzina sa triacetinom u sistemu bez rastvarača su izvođene pri različitim koncentracijama komercijalnog enzima Novozym[®] 435. Na slici 4.20 može se primetiti da količina primenjenog biokatalizatora

nije značajno uticala na stepen konverzije floridzina, s obzirom da je u svim eksperimentima postignuto skoro 100 % konverzije tokom 24 h trajanje reakcije.



Slika 4.20 Uticaj koncentracije enzima na stepen konverzije. Reakcije su izvođene na 70 °C pri 150 o/min, sa 50 mM floridzina u 5 ml triacetina.

Sa druge strane, primećene su razlike u kinetičkim profilima sintetisanih proizvoda, s obzirom da je u reakciji sa najmanjom koncentracijom enzima, floridzin-acetat bio glavni proizvod tokom 30 h trajanja reakcije, dok je floridzin-diacetat preuzeo primat već nakon 26 h, odnosno 6 h u reakcijama u kojima je koncentracija enzim bila 1 % (w/v) i 2,5 % (w/v), redom (slika 4.21). Imajući u vidu postignute rezultate, može se zaključiti da se kontrolisanim izborom početnih uslova reakcije, koncentracije enzima i koncentracije floridzina, reakcija može voditi na takav način u zavisnosti od željenog sastava finalnog proizvoda. Treba naglasiti da oba proizvoda reakcije mogu biti primenjena u različitim kozmetičkim formulacijama s obzirom da se njihove molekulske mase (monoacetat, 478,44 g/mol i diacetat, 520,47 g/mol) i log P vrednosti (monoacetat 1,11 i diacetat 1,59) nalaze u opsegu preporučenih vrednosti za koje se smatra da omogućavaju efikasan transdermalni prenos aktivnih supstanci u proizvodima za negu kože [177].

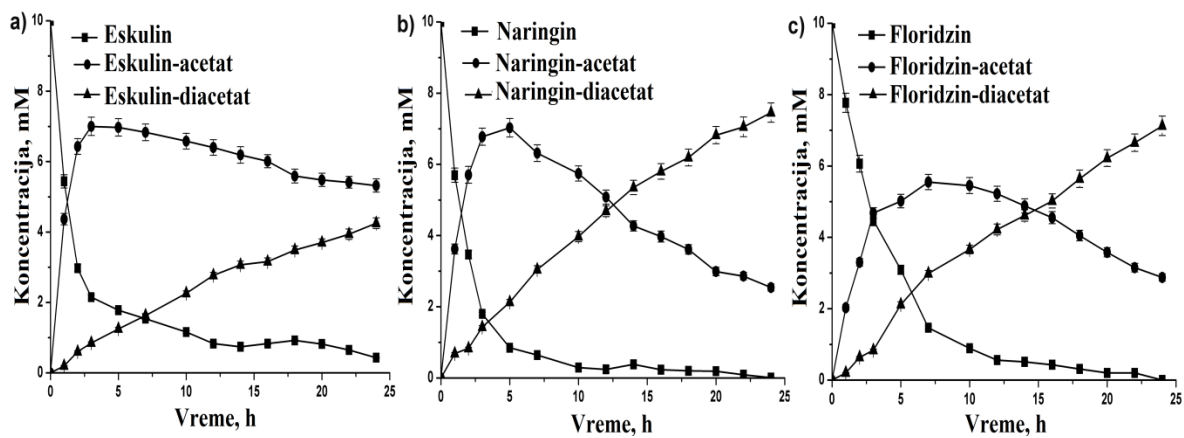


Slika 4.21 Koncentracioni profili sintetisanih proizvoda dobijenih nakon reakcije acetilovanja flordizina izvođenim u sistemu bez rastvarača pri različitim koncentracijama enzima: a) 0,5 % (w/v), b) 1 % (w/v) i c) 2,5 % (w/v). Reakcije su izvođene na 70 °C pri 150 o/min, pri koncentraciji flordizina od 50 mM i 5 ml triacetina.

4.2.1.3. Sinteza acetil-derivata naringina i eskulina

Da bi se utvrdilo da li je proces acetilovanja u sistemu bez rastvarača primenljiv i na glikozilovane predstavnike drugih klasa flavonoida, u nastavku istraživanja izvedeni su eksperimenti sa naringinom i eskulinom kao acil-akceptorima. Reakcija je uspešno izvedena i sa preostala dva flavonoida, a poređenjem kinetičkih profila sintetisanih estara u sva tri slučaja, može se primetiti da se tok sinteze proizvoda u reakciji sa eskulinom kao acil-akceptorom značajno razlikuje od toka reakcije dobijenih primenom druga dva flavonoida (slika 4.22). Naime, i nakon 24 h trajanja reakcije eskulin-monoacetat je bio glavni proizvod reakcije, dok je u eksperimentima sa naringinom i flordizinom ravnotežna koncentracija proizvoda primećena već nakon 12,5 h, odnosno 15 h, nakon čega je usledio rast koncentracije diacetata, praćen padom koncentracije monoacetata (slika 4.22). Zanimljivo je to da su koncentracioni profili sintetisanih proizvoda dobijenih u reakciji sa naringinom, flavonoidom koji ima disaharidnu šećernu jedinicu, slični koncentracionim profilima nastalim u reakciji sa flordizinom kao acil-akceptorom, što, sa druge strane, nije bio slučaj u eksperimentu sa eskulinom, koji poseduje istu šećernu jedinicu kao i flordizin, gde je to bilo očekivano. Dakle, čini se da na postupak acetilovanja flavonoida u sistemu bez rastvarača više utiče struktura aglikona flavonoida i njegova kompatibilnost sa

aktivnim centrom molekula enzima, nego vrsta šećerne jedinice, iako se reakcija odigrava na ugljenohidratnom delu molekula.



Slika 4.22 Koncentracioni profili sintetisanih proizvoda dobijenih nakon reakcije acetilovanja a) eskulina, b) naringina i c) floridzina, izvođenim u sistemu bez rastvarača korišćenjem triacetina kao supstrata. Reakcije su izvođene na 70 °C pri 150 o/min, pri koncentraciji floridzina od 10 mM, kocentraciji enzima 1 % (w/v) i 5 ml triacetina.

4.2.1.4. Ispitivanje kinetike reakcije acetilovanja flavonoida u sistemu bez rastvarača

Određivanje kinetičkog modela reakcije je veoma važno jer omogućava predviđanje sastava smeše tokom reakcije, što je od ogromnog značaja za dalju automatizaciju procesa, dizajn bioreaktora, uvećanje razmera i kontrolu procesa. Kinetički model nam daje uvid u mehanizam reakcije kao i prisustvo, odnosno odsustvo inhibicije od strane učesnika u reakciji. U ovoj doktorskoj disertaciji za ispitivanje kinetike u sistemu bez rastvarača korišćen je COPASI softver, program koji omogućava jednostavnu simulaciju kinetičkih modela, na osnovu kojih je moguće izračunati sve važne kinetičke konstante, što omogućava određivanja sastava reakcione smeše tokom celog vremena trajanja reakcije.

Polazna pretpostavka tokom modelovanja reakcije acetilovanja odnosila se na koncentraciju triacetina, tj. acetil ostatka koja nastaje njegovom hidrolizom. S obzirom da je triacetin prisutan u velikom višku, pretpostavlja se da je koncentracija ovog supstrata tokom odigravanja reakcije konstantna, pa se proces mogao opisati kao monosupstratna

reakcija. Predložen je mehanizam koji se sastojao iz dve uzastopne reakcije (jednačine 4.3 i 4.4):



koje predstavljaju ravnotežne procese koji se mogu opisati povratnom Mihaelis-Mentenovom kinetikom (jednačina 4.5):

$$v = \frac{\frac{V_f \cdot [S]}{K_{ms}} - \frac{V_r \cdot [P]}{K_{mp}}}{1 + \frac{[S]}{K_{ms}} + \frac{[P]}{K_{mp}}} \quad (4.5)$$

gde se oznake F , Ac , FAc i $FDAc$ odnose na flavonoid, acetil-donor, flavonoid-acetat i flavonoid-diacetat, redom. v (mM/h), V_f (mM/h) i V_r (mM/h) predstavljaju ukupnu brzinu, maksimalnu brzinu direktne i maksimalnu brzinu povratne reakcije. $[S]$ i $[P]$ (mM) su koncentracije supstrata (flavonoida) i proizvoda (flavonoid-acetata/diacetata), dok su K_{ms} i K_{mp} (mM) odgovarajuće Mihaelis-Mentenove konstante. Prvi korak reakcije predstavlja sintezu flavonoid-monoacetata, koja je praćena sporom povratnom reakcijom koja predstavlja hidrolizu sintetisanog estra u flavonoid (jednačina 4.3), dok se u drugom koraku reakcije sintetisani monoacetat acetiluje pri čemu formira diacetat, koji se delom u povratnoj reakciji hidrolizuje do monoacetata (jednačina 4.4). Brzine formiranja svakog od učesnika u reakcijama u pretpostavljenom dvostepenom modelu mogu biti predstavljene setom običnih diferencijalnih jednačina (jednačine 4.6 - 4.8) gde oznake unutra uglastih zagrada predstavljaju koncentracije određenih vrsta, dok se supskripti 1 i 2 u oznakama kinetičkih parametara odnose na prvu (jednačina 4.3) i drugu (jednačina 4.4) jednačinu kinetičkog modela.

$$\frac{d([F])}{dt} = - \left(\frac{\frac{Vf_1 \cdot [F]}{Kms_1} - \frac{Vr_1 \cdot [FA]}{Kmp_1}}{1 + \frac{[F]}{Kms_1} + \frac{[FA]}{Kmp_1}} \right) \quad (4.6)$$

$$\frac{d([FA])}{dt} = \left(\frac{\frac{Vf_1 \cdot [F]}{Kms_1} - \frac{Vr_1 \cdot [FA]}{Kmp_1}}{1 + \frac{[F]}{Kms_1} + \frac{[FA]}{Kmp_1}} \right) - \left(\frac{\frac{Vf_2 \cdot [FA]}{Kms_2} - \frac{Vr_2 \cdot [FDA]}{Kmp_2}}{1 + \frac{[FA]}{Kms_2} + \frac{[FDA]}{Kmp_2}} \right) \quad (4.7)$$

$$\frac{d([FDA])}{dt} = \left(\frac{\frac{Vf_2 \cdot [FA]}{Kms_2} - \frac{Vr_2 \cdot [FDA]}{Kmp_2}}{1 + \frac{[FA]}{Kms_2} + \frac{[FDA]}{Kmp_2}} \right) \quad (4.8)$$

Eksperimentalni rezultati dobijeni primenom različitih koncentracija model flavonoida, floridzina (30, 50, 75, 100 mM), tokom 72 h trajanja reakcije sa 1 % (w/v) enzima, kao i eksperimentalni rezultati dobijeni sa druga dva flavonoida korišćeni su za modelovanje. Kinetički parametri pretpostavljenog modela su određeni primenom nelinearne regresione analize korišćenjem genetičkog algoritma COPASI programa. Od jednog seta eksperimentalnih podataka za floridzin (50 mM floridzin, 1 % Novozym[®] 435 u 5 ml triacetina, na 70 °C u toku 72 h, što odgovara slici 4.17, kao i za naringin i eskulin (10 mM flavonoid, 1 % Novozym[®] 435 u 5 ml triacetina, na 70 °C tokom 24 h, što odgovara slici 4.22 (a i b), za pretpostavljeni model određeno je po osam prividnih kinetičkih parametara čije su vrednosti predstavljene u tabeli 4.7.

Poređenjem vrednosti parametara dobijenih u eksperimentima sa različitim flavonoidima, primećeno je da su određene vrednosti za floridzin i naringin veoma slične, što je u saglasnosti sa dobijenim koncentracionim profilima nakon reakcije acetilovanja ova dva flavonoida o kojima je bilo reči u poglavlju 4.2.1.3. Takođe, u eksperimentima sa svim flavonoidima, brzine direktnih reakcija su mnogo veće u odnosu na brzine povratnih reakcija, što znači da se reakcije esterifikacije odigravaju mnogo brže od hidrolize estara.

Pored određenih kinetičkih parametara, izračunate su i konstante specifičnosti reaktanata u svim reakcijama (tabela 4.7). U reakcijama acetilovanja sva tri flavonoida, evidentno je da enzim pokazuje najveći afinitet ka esterifikaciji molekula flavonoida, dok je najmanja

specifičnost pokazana ka reakcijama hidrolize diacetata do monoacetata. Za svaku reakciju dobijene su dve konstante specifičnosti za flavonoid-acetat, s obzirom da se monoacetat javlja kao proizvod u prvom stupnju i kao supstrat u drugom stupnju reakcije i rezultati pokazuju da je ovo jedinjenje podložnije reakciji esterifikacije, nego reakciji hidrolize.

Tabela 4.7 Određene vrednosti prividnih kinetičkih parametara pomoću COPASI softvera i izračunate konstante specifičnosti za sve reaktante.

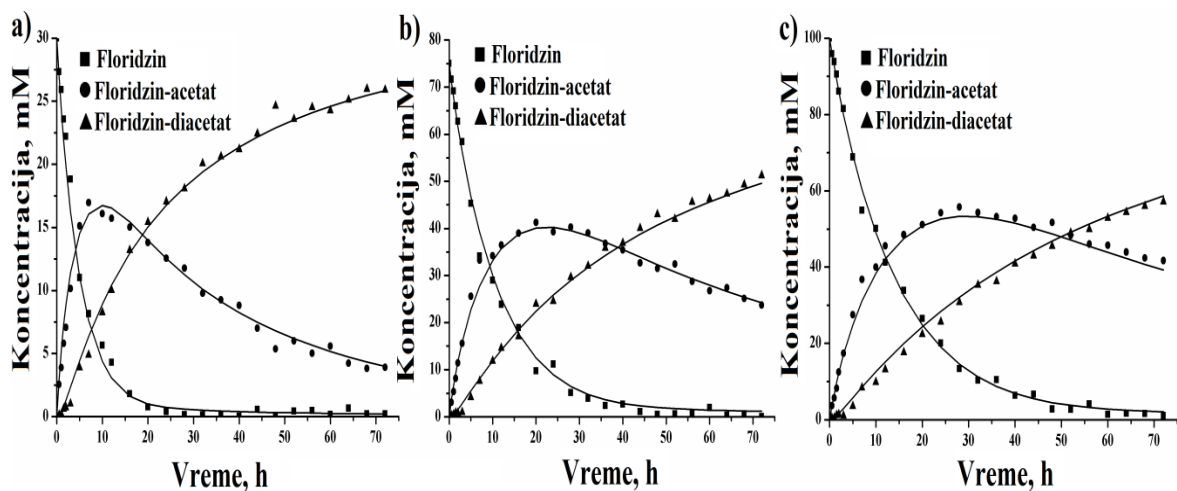
Parametri	Određene vrednosti (COPASI)			Konstanta specifičnosti, $\text{dm}^3/\text{g/h}$	Izračunate vrednosti za sve reaktante		
	Floridzin	Eskulin	Naringin		Floridzin	Eskulin	Naringin
K_{ms_1} (mM)	7,207	9,661	5,356	$K_{S_{1,f}^*}$	0,116	0,215	0,160
K_{mp_1} (mM)	4,563	2,210	4,675	$K_{S_{1,me}}$	$5,22 \cdot 10^{-3}$	$2,99 \cdot 10^{-2}$	$7,69 \cdot 10^{-3}$
V_{f_1} (mM/h)	8,324	20,75	8,561				
V_{r_1} (mM/h)	0,238	0,656	0,359	$K_{S_{2,me}}$	$1,67 \cdot 10^{-2}$	$6,63 \cdot 10^{-3}$	$9,83 \cdot 10^{-3}$
K_{ms_2} (mM)	46,50	139,24	41,39				
K_{mp_2} (mM)	4,105	1,575	9,040	$K_{S_{2,de}}$	$1,49 \cdot 10^{-5}$	$1,54 \cdot 10^{-5}$	$8,69 \cdot 10^{-6}$
V_{f_2} (mM/h)	7,743	9,250	4,069				
V_{r_2} (mM/h)	$6,12 \cdot 10^{-4}$	$2,43 \cdot 10^{-4}$	$7,86 \cdot 10^{-4}$				

*f, me, de se odnose na flavonoid, monoestar i diestar.

Zaključci izvedeni na osnovu analize određenih kinetičkih parametara su u saglasnosti sa koncentracionim profilima svih učesnika u reakciji, ukazujući na to da se pri dužim reakcionim vremenima koncentracija flavonoida približava vrednosti 0, tj. ostvaruje se 100% konverzije limitirajućeg supstrata (slika 4.22).

4.2.1.4.1. Validacija dobijenog kinetičkog modela

U cilju provere adekvatnosti dobijenog kinetičkog modela izvršena je simulacija reakcionog toka na osnovu prethodno određenih kinetičkih parametara (tabela 4.7) za reakciju acetilovanja floridzina kao model flavonoida. Za simulaciju reakcionog toka korišćena su tri seta eksperimentalnih podataka dobijena u reakciji acetilovanja floridzina u istim uslovima (1 % Novozym[®] 435 u 5 ml triacetina, na 70 °C u toku 72 h) pri različitim početnim koncentracijama acil-akceptora (30, 70 i 100 mM floridzin).



Slika 4.23 Fitovanje eksperimentalnih podataka (simboli) reakcije acetilovanja floridzina dobijenim kinetičkim modelom (linije). Eksperimentalni podaci su dobijeni pri početnoj koncentraciji floridzina od a) 30 mM, b) 70 mM i c) 100 mM.

Na slici 4.23 punom linijom predstavljene su predviđene krive zavisnosti koncentracije od vremena, dok su eksperimentalni podaci prikazani simbolima. Kao što se može videti, postignuto je dobro slaganje pretpostavljenog mehanizma sa stvarnim eksperimentalnim vrednostima, što je takođe potvrđeno i računanjem koeficijenta determinacije (R^2), s obzirom da je za sve promenljive u svim eksperimentima R^2 bio vrlo blizu vrednosti 1 (tabela 4.8). Pored toga, treba naglasiti da pretpostavljeni model pokazuje dobro slaganje ne samo u početnim vremenima, već i tokom dužeg reakcionog perioda i to za sve četiri testirane početne koncentracije floridzina.

Tabela 4.8 Izračunate vrednosti R^2 za sve promenljive u svim eksperimentima sa floridzinom kao model flavonoidom korišćenim za kinetičko modelovanje.

	Početna koncentracija floridzina, mM			
	30	50	75	100
R^2 (F)	0,995	0,997	0,997	0,998
R^2 (FAc)	0,978	0,983	0,987	0,994
R^2 (FDAc)	0,997	0,998	0,998	0,998

*Oznake F, FAc, FDAc se odnose na floridzin, floridzin-acetat i floridzin-diacetat

Na kraju, kinetička studija je pokazala da s obzirom na veliki višak triacetina u reakcionoj smeši, proces acilovanja se može opisati dvostepenom monosupstratnom reakcijom. Oba stupnja su adekvatno opisana reverzibilnom Mihaelis-Mentenovom kinetikom ne samo u početnom stupnju reakcije, već tokom celih ispitanih 72 h trajanja reakcije, što omogućava primenu dobijenih prividnih kinetičkih konstanti za buduće planiranje biokatalitičkog procesa.

4.2.2. Primena biljnih ulja kao acil-donora za sintezu estara flavonoida

Jedan od glavnih faktora koji utiče na proces acilovanja flavonoida, kao i fiziološke osobine sintetisanih estara je priroda acil-donora. Proizvodi različite lipofilnosti mogu biti sintetisani odabirom odgovarajuće kiseline (dužina lanca, zasićenje), što ih može učiniti pogodnim za različite primene. Do sada, različite čiste alifatične i aromatične kiseline, kao i njihovi vinil estri su korišćene u reakciji esterifikacije flavonoida [104]. Prethodno prikazani rezultati (poglavlje 4.1.2.3.) pokazuju da se veliki broj masnih kiselina može koristiti kao acil-donor i omogućiti visok stepen konverzije flavonoida u odgovarajuće estre. Jedan od glavnih ciljeva istraživača koji se bave ovom tematikom svakako je smanjenje troškova proizvodnje estara flavonoida. Primena alternativnih, jeftinijih i lako dostupnih acil-donora kao što su biljna ulja predstavlja jedan od mogućih načina za postizanje ovog cilja, s obzirom da ova ulja predstavljaju bogat izvor različitih masnih kiselina. Pregledom dostupne literature koje se bavi sintezom estara flavonoida, pronađeno je samo jedno istraživanje u kojem je za esterifikaciju naringina korišćeno ulje (ricinusovo ulje) kao acil-donor [126]. Međutim, treba napomenuti da ovo ulje ima atipične hemijske osobine u poređenju sa većinom drugih biljnih ulja, s obzirom da ricinolna kiselina čini 84 do 91 % masnokiselinskog sastava ovog ulja, dok su linolna, oleinska, palmitinska i stearinska kiselina prisutne u tragovima. Almeida i saradnici su pokazali da je nakon 120 h trajanja reakcije naringin-6"-*O*-ricinolat glavni proizvod reakcije u oba sistema, i kada je ricinusovo ulje korišćeno kao acil-donor kao i kada je čista ricinolna kiselina korišćena kao supstrat u reakciji, pri čemu su ostvareni stepeni konverzije u ovim reakcijama bili 33 % i 24 %, redom [126].

Cilj istraživanja ove faze doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti sinteze različitih estara flavonoida u reakciji transesterifikacije tri strukturno različita flavonoida, eskulina, floridzina i naringina, primenom alternativnih, prirodnih acil-donora, kao što su različita biljna ulja (kokosovo, laneno i suncokretovo ulje) katalizovanoj komercijalnim preparatom Novozym[®] 435. Najveća prednost primene ovih jedinjenja kao supstrata je činjenica da su to prirodna jedinjenja, lako dostupna i njihova primena drastično smanjuje troškove proizvodnje, s obzirom da su ulja mnogo jeftiniji supstrati u poređenju sa čistim masnim kiselinama, naročito polinezasićenim masnim kiselinama. Prilikom odabira ulja kao supstrata za reakcije esterifikacije, vodilo se računa da osim po masnokiselinskom sastavu, ulje i po svojim organoleptičkim svojstvima bude pogodno za upotrebu u kozmetičkim preparatima, s obzirom na dalji plan istraživanja ove disertacije. Izabrana ulja - kokosovo, laneno i suncokretovo - su dobri izvori različitih zasićenih (C₈-C₁₈) i nezasićenih masnih kiselina (oleinske, linolne i α -linolenske kiseline), standardnih sastojaka hrane i različitih kozmetičkih preparata (tabela 4.9).

Tabela 4.9 Masnokiselinski sastav ulja korišćenih u reakciji transesterifikacije predstavnika različitih klasa flavonoida.

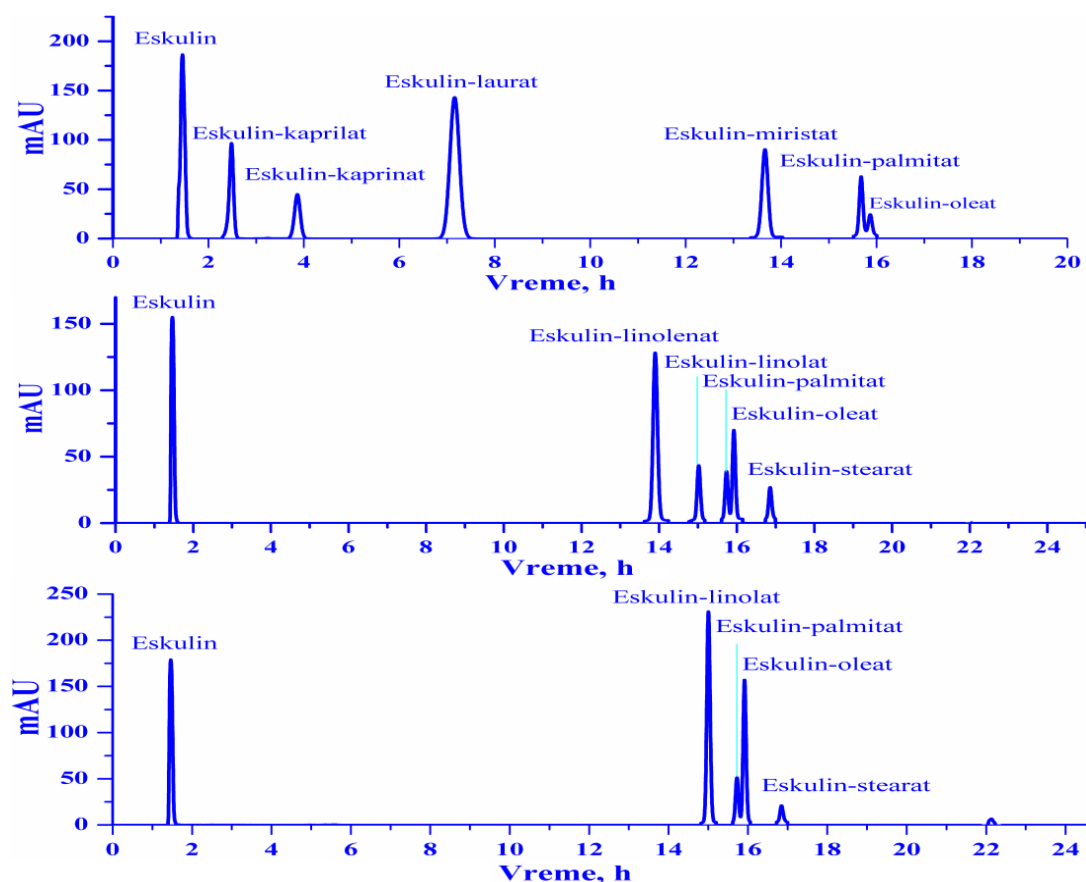
Ulje	Masne kiseline, %								
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18/1	C18/2	C18/3
Kokosovo	19,00	7,80	46,40	16,60	5,20	-	5,00	-	-
Laneno	-	-	-	-	10,86	1,08	19,75	13,58	54,73
Suncokretovo	-	-	-	-	8,23	3,71	29,79	58,27	-

Takođe, dobro je poznato da ova ulja pokazuju višestruke koristi za zdravlje ljudi, uključujući negu kože i negu kose, tako da nakon uklanjanja enzima i rastvarača, smeša estara i ulja se može direktno koristiti u kozmetičkim formulacijama jer neproreagovali supstrat (trigliceridi) ima pozitivno dejstvo, a međuproizvodi (mono- i digliceridi) mogu da imaju ulogu u formulisanju finalnog proizvoda zahvaljujući svojim emulgujućim svojstvima. Štaviše, topikalna primena ulja je efikasan metod za prenos esencijalnih masnih kiselina u kožu, a potencijalno i do sistemske cirkulacije [221]. Esencijalne masne kiseline pokazuju svoje blagotvorno dejstvo na kožu poboljšanjem barijerne funkcije, povećanjem

fluidnosti, fleksibilnosti i permeabilnosti ćelijske membrane, kao i smanjenjem transepidermalnog gubitka vode [222, 223].

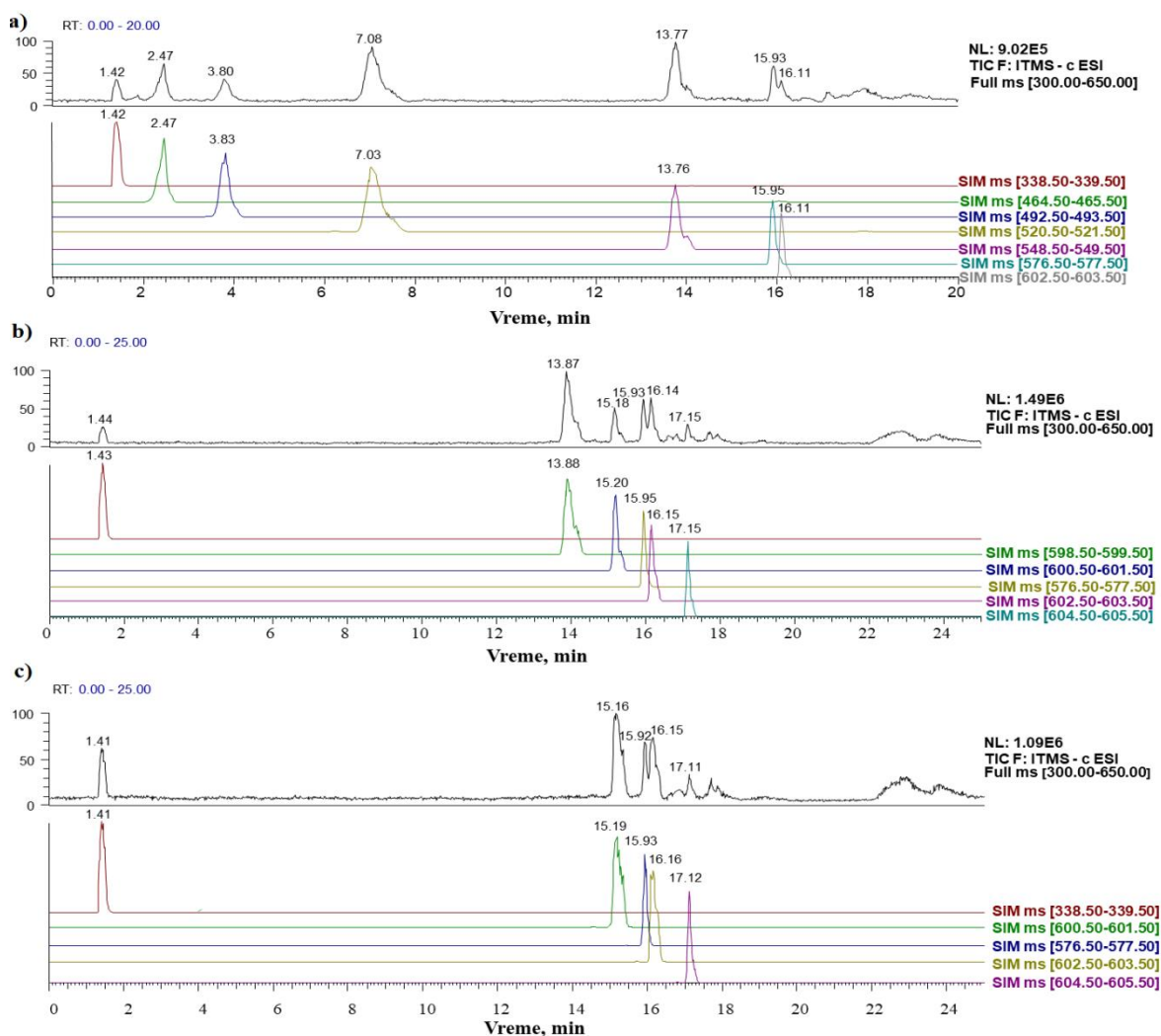
4.2.2.1. Uticaj vrste biljnog ulja na prinos enzimske transesterifikacije

Kao što je već predočeno, u preliminarnim eksperimentima ove faze istraživanja ispitana je mogućnost esterifikacije tri člana različitih klasa flavonoida (floridzina, naringina i eskulina) pri čemu su kao acil-donori korišćena biljna ulja, kokosovo, suncokretovo i laneno ulje. Reakcije transesterifikacije su izvođene pri koncentraciji flavonoida od 10 mM i molskom odnosu flavonoid:ulje 1:6 u acetonitrilu kao pogodnom medijumu za odigravanje reakcije esterifikacije flavonoida (poglavlje 4.1.2.1.). S obzirom na to da su ulja trigliceridi različitih karboksilnih kiselina, sasvim očekivano kao proizvodi reakcije transesterifikacije dobijene su smeše različitih flavonoid estara masnih kiselina.

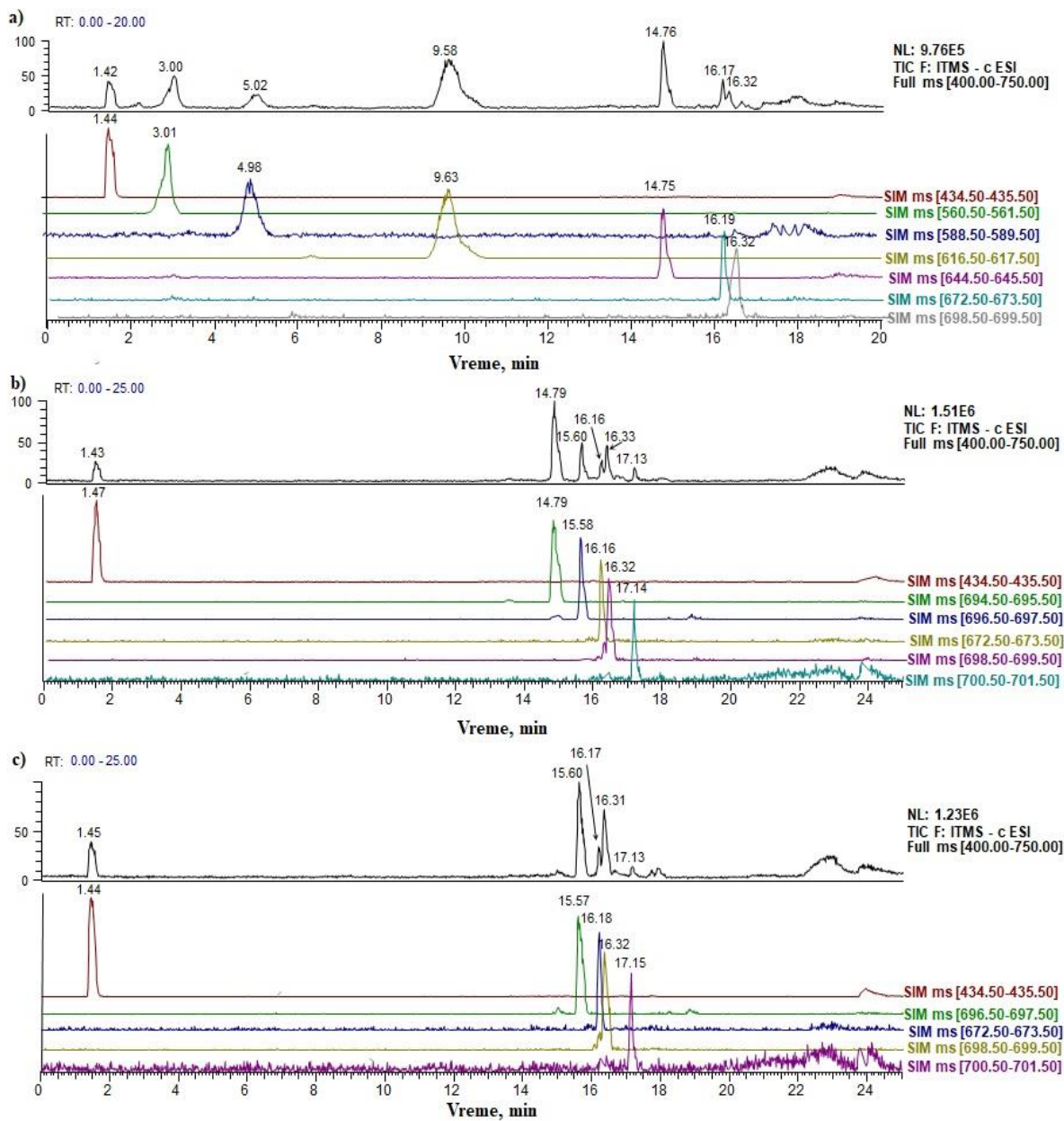


Slika 4.24 Tipični primeri hromatograma dobijenih analizom reakcione smeše nakon reakcije transesterifikacije eskulina sa a) kokosovim, b) lanenim i c) suncokretovim uljem.

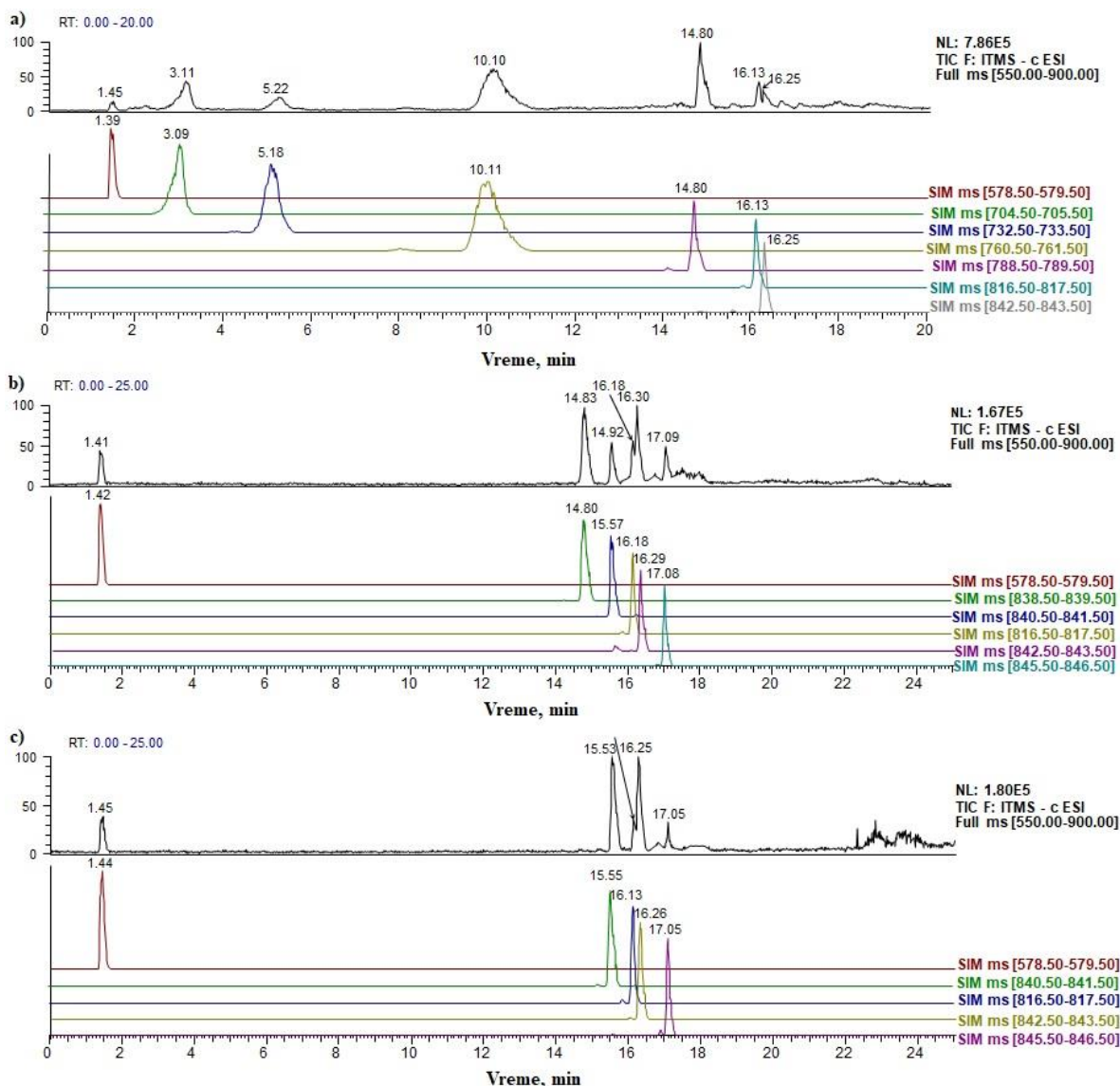
Uprkos složenom sastavu same reakcione smeše i prisustvu jedinjenja slične hidrofobnosti, detaljnim razvijanjem odgovarajuće HPLC metode, pikovi svih sintetisanih estara uspešno su razdvojeni i na slici 4.24 su predstavljeni tipični hromatogrami dobijeni nakon analize reakcione smeše nastale u reakciji eskulina sa tri pomenuta ulja. Štaviše, u cilju identifikacije proizvoda reakcije transesterifikacije, izvršena je HPLC-MS analiza svih devet reakcionih smeša dobijenih transesterifikacijom tri flavonoida (eskulina, floridzina i naringina) sa kokosovim, lanenim i suncokretovim uljem i dobijeni maseni hromatogrami predstavljeni su na slikama 4.25 - 4.27.



Slika 4.25 Maseni hromatogrami smeše sintetisanih estara u reakciji transesterifikacije eskulina sa a) kokosovim, b) lanenim i c) suncokretovim uljem



Slika 4.26 Maseni hromatogrami smeše sintetisanih estara u reakciji transesterifikacije floridzina sa a) kokosovim, b) lanenim i c) suncokretovim uljem



Slika 4.27 Maseni hromatogrami smeše sintetisanih estara u reakciji transesterifikacije naringina sa a) kokosovim, b) lanenim i c) suncokretovim uljem

U svim slučajevima, maseni hromatogrami pokazuju da mase dobijenih proizvoda odgovaraju $[M-H]^-$ oblicima monoestara tri flavonoida i masnih kiselina prisutnih u ispitanom ulju. Prisustvo monoestara različitih masnih kiselina kao proizvoda reakcije je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima o regioselektivnoj esterifikaciji flavonoida korišćenjem različitih masnih kiselina kao acil-donora i CAL B kao biokatalizatora reakcije [101, 119]. Takođe, NMR analize estara različitih flavonoida i masnih kiselina srednjeg i

dugog lanca su pokazale da su sintetisani monoestri dobijeni isključivo esterifikacijom primarne OH grupe šećernog ostatka molekula [114, 115, 207].

U tabeli 4.10 prikazani su sastavi reakcionih smeša i ostvareni stepeni konverzije limitirajućih supstrata dobijeni nakon analize preliminarnih eksperimenata reakcije transesterifikacije. Rezultati pokazuju da su reakcije uspešno izvedene u svih devet eksperimenata, s obzirom da je nakon 90 h trajanja reakcije stepen konverzije limitirajućeg supstrata bio preko 65 % u svim reakcijama.

Tabela 4.10 Sastav reakcionih smeša i ostvareni stepeni konverzije limitirajućih supstrata nakon 90 h trajanja reakcije transesterifikacije. Reakcije su izvođene sa 10 mM flavonoida, 1 % (w/v) enzima, molski odnos flavonoid:ulje 1:6 u acetonitrilu (do 5 ml).

Acil-akceptor	Ulje	Sintetisani estri, mM									Stepen konv. %
		C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18/1	C18/2	C18/3	
<i>Floridzin</i>	Kokos	1,25	0,74	4,64	1,58	0,62	-	0,27	-	-	90,98
	Lan	-	-	-	-	0,56	0,39	1,55	1,20	4,45	81,36
	Suncokret	-	-	-	-	0,65	0,28	2,49	4,33	-	77,57
<i>Naringin</i>	Kokos	1,01	0,60	3,55	1,35	0,59	-	0,44	-	-	75,43
	Lan	-	-	-	-	0,57	0,42	1,60	1,06	4,02	76,70
	Suncokret	-	-	-	-	0,63	0,36	2,78	4,73	-	85,08
<i>Eskulin</i>	Kokos	0,87	0,55	3,39	1,12	0,44	-	0,30	-	-	66,65
	Lan	-	-	-	-	0,51	0,36	1,34	0,93	3,40	65,31
	Suncokret	-	-	-	-	0,63	0,35	2,37	3,40	-	67,44

U eksperimentima u kojima je floridzin korišćen kao acil-donor, najveći stepen konverzije ostvaren je u reakciji sa kokosovim uljem kao donatorom acil ostatka (90 %), dok su slični stepeni konverzije (~80 %) ostvareni u reakcijama sa drugim uljima, ukazujući da su masne kiseline srednjeg lanca nešto bolji acil-donori u poređenju sa masnim kiselinama dugog lanca, što je u saglasnosti i sa rezultatima dobijenim u prethodnom istraživanju u okviru ove disertacije (poglavlje 4.1.2.3.). Sa druge strane, suncokretovo ulje se pokazalo kao najbolji acil-donor u reakciji esterifikacije naringina, pri čemu je ostvaren stepen konverzije od 85 %. Pored toga, ostvareni stepeni konverzije naringina u reakcijama sa sva tri ulja su nekoliko puta veći u odnosu na stepen konverzije ostvaren u reakciji esterifikacije naringina sa ricinusovim uljem [126]. Kada je reč o reakcijama u kojima je eskulin korišćen kao acil-

akceptor, ostvareni stepeni konverzije bili su oko 65 % u reakcijama sa svim ispitanim uljima, pa se može reći da su sva tri ulja podjednako dobri supstrati za reakciju esterifikacije eskulina. Međutim, upoređivanjem stepena konverzije ostvarenih u reakcijama sa različitim flavonoidima, primećuje se da su najmanji stepeni konverzije limitirajućeg supstrata ostvareni u eksperimentima u kojima je eskulin korišćen kao acil-akceptor. Ovakvi rezultati su iznenađujući, s obzirom da je eskulin najmanji molekul od tri ispitana flavonoida, tako da su predviđene manje sterne smetnje i lakši pristup supstrata aktivnom centru molekula enzima.

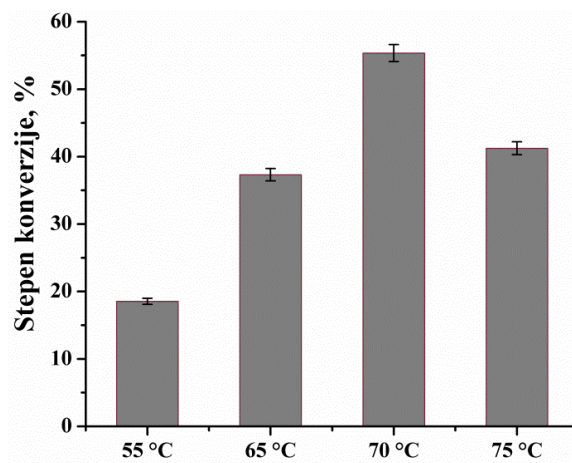
Ostvareni rezultati u ovom preliminarnom eksperimentu pokazuju da esterifikacija tri strukturno različita flavonoida može biti uspešno sprovedena korišćenjem različitih biljnih ulja kao acil-donora, omogućavajući sintezu smeše estara flavonoida različitih masnih kiselina u jednom koraku reakcije pri značajnom smanjenju ukupnih troškova samog postupka.

4.2.2.2. Optimizacija sinteze estara eskulina sa lanenim uljem kao acil-donorom

Nakon uspešno izvedenog preliminarnog eksperimenta primene biljnih ulja kao supstrata u reakciji esterifikacije flavonoida, fokus daljeg istraživanja bio je na optimizaciji ključnih reakcionih parametara u cilju povećanja vrednosti izlaznih veličina postupka sinteze (stepena konverzije, prinosa proizvoda i specifičnog prinosa). Kao model sistem za optimizaciju reakcije transesterifikacije izabrana je reakcija eskulina sa lanenim uljem, imajući u vidu najmanji stepen konverzije ostvaren u preliminarnom eksperimentu, a samim tim i više prostora za poboljšanje samog procesa.

4.2.2.2.1. Uticaj temperature

U cilju određivanja optimalne temperature reakcije transesterifikacije eskulina sa lanenim uljem katalizovane preparatom Novozym[®] 435, ispitan je uticaj temperature na stepen konverzije limitirajućeg supstrata. Reakcije su izvođene u temperaturnom opsegu od 55 do 75 °C i ostvareni stepeni konverzije prikazani su na slici 4.28.



Slika 4.28 Uticaj temperature na stepen konverzije eskulina u reakciji transesterifikacije sa lanenim uljem. Reakcije su izvođene u acetonitrilu tokom 48 h sa 0,05 M eskulina i 1,5 % (w/v) enzima i molskim odnosom supstrata 1:3.

Sa povećanjem temperature od 55 do 70 °C raste i stepen konverzije eskulina, dok daljim povećanjem reakcione temperature dolazi do pada ostvarenog stepena konverzije. Rezultati pokazuju da je optimalna temperatura za ovu reakciju 70 °C što je nešto viša temperatura u odnosu na optimalne temperature dobijene u studijama koje se bave CAL B katalizovanom esterifikacijom flavonoida. Većina autora je pokazala da je optimalna temperatura za esterifikaciju flavonoida sa karboksilnim kiselinama oko 60 °C, zbog najveće aktivnosti biokatalizatora, dobre rastvorljivosti supstrata i proizvoda i ostvarenih visokih stepena konverzija [75, 110]. Nešto viša optimalna temperatura reakcije transesterifikacije može biti pripisana prirodi korišćenog acil-donora, imajući u vidu viskoznost i kompleksnu strukturu lanenog ulja u poređenju sa čistim masnim kiselinama.

4.2.2.2. Optimizacija ostalih reakcionih parametara metodom odzivne površine

Optimizacija ostalih reakcionih parametara reakcije transesterifikacije eskulina sa lanenim uljem vršena je primenom statističkih metoda planiranja. U cilju dobijanja odgovarajućeg modela za optimizaciju, primenjen je centralni kompozitni plan koji uključuje 30 eksperimenata, pri čemu je četiri reakciona faktora varirano na pet nivoa vrednosti. Ispitan

je uticaj ključnih reakcionih faktora - koncentracije enzima, molskog odnosa supstrata koncentracije eskulina i reakcionog vremena - na stepen konverzije limitirajućeg supstrata (Y_1 , %), prinos proizvoda (Y_2 , mg/ml) i specifični prinos proizvoda (Y_3 , mmol estera/g_{enzima}) kao izlazne veličine. Kodirane i stvarne vrednosti eksperimentalnih faktora prikazani su u tabeli 4.11. Vrste promenljivih kao i opsezi ispitanih vrednosti su odabrani na osnovu rezultata dobijenih prilikom optimizacije esterifikacije flavonoida u reakciji sa oleinskom kiselinom (poglavlje 4.1.2.).

Tabela 4.11 Kodirane i stvarne vrednosti eksperimentalnih faktora.

Faktori	Kodirane vrednosti				
	-2	-1	0	1	2
Koncentracija enzima, X_1 (w/v)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Koncentracija eskulina, X_2 (M)	0,01	0,035	0,06	0,085	0,11
Molski odnos supstrata, X_3	1:0,33	1:1	1:1,67	1:2,33	1:3
Reakciono vreme, X_4 (h)	10	30	50	70	90

U tabeli 4.12 predstavljen je eksperimentalni plan sa kodiranim vrednostima ispitanih reakcionih faktora i ostvarenim rezultatima. Brzim pregledom dobijenih rezultata može se uočiti da ispitani reakcioni faktori različito utiču na različite izlazne veličine. Najveći stepen konverzije eskulina ostvaren je u eksperimentu 14 izvedenom pri koncentraciji eskulina 0,035 M, koncentraciji enzima 2 % (w/v), molskom odnosu eskulin:laneno ulje 1:2,33 nakon 70 h trajanja reakcije. Visoki stepeni konverzije ostvareni su i u eksperimentima izvođenim pri jednakoj ili manjoj koncentraciji eskulina (eksperiment 6, 13 i 19), što ukazuje na činjenicu da je visok stepen konverzije limitirajućeg supstrata moguće ostvariti samo pri malim koncentracijama eskulina. Sa druge strane, najveći prinos sintetisanih estara (13,68 mg/ml) postignut je u eksperimentu 16 u kojem su kodirane vrednosti svih parametara bile 1. Visok prinos proizvoda ostvaren je i u eksperimentu 18 izvođenom pri najvećoj ispitanoj koncentraciji enzima i najmanjem reakcionom vremenu, i centralnim vrednostima preostala dva parametra. Kao što je bilo i očekivano, najveći specifični prinos proizvoda (2,31 mmol/g_{enzima}) ostvaren je pri najmanjoj koncentraciji enzima i centralnim vrednostima ostalih parametara (eksperiment 17).

Tabela 4.12 Eksperimentalni plan i ostvareni rezultati.

Br.	Konc. enzima, X ₁ % (w/v)	Konc. eskulina, X ₂ , M	Molski odnos supstrata, X ₃	Reakciono vreme, X ₄ , h	Stepen konverzije, Y ₁ , %	Prinos, Y ₂ , mg/ml	Specifični prinos, Y ₃ , mmol/g _{enzima}
1	-1	-1	-1	-1	29,54	6,21	1,03
2	1	-1	-1	-1	34,47	7,25	0,60
3	-1	1	-1	-1	14,69	7,50	1,25
4	1	1	-1	-1	20,68	10,56	0,88
5	-1	-1	1	-1	36,4	7,66	1,27
6	1	-1	1	-1	50,63	10,65	0,89
7	-1	1	1	-1	13,26	6,77	1,13
8	1	1	1	-1	23,96	12,23	1,02
9	-1	-1	-1	1	41,51	8,73	1,45
10	1	-1	-1	1	39,51	8,31	0,69
11	-1	1	-1	1	20,83	10,64	1,77
12	1	1	-1	1	25,40	12,98	1,08
13	-1	-1	1	1	45,72	9,61	1,60
14	1	-1	1	1	55,3	11,63	0,97
15	-1	1	1	1	19,52	9,97	1,66
16	1	1	1	1	26,78	13,68	1,14
17	-2	0	0	0	19,22	6,93	2,31
18	2	0	0	0	37,90	13,67	0,91
19	0	-2	0	0	54,54	3,28	0,36
20	0	2	0	0	14,39	9,51	1,06
21	0	0	-2	0	13,35	4,82	0,53
22	0	0	2	0	33,06	11,92	1,32
23	0	0	0	-2	13,17	4,74	0,53
24	0	0	0	2	37,75	13,61	1,51
25	0	0	0	0	33,55	12,11	1,34
26	0	0	0	0	37,92	13,64	1,52
27	0	0	0	0	31,6	11,41	1,27
28	0	0	0	0	30,10	10,87	1,21
29	0	0	0	0	40,25	13,66	1,61
30	0	0	0	0	34,70	12,53	1,39

U cilju određivanja preciznih optimalnih vrednosti, tri izlazne veličine su fitovane modelom (jednačina 3.2), a adekvatnost regresionih modela drugog reda je potvrđena Fišerovim testom u sva tri slučaja. Za ispitivanje značajnosti koeficijenata regresionih modela korišćen je Studentov test i nakon isključivanja koeficijenata koji nisu bili statistički značajni, dobijeni su sledeći modeli koji opisuju uticaj reakcionih parametara na tri pomenute izlazne veličine:

$$Y_1 = 35,2 + 3,86X_1 - 10,4X_2 + 3,52X_3 + 4,17X_4 - 1,98X_3^2 - 2,58X_2X_3 \quad (4.9)$$

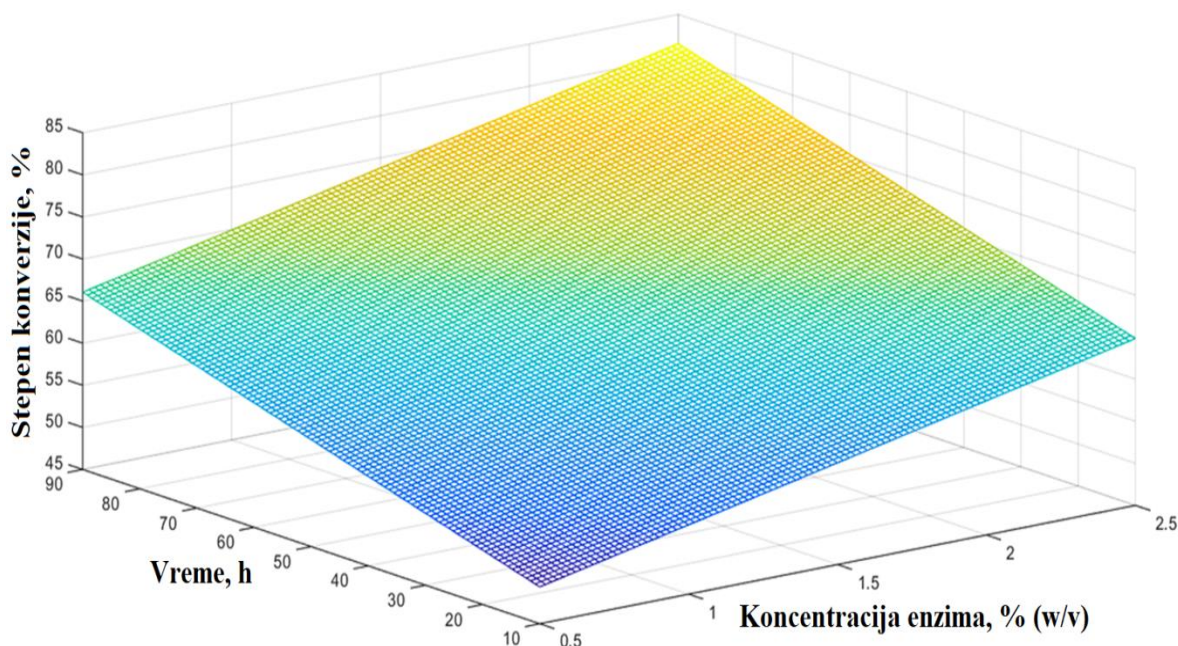
$$Y_2 = 12,7 + 1,41X_1 + 1,11X_2 + 1,01X_3 + 1,44X_4 - 1,24X_2^2 - 0,749X_3^2 \quad (4.10)$$

$$Y_3 = 1,41 - 0,279X_1 + 0,117X_2 + 0,104X_3 + 0,177X_4 + 0,0817X_1^2 - 0,143X_2^2 - 0,0879X_3^2 \quad (4.11)$$

Svi ispitivani reakcioni faktori su bili značajni u uključeni su u sva tri regresiona modela.

4.2.2.2.1. Uticaj koncentracije enzima i reakcionog vremena

Sa ekonomskog stanovišta, koncentracija biokatalizatora i vreme trajanje reakcije značajno utiču na ukupne troškove samog procesa proizvodnje, imajući u vidu visoku cenu komercijalnog enzima i činjenicu da se pravilnim regulisanjem vremena trajanja reakcije ukupni troškovi mogu značajno redukovati. Zbog toga, ispitan je uticaj koncentracije enzima u opsegu 0,5-2,5 % (w/v) i reakcionog vremena (10 - 90 h) na tri pomenute izlazne veličine sa ciljem određivanja minimalne koncentracije enzima neophodne za postizanje maksimalnih vrednosti izlaznih parametara u što kraćem vremenskom periodu. Uočeno je da povećanje koncentracije enzima i reakcionog vremena dovodi do linearnog povećanja kako stepena konverzije eskulina tako i ukupnog prinosa proizvoda (jednačine 4.9 i 4.10). Na slici 4.29 prikazan je uticaj ova dva faktora na stepen konverzije limitirajućeg supstrata i može se uočiti da se najveći stepen konverzije ostvaruje pri maksimalnim ispitanim vrednostima ova dva parametra. Isti trend primećen je i u reakciji esterifikacije naringina sa dekanskom kiselinom katalizovanoj istim enzimom, s obzirom da je povećanjem koncentracije enzima od 5 do 20 mg/ml dovelo do povećanja stepena konverzije od 25 do 45 % [101]. Sa druge strane, drugačiji trend primećen je kod uticaja ovog faktora na specifični prinos, s obzirom da je opisan negativnim linernim koeficijentom (-0,279) i pozitivnim kvadratnim koeficijentom (0,0817) (jednačina 4.11). Imajući u vidu vrednosti pomenutih koeficijenata, može se zaključiti da sa povećanjem koncentracije enzima dolazi do smanjenja specifičnog prinosa proizvoda i da je najmanja ispitana koncentracija enzima (0,5 % (w/v)) optimalna za postizanje visokog specifičnog prinosa proizvoda.



Slika 4.29 Odzivna površina uticaja koncentracije enzima i reakcionog vremena na stepen konverzije eskulina.

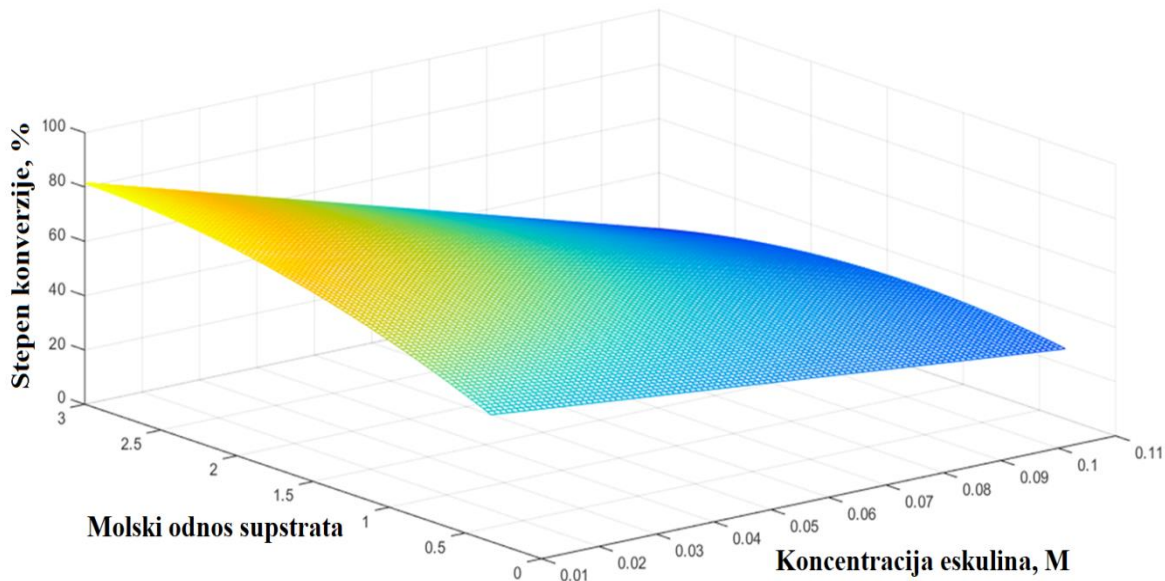
Kada je reč o uticaju reakcionog vremena, linearni koeficijent β_4 u jednačinama modela za sve tri izlazne veličine (jednačine 4.9 - 4.11) pokazuje da sa povećanjem reakcionog vremena dolazi do povećanja vrednosti sva tri izlazna parametra, pa se može zaključiti da je maksimalna ispitana vrednost dužine trajanja reakcije (90 h) zapravo optimalno reakciono vreme za sva tri izlazne veličine.

4.2.2.2.2. Uticaj koncentracije supstrata

Uticaj početnih koncentracija supstrata je ispitan variranjem dva reakciona faktora: koncentracije eskulina i molskog odnosa supstrata. Početna koncentracija flavonoida koja se koristi u reakcijama esterifikacije je važan parametar koji utiče na tok reakcije, s obzirom da je primena visokih koncentracija flavonoida najčešće ograničena njihovom slabom rastvorljivošću. Generalno, u opsegu vrednosti kada rastvorljivost nije ograničavajući faktor, primećeno je da stepen konverzije i početne brzine reakcije esterifikacije rastu sa povećanjem koncentracije flavonoida [15]. Međutim, s obzirom na veliku strukturnu raznolikost flavonoida i njihovu rastvorljivost, uticaj početne

koncentracije acil-akceptora mora biti detaljno ispitan. Što se tiče molskog odnosa supstrata, već je više puta pomenuto da se, radi pomeranja ravnoteže ka stvaranju proizvoda, reakcije esterifikacije flavonoida izvode u višku acil-donora [8, 224]. U cilju određivanja optimalnih vrednosti ova dva parametra za esterifikaciju eskulina u reakciji sa lanenim uljem, ispitan je njihov uticaj na tri izlazne veličine.

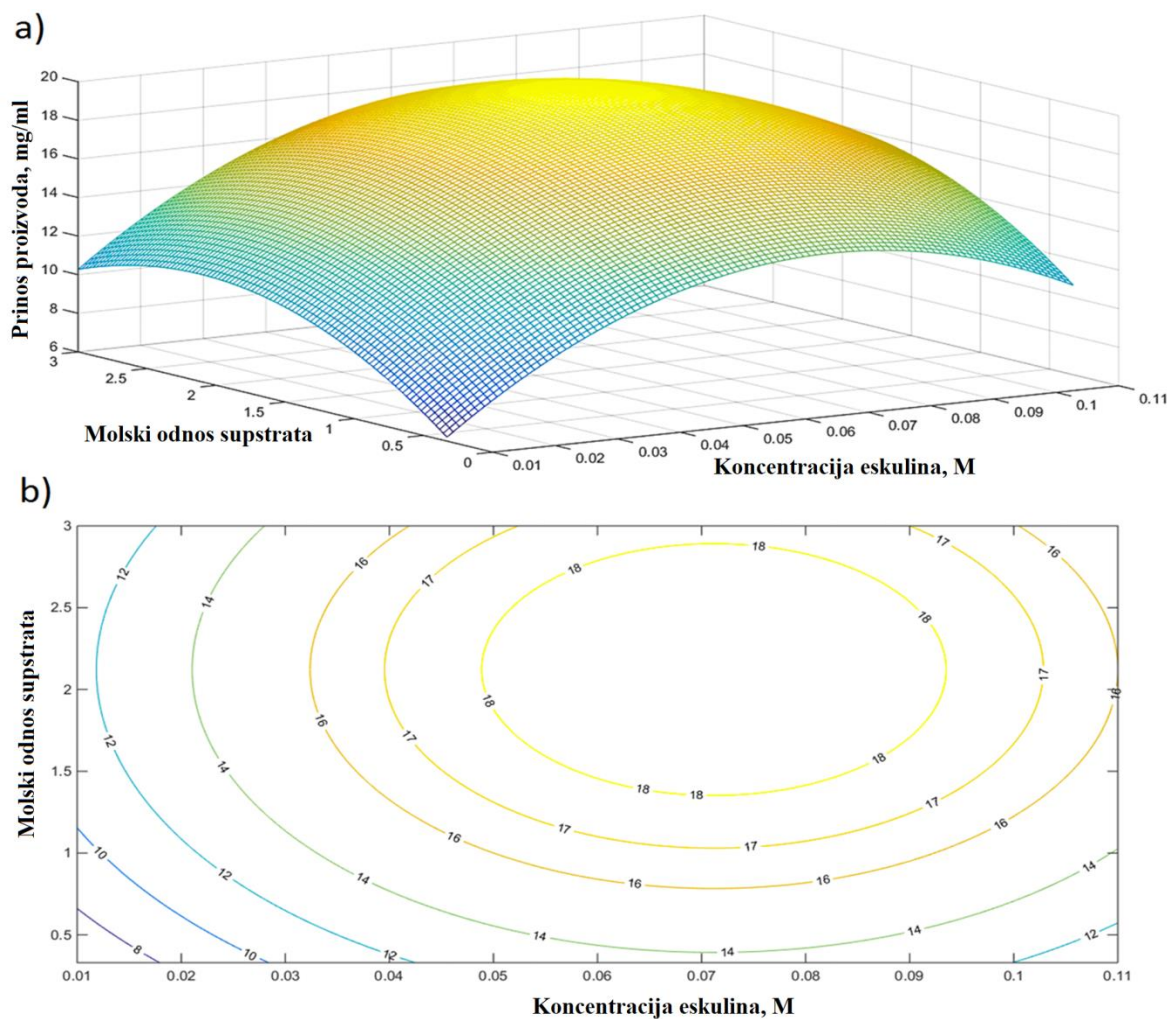
Pojedinačni uticaj koncentracije eskulina na stepen konverzije opisan je negativnim linearnim koeficijentom β_2 (jednačina 4.9), pa se sa povećanjem početne koncentracije eskulina primećuje blagi pad stepena konverzije što je i prikazano na slici 4.30. Sa druge strane uticaj molskog odnosa supstrata na stepen konverzije eskulina opisan je pozitivnim linearnim koeficijentom β_3 (3,52) i negativnim kvadratnim koeficijentom (-1.98), što se grafički prikazuje kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Treba naglasiti da koncentracija eskulina ima blagi uticaj na poziciju lokalnog maksimuma s obzirom na postojanje negativne interakcije (β_{23}) između koncentracije eskulina (X_2) i molskog odnosa supstrata (X_3).



Slika 4.30 Odzivna površina uticaja koncentracije eskulina i molskog odnosa supstrata na stepen konverzije eskulina.

Kao što se može primetiti (slika 4.30) maksimalni stepen konverzije ostvaruje se pri najmanjoj koncentraciji eskulina 0,01 M i maksimalnom ispitanom molском odnosu eskulin:ulje 1:3 (odgovara molском odnosu eskulin:masna kiselina 1:9). Iako se u većini studija koje se bave esterifikacijom flavonoida smatra da je optimalni molски odnos flavonoid:karboksilna kiselina 1:5 [8, 12, 100, 110], Ćeliz i saradnici su pokazali da u zavisnosti od korišćenog rastvarača u reakciji, optimalni molски odnos varira, pa je tako molски odnos acil-akceptor:acil-donor 1:10 bio dovoljan za postizanje skoro potpune konverzije za reakcije izvođene u acetonu i acetonitrilu, dok je za reakcije izvođene u tetrahidrofuranu (THF) i *t*-butanolu 1:40 bio optimalan molски odnos [116]. Pored toga, s obzirom na rezultate ostvarene prilikom optimizacije reakcije sinteze eskulin-oleata (poglavlje 4.1.4), očigledno je da i vrsta acil-donora, a verovatno i temperatura odigravanja reakcije utiču na optimalni molски odnos supstrata.

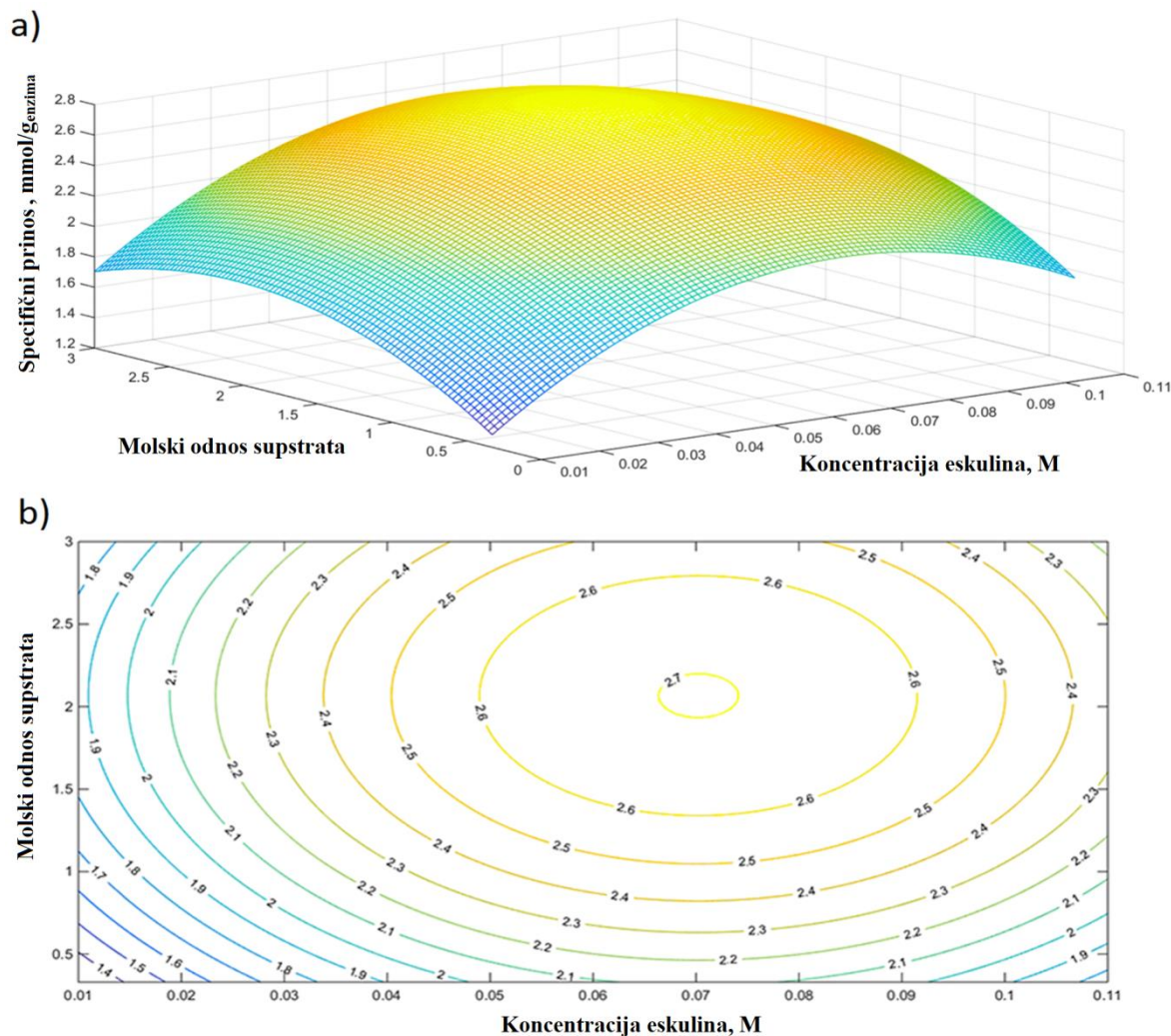
Optimalne vrednosti koncentracije eskulina i molskog odnosa supstrata se razlikuju u zavisnosti od ispitane izlazne vrednosti. Uočena međusobna interakcija uticaja koncentracije eskulina i molskog odnosa supstrata na prinos proizvoda i specifični prinos opisana je negativnim koeficijentima β_{22} i β_{33} (jednačine 4.10 i 4.11). Oba signifikantna kvadratna koeficijenta u jednačinama 4.10 i 4.11 imaju negativnu vrednost, što znači da se njihov uticaj na prinos proizvoda i specifični prinos može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom (slike 4.31 i 4.32)



Slika 4.31 a) Odzivna površina i b) konturni dijagram uticaja koncentracije eskulina i molskog odnosa supstrata na prinos proizvoda.

Model predviđa da se maksimalni prinos proizvoda kao i specifični prinos ostvaruju pri koncentraciji eskulina 0,07 M i molskom odnosu eskulin:ulje 1:2. Generalno, optimalne vrednosti ova dva parametra su iste za prinos proizvoda i specifični prinos kao izlazne veličine, ali značajno se razlikuju od optimalnih vrednosti dobijenih za stepen konverzije kao izlazni parametar, ukazujući na to da je znatno veća koncentracija eskulina pogodna za izlazne veličine koje opisuju ukupnu produktivnost procesa nego za maksimalnu konverziju. Sa druge strane, dobijene optimalne vrednosti su u saglasnosti sa optimalnim

vrednostima dobijenim prilikom optimizacije esterifikacije eskulina primenom oleinske kiseline kao acil-donora (poglavlje 4.1.4).



Slika 4.32 a) Odzivna površina i b) konturni dijagram uticaja koncentracije eskulina i molskog odnosa supstrata na specifični prinos proizvoda.

4.2.2.2.2.3. Optimalni uslovi odigravanja reakcije i provera adekvatnosti modela

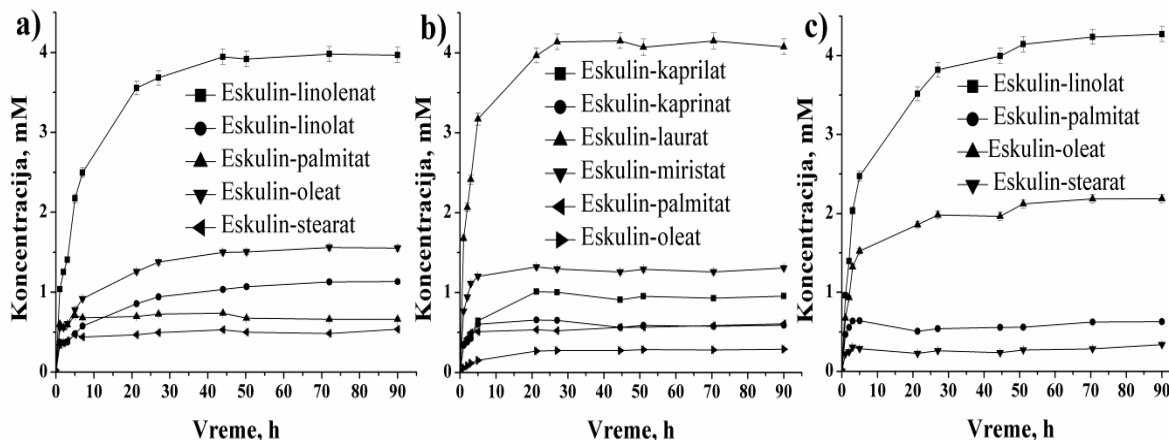
Radi provere adekvatnosti tri dobijena modela izvedeni su dodatni eksperimenti pod usvojenim optimalnim uslovima za sve tri izlazne veličine. U reakciji izvedenoj pod optimalnim uslovima za stepen konverzije (koncentracija enzima 2,5 % (w/v),

koncentracija eskulina 0,01 M, molski odnos eskulin:ulje 1:3 i reakciono vreme 90 h, na temperaturi od 70 °C), ostvaren je stepen konverzije od 78,5 %, što predstavlja 3,68 % odstupanja od vrednosti predviđene modelom. Sa druge strane, prilikom izvođenja reakcije pod optimalnim uslovima za prinos proizvoda (koncentracija enzima 2,5 % (w/v), koncentracija eskulina 0,07 M, molski odnos supstrata 1:2 i vreme trajanja reakcije 90 h), sintetisano je 19,13 mg/ml estara, što predstavlja odstupanje manje od 1 % od teorijski određene vrednosti po jednačini modela. I na kraju, nakon izvođenja reakcije pod optimalnim uslovima za specifični prinos kao treću izlaznu veličinu (koncentracija enzima 0,5 % (w/v), koncentracija eskulina 0,07 M, molski odnos supstrata 1:2 i vreme trajanja reakcije 90 h) rezultati su pokazali da je ostvaren specifični prinos proizvoda od 2,83 mmol/g_{enzima} što odgovara odstupanju od 4,81 % u odnosu na vrednost predviđenu modelom. Imajući u vidu da su odstupanja u sva tri slučaja manja od 5 %, može se zaključiti da je adekvatnost dobijenih modela zadovoljavajuća i da model omogućava dobra predviđanja izlaznih veličina reakcije.

4.2.2.3. Primena dobijenih optimalnih reakcionih uslova u reakciji transesterifikacije eskulina sa drugim uljima

Ako se uporede dobijene optimalne vrednosti parametara sa uslovima primenjenim u preliminarnim ekseperimentima reakcije transesterifikacije različitih flavonoida sa biljnim uljima, jasno je da se veći prinos proizvoda, odnosno stepen konverzije, može ostvariti promenom molskog odnosa supstrata sa 1:6 na 1:3 i 1:2. U cilju ispitivanja dalje primene rezultata dobijenih tokom optimizacije metodom odzivnih površina, izvedene su reakcije transesterifikacije primenom kokosovog i suncokretovog ulja pod određenim optimalnim uslovima za stepen konverzije eskulina. Primećeno je da je nakon 90 h trajanja reakcije 78,3 % i 74,3 % eskulina prevedeno u odgovarajuće estre u reakciji sa kokosovim u suncokretovim uljem, redom, što je značajno poboljšanje u odnosu na rezultate preliminarnih eksperimenata (tabela 4.10). Smanjenje molskog odnosa eskulin:ulje sa 1:6 na 1:3 dovelo je do dobijanja većih koncentracija sintetisanih estara (slika 4.33). Iako je višak acil-donora poželjan u reakciji esterifikacije, u ovom slučaju, s obzirom na viskoznost

korišćenog ulja, veliki višak ovog acil-donora u reakcionoj smeši verovatno otežava pristup supstrata aktivnom centru molekula enzima.

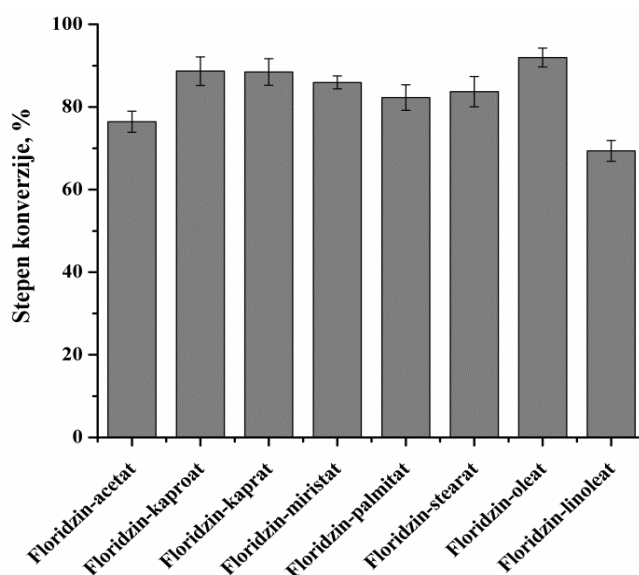


Slika 4.33 Koncentracioni profili estara dobijenih u reakciji transesterifikacije eskulina sa: a) lanenim, b) kokosovim i c) suncokretovim uljem. Reakcije su izvođene pod optimalnim uslovima za stepen konverzije.

S obzirom na ostvarene rezultate, može se zaključiti da se smeša estara flavonoida različitih masnih kiselina može sintetisati u jednom koraku primenom različitih biljnih ulja kao acil-donora i CAL B kao biokatalizatora. U zavisnosti od krajnje primene, odabirom odgovarajućeg ulja, mogu se dobiti proizvodi različitih karakteristika i lipofilnosti. Pa tako, izborom kokosovog ulja, kao proizvod reakcije očekuje se smeša estara zasićenih masnih kiselina srednje dužine lanca. Sa druge strane, estri nezasićenih masnih kiselina dugog lanca su dominantni proizvodi reakcije transesterifikacije eskulina sa preostala dva ulja, pa tako eskulin-linolenat predstavlja glavni proizvod reakcije transesterifikacije eskulina sa lanenim uljem, dok su eskulin-linolat i eskulin-oleat glavni proizvodi reakcije izvođene sa suncokretovim uljem (slika 4.33). Korišćena ulja su česte komponente različitih kozmetičkih proizvoda, pa tako radi dalje primene sintetisanih estara nije potrebno uklanjati ostatak neproreagovalog ulja, kao ni proizvode njihove delimične razgradnje (monogliceride i digliceride), s obzirom da, zahvaljujući njihovim emulgujućim svojstvima, njihovo prisustvo može poboljšati sam postupak pripreme različitih kozmetičkih formulacija.

4.2.3. Različiti acil-donori u reakciji sinteze estara flavonoida

U ovom poglavlju disertacije navedeni su kratki zaključci o primeni različitih acil-donora u reakciji sinteze estara flavonoida. Na početku ispitan je širok opseg (C_2 - C_{18}) kako zasićenih, tako i nezasićenih čistih masnih kiselina u reakciji sinteze estara floridzina. Sve kiseline pokazale su se kao dobri donori acil ostatka za reakciju esterifikacije, s obzirom na ostvaren visok stepen konverzije limitirajućeg supstrata (preko 70 %) u svim reakcijama (slika 4.34).



Slika 4.34 Stepen konverzije floridzina ostvaren u reakciji esterifikacije primenom različitih masnih kiselina kao acil-donora.

S obzirom na visoku cenu čistih masnih kiselina, u cilju razvijanja isplativijeg i ekonomičnijeg postupka sinteze estara ispitano je i nekoliko alternativnih acil-donora. Tako su pored sirćetne kiseline, triacetin i anhidrid sirćetne kiseline ispitani u reakciji sinteze flavonoid-acetata i pokazano je da se oba supstrata mogu uspešno koristiti u reakciji acetilovanja u organskom rastvaraču. Međutim, kada je reč i o ekološki prihvatljivim reakcijama u kojima je moguće koristiti veće početne koncentracije supstrata, triacetin se pokazao kao odličan supstrat za odigravanje reakcije u sistemu bez rastvarača, pri čemu se u toku nepunih 24 h ostvaruju totalne konverzije limitirajućeg supstrata u dva proizvoda

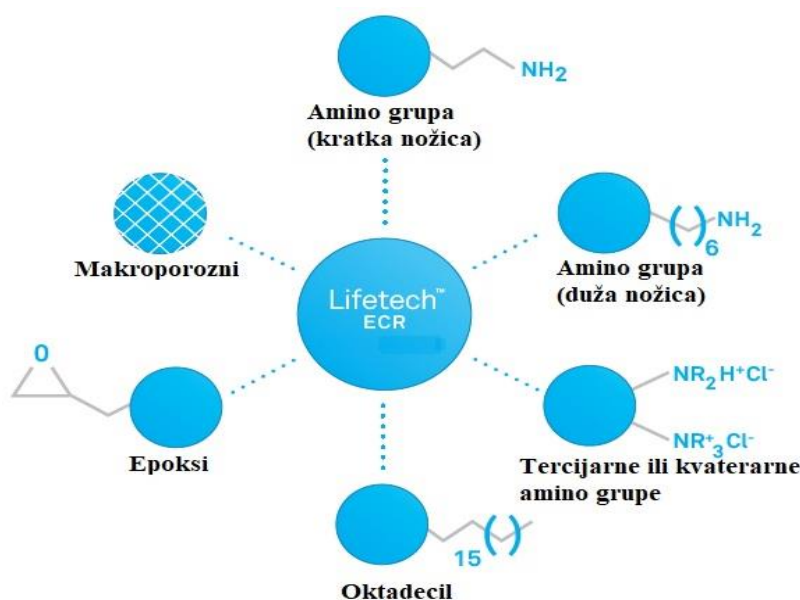
reakcije, flavonoid-acetat i flavonoid-diacetat. Pored toga, sprovedena kinetička studija je pokazala da se oba stupnja reakcije mogu opisati povratnom Michaelis-Mentenovom kinetikom, omogućavajući uspešnu primenu dobijenih kinetičkih konstanti za planiranje budućih biokatalitičkih procesa.

Na kraju, biljna ulja, kao što su kokosovo, laneno i suncokretovo ulje, su se pokazali kao veoma dobra alternativa čistim masnim kiselinama u reakciji esterifikacije flavonoida, s obzirom da su to lako dostupna, prirodna jedinjenja, bogata najrazličitijim masnim kiselinama, značajno jeftiniji supstrati u poređenju sa čistim kiselinama, naročito polinezasićenim. Razvijen je novi pristup primene prirodnih bioizvora u reakciji transesterifikacije strukturno različitih molekula flavonoida, pri čemu nastaje širok spektar proizvoda, čije je polje primene prošireno kako u prehrambenoj, tako i u kozmetičkoj industriji. Osim toga, postupak izveden na ovaj način dovodi do smanjenja ukupnih troškova, što je veoma važno za dalji razvoj samog procesa.

4.3. Imobilizacije lipaze tipa B iz *C.antarctica*

U prethodnom poglavlju ispitan je jedan od mogućih načina za smanjenje ukupnih troškova procesa sinteze estara flavonoida, primenom alternativnih, jeftinijih acil-donora. Sa druge strane, s obzirom na pomenutu visoku cenu komercijalnog enzimskog preparata koji se najčešće koristi u reakciji esterifikacije, kao i malog broja biokatalizatora koje se mogu koristiti u reakciji sinteze estara flavonoida, priprema novih, jeftinijih imobilisanih biokatalizatora je važan korak u povećanju ekonomičnosti enzimskog procesa sinteze estara ovih bioaktivnih jedinjenja.

Shodno tome, ispitana je mogućnost imobilizacije CAL B proizvedene od strane genetski modifikovane plesni *Aspergillus niger* na osam LifeTech™ nosača ECR serije sa različitim funkcionalnim grupama (slika 4.35). Postupak imobilizacije CAL B na odabrane nosače ECR serije je optimizovan i najaktivniji preparati su ispitani u reakciji sinteze estara flavonoida. Pored toga, ispitana je i esterifikaciona aktivnost odabranih, najaktivnijih preparata imobilisane CAL B na različite nosače, kao što su modifikovane i nemodifikovane čestice nano-silike [202], Purolite® MN102, Eupergit® C250L [201], čiji je postupak imobilizacije prethodno optimizovan na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju.



Slika 4.35 Funkcionalne grupe određenih LifeTech™ nosača ECR serije [225].

4.3.1. Imobilizacija CAL B na LifeTech™ ECR nosače

LifeTech™ nosači ECR serije su grupa stirenskih, odnosno metakrilatnih biokompatibilnih nosača za imobilizaciju koji se mogu koristiti u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji [226]. Ovi nosači predstavljaju čvrste, sferične čestice, mehanički veoma stabilne, koje se lako odvajaju iz reakcione smeše čime je omogućena njihova upotreba u više ciklusa. Zahvaljujući svojim karakteristikama, kompatibilni su sa različitim vrstama reaktora.

U preliminarnom eksperimentu, u cilju odabira najpogodnijeg nosača, ispitana je imobilizacija lipaze tipa B iz *C. antarctica* na osam LifeTech™ nosača ECR serije sa različitim funkcionalnim grupama, čije su karakteristike date u tabeli 4.13. Postupak imobilizacije CAL B izvođen je na 25 °C tokom 24 h sa 10 mg nosača pri čemu je početna koncentracija proteina bila 18 mg/g_{nosača} i smeša je dopunjena do 1 ml fosfatnim puferom pH 7 definisanog molariteta (0,1 M pufer za nosače sa amino i epoksi funkcionalnim grupama i 1 M za nosač sa oktadecil grupom). Nakon završene imobilizacije ispitana je hidrolitička aktivnost imobilisanih preparata i dobijene vrednosti su date u tabeli 4.13.

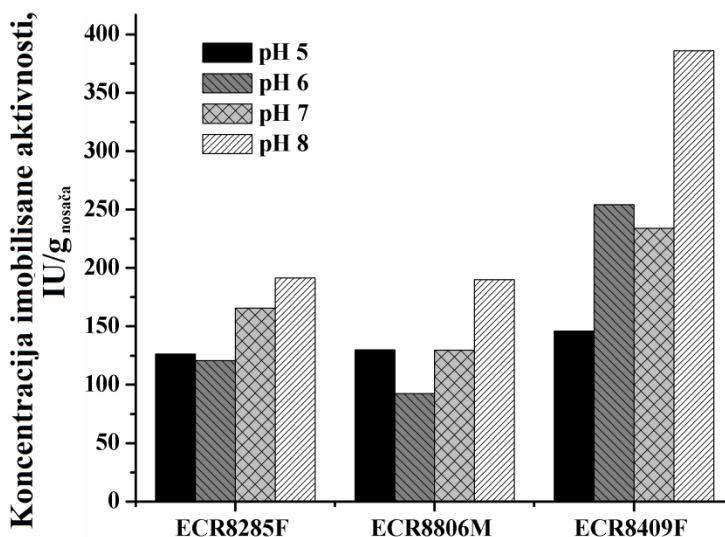
Tabela 4.13 Osobine LifeTech™ nosača ECR serije korišćenih za imobilizaciju CAL B i određene aktivnosti imobilisanih preparata.

LifeTech nosač	Tip nosača	Funkcionalna grupa	Veličina pora	Konc. imobilisane aktivnosti, IU/g _{nosača}
ECR8305F	amino C2 metakrilat	NH ₂ (kratka nožica)	300-600	101,84
ECR8309F	amino C2 metakrilat	NH ₂ (kratka nožica)	600-1200	201,68
ECR8404F	amino C6 metakrilat	NH ₂ (duga nožica)	300-600	187,89
ECR8409F	amino C6 metakrilat	NH ₂ (duga nožica)	600-1200	234,06
ECR1508	tercijarni amino stiren	-NR ₂	-	123,80
ECR1604	kvaternarni amino stiren	-NR ₃ ⁺	-	92,27
ECR8806M	Oktadecil metakrilat	Oktadecil	500-700	129,63
ECR8285F	Epoksi/butil metakrilat	Epoksi	-	165,55

Na osnovu preliminarnih rezultata, može se zaključiti, da je do imobilizacije lipaze došlo na svim ponuđenim nosačima. Kada je reč o nosačima sa amino funkcionalnom grupom, za dobijanje imobilisanog preparata visoke aktivnosti, pogodniji su nosači sa primarnom amino grupom, u poređenju sa nosačima sa tercijarnom i kvaternarnom amino grupom. Pored toga, primetno je i da se imobilisani preparati veće aktivnosti dobijaju ukoliko se koristi nosač sa porama većih dimenzija, što je verovatno posledica olakšanog pristupa enzima tokom imobilizacije porama u dubljim slojevima čestice nosača, kao i olakšanom pristupu supstrata molekulima vezanog enzima. Kada je reč o uticaju dužine nožice funkcionalne grupe, pogodniji je nosač sa dužom nožicom s obzirom da su bolji rezultati hidrolitičke aktivnosti ostvareni prilikom imobilizacije CAL B na amino C₆ metakrilatni nosač. Tačnije, enzim imobilisan na pomenuti amino nosač pokazuje i najveću hidrolitičku aktivnost od svih osam ispitanih imobilisanih preparata. S tim u vezi, za dalji rad odabran je amino C₆ metakrilatni nosač kao jedan od potencijalno dobrih nosača za imobilizaciju CAL B. Pored njega, radi ispitivanja i optimizovanja različitih metoda imobilizacije, a shodno krajnjoj primeni imobilisanih preparata, pored izabranog nosača sa primarnom amino grupom, za dalji rad odabrani su i nosači sa drugim funkcionalnim grupama, oktadecil i epoksi. ECR8806M nosač sa oktadecil funkcionalnim grupama izabran je u cilju ispitivanja adsorpcije CAL B na ovaj jako hidrofobni nosač, s obzirom na dobre prethodno ostvarene rezultate prilikom imobilizacije CAL B na hidrofobne nosače [201], kao i zbog činjenice da se imobilisani biokatalizatori na ovim nosačima mogu koristiti u organskim rastvaračima, što je jako bitno zbog dalje primene u reakciji sinteze estara flavonoida. Sa druge strane, u cilju detaljnog ispitivanja kovalentne imobilizacije CAL B, za dalji rad odabran je i ECR8285F nosač sa epoksi funkcionalnim grupama, s obzirom da je ovaj nosač pogodan za kovalentnu imobilizaciju lipaza, posebno CAL B, zbog jedinstvenog kombinovanog efekta, prisustva epoksi grupa za kovalentnu imobilizaciju i veoma hidrofobnog nosača. U cilju optimizovanja postupka imobilizacije CAL B na tri odabrana nosača (ECR8409F, ECR8806M, ECR8285F) i dobijanja što aktivnijih imobilisanih preparata, u narednoj fazi istraživanja ispitan je uticaj nekoliko značajnih parametara (pH pufera u kome se vrši imobilizacija, ponuđene koncentracije enzima, kao i vremena imobilizacije) na proces imobilizacije.

4.3.1.1. Uticaj pH na imobilizaciju CAL B

U početnom eksperimentu ispitan je uticaj pH pufera za imobilizaciju na aktivnost dobijenih imobilisanih preparata. Imobilizacija je izvođena u toku 24 h sa 10 mg nosača i početnom koncentracijom proteina 18 mg/g_{nosača}, a smeša je dopunjena do 1 ml odgovarajućim puferom (pH vrednosti 5, 6, 7 ili 8), pri čemu je molaritet korišćenih pufera bio isti kao u preliminarnom eksperimentu. Uočeno je (slika 4.36) da prilikom porasta pH vrednosti pufera za imobilizaciju od 5 do 7, nema značajnije promene aktivnosti lipaze imobilisane na sva tri nosača, dok se pri pH 8 primećuje porast aktivnosti, naročito kod nosača sa amino funkcionalnim grupama, pri čemu je ostvarena maksimalna hidrolitička aktivnost imobilisane lipaze od 386 IU/g_{nosača}.



Slika 4.36 Uticaj pH pufera na koncentraciju imobilisane aktivnosti lipaze.

S obzirom da u ispitanom opsegu pH nije pokazan značajan uticaj na aktivnost lipaze imobilisane na nosač sa epoksi funkcionalnim grupama, a sa druge strane, imajući u vidu literaturni podatak da su epoksidne grupe stabilne i veoma reaktivne u velikom opsegu pH vrednosti i jonske jačine, za nosač sa epoksi grupama izvedeni su dodatni eksperimenti imobilizacije lipaze u 0,05 i 0,5 M puferu pH 10. U tabeli 4.14 prikazane su dobijene vrednosti aktivnosti lipaze imobilisane na nosač sa epoksi grupama pri različitim pH vrednostima pufera.

Tabela 4.14 Koncentracije aktivnosti imobilisane lipaze na ECR8285F nosač pri različitim pH vrednostima pufera.

pH	5	6	7	8	10 (50 mM)	10 (0,5 M)
A, IU/g _{nosača}	126,43	120,63	165,55	191,51	263,28	402,43

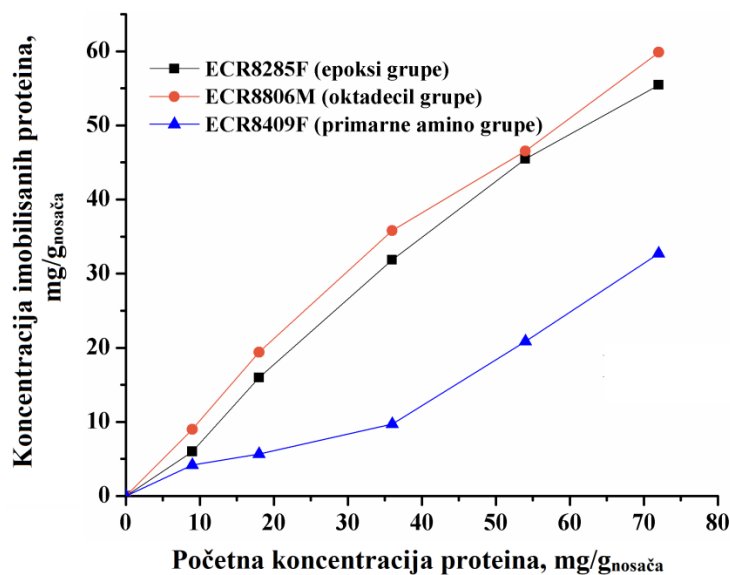
Kao što je i očekivano, znatno veće aktivnosti lipaze imobilisane na nosač sa epoksi grupama dobijaju se pri većim vrednostima pH pufera, a maksimalna koncentracija imobilisane aktivnosti (402,43 IU/g_{nosača}) dobija se u 0,5 M puferu pH 10. Poznato je da u 0,5 M puferu pH 10 dolazi do reakcije između nukleofilnih grupa prisutnih na površini molekula enzima i epoksidnog prstena (jak elektrofil), što dovodi do nastanka kovalentne veze između enzima i epoksi grupa nosača usled otvaranja epoksidnog prstena. Elektrostatičke interakcije su ovom prilikom suzbijene, dok hidrofobne interakcije postoje i stabilizuju zauzetu aktivnu konformaciju vezanog enzima [202]. S obzirom na ostvarene rezultate, u daljem radu za imobilizaciju lipaze na nosač sa amino i oktadecil funkcionalnim grupama korišćen je 0,1 M i 1 M pufer pH 8, redom, dok je za imobilizaciju enzima na nosač sa epoksi grupama izabran 0,5 M pufer pH 10.

4.3.1.2. Uticaj početne koncentracije proteina na imobilizaciju CAL B

Nakon ispitanog uticaja pH pufera za imobilizaciju, ispitan je i uticaj početne koncentracije proteina (9, 18, 36, 54 i 72 mg/g_{nosača}) na koncentraciju imobilisanih proteina (mg/g_{nosača}), kao i na koncentraciju imobilisane aktivnosti (IU/g_{nosača}) dobijenih preparata. Imobilizacija je izvođena u toku 24 h sa 10 mg nosača, a smeša je dopunjena do 1 ml puferom usvojenim u prethodnom poglavlju kao optimalnim za imobilizaciju na određene nosače.

Kada je reč o uticaju početne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisanih proteina, analizom dobijenih rezultata (slika 4.37) može se primetiti da sa porastom početne količine lipaze dolazi do linearnog rasta koncentracije imobilisanih proteina (mg/g_{nosača}) sve do maksimalno ponuđene koncentracije od 72 mg/g_{nosača} u eksperimentima izvedenim sa sva tri nosača. Maksimalna koncentracija imobilisanih proteina od 59,9 mg/g_{nosača} (83 % od inicijalno ponuđenih proteina) je ostvarena prilikom imobilizacije lipaze na nosač sa oktadecil funkcionalnim grupama. Približno ista vrednost za vezane proteine ostvarena je i

prilikom imobilizacije CAL B na nosač sa epoksi funkcionalnom grupom ($55,5 \text{ mg/g}_{\text{nosača}}$), dok je najmanja koncentracija imobilisanih proteina ($32,69 \text{ mg/g}_{\text{nosača}}$) ostvarena u eksperimentu u kojem je korišćen nosač sa primarnom amino grupom.

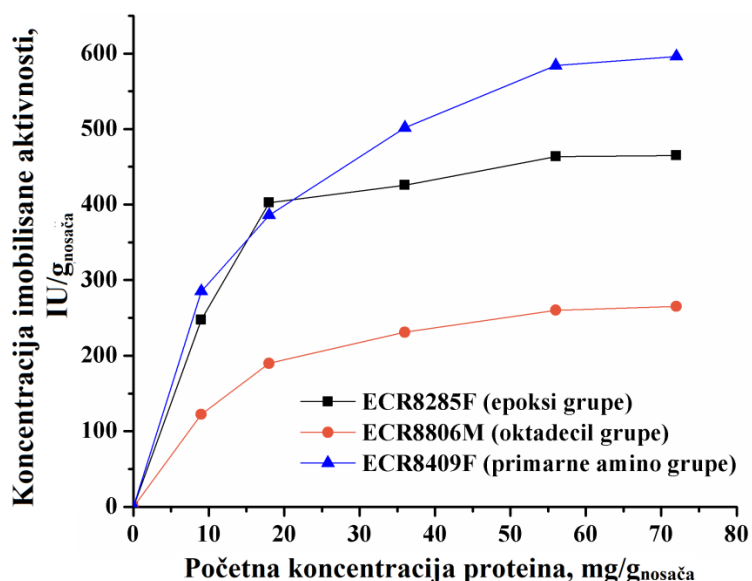


Slika 4.37 Uticaj početne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisanih proteina.

Analizom aktivnosti dobijenih imobilisanih preparata u zavisnosti od početne koncentracije proteina, uočava se (slika 4.38) da prilikom imobilizacije CAL B na sva tri nosača sa porastom početne koncentracije proteina od 9 do $54 \text{ mg/g}_{\text{nosača}}$ dolazi do rasta hidrolitičke aktivnosti imobilisane lipaze, dok sa daljim povećanjem početne koncentracije proteina nema značajnijeg porasta koncentracije imobilisane aktivnosti preparata. Može se zapaziti da, iako koncentracija imobilisanih proteina raste u celom ispitivanom opsegu početnih koncentracija proteina, razlika u imobilisanoj aktivnosti sva tri imobilisana preparata pri početnoj koncentraciji proteina od 54 i $72 \text{ mg/g}_{\text{nosača}}$ je jako mala (manje od 5 %) što implicira da je iz ugla imobilisane aktivnosti ekonomski najisplativije postupak imobilizacije na sva tri nosača sprovoditi pri početnoj koncentraciji proteina od $54 \text{ mg/g}_{\text{nosača}}$.

Treba naglasiti da iako je koncentracija imobilisanih proteina bila najmanja prilikom imobilizacije lipaze na nosač sa primarnim amino grupa, dobijeni preparat ispoljava

najveću hidrolitičku aktivnost (596 IU/g_{nosača}), pa se može zaključiti da prilikom adsorpcije enzima na ovaj nosač, dolazi do najmanjeg gubitka aktivnosti enzima. Sa druge strane, bez obzira što je koncentracija imobilisanih proteina najveća u slučaju imobilizacije lipaze na nosač sa oktadecil funkcionalnom grupom, dobijeni imobilisani preparat pokazuje najmanju hidrolitičku aktivnost (265 IU/g_{nosača}). Pretpostavlja se da tokom adsorpcije CAL B na hidrofobni nosač dolazi do određenih promena u konformaciji enzima, pa samim tim i do delimičnog gubitka aktivnosti [79].



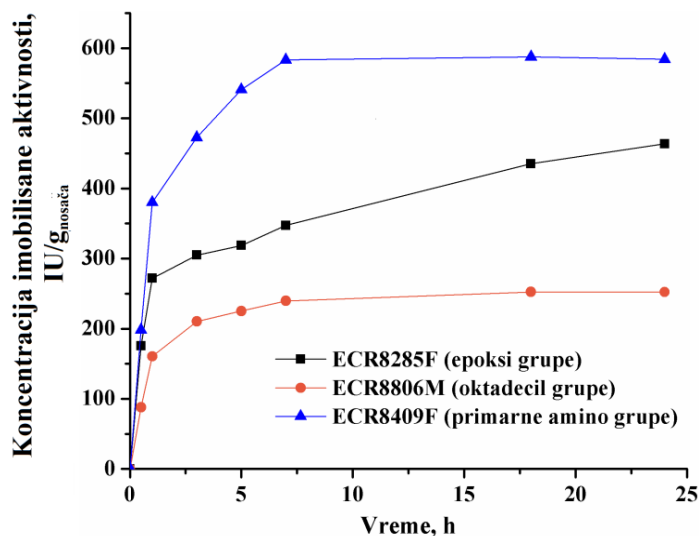
Slika 4.38 Uticaj početne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti.

4.3.1.3. Uticaj vremena na tok imobilizacije CAL B

Imobilizacija CAL B na tri pomenuta nosača praćena je u toku vremena i ispitana je aktivnost dobijenih preparata (IU/g_{nosača}) nakon 30 min, 1, 3, 5, 7, 18 i 24 h trajanja imobilizacije. Postupak je izvođen pri prethodno usvojenim optimalnim uslovima imobilizacije za određene nosače i početnoj koncentraciji proteina od 54 mg/g_{nosača}.

Analizom dobijenih rezultata (slika 4.39) može se primetiti da prilikom imobilizacije na sva tri nosača, koncentracija imobilisane aktivnosti lipaze raste tokom prvih 7 h trajanja imobilizacije. U slučaju imobilizacije lipaze na nosač sa epoksi funkcionalnim grupama taj trend se nastavlja i tokom 24 h trajanja imobilizacije, dok je prilikom imobilizacije lipaze

na nosače sa oktadecil i amino grupama primećeno da vrednosti aktivnosti imobilisanih preparata nakon 7 h ostaju konstantne.



Slika 4.39 Uticaj vremena imobilizacije na koncentraciju imobilisane aktivnosti.

Ovakav trend bio je i očekivan, s obzirom da za razliku od imobilizacije na nosače sa oktadecil i primarnom amino funkcionalnom grupom gde dolazi samo do fizičke adsorpcije enzima na površinu nosača, prilikom imobilizacije lipaze na nosač sa epoksi grupama nakon adsorpcije na površini nosača dolazi do stvaranja kovalentnih veza između molekula enzima i epoksidnog prstena, za šta je potrebno više vremena. Što se tiče imobilizacije CAL B na nosače iz LifetechTM ECR serije sa oktadecil i primarnom amino funkcionalnom grupom pretpostavlja se da se adsorpcija enzima odigrava posredstvom različitih mehanizama. Prilikom imobilizacije CAL B na nosač sa oktadecil funkcionalnom grupom dolazi do stvaranja hidrofobnih interakcija između izrazito hidrofobne površine nosača i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka molekula lipaze, dok su prilikom imobilizacije CAL B na nosač sa primarnom amino grupom dominantne elektrostatičke interakcije. Pod ovim eksperimentalnim uslovima amino grupe nosača su pozitivno naelektrisane i ostvaruju elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanim grupama koje se nalaze na površini molekula enzima.

4.3.2. Primena CAL B imobilisane na različite nosače u reakciji sinteze estara flavonoida

Imajući u vidu da je krajnji cilj ovog dela doktorske disertacije bio pronalazak odgovarajućih imobilisanih preparata, konkurentnih standardnom komercijalnom preparatu Novozym[®] 435, za primenu u reakciji sinteze estara flavonoida, pomenuti pripremljeni preparati CAL B imobilisane na Lifetech[™] nosače, kao i najaktivniji preparati imobilisane CAL B dobijeni u ranijim istraživanjima sprovedenim na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju su ispitani u reakciji esterifikacije flavonoida u acetonitrilu primenom oleinske kiseline kao acil-donora. Kovalentna imobilizacija CAL B na Eupergit[®] C250L, kao i adsorpcija ovog enzima na Purolite[®] MN102 je ranije optimizovana [201], kao i imobilizacija CAL B na nemodifikovne nanočestice silicijum-dioksida i na nanočestice modifikovane pojedinačnim tretiranjem 3-aminopropiltrimetoksi-silanom (APTMS) i N-fenilaminopropiltrimetoksi-silanom (PAPMS) [202], pa su u eksperimentima primenjeni uslovi pod kojima su dobijeni najaktivniji preparati. Karakteristike imobilisanih preparata korišćenih u reakcijama esterifikacije dati su u tabeli 4.15.

Tabela 4.15 Karakteristike imobilisanih preparata korišćenih u reakciji esterifikacije flavonoida.

Nosači	c ₀ (mg/g _{nosača})	Pv (mg/g _{nosača})	YI (%)	A (IU/g _{nosača})	SA (IU/mg)
ECR8285F	54	45,5	84,2	463,6	10,19
ECR8806M	54	48,5	89,8	260,4	5,37
ECR8409F	54	20,86	38,6	584,1	28,00
Purolite [®] MN102	18,75	8,41	44,9	677,60	80,57
Eupergit [®] C250L	19,6	14,9	76,1	1226,8	82,2
nano-SiO ₂	24,68	7,50	30,4	360,10	48,01
nano-SiO ₂ -PAPMS	24,68	13,0	52,7	1200,2	164,9
nano-SiO ₂ -APTMS	24,68	15,27	61,9	1518,6	175

c₀ – početna koncentracija proteina, Pv – koncentracija imobilisanih proteina,
YI – prinos imobilizacije, A – koncentracija imobilisane aktivnosti, SA – specifična aktivnost.

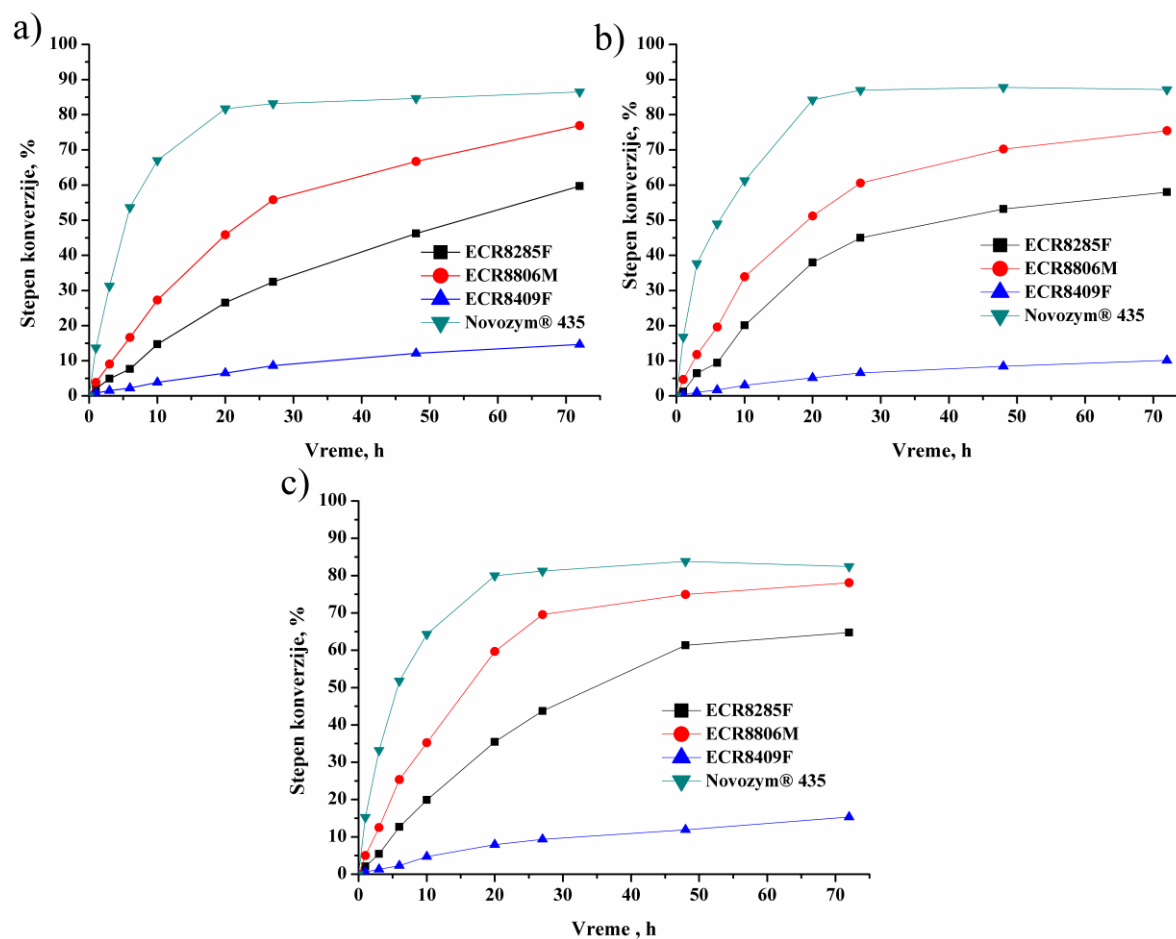
U cilju ispitivanja esterifikacione moći CAL B imobilisane na tri odabrana nosača Lifetech[™] ECR serije, izvođene su reakcije acilovanja tri različita flavonoida u kojima je

ulogu acil-donora imala oleinska kiselina. Kao sistem za poređenje, paralelno su izvođene i reakcije esterifikacije pomenutih flavonoida u kojima je kao katalizator korišćen komercijalni preparat Novozym[®] 435. Uslovi odigravanja reakcija esterifikacije izabrani su na osnovu prethodno opisane optimizacije (poglavlje 4.1.), a u svim reakcionim smešama primenjena aktivnost enzima iznosila je 4 IU/ml.

Na slici 4.40 prikazani su kinetički profili dobijenih estara tokom reakcije esterifikacije flavonoida katalizovane pomenutim imobilisanim preparatima. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da prilikom primene sva tri imobilisana preparata u reakcijama sinteze estara sva tri flavonoida dolazi do sinteze željenog proizvoda. Takođe, pokazano je da bez obzira na najslabiju hidrolitičku aktivnost, CAL B imobilisana na hidrofobni nosač (ECR 8806M) sa oktadecil funkcionalnim grupama pokazuje najveću esterifikacionu aktivnost, s obzirom da su nakon 72 h najveći stepeni konverzije sva tri flavonoida (oko 75 %) ostvareni upravo u reakcijama u kojima je ovaj imobilisani preparat korišćen kao biokatalizator. Nešto manja, ali opet značajna esterifikaciona aktivnost primećena je kod CAL B imobilisane na nosač sa epoksi funkcionalnim grupama (ECR 8285F), s obzirom da su ostvareni stepeni konverzije u sve tri reakcije oko 60 %, dok su najslabiji rezultati ostvareni u reakcijama u kojima je kao katalizator korišćena CAL B imobilisana na nosač sa primarnim amino grupama (ECR 8409F). Iako je ovaj imobilisani preparat pokazivao najveću hidrolitičku aktivnost, nije se pokazao kao dobar izbor za reakciju esterifikacije flavonoida.

Kada je reč o ostvarenim konverzijama u reakcijama sa različitim flavonoidima, primetno je da se u sva tri slučaja najveći stepeni konverzije dobijaju tokom esterifikacije eskulina, što je i očekivano s obzirom da je to najmanji molekul, pa se pretpostavlja da su i sterne smetnje svedene na minimum. Ukoliko se dobijeni rezultati uporede sa rezultatima ostvarenim sa komercijalnim enzimom, primetno je da se reakcije esterifikacije svih flavonoida katalizovane Novozym[®] 435 odigravaju brže u poređenju sa reakcijama u kojima se koriste pripremljeni imobilisani preparati, s obzirom da se ravnotežni stepen konverzije ostvaruje nakon 24 h trajanja reakcije. Takođe, u svim reakcijama ostvareni su nešto niži stepeni konverzije nego u reakciji sa komercijalnim enzimom, ali treba naglasiti

da se primenom lipaze imobilisane na hidrofobni nosač ostvaruju jako dobri rezultati i da se nakon 72 h ostvaruju konverzije bliske onim postignutim primenom komercijalnog preparata.



Slika 4.40 Kinetički profili reakcije esterifikacije a) floridzina, b) naringina i c) eskulina katalizovane lipazom imobilisanom na LifeTechTM nosače kao i komercijalnim preparatom Novozym® 435. Reakcije su izvođene u acetonitrilu na 65 °C, pri 150 o/min u toku 72 h, pri koncentraciji flavonoida 0,01 M i molskom odnosu supstrata 1:18.

Ispitivanje esterifikacione aktivnosti ostalih imobilisanih preparata navedenih u tabeli 4.15 vršeno je primenom u reakciji sinteze floridzin-oleata koja je izvođena pri prethodno određenim optimalnim uslovima (poglavlje 4.1.2.), a primenjena aktivnost enzima bila je kao i u prethodnim eksperimentima 4 IU/ml. Iz tabele 4.16 u kojoj su sumirani prinosi

floridzin-oleata dobijenih u reakciji esterifikacije katalizovanoj lipazom iz *C.antarctica* imobilisane na različitim nosačima može su uočiti da u dva slučaja, primenom CAL B imobilisane na Eupergit® C250L i nemodifikovane nanočestica silicijum dioksida, uopšte ne dolazi do reakcije esterifikacije, s obzirom da proizvod reakcije nije detektovan.

Tabela 4.16 Prinos floridzin-oleata nakon 72 h u reakciji katalizovanoj CAL B imobilisanoj na različitim nosačima

Nosači	Koncentracija floridzin-oleata, mM
Lewatit® VP OC 1600 (Novozym® 435)	8,65
Purolite® MN102	4,40
Eupergit® C250L	/
nano-SiO ₂	/
nano-SiO ₂ -PAPMS	0,59
nano-SiO ₂ -APTMS	0,39
ECR8285F	5,91
ECR8806M	7,69
ECR8409F	1,46

Pored toga, i primenom modifikovanih nanočestica (nano-SiO₂-PAPMS, nano-SiO₂-APTMS) ostvareni su zanemarljivo mali prinosi estera u poređenju sa rezultatima dobijenim primenom komercijalnog preparata Novozym® 435. Modifikacijom nanočestica APTMS-om uvedene su amino grupe koje su tretirane cijanuril hloridom (hlortiazinom) pri čemu je omogućeno uspostavljanje kovalentnih veza sa amino grupama na površini enzima. Iako su ostvarene velike hidrolitičke aktivnosti CAL B kovalentno imobilisane na Eupergit® C250L i nano-SiO₂-APTMS (tabela 4.15) može se zaključiti da ovi preparati nisu pogodni za primenu u reakciji sinteze estara floridzina. Sa druge strane, u cilju povećanja koncentracije hidrofobnih bočnih ostataka na površini nosača nanočestice su modifikovane i PAMPS-om pri čemu je omogućeno uspostavljanje hidrofobnih interakcija sa hidrofobnim grupama na površini lipaze koje stabilizuju formiranje aktivne otvorene konformacije enzima. Međutim, ni primenom ovog preparata nije ostvaren značajni prinos sintetisanog estera, što je iznenađujuće, s obzirom da je primenom CAL B imobilisane na ovaj nosač u reakciji esterifikacije vitamina C ostvaren značajni prinos askorbil-oleata [201].

Od pet dodatno ispitanih imobilisanih preparata u reakciji sinteze floridzin-oleata, najveći prinos proizvoda (4,40 mM) ostvaren je u reakciji u kojoj je korišćena CAL B imobilisana na Purolite[®] MN102. Glavna karakteristika ovog nosača je izrazito hidrofobna površina, koja se smatra pogodnom za izvođenje reakcija katalizovanih lipazama, naročito reakcija esterifikacije s obzirom da je niža koncentracija vode na površini čestice, a samim tim i smanjena brzina povratne reakcije hidrolize [201]. Dobra esterifikaciona aktivnost CAL B imobilisane na ovaj nosač bila je i očekivana s obzirom da je u prethodnim ispitivanjima najveći prinos estara takođe ostvaren u reakciji u kojoj je korišćena CAL B imobilisana na hidrofobni nosač sa oktadecil funkcionalnim grupama (ECR8806M).

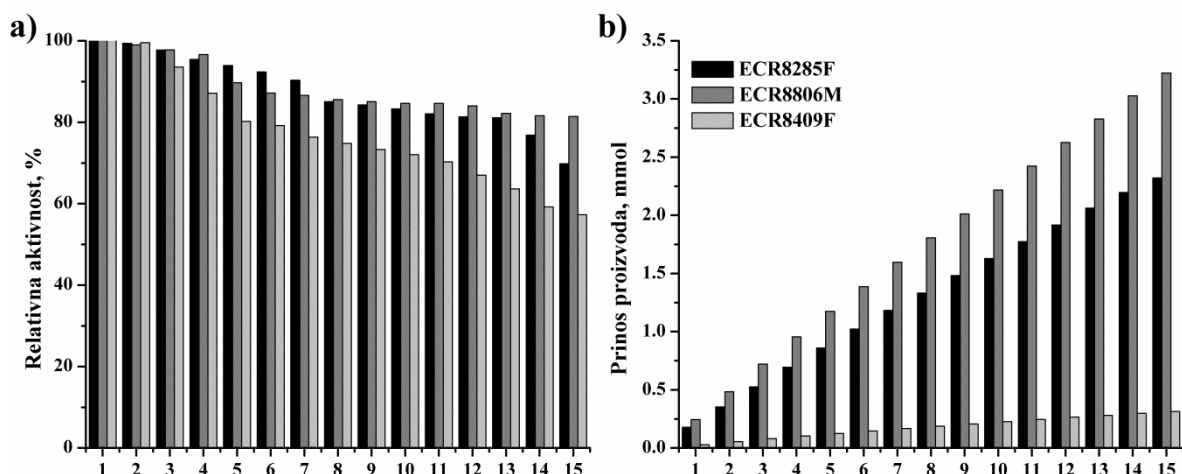
Na kraju, poređenjem rezultata dobijenih u reakciji sa CAL B imobilisanom na različite nosače sa rezultatima dobijenim primenom komercijalnog preparata Novozym[®] 435, može se zaključiti da je u svim reakcijama ostvaren manji prinos sintetisanog estera. Međutim, treba naglasiti da je izuzetno dobar prinos floridzin-oleata (7,69 mM) ostvaren u reakciji katalizovanoj CAL B imobilisanom na ECR8806M nosač, dok je značajan prinos (5,91 mM) ostvaren i u reakciji katalizovanoj lipazom imobilisanom na nosač sa epoksi grupama (ECR8285F), što pruža mogućnost daljeg istraživanja i optimizacije primene ovih preparata za sintezu estara flavonoida.

4.3.2.1. Operativna stabilnost CAL B imobilisane na LifeTech nosače

Već je naglašeno u teorijskom delu disertacije da je jedna od najbitnijih prednosti imobilisanih enzima u odnosu na slobodne enzime, njihovo lakše odvajanje iz reakcione smeše i mogućnost ponovne upotrebe. U cilju procene efikasnosti i opravdanosti postupka imobilizacije CAL B na tri različita LifeTech[™] nosača ECR serije (8285F, 8806M, 8409F) ispitana je operativna stabilnost i mogućnost upotrebe imobilisanih preparata u 15 uzastopnih ciklusa reakcija esterifikacije tri flavonoida (floridzina, naringina i eskulina) sa oleinskom kiselinom kao acil-donorom. Reakcije su izvođene pri koncentraciji flavonoida 10 mM, molskom odnosu supstrata 1:18, u acetonitrilu na 65 °C, tokom 24 h, pri čemu je u svim reakcijama primenjena aktivnost imobilisanog enzima iznosila 4 IU/ml. Relativne vrednosti prinosa flavonoid-oleata predstavljene su na slikama 4.41a, 4.42a i 4.43a, dok su kumulativni prinosi, ostvareni nakon svakog ciklusa, predstavljeni na slikama 4.41b, 4.42b

i 4.43b. Kada je reč o operativnoj stabilnosti CAL B imobilisane na tri različita nosača, generalno, može se zaključiti da CAL B imobilisana na nosače sa hidrofobnim (ECR 8806M) i epoksi (ECR 8409F) funkcionalnim grupama pokazuje izuzetnu operativnu stabilnost u sve tri pomenute reakcije, s obzirom da je nakon 10. ciklusa u svim reakcijama sačuvano preko 75 % početne aktivnosti (slike 4.41a - 4.43a). Dalje izvođenje konsektivnih reakcija dovodi do pada relativne aktivnosti imobilisane lipaze, ali i nakon 15.ciklusa, lipaza imobilisana na ova dva nosača zadržala je više od 50 % svoje početne aktivnosti. Sa druge strane, od tri ispitana imobilisana preparata, najslabiju, ali opet zadovoljavajuću, operativnu stabilnost u sve tri ispitane reakcije pokazuje lipaza imobilisana na nosač sa amino funkcionalnim grupama (ECR 8409F), s obzirom da relativna aktivnost ovog imobilisanog enzimskog preparata pada na 50 % posle osmog, odnosno petog ciklusa u reakciji esterifikacije eskulina i naringina, redom (slika 4.42a i 4.43a). Ipak, CAL B imobilisana na ovaj nosač pokazuje veću stabilnost u reakciji sinteze floridzin-oleata, pa je u ovom slučaju i nakon 15.ciklusa zadržano 60 % početne aktivnosti (slika 4.41a).

Ukoliko se uporedi operativna stabilnost svih imobilisanih preparata u tri pomenute reakcije, može se zaključiti da je najmanja stabilnost korišćenih biokatalizatora primećena u reakciji sinteze naringin-oleata (najglomazniji supstrat). Pretpostavlja se da presudan uticaj na ovakav rezultat ima hidrofilnost kao i veličina/struktura korišćenog molekula supstrata. Pored toga, poređenjem ostvarenih prinosa proizvoda, može se uočiti da su najlošiji rezultati u sve tri pomenute reakcije postignuti prilikom korišćenja enzima imobilisanog na nosač sa amino grupama (slike 4.41b - 4.43b). Štaviše, ostvareni prinosi su približno 5 do 10 puta manji u poređenju sa prinosima ostvarenim sa druga dva imobilisana preparata.

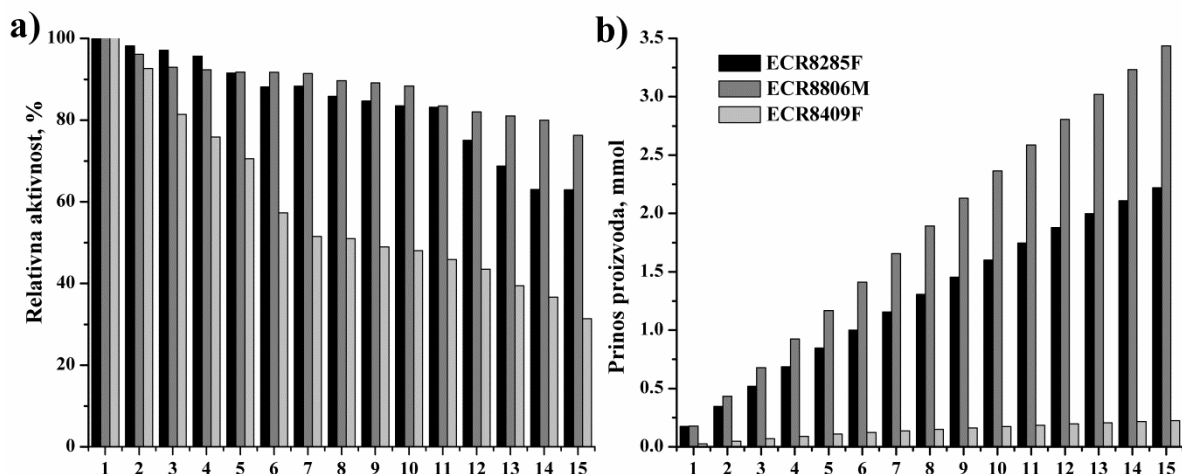


Slika 4.41 a) Operativna stabilnost CAL B imobilisane na LifeTech nosače i b) ostvaren prinos proizvoda tokom 15 ciklusa reakcije sinteze floridzin-oleata.

Kada je reč o reakciji sinteze floridzin-oleata, treba naglasiti da imobilisani preparati pokazuju izuzetnu operativnu stabilnost, s obzirom da je i nakon 15. ciklusa relativna aktivnost sva tri imobilisana preparata bila iznad 60 %. Štaviše, CAL B imobilisana na hidrofobni (ECR 8806M) i epoksi (ECR 8285F) nosač sačuvala je više od 80 % , odnosno 70 % početne aktivnosti, redom (slika 4.41a). Poređenja radi, ispitivanjem operativne stabilnosti komercijalnog preparata Novozym[®] 435 u istoj reakciji, primećen je linearan pad aktivnosti i nakon 10 ciklusa sačuvano je oko 50 % početne aktivnosti (poglavlje 4.1.2.2.2.) što je značajno lošiji rezultat u poređenju sa primenjenim enzimima imobilisanim na LifeTech[™] nosače. Takođe, primenom sva tri imobilisana preparata primećen je rast prinosa proizvoda tokom 15 ciklusa reakcije. Međutim, prinos ostvaren primenom imobilisanog enzima na nosač sa amino funkcionalnim grupama (0,31 mmol) je zanemarljiv u poređenju sa prinosom floridzin-oleata ostvarenog u reakciji sa lipazom imobilisanom na nosač sa epoksi grupama (2,32 mmol), a posebno u odnosu na deset puta veći prinos ostvaren u reakciji katalizovanoj CAL B imobilisanoj na hidrofobni nosač (3,22 mmol).

Sličan trend kao i u prethodnom slučaju primećen je i primenom imobilisanih preparata u reakciji sinteze eskulin-oleata, s tim da je u ovom slučaju uočen veći pad relativne

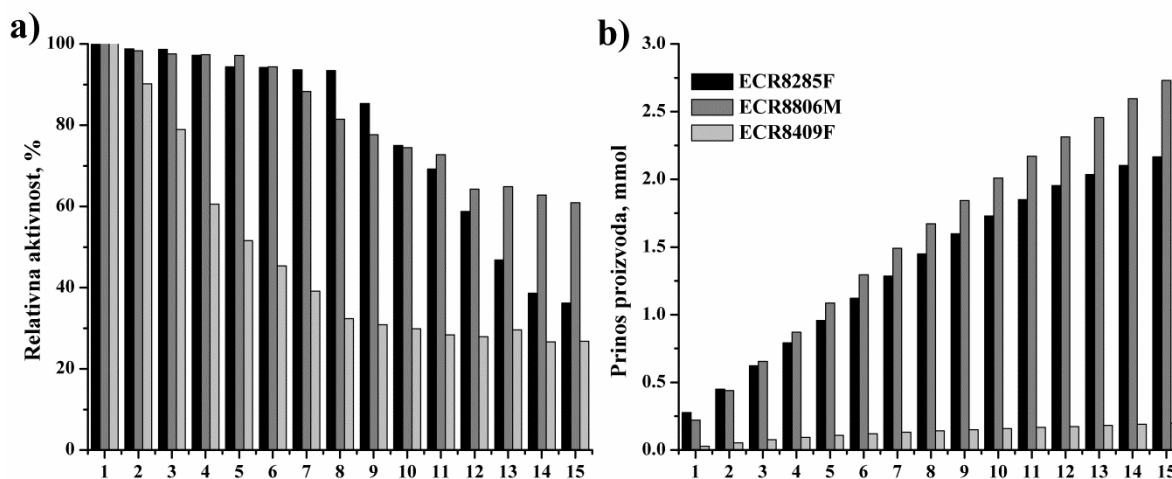
aktivnosti CAL B imobilisane na nosač sa amino grupama (ECR 8409F), pa je tako nakon 15. ciklusa zadržano oko 40 % početne aktivnosti. Za razliku od njega, pokazana je znatno veća operativna stabilnost preostala dva imobilisana preparata u reakciji sinteze eskulin-oleata, s obzirom da je nakon 10. ciklusa reakcije u oba slučaja sačuvano oko 90 % početne aktivnosti, da bi daljim izvođenjem konsektivnih reakcija, nakon 15. ciklusa, relativna aktivnost lipaze imobilisane na nosač sa hidrofobnim (ECR 8806M) i epoksi (ECR 8285F) grupama pala na 76 % i 63 % početne aktivnosti, redom (slika 4.42a). Kao i u prethodnoj reakciji, prinos proizvoda prati isti trend, raste tokom 15 ciklusa pri čemu su kumulativni prinosi na kraju eksperimenta, ostvareni primenom lipaze imobilisane na hidrofobni i epoksi nosač, iznosili 3,44 i 2,22 mmol eskulin-oleata, redom (slika 4.42b).



Slika 4.42 a) Operativna stabilnost CAL B imobilisane na LifeTech nosače i b) ostvaren prinos proizvoda tokom 15 ciklusa reakcije sinteze eskulin-oleata.

Kao što je već pomenuto, primenjeni imobilisani enzimi pokazuju najmanju stabilnost u reakciji sinteze naringin-oleata, pa je tako, tokom osam ciklusa reakcije, kod lipaze imobilisane na nosač sa amino grupama (ECR 8409F) primećen linearan pad relativne aktivnosti do 32 %, nakon čega se u daljim konsektivnim reakcijama aktivnost primenjenog imobilisanog preparata održava na nekih 30 % početne aktivnosti (slika 4.43). Sa druge strane, lipaza imobilisana na epoksi nosač (ECR 8285F) pokazuje praktično nepromenjenu esterifikacionu aktivnost tokom 8 ciklusa reakcije, nakon čega sledi linearan

pad relativne aktivnosti ovog imobilisanog preparata, pa na kraju 15. ciklusa on iznosi 40 % početne aktivnosti. Najbolju operativnu stabilnost u ovoj reakciji pokazuje CAL B imobilisana na hidrofobni nosač (ECR 8806M), zadržavši oko 60 % početne aktivnosti na kraju 15. ciklusa. U saglasnosti sa tim, maksimalni kumulativni prinos ostvaren je primenom ovog imobilisanog preparata, tako da je nakon 15.ciklusa sintetisano 2,73 mmol naringin-oleata.



Slika 4.43 a) Operativna stabilnost CAL B imobilisane na LifeTech nosače i b) ostvaren prinos proizvoda tokom 15 ciklusa reakcije sinteze naringin-oleata.

S obzirom na pokazanu operativnu stabilnost i esterifikacionu aktivnost može se zaključiti da lipaza imobilisana na nosač sa amino grupama, i pored dobre hidrolitičke aktivnosti, nije pogodan biokatalizator za reakciju sinteze estara flavonoida. Sa druge strane, postupak imobilizacije lipaze na druga dva nosača, sa hidrofobnim i sa epoksi grupama, radi primene u reakciji esterifikacije flavonoida je sasvim opravdan, imajući u vidu prikazanu esterifikacionu aktivnost i odličnu operativnu stabilnost, tj. mogućnost upotrebe u čak 15 konsektivnih reakcija, pri čemu je zadržano više od 60 % početne aktivnosti.

4.4. Inkorporiranje estara flavonoida u kozmetičke formulacije i praćenje njihove difuzije

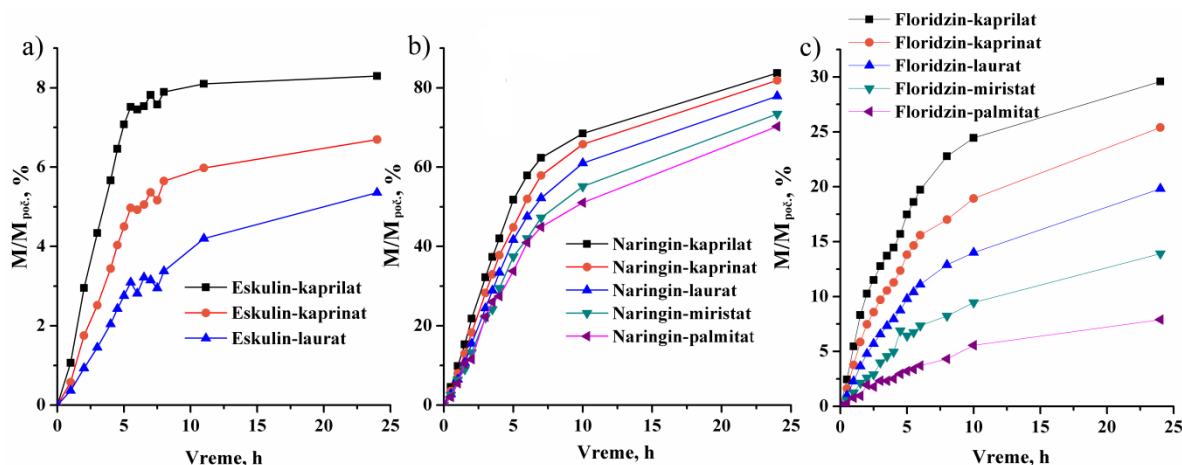
Nakon optimizacije enzimske sinteze estara flavonoida primenom različitih acil-donora, ispitana je mogućnost inkorporiranja smeše estara flavonoida u različite kozmetičke formulacije (emulzije U/V, emulzije gel/U, gel-emulzije, emulzije U/V sa strukturom tečnih kristala, liposome inkorporirane u gelu), i praćena je kinetika otpuštanja estara. Posle uklanjanja rastvarača i enzima, kompletne reakcione smeše nastale u reakciji transesterifikacije korišćene su u pripremi kozmetičkih formulacija.

4.4.1. Difuzija estara flavonoida kroz celuloznoacetatnu membranu

Kao preliminarni eksperiment, korišćenjem standardne Francove ćelije praćena je kinetika otpuštanja estara flavonoida kroz celuloznoacetatnu membranu kako iz uparene smeše estara tako i iz različitih kozmetičkih formulacija da bi se identifikovala razlika u difuzionim profilima različitih estara flavonoida, kao i razlike u profilima otpuštanja estara iz različitih kozmetičkih formulacija. Cilj ovih eksperimenata je da se definiše uticaj vrste masne kiseline, vrste flavonoida i korišćene formulacije na difuzione karakteristike enzimski sintetisanog estara što će, zajedno sa prethodno dobijenim rezultatima o uticaju ključnih faktora na prinos enzimske reakcije, presudno uticati na finalni izbor najpogodnijih estara za proizvodnju. Za ova preliminarna istraživanja korišćene su smeše estara tri flavonoida (floridzina, naringina i eskulina) dobijenih u reakcijama transesterifikacije sa kokosovim uljem, s obzirom da se sa ovim acil-donorom dobija smeša estara masnih kiselina širokog opsega dužine lanca (C₈-C₁₆).

Na slici 4.44 predstavljene su krive otpuštanja estara flavonoida iz uparene smeše kroz celuloznoacetatnu membranu. Tokom 24 h praćenja kinetike otpuštanja može se primetiti da vrsta flavonoida ima značajan uticaj pa je najveći udeo prodifundovalih estara postignut u eksperimentu sa estrima naringina (od 70 do 80 % od početne mase unetih estara), zatim estrima floridzina (8 - 35 %) i na kraju estrima eskulina (5 - 8,5 %). Takođe, prilikom praćenja kinetike otpuštanja estara naringina uočene su veoma male razlike u udelu

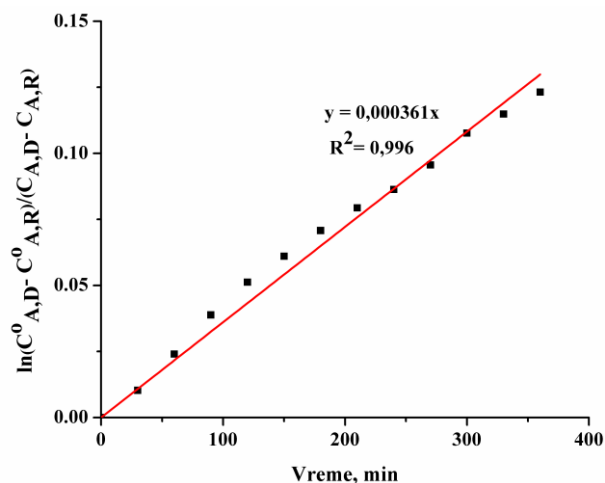
prodifunovalih estara, bez obzira na dužinu lanca masnokiselinskog ostatka, za razliku od eksperimenata u kojima su korišćeni estri floridzina i eskulina u kojima postoje jasne razlike u udelima prodifundovalih estara i u kojima je uočen očekivani trend da udeo estara u receptorskoj smeši opada sa porastom broja C atoma u masnokiselinskom lancu. Dodatno, treba napomenuti da estar flavonoida sa oleinskom kiselinom nije detektovan ni u jednom od pomenutih eksperimenata, što se može pripisati velikoj hidrofobnosti molekula, kao i njegovoj glomaznoj strukturi. Takođe, u eksperimentu u kojem je korišćena uparena smeša estara eskulina, nisu detektovani ni estri miristinske i palmitinske kiseline. Ovakvi rezultati postignuti sa estrima eskulina, mogu se objasniti i razlikama u konzistenciji uparenih smeša flavonoida, s obzirom da je tokom uparavanja rastvarača iz reakcione smeše sa estrima eskulina došlo do pojave “ljuspica”, pa je čitava smeša bila u polučvrstom stanju, za razliku od tečnih smeša estara preostala dva flavonoida.



Slika 4.44 Profili otpuštanja estara flavonoida kroz celuloznoacetatnu membranu iz uparenih smeša estara.

Za određivanje koeficijenata difuzije iz uparene smeše estara flavonoida korišćena je standardna jednačina koja se koristi za izračunavanje koeficijenta difuzije iz rastvora (jednačina 2.20). Vrednosti koeficijenata difuzije svih estara dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem izračunati su na osnovu vrednosti nagiba pravolinijskog dela zavisnosti $\ln\left(\frac{C_{A,D}^0 - C_{A,R}^0}{C_{A,D} - C_{A,R}}\right)$ od t i poznate vrednosti geometrijske konstante β (24900 m^{-2}) za korišćenu

celuloznoacetatnu membranu i standardnu Francovu ćeliju od 20 ml. Na slici 4.45 predstavljen je primer fitovanja eksperimentalnih podataka otpuštanja floridzin-laurata u cilju određivanja koeficijenta difuzije.



Slika 4.45 Određivanje koeficijenta difuzije estara iz uparene smeše na primeru floridzin-laurata.

Na osnovu izračunatih vrednosti koeficijenata difuzije za različite estre floridzina, naringina i eskulina (tabela 4.17) može se zaključiti da za estre svih flavonoida koeficijent difuzije opada sa povećanjem broja C atoma u molekulu, što je, s obzirom na hidrofилnu prirodu celuloznoacetatne membrane, bilo i za očekivati, jer sa povećanjem broja C atoma masnokiselinskog ostatka, raste i stepen hidrofobnosti molekula, pa samim tim takvi molekuli sporije prolaze kroz hidrofилnu membranu. Pored toga, sa povećanjem broja C atoma povećava se i veličina molekula, što dodatno otežava difuziju.

Međutim, kada se uporede estri različitih flavonoida sa istim masnim kiselinama, nije primećen očekivani trend da veći molekuli sporije difunduju, s obzirom da po brzini difuzije prednjače estri naringina, najvećeg molekula, zatim estri floridzina i na kraju estri eskulina, koji je od ispitivanih flavonoida najmanji i najhidrofилniji molekul. Pored toga, pregledom literature utvrđeno je da su koeficijenti difuzije palmitat estara floridzina i naringina veći nego koeficijent difuzije hidrofилnijeg jedinjenja, manje molekulske mase, askorbil-palmitata ($D=2,49 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{min}$) [227]. Ovakav rezultat upućuje na zaključak da na

difuzione karakteristike estara različitih flavonoida veći uticaj ima struktura aglikona ili odnos hidrofilnih i hidrofobnih delova molekula. Kao što je već rečeno estri eskulina su bili u polučvrstoj formi, pa je to, verovatno, značajno doprinelo sporijoj difuziji. S obzirom na predstavljene rezultate dobijene praćenjem difuzije estara iz uparenih smeša i na otežan rad prilikom korišćenja estara eskulina, naredni eksperimenti praćenja kinetike otpuštanja estara iz kozmetičkih formulacija izvedeni su samo sa estrima floridzina i naringina.

Tabela 4.17 Izračunati koeficijenti difuzije estara flavonoida iz uparene smeše.

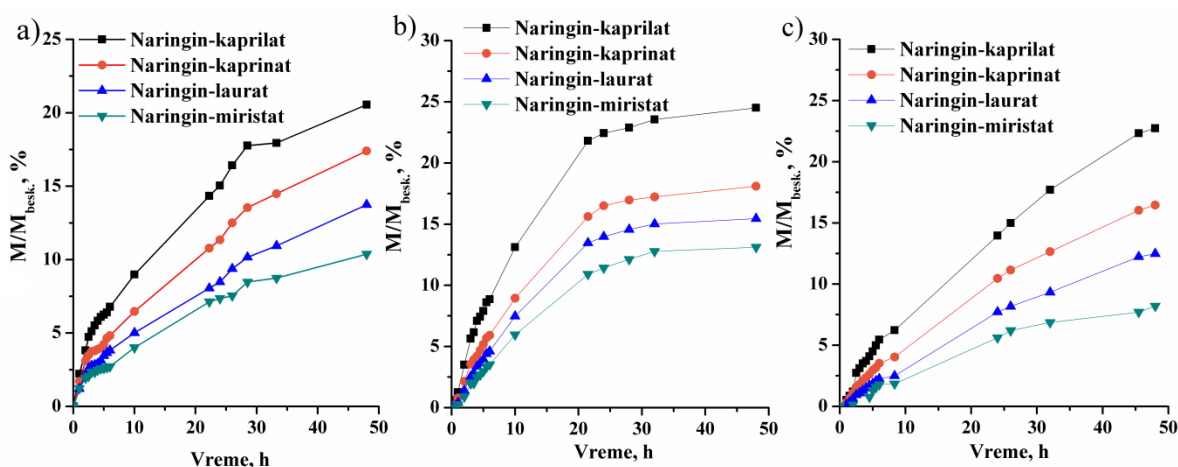
Estri	Log P*	$D \cdot \beta \cdot 10^3$	$D \cdot 10^8$, m^2/min
Floridzin-kaprilat	4,05	0,695	2,791
Floridzin-kaprinat	5,06	0,547	2,197
Floridzin-laurat	6,07	0,361	1,450
Floridzin-miristat	7,08	0,23	0,924
Floridzin-palmitat	8,08	0,117	0,470
Naringin-kaprilat	3,27	2,43	9,759
Naringin-kaprinat	4,29	1,901	7,634
Naringin-laurat	5,30	1,652	6,634
Naringin-miristat	6,31	1,514	6,080
Naringin-palmitat	7,32	1,364	5,478
Eskulin-kaprilat	2,65	0,234	0,939
Eskulin-kaprinat	3,66	0,146	0,586
Eskulin-laurat	4,67	0,084	0,337

*log P vrednosti izračunate korišćenjem Molinspiration online softvera (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>)

4.4.2. Difuzija estara flavonoida inkorporiranih u kozmetičke formulacije kroz celuloznoacetatnu membranu

U cilju određivanja razlika u difuzionim profilima estara iz različitih kozmetičkih formulacija, estri naringina i floridzina dobijeni u reakciji sa kokosovim uljem inkorporirani su u različite formulacije, klasičnu emulziju U/V, gel-emulziju i u liposome koji su kasnije dispergovani u gelu i praćena je kinetika otpuštanja.

Analizom eksperimentalnih podataka dobijenih praćenjem kinetike otpuštanja estara naringina iz tri pomenute kozmetičke formulacije dobijeni su sledeći profili (slika 4.46)

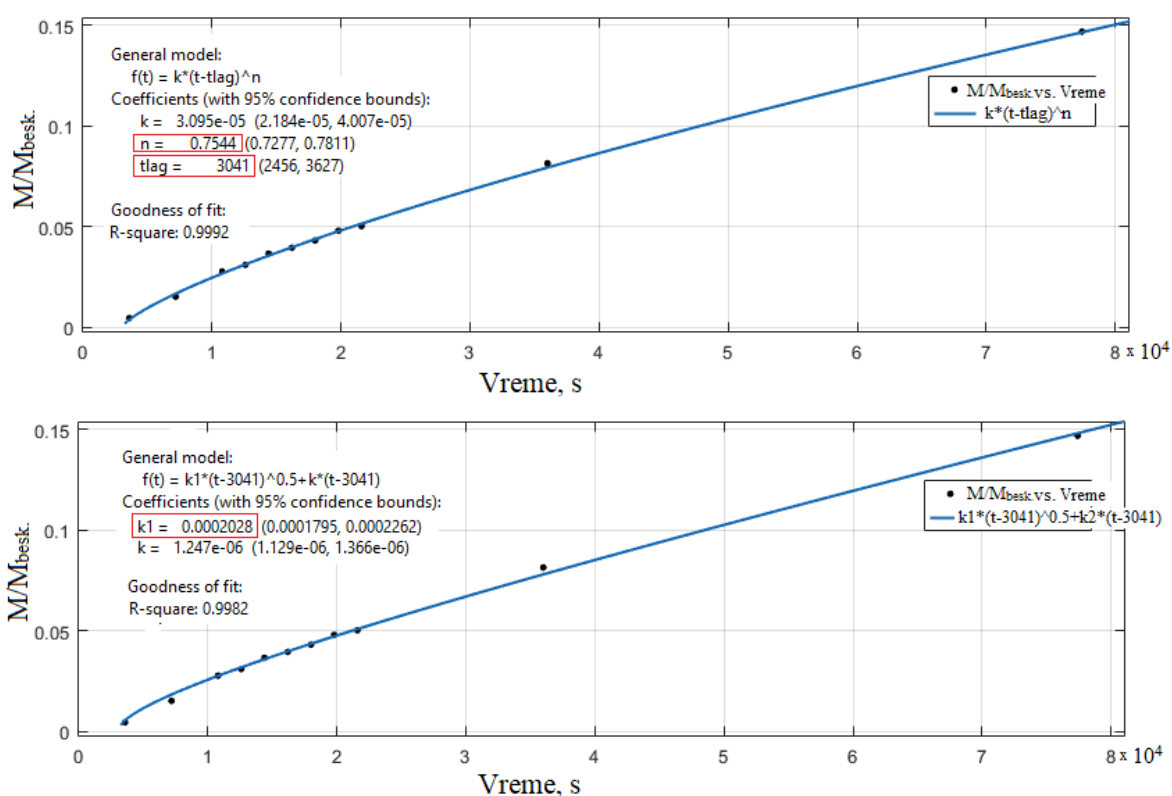


Slika 4.46 Krive otpuštanja estara naringina iz tri različite kozmetičke formulacije: a) klasične emulzije U/V, b) gel-emulzije i c) lipozoma dispergovanih u gelu.

Za razliku od eksperimenta sa uparenim reakcionim smešama, prilikom otpuštanja estara naringina iz kozmetičkih formulacija primećeno je da je difuzija dosta sporija, a pored toga, ni u jednom eksperimentu naringin-palmitat i naringin-oleat nisu detektovani u receptorskom rastvoru. Takođe, primećene su veće razlike u udelima prodifundovalih estara u toku vremena, a može se primetiti da je trend otpuštanja isti, udeo prodifundovalih estara opada sa povećanjem broja ugljenikovih atoma u masnokiselinskom ostatku. Kada je reč o otpuštanju estara iz različitih formulacija, primećeno je da su udeli prodifundovalih estara iz gel-emulzije i lipozoma dispergovanih u gelu nešto veći u odnosu na udele odgovarajućih estara dobijenje otpuštanjem iz klasične emulzije U/V. Tako, udeo najmanjeg molekula naringin-kaprilata u receptorskom rastvoru iznosi oko 25 % u slučaju otpuštanja estara iz gel-emulzije i lipozoma dispergovanih u gelu, dok je udeo istog estera nešto manji od 20 % u slučaju otpuštanja iz klasične emulzije U/V. Situacija je nešto drugačija prilikom otpuštanja većih molekula, pa je tako najveći udeo prodifundovalog naringin-miristata iz gel-emulzije (12,5 %), zatim emulzije U/V (10 %) i na kraju iz lipozoma dispergovanih u gelu (7,5 %). Očigledno je da veći molekuli teže prolaze kroz dvoslojnu strukturu čestica lipozoma.

U cilju preciznijeg definisanja brzine otpuštanja estara naringina iz različitih kozmetičkih formulacija izračunati su odgovarajući koeficijenti difuzije. S obzirom da su se u ovom

slučaju ispitivala otpuštanja bioaktivnih komponenti iz polučvrstih formulacija, za fitovanje eksperimentalnih podataka difuzije estara naringina iz klasične emulzije U/V u Matlab programu korišćena je standardna Higučijeva jednačina ($n=0,5$) (jednačina 2.26), dok je za fitovanje podataka otpuštanja estara iz preostale dve formulacije korišćena modifikovana Higučijeva jednačina (jednačina 2.31) koja uključuje i prisustvo *lag* faze (t_{lag}) i uticaj relaksacije polimera, s obzirom da se radi o sistemima koji bubre i rezultate nije bilo moguće fitovati standardnom Higučijevom jednačinom. Postupak fitovanja prikazan je na slici 4.47 na primeru prenosa naringin-laurata iz gel-emulzije.



Slika 4.47 Fitovanje eksperimentalnih podataka dobijenih difuzijom naringin-laurata iz gel-emulzije kroz celuloznoacetatnu membranu.

Efektivni koeficijenti difuzije estara naringina izračunati su korišćenjem jednačine (jednačine 2.27) i izračunate vrednosti, kao i vrednosti koeficijenta n i dužine trajanja *lag* faze u slučaju otpuštanja estara iz gel-emulzije i lipozoma dispergovanih u gelu predstavljeni su u tabeli 4.18. Na osnovu dobijenih rezultata, može se primetiti da u sva tri

eksperimenta vrednosti efektivnih koeficijenata difuzije opadaju sa povećanjem broja C atoma u masnokiselinskom ostatku. Takođe, poređenjem vrednosti efektivnih koeficijenata difuzije estara iz različitih kozmetičkih formulacija uočava se da estri naringina najbrže difunduju iz gel-emulzije, dok su najmanje vrednosti koeficijenata difuzije dobijene u eksperimentu u kojem je korišćena emulziju U/V. Prilikom fitovanja svih eksperimentalnih krivih, vrednost R^2 je bila veća od 0,97.

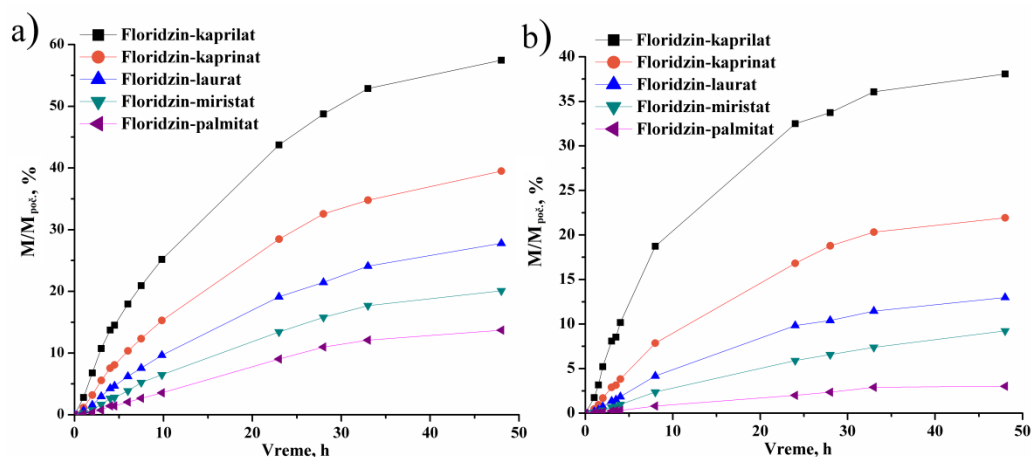
Tabela 4.18 Efektivni koeficijenti difuzije estara naringina inkorporiranih u različite kozmetičke formulacije

Formulacija	Estri	n	t_{lag} , min	$k_1 \cdot 10^3$, min^{-n}	$D_{ef} \cdot 10^{10}$, m^2/min
<i>Emulzija U/V</i>	Naringin-kaprilat	0,5	/	3,714	1,88
	Naringin-kaprinat	0,5	/	2,043	0,569
	Naringin-laurat	0,5	/	1,432	0,279
	Naringin-miristat	0,5	/	0,998	1,357
<i>Gel-emulzija</i>	Naringin-kaprilat	0,623	41,58	8,654	3,407
	Naringin-kaprinat	0,698	42,82	5,342	0,703
	Naringin-laurat	0,754	50,68	4,442	0,307
	Naringin-miristat	0,757	73,93	3,611	0,199
<i>Lipozomi dispergovani u gelu</i>	Naringin-kaprilat	0,630	60,72	17,81	3,415
	Naringin-kaprinat	0,710	62,05	15,63	0,633
	Naringin-laurat	0,769	70,20	12,14	0,198
	Naringin-miristat	0,806	83,53	3,221	0,087

Kada je reč o otpuštanju estara naringina iz formulacija koje bubre, za sve ispitane estre vrednosti koeficijenta n su u opsegu $0,5 < n < 1$ što ukazuje na činjenicu da brzina otpuštanja

estara kao bioaktivnih komponenti iz ovih kozmetičkih formulacija zavisi kako od same difuzije tako i od relaksacije polimera. Na osnovu vrednosti koeficijenta n za različite estre (tabela 4.18), može se zaključiti da sa rastom dužine lanca masne kiseline u molekulu estara raste i uticaj relaksacije polimera na brzinu prenosa bioaktivne komponente. Takođe, isti trend je primećen i kod dužine trajanja *lag* faze, što je veći molekul estara, duže vremena je potrebno da bi se estar detektovao u receptorskoj smeši.

Zbog nešto slabije difuzije estara naringina iz emulzije ulje u vodi, u narednom eksperimentu ispitana je kinetika otpuštanja estara floridzina samo iz gel-emulzije i lipozoma dispergovanih u gelu kroz celuložnoacetatnu membranu. Na slici 4.48 predstavljeni su udeli prodifundovalih estara floridzina kroz celuložnoacetatnu membranu iz dve pomenute kozmetičke formulacije. Nakon 48 h udeo prodifundovalih estara floridzina iz gel-emulzije se kreće od 13,72 % za najveći detektovani molekul floridzin-palmitat, pa sve do 57,45 % za floridzin-kaprilat. U slučaju otpuštanja estara iz lipozoma dispergovanih u gelu, udeo svih prodifundovalih estara je nešto manji u poređenju sa udelom odgovarajućih estara prodifundovalih iz gel-emulzije, pa je tako udeo prodifundovalog floridzin-kaprilata 38,08 %, a floridzin-palmitat 3,01 %.



Slika 4.48 Krive otpuštanja estara floridzina iz kozmetičkih formulacija: a) gel-emulzije i b) lipozoma dispergovanih u gelu.

Poređenjem krivih otpuštanja odgovarajućih estara dva različita flavonoida iz pomenutih formulacija (slike 4.46 i 4.48), treba napomenuti da je u slučaju otpuštanja estara floridzina detektovan i estar palmitinske kiseline u receptorskom rastvoru, što nije bio slučaj prilikom otpuštanja estara naringina. Pored toga, udeli prodifundovalih estara floridzina iz obe formulacije su veći u poređenju sa udelima prodifundovalih odgovarajućih estara naringina.

Dobijeni eksperimentalni podaci fitovani su takođe modifikovanom Higučijevom jednačinom (jednačina 2.31) i izračunate vrednosti efektivnih koeficijenta difuzije, kao i vrednosti koeficijenta n i lag faze predstavljeni su u tabeli 4.19.

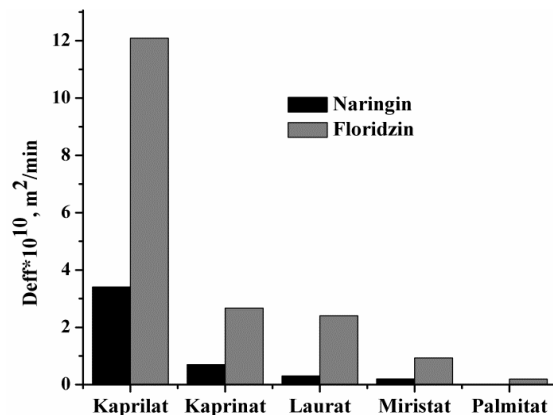
Tabela 4.19 Efektivni koeficijenti difuzije estara floridzina inkorporiranih u različite kozmetičke formulacije kroz celuloznoacetatnu membranu.

Formulacija	Estri	n	t_{lag}, min	$k_1 \cdot 10^3, \text{min}^{-n}$	$D_{ef} \cdot 10^{10}, \text{m}^2/\text{min}$
<i>Gel-emulzija</i>	Floridzin-kaprilat	0,616	45,90	14,39	12,09
	Floridzin-kaprinat	0,699	49,18	9,504	2,671
	Floridzin-laurat	0,629	104,3	6,743	2,403
	Floridzin-miristat	0,651	111,6	4,608	0,933
	Floridzin-palmitat	0,738	116,4	3,013	0,195
<i>Lipozomi dispergovani u gelu</i>	Floridzin-kaprilat	0,609	55,55	11,69	6,13
	Floridzin-kaprinat	0,658	55,58	2,245	0,156
	Floridzin-laurat	0,646	57,63	1,449	0,0715
	Floridzin-miristat	0,546	58,82	0,00130	0,0000129
	Floridzin-palmitat	0,601	59,97	0,00149	0,0000108

Primećeno je da otpuštanje estara floridzina iz gel-emulzije i lipozoma dispergovanih u gelu takođe zavisi kako od same difuzije tako i od relaksacije polimera, s obzirom da su vrednosti koeficijenta n u svim slučajevima u opsegu $0,5 < n < 1$. Takođe, u poređenju sa eksperimentom u kojem je praćeno otpuštanje estara naringina, prilikom otpuštanja estara floridzina iz obe formulacije detektovan je i estar palmitinske kiseline u receptorskom rastvoru, ali ne i floridzin-oleat. Sasvim očekivano, i u slučaju estara floridzina efektivni koeficijent difuzije opada sa povećanjem dužine lanca masne kiseline u molekulu estra u oba ispitana slučaja, s tim da su za razliku od eksperimenta u kojem su ispitivani estri

naringina, u ovim eksperimentima primećene veće razlike u koeficijentima difuzije istih estara iz različitih kozmetičkih formulacija. Brzine difuzije estara floridzina iz lipozoma dispergovanih u gelu su, i po nekoliko puta manje u odnosu na brzinu difuzije odgovarajućih estara iz gel-emulzija, što je bilo i očekivano, s obzirom da u ovom slučaju estri floridzina treba da prođu i kroz fosfolipidni dvosloj čestice lipozoma a tek onda kroz matriks gela do same membrane. Ovi rezultati ukazuju da se primenom lipozoma kao sistema za inkorporiranje estara floridzina može postići kontrolisano otpuštanje bioaktivne supstance. Sa druge strane, ako se uporede te iste vrednosti dobijene za estre naringina (tabela 4.18), nije primećena tako značajna razlika u koeficijentima difuzije iz dve različite formulacije, što može biti posledica lošijeg inkorporiranja većih molekula estara naringina u samu strukturu lipozoma, tako da se jedan deo verovatno nalazio slobodan u gelu.

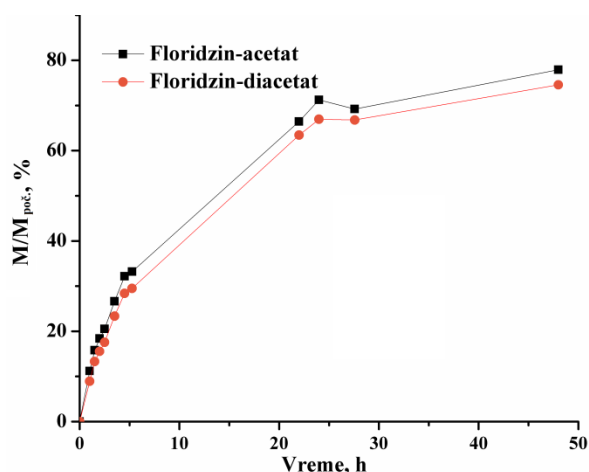
Kada se uporede efektivni koeficijenti difuzije estara dva različita flavonoida dobijenih tokom otpuštanja iz gel-emulzija kao nosača koji se pokazao kao najbolji za transdermalni prenos (slika 4.49), primećuje se da su efektivni koeficijenti difuzije estara floridzina veći od koeficijenata difuzije odgovarajućih estara naringina, što je obrnuti trend u odnosu na rezultate dobijene tokom praćenja otpuštanja iz uparenih smeša estara (tabela 4.17). Može se pretpostaviti da pri difuziji estara iz formulacije veličina molekula počinje da dobija značajniju ulogu od hidrofилности molekula, s obzirom da manji molekuli, u ovom slučaju estri floridzina, brže difunduju kroz matriks polimera (nosača).



Slika 4.49 Poređenje efektivnih koeficijenata difuzije estara naringina i floridzina kroz celuloznoacetatnu membranu iz gel-emulzije.

S obzirom na ostvarene rezultate prilikom praćenja otpuštanja estara iz kozmetičkih formulacija i činjenice da manji molekuli brže difunduju, u narednom eksperimentu ispitana je mogućnost difuzije acetil-derivata floridzina sintetisanih u reakciji sa triacetinom (poglavlje 4.2.1.2.). Prilikom inkorporiranja estara u gel-emulziju korišćena je reakciona smeša nastala nakon reakcije esterifikacije i uklanjanja biokatalizatora. Nakon uspešnog inkorporiranja, praćena je kinetika otpuštanja ovih molekula kroz celuloznoacetatnu membranu.

Posmatranjem krivih otpuštanja (slika 4.50), uočava se da ne postoje velike razlike u udelu prodifundovalih estara, udeo floridzin-diacetata je malo manji u odnosu na udeo floridzin-acetata. Naime, nakon 48 h praćenja kinetike otpuštanja acetata floridzina iz gel-emulzije, udeo prodifundovalog floridzin-acetata iznosio je 78 %, dok je udeo prodifundovalog floridzin-diacetata iznosio 74 %. Međutim, treba naglasiti da je već nakon 24 h praćenje kinetike otpuštanja udeo prodifundovalog monoacetata i diacetata bio oko 70 %. Ovakav trend je i očekivan s obzirom da ne postoje velike razlike u veličini i hidrofobnosti ova dva molekula. Sa druge strane, udeli prodifundovalih acetata floridzina iz gel-emulzije su značajno veći od udela prodifundovalih estara floridzina i naringina iz iste formulacije, ispitanih u prethodnim eksperimentima (slike 4.46 i 4.48).



Slika 4.50 Krive otpuštanja floridzin-acetata i floridzin-diacetata iz gel-emulzije kroz celuloznoacetatnu membranu.

Fitovanjem eksperimentalno dobijenih podataka, utvrđeno je da se vrednosti koeficijenta n nalaze u opsegu $0,5 < n < 1$, ali da su bliske vrednosti 0,5 što znači da brzina prenosa ovih estara iz gel-emulzije kroz celuložnoacetatnu membranu u najvećoj meri zavisi od same difuzije, a mnogo manje od relaksacije polimera (tabela 4.20). Takođe, izračunati efektivni koeficijenti difuzije su značajno veći u poređenju sa vrednostima koeficijenata difuzije dobijenih za ostale estre floridzina (tabela 4.19), kao i estre naringina (tabela 4.18), što potvrđuje činjenicu da manji molekuli brže difunduju iz gel-emulzija kroz celuložnoacetatnu membranu.

Tabela 4.20 Efektivni koeficijenti difuzije floridzin-acetata i -diacetata iz gel-emulzije.

Estri	n	t_{lag} , min	$k_1 \cdot 10^2$, min^{-n}	$D_{ef} \cdot 10^8$, m^2/min
Floridzin-monoacetat	0,563	18,78	2,408	1,03
Floridzin-diacetat	0,619	16,70	2,239	0,563

Ovi rezultati pokazuju da acetil-derivati flavonoida pokazuju najbolje difuzione karakteristike, ali će konačni zaključci o najpogodnijim proizvodima biti doneti u narednoj fazi istraživanja u kojoj je Strat-M[®] membrana korišćena za *in vitro* ispitivanje transdermalne difuzije odabranih smeša estara iz različitih formulacija.

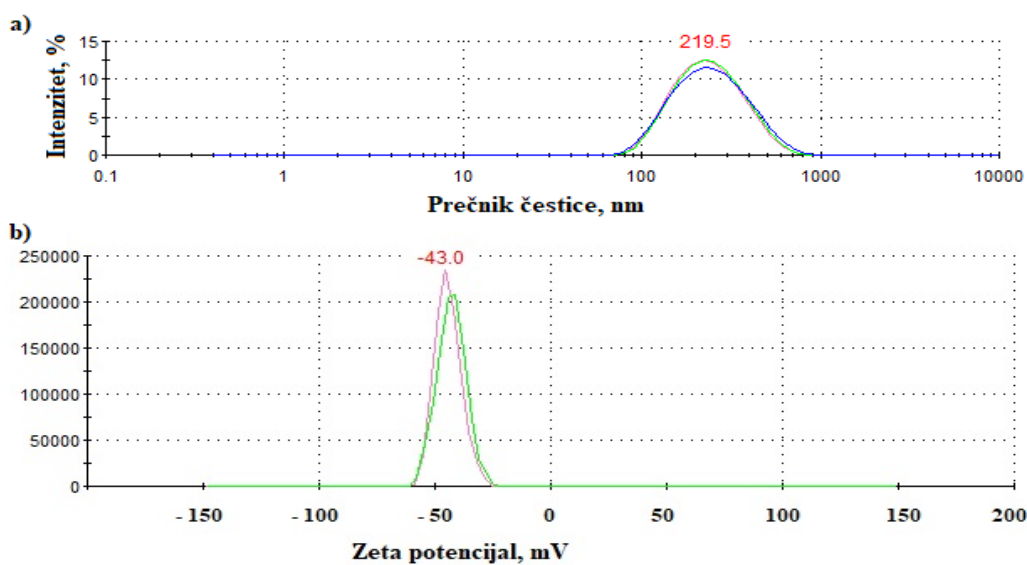
4.4.3. *In vitro* analiza transdermalne difuzije estara flavonoida inkorporiranih u kozmetičke formulacije

U cilju procene efikasnosti primene estara flavonoida kao aktivnih supstanci u kozmetičkim proizvodima, neophodno je prvo ispitati da li i u kojoj meri, nakon topikalne primene, estri mogu prodrati kroz određene slojeve kože. U skladu sa tim, ispitana je difuzija odabranih estara iz najpogodnijih kozmetičkih formulacija u sistemu sa sintetskom membranom (Strat-M[®]) koja predstavlja model sistem za transdermalni prenos mase.

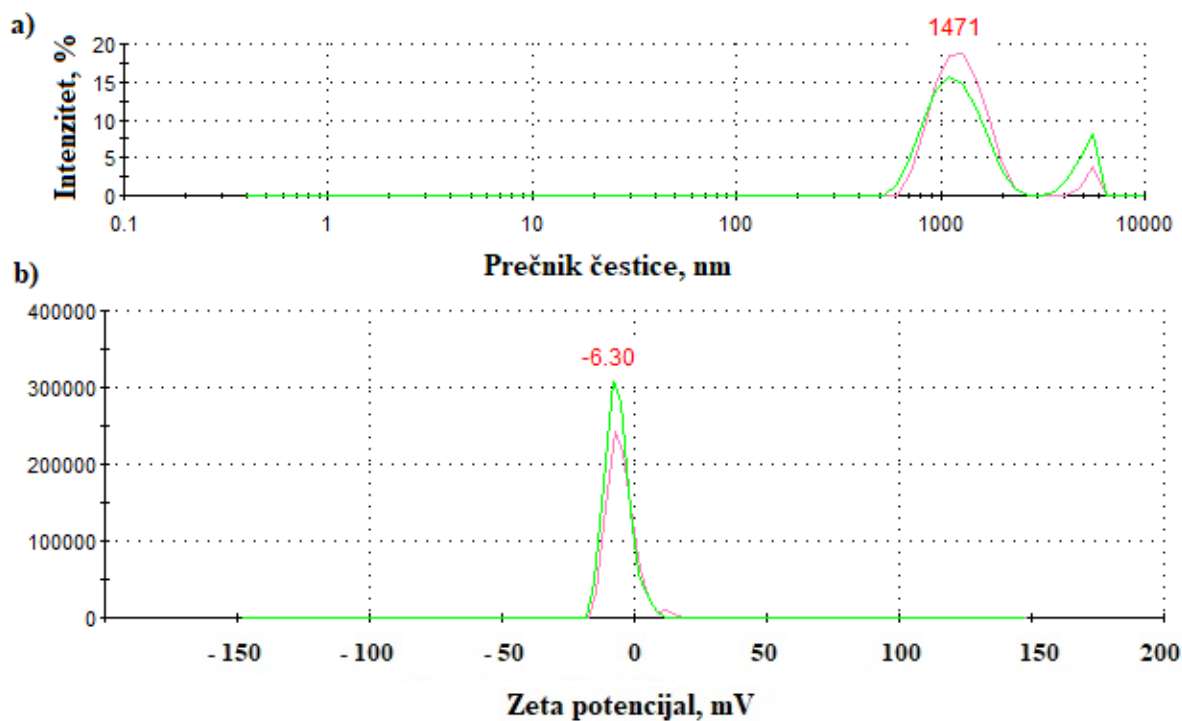
4.4.3.1. Transdermalna difuzija acetil-derivata floridzina

Imajući u vidu rezultate postignute tokom preliminarnih difuzionih eksperimenata i činjenice da su acetati često korišćene forme kada su u pitanju estri bioaktivnih jedinjenja, npr. vitamina [228], jedan od ciljeva ove faze istraživanja bio je ispitivanje mogućnosti inkorporiranja smeše estara floridzin-acetata i floridzin-diacetat u različite kozmetičke formulacije i u liposome kao sisteme za kontrolisano otpuštanje. Pored toga, praćenja je kinetika otpuštanja estara iz pomenutih formulacija korišćenjem Strat-M[®] membrane, kako bi se ispitao potencijal primene ovih estara u različitim kozmetičkim proizvodima za negu kože.

Acetil-derivati floridzina inkorporirani su u različite vrste emulzija, kao što su: gel-emulzije, emulzije tipa ulje u vodi, emulzije tipa gel u ulju i emulzije sa tečnim kristalima, zatim i u liposome kao sisteme za kontrolisano otpuštanje. Priprema lipozoma vršena je primenom metode tankog filma u cilju dobijanja lipozoma sa holesterolom, dok je druga vrsta lipozoma pripremljena korišćenjem komercijalne prolipozomalne smeše (Natapide[®] II). Tako napravljeni lipozomi ispitani su sa stanovišta veličine čestica i površinskog *zeta* naelektrisanja u cilju procene stabilnosti pripremljenih čestica. Pokazano je da je srednji prečnik lipozoma pripremljenih primenom komercijalne prolipozomne smeše iznosio 219,5 nm, a izmerena vrednost površinskog *zeta* potencijala -43 mV (slika 4.51). Sa druge strane, srednji prečnik lipozoma pripremljenih metodom tankog filma bio je skoro 7 puta veći i iznosio je 1471 nm dok je izmerena vrednost *zeta* potencijala bila -6,3 mV (slika 4.52). Dobijeni rezultati ukazuju da su, generalno, čestice pripremljene na oba načina stabilne, s tim da lipozomi pripremljeni korišćenjem komercijalne smeše pokazuju izuzetnu stabilnost. Pripremljeni lipozomi kasnije su dispergovani u gel i korišćenjem Francove ćelije praćena je kinetika otpuštanja acetil-derivata floridzina iz svih pripremljenih kozmetičkih formulacija.

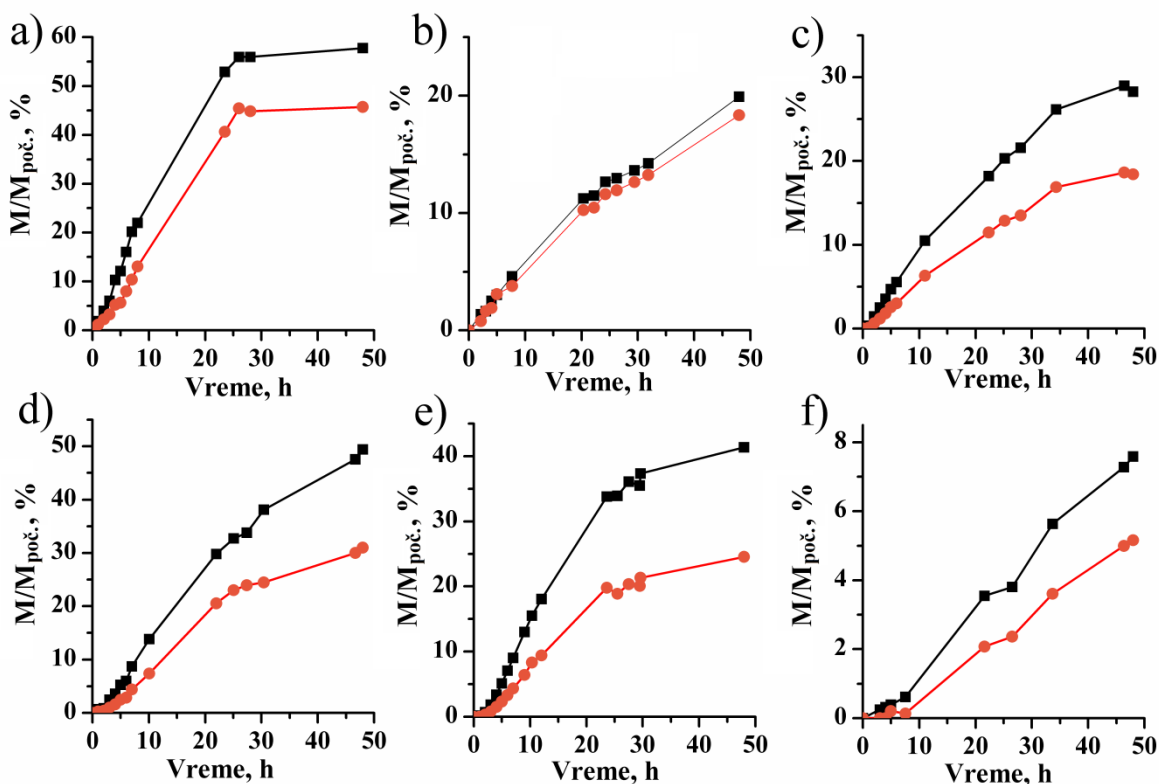


Slika 4.51 Raspodela a) veličine čestica i b) zeta potencijala lipozoma pripremljenih korišćenjem komercijalne prolipozomne smeše.



Slika 4.52 Raspodela a) veličine čestica i b) zeta potencijala lipozoma sa holesterolom pripremljenih metodom tankog filma.

Analizom dobijenih rezultata primećuje se da je u svim eksperimentima udeo monoacetata u receptorskom rastvoru veći nego udeo diacetata, a da je ta razlika najmanje izražena u eksperimentu prilikom otpuštanja estara floridzina iz lipozoma dispergovanih u gelu (slika 4.53). Ovakav rezultat upućuje na zaključak da je, u ovom slučaju, kinetika otpuštanja aktivne komponente određena brzinom difuzije iz lipozoma i da je ona značajno sporija od difuzije kroz gel koji je nosač lipozoma.



Slika 4.53 Kinetika otpuštanja floridzin-acetata (crna) i floridzin-diacetata (crvena) kroz Strat-M[®] membranu iz različitih kozmetičkih formulacija: a) gel-emulzije, b) lipozoma dispergovanih u gelu, c) lipozoma sa holesterolom dispergovanih u gelu, d) emulzije U/V, e) emulzije gel u ulju i f) emulzije sa tečnim kristalima.

Najveći udeo prodifundovalih estara ostvaren je prilikom otpuštanja acetata floridzina iz gel-emulzije (58 % monoacetata i 45 % diacetata), dok su nešto manji udeli ostvareni prilikom otpuštanja iz emulzije tipa ulje u vodi, pa je udeo floridzin-acetata iznosio 50 %, dok je udeo floridzin-diacetata bio 31 % (slika 4.53 (a i d)). Najmanji udeli prodifundovalih

estara primećeni su prilikom otpuštanja iz emulzija sa tečnim kristalima, pa je tako u receptorskom rastvoru detektovano samo 7,5 %, odnosno 5 % od početne mase floridzin-acetata i floridzin-diacetata, redom (slika 4.53f).

Fitovanjem eksperimentalno dobijenih rezultata jednačinama 2.28 i 2.31 u Matlab programu dobijeni su podaci prikazani u tabeli 4.20. Validnost dobijenih podataka je potvrđena određenim koeficijentima determinacije, s obzirom da je prilikom fitovanja svakog seta podataka vrednost R^2 bila veća od 0,96. Može se primetiti da u svim formulacijama u kojima je prisutna forma gela, prenos komponente zavisi kako od same difuzije tako i od relaksacije lanaca korišćenog polimera, s obzirom da su vrednosti koeficijenta n u svim tim eksperimentima u opsegu $0,5 < n < 1$. Takođe, u svim eksperimentima primećeno je kašnjenje u početku prenosa komponenta kroz membranu, tj. u svim eksperimentima prisutna je tzv. *lag* faza, a najduži period početka prolaska komponenti kroz membranu primećen je u eksperimentu u kojem su estri inkorporirani u emulziju sa tečnim kristalima. Pretpostavlja se da je uzrok tome otežan prolazak samih estara kroz strukturu oleozoma koja se formira oko dispergovanih kapljica uljane faze. Treba imati u vidu da *lag* faza predstavlja vreme potrebno da se estri nadju u receptorskom rastvoru što znači da dodje do njihovog transdermalnog prenosa i penetracije do hipodermisa, a da je vreme penetracije u gornje slojeve membrane kraće. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da najveća količina aktivne komponente ostaje u *stratum corneum*-u i epidermisu, a najmanji deo prolazi do hipodermisa, što ne umanjuje efikasnost formulacije [229].

Izračunati efektivni koeficijenti difuzije acetyl-derivata floridzina takođe su predstavljeni u tabeli 4.21 i može se videti da su daleko najveće vrednosti efektivnih koeficijenata difuzije dobijene tokom otpuštanja estara floridzina iz emulzije tipa U/V, kao i iz gel-emulzija, što je u skladu i sa ostvarenim udelima prodifundovalih estara nakon 48 h. Može se zaključiti da su za difuziju pomenutih estara floridzina pogodnije formulacije u kojima je voda kontinualna faza, pri čemu estri najbrže difunduju iz formulacije u kojoj nije prisutna forma gela, iz emulzije U/V, dok je nešto slabija difuzija primećena tokom difuzije iz gel-

emulzija, što se može objasniti delimično otežanim prolaskom estara kroz matriks polimera.

Tabela 4.21 Podaci dobijeni fitovanjem eksperimentalnih podataka i izračunati efektivni koeficijenti difuzije acetil-derivata floridzina.

Formulacija	Estri	n	t_{lag} , min	$k_1 \cdot 10^3$, min^{-n}	$D_{ef} \cdot 10^{10}$, m^2/min
<i>Gel-emulzija</i>	Floridzin-acetat	0,570	57,05	12,28	11,58
	Floridzin-diacetat	0,785	52,03	8,594	0,975
<i>Lipozomi dispergovani u gelu</i>	Floridzin-acetat	0,698	90,48	4,489	0,617
	Floridzin-diacetat	0,706	102,7	4,189	0,503
<i>Lipozomi sa holesterolom dispergovani u gelu</i>	Floridzin-acetat	0,773	79,97	6,528	0,906
	Floridzin-diacetat	0,798	114,9	4,035	0,274
<i>Emulzija sa tečnim kristalima</i>	Floridzin-acetat	0,5	1122	2,143	0,715
	Floridzin-diacetat	0,5	1140	1,401	0,307
<i>Emulzija ulje u vodi</i>	Floridzin-acetat	0,5	236,7	10,63	24,64
	Floridzin-diacetat	0,5	239	5,479	6,55
<i>Emulzija gel u ulju</i>	Floridzin-acetat	0,908	119,9	6,860	0,234
	Floridzin-diacetat	0,911	158,1	3,961	0,0764

Ukoliko se proanaliziraju i ostali rezultati dobijeni nakon otpuštanja acetil-derivata floridzina iz različitih formulacija, može se primetiti da pomenuti estri najsporije difunduju iz emulzije tipa gel u ulju, što opet vodi do zaključka da su za prenos estara najbolje formulacije u kojima je voda kontinualna faza, odnosno u kojima su kapljice ulja dispergovane u vodi. Objašnjenje se može se naći u literaturi [176], gde Vičers i saradnici

navode da što je veća razlika u polarnosti između formulacije i inkorporirane komponente, veća je pogonska sila za difuziju kroz membranu. Pa tako lipofilni estri koji su slabije rastvorni u hidrofilnijim formulacijama brže „napuštaju“ formulaciju i migriraju ka lipofilnijoj membrani u kojoj je njihova rastvorljivost veća. U suprotnom, kada je formulacija lipofilnija od membrane, inkorporirane komponente teže da ostanu u njoj, a samim tim je i brzina difuzije manja, što je slučaj prilikom inkorporiranja estara u emulzije gel u ulju. Iako su najmanje vrednosti efektivnog koeficijenta difuzije dobijene prilikom praćenja kinetike prenosa estara iz emulzije tipa gel u ulju, udeo prodifundovalih estara u receptorskom rastvoru je jako visok, što se može objasniti kombinovanim efektom prenosa komponente, s obzirom da u ovom slučaju prenos komponente uglavnom zavisi od relaksacije polimera, a manjim delom od difuzije komponente ($n \sim 0,9$).

Upoređivanjem izračunatih vrednosti efektivnih koeficijenata difuzije floridzin-acetata i floridzin-diacetata iz lipozoma dispergovanih u gelu sa vrednostima koeficijenata difuzije odgovarajućih estara iz lipozoma sa holesterolom dispergovanih u gelu, može se primetiti da su nešto veće vrednosti dobijene u eksperimentu u kojem je korišćen holesterol. Ovakav trend može biti posledica činjenice da su se upotrebom holesterola dobili lipozomi kod kojih je membrana poroznija, pa je samim tim i brzina difuzije veće. Međutim, može se zaključiti da je i za jednu i za drugu formulaciju u kojoj su korišćeni lipozomi primećen efekat produženog otpuštanja, s obzirom da su vrednosti efektivnih koeficijenata difuzije estara značajno niži u poređenju sa vrednostima koeficijenata dobijenih otpuštanjem iz gel-emulzija.

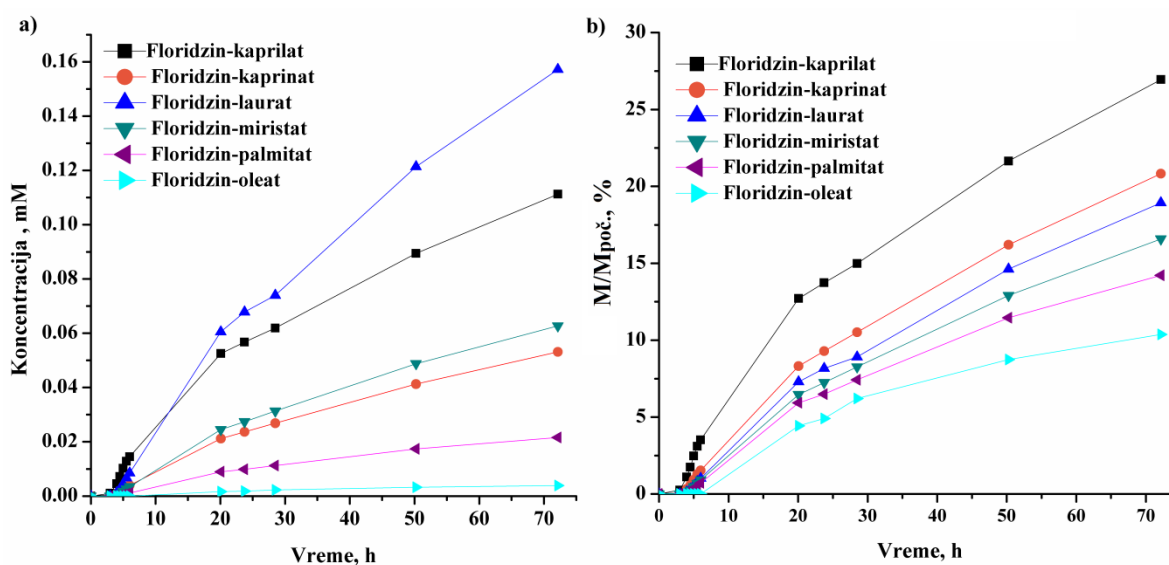
4.4.3.2. Transdermalna difuzija smeša estara flavonoida dobijenih transesterifikacijom biljnih ulja

Nakon uspešno izvedenih eksperimenata ispitivanja transdermalnog prenosa acetyl-derivata floridzina, fokus istraživanja bio je na *in vitro* ispitivanju transdermalnog prenosa estara flavonoida (floridzina i naringina) dobijenih u reakciji transesterifikacije korišćenjem biljnih ulja, iz različitih kozmetičkih formulacija primenom komercijalne model membrane Strat-M[®]. Pored estara flavonoida dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem koji su korišćeni u preliminarnim eksperimentima, ispitana je i brzina transdermalne difuzije estara

flavonoida dobijenih u reakciji sa lanenim uljem, s obzirom da je poznato da ovo ulje, bogato ω -3 masnim kiselinama, pomaže u obnavljanju kože. Cilj ove faze istraživanja je ispitivanje potencijala i optimizacija primene različitih smeša estara flavonoida kao bioaktivnih komponenti u kozmetičkim proizvodima.

4.4.3.2.1. Transdermalna difuzija iz gel-emulzija

Smeše estara pomenutih flavonoida korišćene su za pripremu gel-emulzija kao pogodnih kozmetičkih formulacija i praćena je kinetika otpuštanja estara kroz Strat-M[®] membranu. Na slici 4.54 predstavljene su krive otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem.

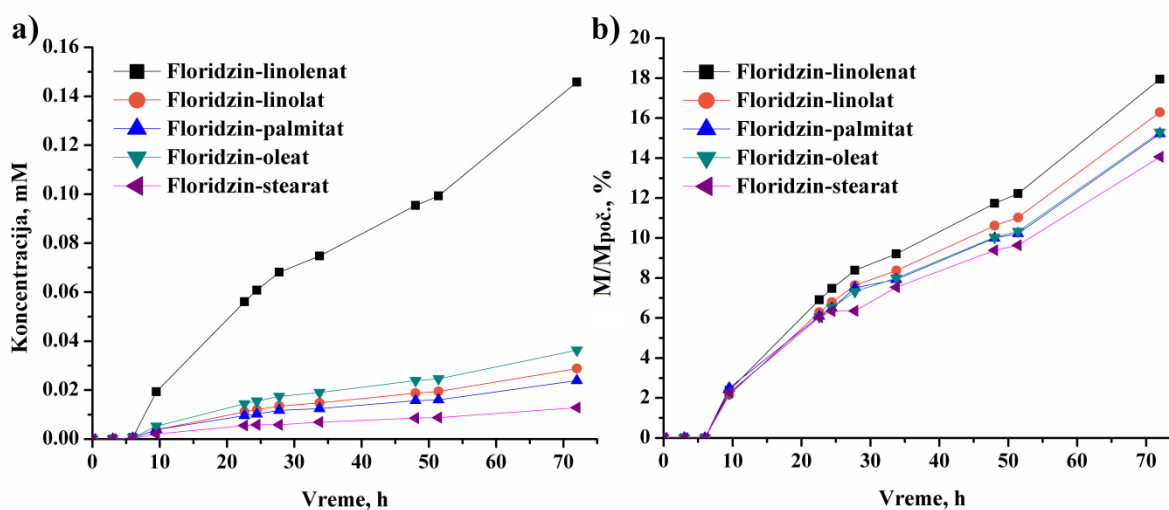


Slika 4.54 Kinetika otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem iz gel-emulzije: a) koncentracioni profili i b) udeo prodifundovanih estara u receptorskom rastvoru.

Na osnovu koncentracionih profila dobijenih analizom uzoraka receptorskog rastvora u toku vremena može se zaključiti da je za ispitano vreme najviše prodifundovalo floridzin-laurata s obzirom da je detektovana najveća koncentracija ovog estera u receptorskom delu. Međutim, imajući u vidu da je koncentracija ovog estera u formulaciji dosta veća od koncentracije ostalih estara (tabela 4.9), veća je i pogonska sila za difuziju, pa je i brži

porast koncentracije u receptorskom rastvoru. Ovaj rezultat pokazuje da bi najveći značaj za bioaktivno dejstvo kozmetičkog proizvoda ovog tipa imao floridzin-laurat jer bi nakon difuzije smeše kroz kožu bila dostupna najveća koncentracija ovog jedinjenja. Međutim, radi upoređivanja difuzionih karakteristika različitih estara prisutnih u smeši, neophodna je njihova relativizacija. Zbog toga, na slici 4.54b predstavljen je udeo prodifundovalih estara u toku vremena. Može se primetiti da je udeo prodifundovalog estera kiseline kratkog lanca, floridzin-kaprilata, najveći, što ukazuje na činjenicu da kroz membranu najbrže prolaze najmanji molekuli, dok je udeo ostalih prodifundovalih estara manji i može se uočiti da udeo prodifundovalih estara u receptorskom rastvoru opada sa porastom broja C atoma masnokiselinskog ostatka.

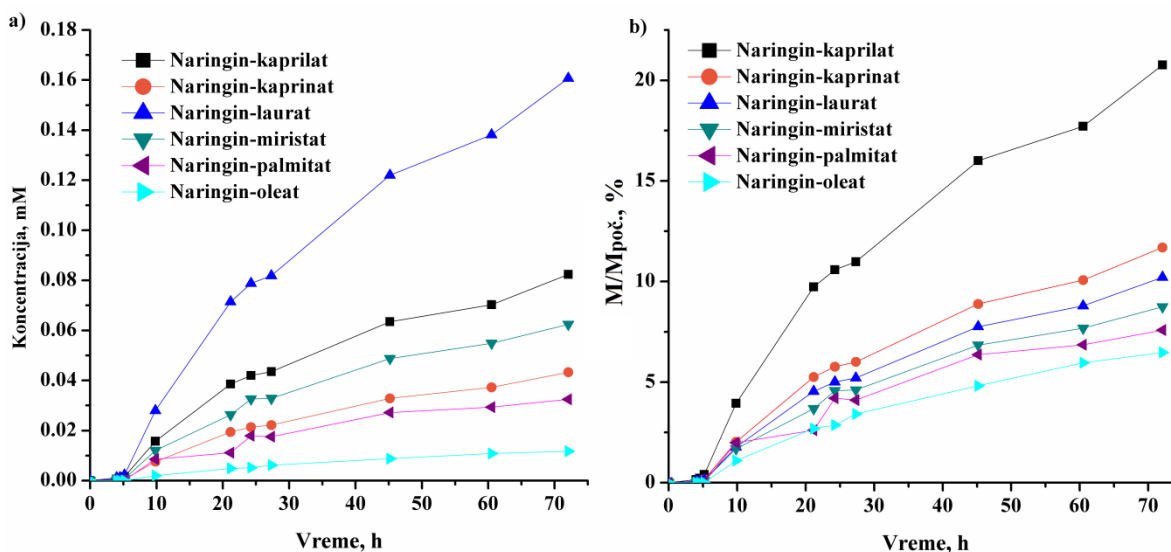
Kada je reč o kinetici otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji transesterifikacije sa lanenim uljem iz gel-emulzije, može se zaključiti da je koncentracija floridzin-linolenata u receptorskom rastvoru najviša (slika 4.55a), što je i bilo očekivano s obzirom na početnu pogonsku silu za difuziju, jer je koncentracija ovog estera u formulaciji značajno veća od ostalih estara.



Slika 4.55 Kinetika otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa lanenim uljem iz gel- emulzije: a) koncentracioni profili i b) udeo prodifundovalih estara u receptorskom rastvoru.

Međutim, kada je reč u udelu prodifundovalih estara u toku vremena (slika 4.55b), primećeno je da ne postoje velike razlike u brzini prolaza estara kroz Strat-M[®] membranu, što i nije iznenađujuće s obzirom na to da se u smeši pretežno nalaze estri masnih kiselina sa 18 C atoma, samo različitog stepena nezasićenosti. Ipak može se uočiti da estri floridzina i nezasićenih masnih kiselina brže difunduju, pri čemu je uspostavljen trend da udeo prodifundovalih estara opada sa smanjenjem broja dvostrukih veza u masnokiselinskom lancu, odnosno sa povećanjem stepena hidrofobnosti samog molekula. Ovakvi rezultati su jako povoljni i za buduću primenu jer upućuju na zaključak da će estri esencijalne linolenske kiseline nešto lakše difundovati kroz kožu, odnosno da će se difuzijom udeo ove vredne komponente u koži dodatno povećati.

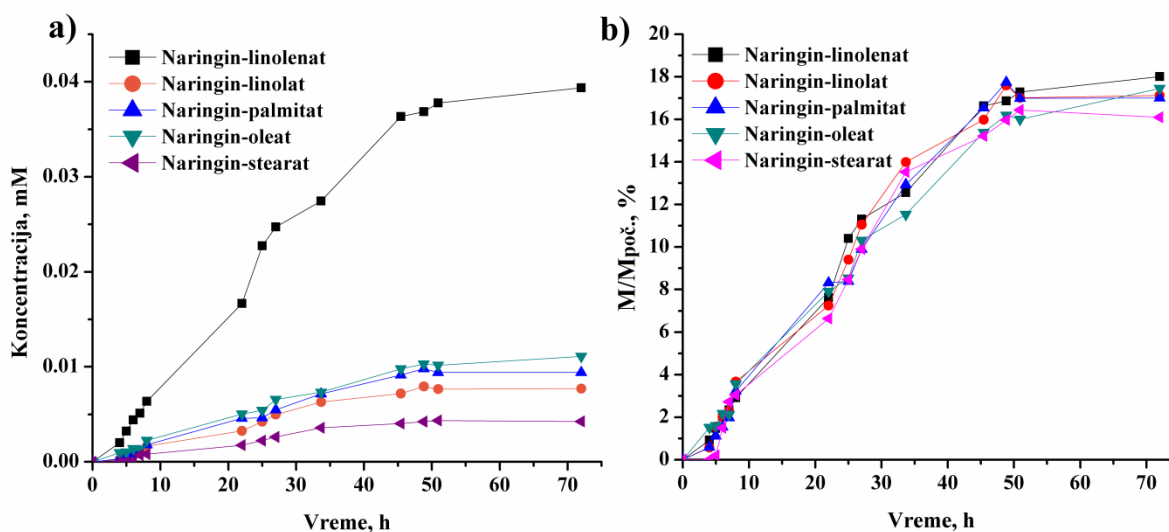
Kada je reč o kinetici otpuštanja estara drugog ispitanog flavonoida, naringina, dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem iz gel-emulzije (slika 4.56) primećen je isti trend kao i u prethodnom eksperimentu sa odgovarajućim estrima floridzina, s obzirom da je u receptorskom rastvoru najviše detekovano estra laurinske kiseline (slika 4.56a).



Slika 4.56 Kinetika otpuštanja estara naringina dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem iz gel-emulzije: a) koncentracioni profili i b) udeo prodifundovalih estara u receptorskom rastvoru.

Pored toga, posmatranjem udela prodifundovalih estara potvrđen je trend da udeo estara prodifundovalih kroz Strat-M[®] membranu opada sa povećanjem molekulske mase estara. Dodatno, može se primetiti da su udeli prodifundovalih estara naringina u toku posmatranog vremena nešto niži u poređenju sa udelima odgovarajućih estara floridzina (slika 4.54b).

Praćenjem kinetike otpuštanja estara naringina dobijenih u reakciji transesterifikacije sa lanenim uljem iz gel-emulzije ustanovljeno je da je u receptorskom rastvoru najviše zastupljen estar linolenske kiseline (slika 4.57a), kao i u eksperimentu sa estrima floridzina. Međutim, kada je reč u udelu prodifundovalih estara u toku vremena (slika 4.57b) primećeno je da, za razliku od eksperimenta sa estrima floridzina, skoro da ne postoje razlike u udelu prodifundovalih estara.



Slika 4.57 Kinetika otpuštanja estara naringina dobijenih u reakciji sa lanenim uljem iz gel- emulzije: a) koncentracioni profili i b) udeo prodifundovalih estara u receptorskom rastvoru.

Za detaljniju analizu karakteristika difuzije različitih estara floridzina i naringina kroz membranu koja simulira transdermalni prenos, neophodna je određena kvantitativna analiza, tj. potrebno je izračunati efektivne koeficijente difuzije svih estara što je učinjeno fitovanjem eksperimentalno dobijenih podataka jednačinom 2.31 u Matlab programu.

Iz tabele 4.22 može se uočiti da su vrednosti koeficijenta n za sve ispitane estre floridzina dobijene u reakciji kako sa kokosovim, tako i sa lanenim uljem u opsegu $0,5 < n < 1$ što ukazuje da se prenos ovih komponenata odigrava kombinovanim mehanizmom, tj. prenos estara zavisi kako od same difuzije, tako i od relaksacije lanaca polimera. Takođe, primećeno je da vrednost koeficijenta n raste sa povećanjem mase aktivne komponente, tj. sve je veći uticaj relaksacije polimera na transdermalni prenos. Kao što se moglo primetiti i sa grafika kinetike otpuštanja estara (slike 4.54 i 4.55), tokom fitovanja eksperimentalnih podataka potvrđeno je postojanje određenog perioda odlaganja prenosa komponenti, tj. estri floridzina detektovani su u receptorskom rastvoru nakon 3,5 h od trenutka nanošenja gela na membranu.

Tabela 4.22 Fitovanje eksperimentalnih rezultata transdermalne difuzije iz gel-emulzija i izračunati efektivni koeficijenti difuzije estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim i lanenim uljem.

Acil-donor	Estri	n	$t_{lag},$ min	$k_1 \cdot 10^3,$ min ⁻ⁿ	$D_{ef} \cdot 10^{10},$ m ² /min
<i>Kokosovo ulje</i>	Floridzin-kaprilat	0,573	231,7	11,63	3,690
	Floridzin-kaprinat	0,683	259,5	5,400	1,182
	Floridzin-laurat	0,707	277,2	4,983	0,824
	Floridzin-miristat	0,717	269,0	4,570	0,638
	Floridzin-palmitat	0,709	274,8	4,168	0,568
	Floridzin-oleat	0,876	349,5	3,467	0,101
<i>Laneno ulje</i>	Floridzin-linolenat	0,731	231,7	4,561	0,484
	Floridzin-linolat	0,775	234,2	4,387	0,342
	Floridzin-oleat	0,809	235,7	3,809	0,197
	Floridzin-stearat	0,782	236,5	3,214	0,172
	Floridzin-palmitat	0,801	235,0	4,031	0,235

Kada je reč o difuzionim karakteristikama samih estara, na osnovu izračunatih efektivnih koeficijenata difuzije potvrđen je trend da najbrže difunduju najmanji molekuli, i da se vrednosti koeficijenata difuzije smanjuju sa povećanjem molekulske mase molekula. Takođe, u slučaju estara floridzina dobijenih u reakciji sa lanenim uljem, najveća vrednost efektivnog koeficijenta difuzije dobijena je za estar sa najviše dvostrukih veza u

masnokiselinskom ostatku molekula, floridzin-linolenat ($0,48 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{min}$), a najmanja za floridzin-stearat ($0,17 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{min}$), molekul u čijem masnokiselinskom ostatku je takođe 18 C atoma, ali bez prisustva dvostrukih veza.

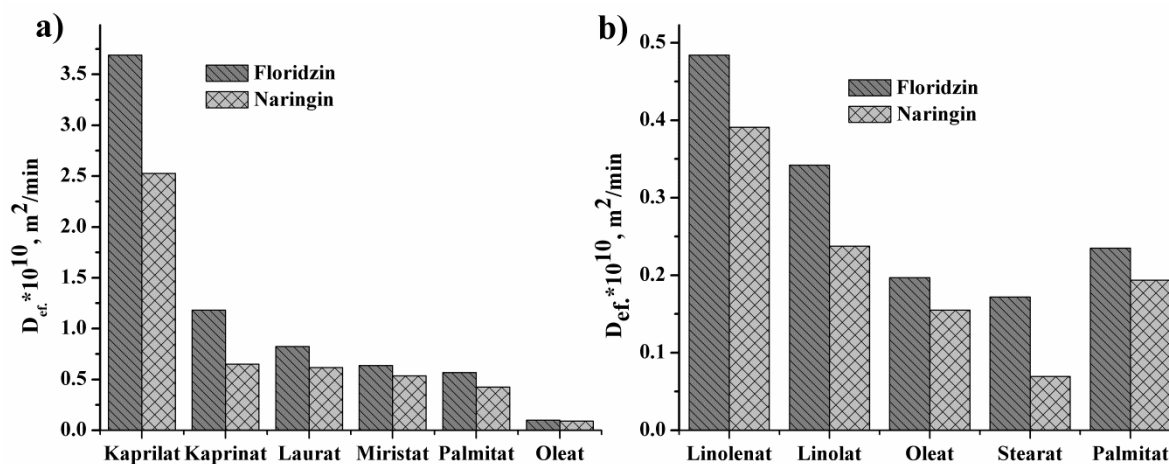
Fitovanjem eksperimentalnih podataka dobijenih praćenjem otpuštanja estara naringina iz gel-emulzija kroz Strat-M[®] membranu, može se reći da su pravilnosti utvrđene tokom otpuštanja estara floridzina, kao što su prisustvo *lag* faze i prisustvo kombinovanog mehanizma prenosa (uticaja difuzije i relaksacije polimera), primećene i u slučaju otpuštanja odgovarajućih estara naringina (tabela 4.23).

Tabela 4.23 Fitovanje eksperimentalnih rezultata transdermalne difuzije iz gel-emulzija i izračunati efektivni koeficijenti difuzije estara naringina dobijenih u reakciji sa kokosovim i lanenim uljem.

Acil-donor	Estri	n	t_{lag}, min	$k_1 \cdot 10^3, \text{min}^{-n}$	$D_{ef} \cdot 10^{10}, \text{m}^2/\text{min}$
<i>Kokosovo ulje</i>	Naringin-kaprilat	0,608	240,0	4,298	2,526
	Naringin-kaprinat	0,637	240,8	2,454	0,651
	Naringin-laurat	0,575	308,8	1,851	0,616
	Naringin-miristat	0,544	309,5	1,519	0,535
	Naringin-palmitat	0,575	264,3	1,536	0,425
	Naringin-oleat	0,591	424,8	1,314	0,092
<i>Laneno ulje</i>	Naringin-linolenat	0,599	236,3	2,263	0,391
	Naringin-linolat	0,687	228,2	2,528	0,238
	Naringin-oleat	0,785	236,8	3,055	0,155
	Naringin-stearat	0,861	238,7	2,780	0,070
	Naringin-palmitat	0,699	237,2	2,394	0,194

Ako se uporede dobijeni efektivni koeficijenti difuzije estara dva različita flavonoida floridzina i naringina (slika 4.58), primećuje se da estri floridzina dobijeni u reakciji i sa kokosovim i sa lanenim uljem brže difunduju iz ispitanih gel-emulzija kroz membranu koja predstavlja model sistem transdermalnog prenosa u odnosu na odgovarajuće estre naringina, što potvrđuje činjenicu da veličina molekula, tj. molekulska masa aktivne komponente ima značajan uticaj na prenos komponente.

S obzirom na ostvarene veće efektivne koeficijente difuzije estara floridzina, u cilju ispitivanja uticaja tipa kozmetičke formulacije na intenzitet prenosa komponente, u narednoj fazi istraživanja ispitana je transdermalna difuzija estara ovog flavonoida iz još dve kozmetičke formulacije, emulzije ulje u vodi i emulzije gel u ulju.

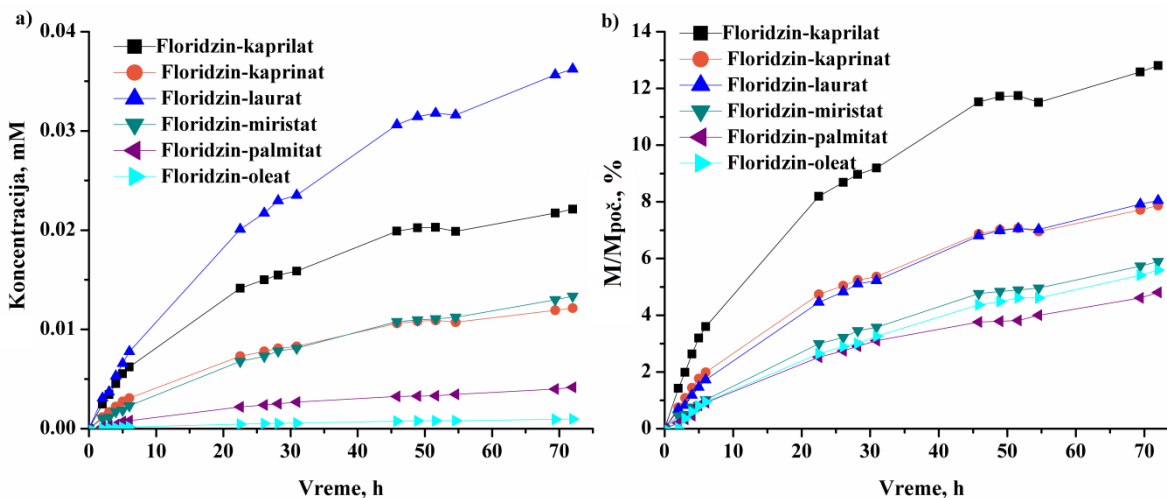


Slika 4.58 Poređenje efektivnih koeficijenata difuzije estara floridzina i naringina dobijenih u reakciji sa: a) kokosovim i b) lanenim uljem.

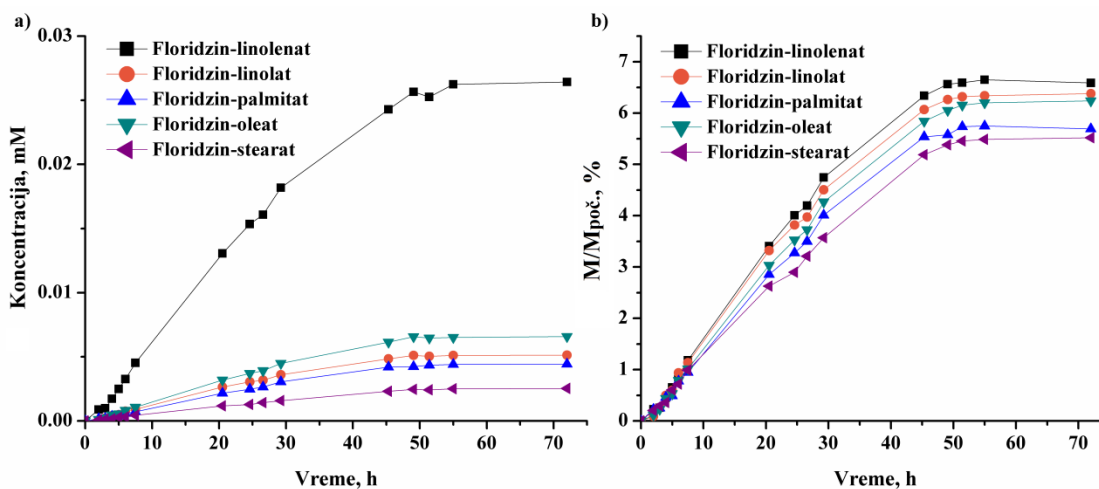
4.4.3.2.2. Transdermalna difuzija iz emulzije ulje u vodi

Emulzija tipa ulje u vodi predstavlja jednu od najzastupljenijih tipova emulzija koja se koristi u različitim vrstama kozmetičkih preparata [176], pa je ispitivanje transdermalne difuzije estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim i lanenim uljem iz klasične emulzije U/V predstavljalo logični sledeći korak.

Što se tiče kinetike otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem (slika 4.59), primećuje se isti trend kao i prilikom otpuštanja ovih estara iz gel-emulzije, s obzirom da je u receptorskom rastvoru floridzin-laurat detektovan u najvećoj koncentraciji (~0,035 mM), dok udeo prodifundovalih estara opada sa porastom broja C atoma u masnokiselinskom delu molekula. Takođe, i u slučaju otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa lanenim uljem zadržan je isti trend, kao i prilikom otpuštanja ovih estara iz gel-emulzija (slika 4.60).



Slika 4.59 Kinetika otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem iz emulzije tipa ulje u vodi: a) koncentracioni profili i b) udeo prodifundovalih estara u receptorskom rastvoru.



Slika 4.60 Kinetika otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa lanenim uljem iz emulzije tipa ulje u vodi: a) koncentracioni profili i b) udeo prodifundovalih estara u receptorskom rastvoru.

Međutim, treba naglasiti da su tokom 72 h praćenja kinetike otpuštanja, koncentracije estara detektovane u receptorskom rastvoru nakon otpuštanja iz emulzija ulje u vodi bile nekoliko puta manje u odnosu na koncentracije odgovarajućih estara detektovanih prilikom

otpuštanja iz gel-emulzije. Pored toga, udeli prodifundovalih estara su značajno manji u poređenju sa eksperimentom u kojem je praćeno otpuštanje ovih estara iz gel-emulzija.

U cilju detaljnijeg i preciznijeg objašnjenja zapaženih pravilnosti neophodna je detaljnija analiza eksperimentalnih podataka u cilju kvantitativnog određivanja karakterističnih parametara prenosa komponente. Zbog toga, eksperimentalni podaci dobijeni praćenjem otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem fitovani su jednačinom 2.29, gde je vrednost koeficijenta n u svim slučajevima bila $n=0,5$, što ukazuje na činjenicu da je mehanizam prenosa estara u ovom slučaju uslovljen isključivo difuzijom. Dobijene vrednosti konstanti k_1 su korišćene u jednačini 2.27 za izračunavanje efektivnih koeficijenata difuzije estara floridzina sintetisanih u reakciji sa kokosovim uljem i dobijeni rezultati predstavljeni su u tabeli 4.24.

Tabela 4.24 Fitovanje eksperimentalnih rezultata transdermalne difuzije iz emulzije ulje u vodi i izračunati efektivni koeficijenti difuzije estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem.

Estri	t_{lag}, min	$k_1 \cdot 10^3$, min^{-0,5}	$D_{ef} \cdot 10^{10}$, m²/min
Floridzin-kaprilat	90,71	2,368	0,316
Floridzin-kaprinat	98,98	1,385	0,108
Floridzin-laurat	110,0	0,782	0,101
Floridzin-miristat	163,6	0,379	0,049
Floridzin-palmitat	168,8	0,263	0,034
Floridzin-oleat	170,2	0,309	0,040

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je period odlaganja (*lag* faza ~ 1,5-3 h) prenosa estara značajno kraći u poređenju sa vrednostima dobijenih tokom otpuštanja odgovarajućih estara iz gel-emulzija. Ipak, brzine difuzije estara floridzina iz emulzije tipa ulje u vodi su višestruko manje u poređenju sa brzinom difuzije odgovarajućih estara iz gel-emulzije (tabela 4.22). Slabiji prenos komponenti iz emulzija tipa ulje u vodi u odnosu na prenos iz gel-emulzija se može objasniti različitim mehanizom prenosa, s obzirom da je u slučaju emulzija tipa ulje u vodi, brzina prenosa određena samo difuzijom molekula, dok u

slučaju gel-emulzija pored difuzije na prenos komponente utiče i relaksacija samog polimera, koja dovodi do olakšanog prenosa.

Kada je reč o otpuštanju estara floridzina dobijenih u reakciji sa lanenim uljem iz emulzije ulje u vodi, primećeno je da eksperimentalni podaci nisu mogli biti fitovani očekivanom jednačinom 2.29 pri vrednosti koeficijenta $n=0,5$. Očigledno je da u ovom slučaju, otpuštanje estara floridzina viših masnih kiselina različitog stepena nezasićenosti nije uslovljeno isključivo difuzijom, već je prisutan kombinovani mehanizam prenosa. Zbog toga, dobijeni podaci fitovani su modifikovanom Higučijevom jednačinom 2.31 i dobijene vrednosti karakterističnih parametara, koeficijenta n , lag faze i konstante k_1 koja je kasnije korišćena za proračun efektivnih koeficijenata difuzije predstavljene su u tabeli 4.25.

Tabela 4.25 Fitovanje eksperimentalnih rezultata transdermalne difuzije iz emulzije ulje u vodi i izračunati efektivni koeficijenti difuzije estara floridzina dobijenih u reakciji sa lanenim uljem.

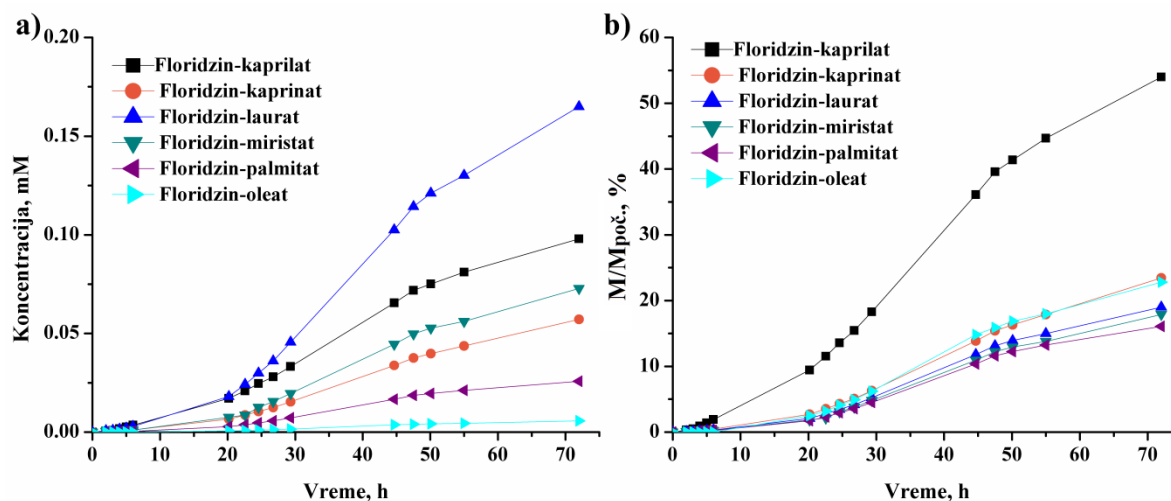
Estri	n	$t_{lag},$ min	$k_1 \cdot 10^4,$ min ⁻ⁿ	$D_{ef} \cdot 10^{12},$ m ² /min
Floridzin-linolenat	0,725	133,3	14,01	3,740
Floridzin-linolol	0,737	119,9	13,76	3,267
Floridzin-oleat	0,772	119,4	11,94	1,845
Floridzin-stearat	0,796	107,0	10,21	1,111
Floridzin-palmitat	0,761	115,9	11,60	1,907

Kao i prilikom prenosa ovih estara iz gel-emulzija i u ovom slučaju primećene su slične vrednosti koeficijenta n (0,72-0,8) za sve ispitane estre što definitivno potvrđuju prisustvo kombinovanog mehanizma prenosa i ukazuje na činjenicu da je otpuštanje estera floridzina i viših masnih kiselina uslovljeno kako samom difuzijom, tako i određenim promenama u strukturi samog nosača, tj.emulzije. Pored toga, kao i u prethodnom slučaju, dobijeni podaci pokazuju kraću lag fazu (~ 2 h) u odnosu na eksperiment otpuštanja odgovarajućih estara iz gel-emulzije. Konačno, poređenjem isključivo difuzionih karakteristika samih estara iz pomenutih kozmetičkih formulacija, primećuje se da su efektivni koeficijenti difuzije estara floridzina i viših masnih kiselina iz emulzije tipa ulje u vodi (tabela 4.25) za

red veličine manji u poređenju sa dobijenim koeficijentima difuzije odgovarajućih estara iz gel-emulzije (tabela 4.22).

4.4.3.2.3. Transdermalna difuzija iz emulzije tipa gel u ulju

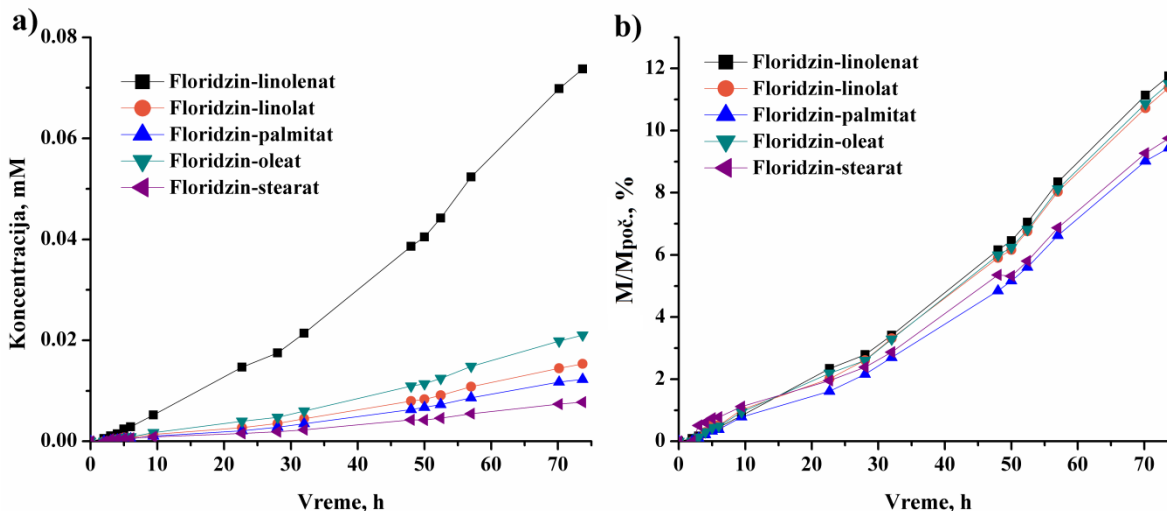
Za razliku od prethodnih eksperimenata u kojima je ispitana brzina otpuštanja estara floridzina iz emulzija u kojima je vodena faza predstavljala kontinulanu fazu, u daljim eksperimentima, ispitana je i mogućnost transdermalne difuzije pomenutih estara iz emulzije tipa gel u ulju, gde zapravo ulje čini kontinualnu fazu, a vodena faza je gelirana i dispergovana u kontinualnoj fazi. Kinetika otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim i lanenim uljem predstavljene su na slikama 4.61 i 4.62.



Slika 4.61 Kinetika otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem iz emulzije tipa gel u ulju: a) koncentracioni profili i b) udeo prodifundovalih estara u receptorskom rastvoru.

Može se zaključiti da bez obzira na korišćenu formulaciju, trend otpuštanja ostaje isti, u receptorskom rastvoru najviše su prisutni estri čije su početne koncentracije u donorskom delu bile najveće, floridzin-laurat (slika 4.61a) i floridzin-linolenat (slika 4.62a). Što se tiče udela prodifundovalih estara, ako se zanemari najmanji ispitani estar, primećene su znatno manje razlike u udelu prodifundovalih estara različite molekulske mase (slika 4.61b). U slučaju otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa lanenim uljem, postoji jasna

razlika i evidentno je da estri nezasićenih masnih kiselina malo brže difunduju u odnosu na estre zasićenih masnih kiselina (slika 4.62b).



Slika 4.62 Kinetika otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa lanenim uljem iz emulzije tipa gel u ulju: a) koncentracioni profili i b) udeo prodifundovalih estara u receptorskom rastvoru.

Međutim, treba naglasiti da se za razliku od prethodnih eksperimenata praćenja transdermalne difuzije iz različitih formulacija, posmatranjem krivih otpuštanja estara floridzina iz emulzije tipa gel u ulju primećuje prisustvo dva različita perioda otpuštanja: prvi period u kojem je prenos aktivne komponente spor, kojeg prati period značajno bržeg prenosa komponente. Moguće objašnjenje ovakvog ponašanja može biti u činjenici da je u ovom sistemu vodena, dispergovana faza gelirana i da makropodručja gelirane vodene faze doprinose drugačijem mehanizmu prenosa aktivne komponente kroz membranu koja simulira transdermalni prenos.

S obzirom na prisustvo dva perioda u toku otpuštanja, određivanje efektivnih koeficijenata difuzije estara iz emulzije gel u ulju podeljeno u dve faze. Eksperimentalni podaci dobijeni tokom prvog perioda (do 24 h) fitovani su pomenutim jednačinama 2.29 i 2.31, dok je prilikom fitovanja eksperimentalnih podataka dobijenih u drugom periodu otpuštanja (nakon 24 h) dobijeno da su vrednosti koeficijenta $n=1$ za sve testirane estre što ukazuje na

činjenicu da u ovom periodu prenos komponente zavisi isključivo od relaksacije polimera i pripada tzv. „Case II“ mehanizmu otpuštanja, kada je brzina difuzije dosta veća od brzine difuzije po Fikovom zakonu. Drugim rečima, dolazi do promene u strukturi gel klastera što dovodi do lakšeg prenosa aktivne komponente, čime se i objašnjava drastičan porast udela prodifundovalih estara u drugom periodu otpuštanja.

Korišćenjem parametara dobijenih prilikom fitovanja eksperimentalnih podataka izračunati su efektivni koeficijenti difuzije različitih estara floridzina iz emulzije tipa gel u ulju i predstavljeni u tabeli 4.26.

Tabela 4.26 Efektivnih koeficijenti difuzije estara floridzina iz emulzije gel u ulju.

Acil-donor	Estri	$D_{ef} \cdot 10^{13}$, m^2/min
<i>Kokosovo ulje</i>	Floridzin-kaprilat	2,042
	Floridzin-kaprinat	1,863
	Floridzin-laurat	1,693
	Floridzin-miristat	1,623
	Floridzin-palmitat	/
	Floridzin-oleat	/
<i>Laneno ulje</i>	Floridzin-linolenat	2,411
	Floridzin-linolat	1,623
	Floridzin-oleat	0,558
	Floridzin-stearat	1,336
	Floridzin-palmitat	1,258

Vrednosti za floridzin-palmitat i floridzin-oleat u slučaju otpuštanja estara dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem nisu određene, s obzirom na to da, tokom eksperimenta pomenuti estri nisu ni detektovani u receptorskom rastvoru. Može se primetiti da su koeficijenti difuzije estara floridzina dobijenih prilikom otpuštanja iz emulzije gel u ulju višestruko manji u poređenju sa koeficijentima difuzije odgovarajućih estara iz dve prethodno ispitane kozmetičke formulacije, što potvrđuje činjenicu da su za otpuštanje estara flavonoida kao aktivnih komponenti pogodnije formulacije u kojima je voda kontinualna faza.

4.4.4. Zaključci analize difuzionih karakteristika

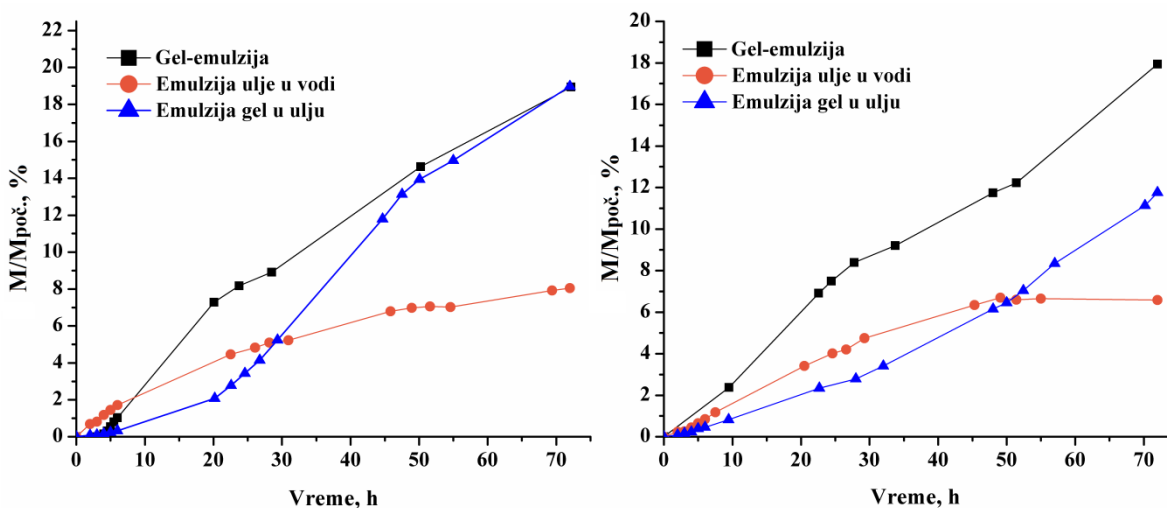
U poslednjem poglavlju ovog dela istraživanja upoređeni su rezultati dobijeni tokom različitih faza eksperimentalnog rada i sumirani su osnovni zaključci analize difuzionih karakteristika različitih estara flavonoida.

Zajednička karakteristika difuzionih eksperimenata sa acetatima floridzina i smešama estara dobijenim transesterifikacijom biljnih ulja je postojanje *lag* faze i produžena difuzija aktivne supstance. Ovakve rezultate i karakteristike Strat-M[®] membrane treba proanalizirati sa aspekta primenljivosti ovakvih formulacija u kozmetičkim proizvodima. Treba se podsetiti (poglavlje 2.6.3.3) da se Strat-M[®] membrana sastoji od delova koji imitiraju slojeve kože epidermis, dermis i hipodermis, a da svaka aktivna supstanca pre ovih slojeva ima *stratum corneum* kao prepreku. Na osnovu sastava može se pretpostaviti da se najveći deo aktivne komponente deponuje u lipofilnom sloju *stratum corneum*, odakle se lagano otpušta kroz dublje slojeve kože, tj. slojeve membrane do samog receptorskog rastvora. Ovu pretpostavku potkrepljuju i rezultati dodatno odrađenih ispitivanja, s obzirom da je nakon izvođenja tri difuziona eksperimenata, izvršena ekstrakcija aktivnih komponenti iz Strat-M[®] membrane korišćenjem metanola (20 ml) kao rastvarača. Rezultati su pokazali da su mase estara detektovanih u ekstraktu približno jednake masama odgovarajućih estara detektovanih u receptorskom rastvoru, što potvrđuje činjenicu da veliki deo aktivne komponente prodre u membranu. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima, s obzirom da su Šmid i saradnici praćenjem otpuštanja izoflavona, ganisteina, iz emulzije kroz kožu i analizom njenih slojeva nakon 4 h, pokazali da se najveći deo ovog molekula deponuje u gornjim slojevima *stratum corneum*, dok je samo 4 % ovog molekula primećeno u dubljim slojevima kože [230]. Primenom ganisteina inkorporiranih u lipozome, primećeno je više aktivne komponente u dubljim slojevima kože. Do sličnih rezultata došli su i Vickers i saradnici, imajući u vidu da je analiza transdermalnog prenosa velikog broja aktivnih supstanci, širokog opsega molarnih masa i različitog stepena hidrofobnosti, pokazala da se i nakon 48 h, najveći deo aktivne supstance zadržava u *stratum corneum*-u [229]. Takođe, analizom traka određenih slojeva *stratum corneum*-a,

utvrđeno je da količina aktivne komponente linearno opada sa povećanjem broja trake od 1 do 10 (traka br. 1 je pri površini kože), što potvrđuje i postizanje stacionarnih uslova.

Poređenjem rezultata difuzionih eksperimenata primenom acetil-derivata floridzina kao aktivnih komponenti (slika 4.53) sa rezultatima dobijenim primenom smeše estara floridzina nastalih transesterifikacijom biljnih ulja (slike 4.54, 4.55, 4.59-4.61), može se primetiti da je difuzija acetil-derivata floridzina značajno brža. Tako na primer, udeo prodifundovalog floridzin-acetata i floridzin-diacetata iz gel-emulzije iznosio je 60 %, odnosno 45%, dok je prilikom otpuštanja estara floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim i lanenim uljem iz iste formulacije, postignut najveći udeo floridzin-kaprilata od 21,5 % i floridzin-linolenata od 12 %, dok su udeli ostalih estara bili niži. Kada je reč o difuzionim karakteristikama, takođe, može se primetiti da su vrednosti efektivnih koeficijenata difuzije acetata floridzina (tabela 4.21) višestruko veće u poređenju sa koeficijentima difuzije estara sintetisanih u reakciji sa uljima (tabele 4.22, 4.24-4.26), što potvrđuje činjenicu da iz formulacija manji molekuli brže difunduju kroz Strat-M[®] membranu. Takođe, u slučaju otpuštanja floridzin-acetata iz gel-emulzije primećena je znatno kraća *lag* faza (~1 h) nego prilikom otpuštanja estara dobijenih u reakciji sa kokosovim i lanenim uljem (~3-4 h).

U cilju poređenja difuzionih karakteristika estara floridzina iz različitih kozmetičkih formulacija, na slici 4.63 grafički su upoređeni tokovi difuzije iz tri pomenute formulacije na primeru floridzin-laurata i floridzin-linolenata, kao estara čije su koncentracije u receptorskom rastvoru bile najveće u sva tri slučaja. Pored toga, u tabeli 4.27 predstavljene su i vrednosti efektivnih koeficijenata difuzije odgovarajućih estara iz gel-emulzija, emulzija tipa ulje u vodi i emulzija tipa gel u ulju.



Slika 4.63 Krive otpuštanja a) florigidin-laurata i b) florigidin-linolenata iz tri različite kozmetičke formulacije.

Na osnovu prikazanih grafika (slika 4.63) primećuje se da je udeo prodifundovanih estara iz emulzije tipa gel u ulju relativno visok, ali se takav rezultat pripisuje promeni u unutrašnjoj strukturi emulzije i olakšanom prenosu. Međutim, kada je reč o poređenju samo difuzionih karakteristika estara iz različitih formulacija (tabela 4.27), evidentno je da svi estri najbrže difunduju iz gel-emulzija, zatim emulzija ulje u vodi i na kraju iz emulzija gel u ulju. Dobijeni rezultati potvrđuju zaključak donet nakon praćenja otpuštanja acetil-derivata florigidina, da su za prenos estara flavonoida pogodnije formulacije u kojima je vodena faza kontinualna faza. U formulacijama koje su manje lipofilne od membrane, estri flavonoida su slabije rastvorni i zato se većim brzinama kreću iz formulacije ka lipofilnoj membrani, što je slučaj u gel-emulzijama i emulziji ulje u vodi, gde je voda kontinualna faza. S druge strane, mali koeficijenti difuzije samim tim i sporija difuzija, u emulzijama gel u ulju mogu biti direktna posledica veće rastvorljivosti estara flavonoida u ovoj formulaciji, nego u Strat-M[®] membrani. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa rezultatom pronađenim u literaturi, s obzirom da su Jurkovič i saradnici pokazali da je prenos askorbil-palmitata do kože značajno brži ukoliko je bioaktivna supstanca inkorporirana u mikroemulzije tipa ulje u vodi nego u mikroemulzije tipa voda u ulju [231].

Tabela 4.27 Poređenje efektivnih koeficijenata difuzije estara floridzina iz različitih kozmetičkih formulacija

Acil-donor	Estri	Gel-emulzija	Emulzija ulje u vodi	Emulzija gel u ulju
		$D_{ef} \cdot 10^{10},$ m^2/min	$D_{ef} \cdot 10^{10},$ m^2/min	$D_{ef} \cdot 10^{13},$ m^2/min
<i>Kokosovo ulje</i>	Floridzin-kaprilat	3,690	0,316	2,042
	Floridzin-kaprinat	1,182	0,108	1,863
	Floridzin-laurat	0,824	0,101	1,693
	Floridzin-miristat	0,638	0,049	1,623
	Floridzin-palmitat	0,568	0,034	/
	Floridzin-oleat	0,101	0,040	/
<i>Laneno ulje</i>	Floridzin-linolenat	0,484	0,0374	2,411
	Floridzin-linolat	0,342	0,0327	1,623
	Floridzin-oleat	0,197	0,0184	0,558
	Floridzin-stearat	0,172	0,0111	1,336
	Floridzin-palmitat	0,235	0,0191	1,258

Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da su acetati floridzina dobijeni u reakciji sa triacetinom kao i smeše estara flavonoida dobijene u reakciji sa prirodnim uljima uspešno inkorporirane u različite kozmetičke formulacije i da pomenuti estri iz formulacija difunduju kroz Strat-M[®] membranu koja predstavlja model sistem za transdermalni prenos. Shodno tome, u cilju potencijalne komercijalne primene, pomenuti kozmetički preparati moraju biti detaljnije okarakterisani.

4.5. Karakterizacija kozmetičkih formulacija sa inkorporiranim estrima flavonoida

U cilju ispitivanja mogućnosti komercijalne primene različitih kozmetičkih formulacija čije aktivne komponente predstavljaju estri flavonoida dobijeni u reakciji sa odabranim biljnim uljima, neophodno je bilo ispitati stabilnost samih pripremljenih emulzija kao i njihov hidrirajući efekat i stepen iritabilnosti nakon topikalne primene.

4.5.1. Predviđanje stabilnosti emulzija merenjem *zeta* potencijala

S obzirom da su emulzije suštinski termodinamički nestabilni sistemi, jer do razdvajanja faza neizbežno dolazi u nekom trenutku [232], u cilju ispitivanja stabilnosti prethodno analiziranih emulzija pripremljenih sa smešama estara različitih flavonoida, mereno je površinsko naelektrisanje (*zeta* potencijal) kapljica dispergovane faze tokom dva meseca i dobijene vrednosti predstavljene su u tabeli 4.28. Iako estri eskulina dobijeni u reakciji sa različitim uljima nisu ispitivani sa stanovišta transdermalne difuzije, što zbog lošijih preliminarnih rezultata, što zbog otežane manipulacije prilikom pripreme samih formulacija, u ovom delu doktorske disertacije biće okarakterisane i formulacije pripremljene sa estrima ovog flavonoida, s obzirom da se u nekom narednom periodu uz korišćenje odgovarajuće opreme planira i dopuna *in vitro* analize transdermalnog prenosa ovih estara.

Sve formulacije pokazale su negativne vrednosti površinskog *zeta* naelektrisanja i merenjem *zeta* potencijala emulzija neposredno nakon pripreme, ustanovljeno je da su sve emulzije bile izuzetno stabilne, s tim da se može naglasiti da su gel-emulzije pokazivale malo veću stabilnost, s obzirom da su vrednosti *zeta* potencijala za gel-emulzije sa estrima različitih flavonoida bile manje od -40 mV, a za emulzije ulje u vodi manje od -29 mV. Kada je reč o stabilnosti pripremljenih emulzija tokom 2 meseca skladištenja na osnovu vrednosti *zeta* potencijala izmerenog nakon 15 i nakon 60 dana može se uočiti da vrednosti *zeta* potencijala blago rastu, tj. verovatno dolazi do nekih malih promena u unutrašnjoj

strukturi emulzija, ali i nakon 60 dana vrednosti *zeta* potencijala su bile daleko od nule (< - 25 mV) pa se može zaključiti da su pripremljene formulacije veoma stabilne.

Tabela 4.28 Izmerene vrednosti *zeta* potencijala emulzija sa smešama estara flavonoida.

Flavonoid	Ulje	Emulzija	Zeta potencijal, mV		
			1. dan	15. dan	60. dan
Floridzin	kokosovo	gel-emulzija	- 55,60±0,99	- 50,85±2,54	- 32,20±1,13
		emulzija U/V	- 29,25±0,92	- 32,05±0,35	- 29,45±1,21
	laneno	gel-emulzija	- 84,42±1,98	- 79,25±1,34	- 72,41±2,12
		emulzija U/V	- 33,95±0,07	- 31,85±0,78	- 32,90±3,11
	suncokretovo	gel-emulzija	- 43,56±1,43	- 38,01±2,12	- 33,67±2,12
		emulzija U/V	- 34,98±1,08	- 29,03±1,98	- 27,45±1,69
Naringin	kokosovo	gel-emulzija	- 64,30±1,41	- 53,31±3,54	- 42,05±2,47
		emulzija U/V i	- 34,40±1,27	- 30,81±2,68	- 29,25±0,12
	laneno	gel-emulzija	- 77,65±1,48	- 77,35±3,12	- 68,82±1,98
		emulzija U/V	- 37,43±1,98	- 36,8±3,95	- 25,7±0,14
	suncokretovo	gel-emulzija	- 40,93±1,67	- 37,61±1,89	- 31,97±2,31
		emulzija U/V	- 32,87±2,09	- 27,58±2,34	- 25,56±1,84
Eskulin	kokosovo	gel-emulzija	- 53,25±3,26	- 42,15±1,34	- 28,25±1,07
		emulzija U/V	- 28,95±1,07	- 27,80±1,41	- 26,95±0,07
	laneno	gel-emulzija	- 56,20±2,53	- 50,25±3,15	- 48,75±4,54
		emulzija U/V	- 32,75±1,48	- 30,60±0,71	- 39,75±2,74
	suncokretovo	gel-emulzija	- 41,65±2,62	- 34,75±3,02	- 31,00±3,53
		emulzija U/V	- 33,75±1,47	- 27,15±0,92	- 27,25±1,98

Što se tiče stabilnosti emulzija pripremljenih sa estrima različitih flavonoida, nema nekih većih razlika u izmerenom površinskom naelektrisanju što znači da vrsta korišćenog flavonoida ne utiče bitno na stabilnost pripremljene emulzije. Sa druge strane, ukoliko se uporede vrednosti *zeta* potencijala emulzija pripremljenih sa estrima flavonoida dobijenih u reakcijama sa različitim uljima, može se primetiti da su u sva tri slučaja najstabilnije formulacije pripremljene sa estrima dobijenim u reakciji sa lanenim uljem, s obzirom na najmanje vrednosti izmerenih *zeta* potencijala (manje od -55 mV za gel-emulzije i manje od -30 mV za emulzije ulje u vodi). Pored toga, najmanje promene *zeta* potencijala tokom 60 dana skladištenja takođe su primećene kod emulzija sa inkorporiranim estrima flavonoida dobijenim u reakciji sa lanenim uljem.

Dobijeni rezultati impliciraju da proizvodi delimične razgradnje lanenog ulja (digliceridi, monogliceridi i slobodne masne kiseline) pokazuju dobra emulgujuća svojstva i od svih pomenutih ulja najviše doprinose stabilnosti pripremljenih formulacija. Sa druge strane laneno ulje sadrži najveću koncentraciju nezasićenih masnih kiselina pa je za komercijalnu upotrebu ovih formulacija potrebno estre zaštititi od oksidacije tokom skladištenja dodatkom odgovarajućeg antioksidanta (npr. tokoferol).

4.5.2. Ispitivanje efekta hidratacije i dermatološke kompatibilnosti

S obzirom da je pokazano da estri flavonoida najbrže difunduju iz gel-emulzija, kao i činjenice da su pomenute formulacije pokazale dobru stabilnost tokom dva meseca skladištenja, gel-emulzije sa inkorporiranim estrima flavonoida su korišćene kao model sistemi za ispitivanje i procenu efikasne i sigurne dermatološke upotrebe. U tom smislu, ispitan je njihov uticaj na hidrataciju kože, kao i procenjen stepen iritabilnosti nakon topikalne primene. Kao sistem za poređenje korišćena je gel-emulzija sa izopropil-miristatom, kao i gel-emulzija sa kaprilno-kaprinskim trigliceridima, kao standardnim, najčešće korišćenim emolientima.

4.5.2.1. Efekat hidratacije

Imajući u vidu da je jedan od najvažnijih parametara svih kozmetičkih proizvoda za negu kože, sposobnost da hidriraju kožu, TEWL test je korišćen u cilju ispitivanja efekta hidratacije pripremljenih kozmetičkih formulacija. *In vitro* ispitivanje sprovedeno je na model sistemu (1 mm teflonska semi-permeabilna membrana) koji simulira fizičko-hemijski proces koji postoji u živom sistemu. Dobijeni rezultati merenja prikazani su u tabeli 4.29 odakle se može zaključiti da u poređenju sa kontrolnim uzorkom (bez nanete formulacije), nakon primene pripremljenih gel-emulzija koje sadrže smeše estara različitih flavonoida, male promene fluksa isparavanja vode tokom 24 h su detektovane. Ostvareni rezultati ukazuju na pozitivan efekat primenjenih formulacija na kožu s obzirom da su pomenute gel-emulzije u stanju da kompenzuju transepidermalni gubitak vode vodom iz formulacije. Štaviše, primenjene formulacije sprečavaju dalji transepidermalni gubitak vode verovatno putem adsorpcije uljane faze emulzije na površini model sistema. Praktično,

površina ulazi u dinamičku ravnotežu isparavanja i sorpcije vode. Bez sumnje, sve ispitane formulacije ispoljavaju efekat hidratacije kože, i primenom svih preparata efekat hidratacije je podjednak kao i efekat koji obezbeđuju gel-emulzija sa standardnim emolijentima (izopropil-miristatom i kaprilno-kaprinskim trigliceridima). Štaviše, najbolji efekat hidratacije, bolji i od dva pomenuta standardna sistema, ostvaren je prilikom primene gel-emulzija sa inkorporiranim estrima eskulina dobijenih u reakciji sa kokosovim i suncokretovim uljem, estrima floridzina dobijenih u reakciji sa suncokretovim uljem, kao i sa estrima naringina dobijenih u reakciji sa kokosovim uljem, s obzirom da je transepidermalni gubitak vode primenom ovih formulacija praktično nepromenjen tokom 24 h.

Tabela 4.29 Promena fluksa isparavanja vode ($\text{g/m}^2/\text{h}$) mereno sa i bez primene formulacija na model sistem.

Vreme h	Uzorak bez emulzije	Gel- emulzija sa IPM	Gel- emulzija sa KKT	Gel-emulzije sa inkorporiranim estrima različitih flavonoida								
				Eskulin			Floridzin			Naringin		
				LU	KU	SU	LU	KU	SU	LU	KU	SU
0	10,2	10,6	10,6	10,5	10,8	10,7	10,6	10,5	10,6	10,6	10,6	10,6
2	5,5	10,6	10,6	10,5	10,8	10,7	10,6	10,5	10,6	10,6	10,6	10,6
4	2,3	10,6	10,6	10,5	10,8	10,7	10,6	10,5	10,6	10,6	10,6	10,6
6	1,0	10,6	10,6	10,5	10,8	10,7	10,5	10,5	10,6	10,6	10,6	10,6
8	0,5	10,6	10,6	10,5	10,8	10,7	10,5	10,5	10,6	10,6	10,6	10,5
10	0,3	10,6	10,5	10,5	10,8	10,7	10,5	10,5	10,6	10,6	10,6	10,5
12	0,2	10,6	10,5	10,4	10,8	10,7	10,4	10,5	10,6	10,6	10,6	10,5
14	0,1	10,5	10,5	10,4	10,8	10,7	10,4	10,5	10,6	10,5	10,6	10,4
16	0,1	10,5	10,4	10,4	10,8	10,7	10,4	10,5	10,6	10,5	10,6	10,3
18	0,1	10,4	10,4	10,3	10,8	10,7	10,4	10,5	10,6	10,5	10,6	10,3
20	0	10,4	10,4	10,3	10,8	10,7	10,4	10,4	10,6	10,5	10,6	10,2
22	0	10,3	10,3	10,3	10,8	10,7	10,3	10,4	10,6	10,4	10,6	10,2
24	0	10,3	10,3	10,2	10,8	10,7	10,2	10,4	10,6	10,4	10,6	10,0

*IPM-izopropil-miristat; KKT-kaprilno-kaprinski trigliceridi; LU-laneno ulje; KU-kokosovo ulje; SU-suncokretovo ulje;

4.5.2.2. Ispitivanje iritabilnosti i dermatološke kompatibilnosti

Pored efekta hidratacije, stepen iritabilnosti predstavlja važnu karakteristiku svih kozmetičkih formulacija za negu kože. S tim u vezi, primenom Zein testa ispitana je iritabilnost pripremljenih gel-emulzija i dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4.30. Već je pomenuto da vrednosti Zein broja treba da budu manje od 5 za preparate koji se koriste za negu kože, dok je samo za proizvode koji pokazuju veoma nisku iritabilnost vrednost Zein broja manja od 1 [205].

Tabela 4.30 Određene vrednosti Zein broja (mg azota u 100 ml uzorka) za ispitane formulacije.

Gel-emulzija sa IPM	Gel-emulzija sa KKT	Gel-emulzije sa inkorporiranim estrima različitih flavonoida								
		Eskulin			Floridzin			Naringin		
		LU	KU	SU	LU	KU	SU	LU	KU	SU
1,00	1,78	1,04	0,80	0,78	1,15	1,00	0,75	0,80	0,77	1,07

*IPM-izopropil-miristat; KKT-kaprilno-kaprinski trigliceridi; LU-laneno ulje; KU-kokosovo ulje; SU-suncokretovo ulje;

Ostvareni rezultati pokazuju da se ne očekuje da bilo koja od ispitanih formulacija izazove bilo kakvu iritaciju na koži, s obzirom da su vrednosti Zein broja ~1,0 za sve gel-emulzije sa inkorporiranim estrima različitih flavonoida. Treba naglasiti da su vrednosti Zein broja svih pomenutih formulacija bolje u poređenju sa Zein brojem jednog od standarda, gel-emulzije sa kaprilno-kaprinski trigliceridima, i približno jednake Zein broju dobijenom primenom gel-emulzije sa izopropil-miristatom, kao drugim komparativnim sistemom. Štaviše, čak pet od devet ispitanih gel-emulzija pokazuju bolje rezultate (vrednosti Zein broja manje od 1) u poređenju sa standardnim sistemima.

Pored Zein testa, kao dodatni metod za procenu iritabilnosti i dermatološke kompatibilnosti pripremljenih gel-emulzija sa inkorporiranim smešama estara različitih flavonoida primenjen je RBC test koji omogućava brzu procenu stepena oštećenja membrane i denaturacije proteina primenom kozmetičkih formulacija. Za klasifikaciju stepena iritabilnosti proizvoda koristi se odnos hemolitičkog efekta (H50) i indeksa denaturacije (DI), tzv. L/D odnos na osnovu čijih vrednosti se proizvodi klasifikuju kao: neiritirajući

>100, slabo iritirajući >10, srednje iritirajući >1, iritirajući >0,1 i veoma iritirajući <0,1 [206].

Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 4.31), a imajući u vidu pomenutu klasifikaciju može se zaključiti da se šest od devet ispitanih kozmetičkih formulacija pripremljenih sa estrima flavonoida mogu klasifikovati kao neiritirajuće (L/D >100), dok preostale tri formulacije spadaju u kategoriju slabo iritirajućih (L/D >10). Ovo je odličan rezultat s obzirom da su gel-emulzije pripremljene sa standardnim emolientima klasifikovane kao slabo iritirajuće (L/D >10), što praktično znači da većina pripremljenih gel-emulzija sa estrima flavonoida pokazuje čak i bolju dermatološku kompatibilnost nego formulacije pripremljene sa najčešće korišćenim emolientima.

Tabela 4.31 Uticaj pripremljenih gel-emulzija na oštećenje ćelija i denaturaciju proteina.

RBC test	Gel-emulzija sa IPM	Gel-emulzija sa KKT	Gel-emulzije sa inkorporiranim estrima različitih flavonoida								
			Eskulin			Floridzin			Naringin		
			LU	KU	SU	LU	KU	SU	LU	KU	SU
H50, mg/ml	375,9	384,7	412,2	334,8	337,7	422,3	409,1	368,1	364,7	386,1	343,2
DI, %	33,5	37,1	4,11	3,12	3,15	4,21	38,2	3,45	32,1	3,79	32,2
L/D	>10	>10	>100	>100	>100	>100	>10	>100	>10	>100	>10

*IPM-izopropil-miristat; KKT-kaprilno-kaprinski trigliceridi; LU-laneno ulje; KU-kokosovo ulje; SU-suncokretovo ulje;

Ako se uporede rezultati dobijeni sa estrima različitih flavonoida, može se zaključiti da najmanju iritabilnost i najbolju dermatološku kompatibilnost pokazuju formulacije sa estrima eskulina dobijenih u reakciji sa sva tri ulja (L/D >100). Sa druge strane, dve formulacije sa estrima floridzina (sa lanenim i suncokretovom uljem) i gel-emulzija sa estrima naringina dobijenim u reakciji sa kokosovim uljem spadaju u istu kategoriju (neiritirajući). Na kraju, može se zaključiti da se nakon uklanjanja biokatalizatora i rastvarača, ostatak reakcione smeše dobijen u reakciji transesterifikacije flavonoida korišćenjem različitih biljnih ulja može uspešno primeniti na koži u formi gel-emulzije, imajući u vidu odličan efekat hidratacije, neiritirajući karakter i sveukupnu dermatološku kompatibilnost primenjenih kozmetičkih formulacija.

5. Zaključak

Na osnovu eksperimentalno dobijenih rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Rezultati NMR spektralne analize ukazuju na regioselektivnost enzimske sinteze estara flavonoida jer je ustanovljeno da je jedini proizvod enzimske reakcije između floridzina i oleinske kiseline floridzin-6"-*O*-oleat.
- Iako je poznato da su za upotrebu lipaza u reakcijama esterifikacije poželjniji hidrofobniji rastvarači, istraživanje je pokazalo da je acetonitril najpogodniji reakcioni medijum za reakciju sinteze estara floridzina, dok je proizvod reakcije detektovan u tragovima u izooktanu i dodekanu.
- Korišćenjem statističkih metoda planiranja optimizovana je reakcija sinteze floridzin-oleata i uočeno je da se optimizacijom zasnovanom na specifičnom prinosu proizvoda daje mnogo bolji uvid u produktivnost samog enzimskog procesa i u ovoj doktorskoj disertaciji ostvaren je prinos od 5,45 mmol/g_{enzima}, što je jako dobar rezultat u poređenju sa dostupnim literaturnim podacima.
- Ispitivanjem uticaja dužine lanca (C₂-C₁₈) kao i stepena nezasićenosti karboksilne kiseline na sintezu estara floridzina, pokazano je da su sve ispitane kiseline dobri supstrati za reakciju sinteze (stepen konverzije preko 70 %), ali da CAL B pokazuje najveći afinitet ka masnim kiselinama sa više od 6 C atoma.
- Optimizacijom enzimske sinteze estara druga dva flavonoida, naringina i eskulina, primećeno je da optimalne vrednosti reakcionih faktora jako zavise od vrste primenjenog acil-akceptora i da koncentracija flavonoida i molski odnos supstrata imaju najviše uticaja na sintezu estara flavonoida.
- Alternativni acetil-donori, anhidrid sirćetne kiseline i triacetin, ispitani su u reakciji acetilovanja floridzina. Reakcija sinteze floridzin-acetata se uspešno može izvesti u sistemu bez rastvarača, u kojem triacetin ima ulogu i acil-donora i rastvarača. HPLC analizom reakcionih smeša utvrđeno je prisutvo dva proizvoda u svim ispitanim reakcijama, a spektralna NMR analiza je potvrdila da su sintetisani proizvodi floridzin-6"-*O*-acetat i floridzin-3",6"-*O*-diacetat. Proces acetilovanja može se

opisati dvostepenom monosupstratnom reakcijom u kojoj su oba stupnja reakcije adekvatno opisana reverzibilnom Mihaelis-Mentenovom kinetikom. Pretpostavljeni model pokazuje dobro slaganje ne samo u početnim vremenima, već i tokom dužeg reakcionog perioda i to za sve četiri testirane početne koncentracije floridzina.

- Prirodna biljna ulja (kokosovo, laneno i suncokretovo ulje) uspešno su primenjena u reakciji esterifikacije tri strukturno različita flavonoida, floridzina, naringina i eskulina (stepen konverzije > 65 %). Primenom ovih alternativnih acil-donora omogućena je sinteza smeše estara flavonoida različitih masnih kiselina u jednom koraku reakcije pri značajnom smanjenju ukupnih troškova samog postupka. Sintaza estara eskulina u reakciji sa lanenim uljem je optimizovana primenom statističkih metoda planiranja i pokazano je da dobijeni optimalni uslovi mogu biti uspešno primenjeni i u reakciji sinteze estara eskulina korišćenjem druga dva ulja.
- Korišćena ulja su česte komponente različitih kozmetičkih proizvoda, pa tako radi dalje primene sintetisanih estara nije potrebno uklanjati ostatak neproreagovalog ulja, kao ni proizvode njihove delimične razgradnje (monogliceride i digliceride), s obzirom da, zahvaljujući njihovim emulgujućim svojstvima, njihovo prisustvo može poboljšati sam postupak pripreme različitih kozmetičkih formulacija.
- U cilju razvoja novih biokatalizatora, imobilizacija CAL B uspešno je izvedena na svih osam nosača LifeTechTM ECR serije, a proces imobilizacije je optimizovan za tri odabrana nosača sa amino (ECR 8409F), oktadecil (ECR 8806M) i epoksi (ECR 8285F) funkcionalnim grupama. CAL B imobilisana na nosač sa oktadecil i nosač sa epoksi funkcionalnim grupama pokazuje dobru esterifikacionu aktivnost i odličnu operativnu stabilnost tokom 15 ciklusa reakcija sinteze estara tri različita flavonoida.
- Estri flavonoida dobijeni u reakciji sa biljnim uljima uspešno su inkorporirani u različite kozmetičke formulacije i preliminarnim ispitivanjem kinetike otpuštanja iz pomenutih sistema kroz celuloznoacetatnu membranu primećeno je da efektivni koeficijent difuzije estara opada sa povećanjem broja C atoma u masnokiselinskom ostatku i da estri floridzina, kao manjeg molekula, brže difunduju iz gel-emulzija nego odgovarajući estri naringina.

- Smeša mono- i diacetata floridzina dobijenih u reakciji sa triacetinom uspešno je inkorporirana u različite kozmetičke formulacije i liposome kao sisteme za kontrolisano otpuštanje i nakon *in vitro* analize transdermalnog prenosa primenom Strat-M[®] membrane pokazano je da formulacije u kojima je voda kontinualna faza predstavljaju pogodnije nosače ovih estara i omogućavaju brži transdermalni prenos.
- Kada je reč o transdermalnom prenosu estara naringina i floridzina dobijenih u reakciji sa kokosovim i lanenim uljem iz gel-emulzija, u svim eksperimentima ustanovljeno da do prenosa komponente dolazi sa zakašnjenjem (*lag* faza) i da prenos komponente zavisi kako od same difuzije tako i od relaksacije polimera ($0,5 < n < 1$). Efektivni koeficijenti difuzije estara opadaju sa povećanjem broja C atoma i sa smanjenjem broja dvostrukih veze u masnokiselinskom lancu. Estri floridzina dobijeni u reakciji i sa kokosovim i sa lanenim uljem brže difunduju iz ispitanih gel-emulzija kroz membranu koja predstavlja model sistem transdermalnog prenosa u odnosu na odgovarajuće estre naringina.
- Poređenjem difuzionih karakteristika estara floridzina dobijenih otpuštanjem iz različitih formulacija kroz Strat-M[®] membranu ustanovljeno je da estri najbrže difunduju iz gel-emulzije, emulzije ulje u vodi i na kraju iz emulzije gel u ulju, čime je još jednom potvrđeno da su za prenos estara flavonoida pogodnije formulacije u kojima je voda kontinualna faza.
- Kozmetičke formulacije pripremljene sa estrima flavonoida dobijenim u reakciji sa biljnim uljima pokazuju veoma dobru stabilnost tokom 60 dana skladištenja. Pored toga, pripremljene smeše estara se nakon uklanjanja biokatalizatora i rastvarača, mogu uspešno primeniti na koži u formi gel-emulzija, imajući u vidu odličan efekat hidratacije, neiritirajući karakter i sveukupnu dermatološku kompatibilnost primenjenih kozmetičkih formulacija.

6. Literatura

1. Plaza, M., T. Pozzo, J. Liu, K.Z. Gulshan Ara, C. Turner, and E. Nordberg Karlsson, *Substituent Effects on in Vitro Antioxidizing Properties, Stability, and Solubility in Flavonoids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(15): p. 3321-3333.
2. Procházková, D., I. Boušová, and N. Wilhelmová, *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*. Fitoterapia, 2011. **82**(4): p. 513-523.
3. Danihelová, M., J. Viskupičová, and E. Šturdík, *Lipophilization of flavonoids for their food, therapeutic and cosmetic applications*. Acta Chimica Slovaca, 2012. **5**(1): p. 59-69.
4. Cook, N.C. and S. Samman, *Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1996. **7**(2): p. 66-76.
5. Duarte, J., F.P. Vizcaíno, P. Utrilla, J. Jiménez, J. Tamargo, and A. Zarzuelo, *Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships*. General Pharmacology: The Vascular System, 1993. **24**(4): p. 857-862.
6. Hope, W.C., A.F. Welton, C. Fiedler-Nagy, C. Batula-Bernardo, and J.W. Coffey, *In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity by quercetin*. Biochemical Pharmacology, 1983. **32**(2): p. 367-371.
7. Middleton, E., C. Kandaswami, and T.C. Theoharides, *The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer*. Pharmacological Reviews, 2000. **52**(4): p. 673-751.
8. De Araújo, M.E.M.B., Y.E.M. Franco, M.C.F. Messias, G.B. Longato, J.A. Pamphile, and P.D.O. Carvalho, *Biocatalytic Synthesis of Flavonoid Esters by Lipases and Their Biological Benefits*. Planta Medica, 2017. **83**(1-2): p. 7-22.
9. Kodelia, G., K. Athanasiou, and F.N. Kolisis, *Enzymatic synthesis of butyryl-rutin ester in organic solvents and its cytogenetic effects in mammalian cells in culture*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1994. **44**(3): p. 205-212.

10. Warnakulasuriya, S., Ziaullah, and H. Rupasinghe, *Long Chain Fatty Acid Acylated Derivatives of Quercetin-3-O-Glucoside as Antioxidants to Prevent Lipid Oxidation*. *Biomolecules*, 2014. **4**(4): p. 980.
11. Sekhon-Loodu, S., Ziaullah, and H.P.V. Rupasinghe, *Docosahexaenoic acid ester of phloridzin inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in THP-1 differentiated macrophages*. *International Immunopharmacology*, 2015. **25**(1): p. 199-206.
12. Mellou, F., H. Loutrari, H. Stamatis, C. Roussos, and F.N. Kolisis, *Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells*. *Process Biochemistry*, 2006. **41**(9): p. 2029-2034.
13. Muzna, S., D.R. Deonalli, K. S. D, and K. D. V, *Antifungal activity of lipase modified flavonoids from citrus limetta*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014. **6**: p. 116-118.
14. Mellou, F., D. Lazari, H. Skaltsa, A.D. Tselepis, F.N. Kolisis, and H. Stamatis, *Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity*. *Journal of Biotechnology*, 2005. **116**(3): p. 295-304.
15. Chebil, L., C. Humeau, A. Falcimaigne, J.-M. Engasser, and M. Ghoul, *Enzymatic acylation of flavonoids*. *Process Biochemistry*, 2006. **41**(11): p. 2237-2251.
16. Razak, N. and M. Annuar, *Enzymatic synthesis of flavonoid ester: Elucidation of its kinetic mechanism and equilibrium thermodynamic behavior*. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2015. **54**(21): p. 5604-5612.
17. Mukohata, Y., S. Nakabayashi, and M. Higashida, *Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation*. *FEBS Letters*, 1978. **85**(2): p. 215-218.
18. Das, D.K., *Naturally occurring flavonoids: Structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization*, in *Methods in Enzymology*, P. Lester, Editor. 1994, Academic Press. p. 410-420.
19. Erlund, I., *Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology*. *Nutrition Research*, 2004. **24**(10): p. 851-874.

20. Peterson, J. and J. Dwyer, *Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity*. Nutrition Research, 1998. **18**(12): p. 1995-2018.
21. Di Carlo, G., N. Mascolo, A.A. Izzo, and F. Capasso, *Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*. Life Sciences, 1999. **65**(4): p. 337-353.
22. Cushnie, T.P.T. and A.J. Lamb, *Antimicrobial activity of flavonoids*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005. **26**(5): p. 343-356.
23. Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. **13**(10): p. 572-584.
24. Benavente-García, O., J. Castillo, F.R. Marin, A. Ortuño, and J.A. Del Río, *Uses and Properties of Citrus Flavonoids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(12): p. 4505-4515.
25. Izawa, K., Y. Amino, M. Kohmura, Y. Ueda, and M. Kuroda, *Human-Environment Interactions-Taste*. 2010.
26. Alam, M.A., N. Subhan, M.M. Rahman, S.J. Uddin, H.M. Reza, and S.D. Sarker, *Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action*. Advances in Nutrition, 2014. **5**(4): p. 404-417.
27. Rajadurai, M. and P.S.M. Prince, *Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: biochemical and histopathological evidences*. Toxicology, 2006. **228**(2-3): p. 259-268.
28. Ren, X., Y. Shi, D. Zhao, M. Xu, X. Li, Y. Dang, and X. Ye, *Naringin protects ultraviolet B-induced skin damage by regulating p38 MAPK signal pathway*. Journal of dermatological science, 2016. **82**(2): p. 106-114.
29. Hertog, M.G.L., P.C.H. Hollman, and M.B. Katan, *Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. **40**(12): p. 2379-2383.
30. Andy, C., *Cancer killer, a hormone in soya beans starves tumour cells to death*. New Scientist, 1998(2125).
31. Bridle, P. and C.F. Timberlake, *Anthocyanins as natural food colours—selected aspects*. Food Chemistry, 1997. **58**(1-2): p. 103-109.

32. Andersen, O.M. and K.R. Markham, *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. 2005: CRC press.
33. Poumale, H.M.P., R. Hamm, Y. Zang, Y. Shiono, and V. Kuete, *Coumarins and related compounds from the medicinal plants of Africa*, in *Medicinal Plant Research in Africa*. 2013, Elsevier. p. 261-300.
34. Egan, D., R. O'kenedy, E. Moran, D. Cox, E. Prosser, and R.D. Thornes, *The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds*. *Drug metabolism reviews*, 1990. **22**(5): p. 503-529.
35. Gaudout, D., D. Megard, C. Inisan, C. Esteve, and F. Lejard, *Phloridzin-rich phenolic fraction and use thereof as a cosmetic, dietary or nutraceutical agent*. 2006, Google Patents.
36. Ehrenkranz, J.R., N.G. Lewis, C. Ronald Kahn, and J. Roth, *Phlorizin: a review*. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2005. **21**(1): p. 31-38.
37. Van Den Berghe, G., P. Wouters, F. Weekers, C. Verwaest, F. Bruyninckx, M. Schetz, D. Vlasselaers, P. Ferdinande, P. Lauwers, and R. Bouillon, *Intensive insulin therapy in critically ill patients*. *New England journal of medicine*, 2001. **345**(19): p. 1359-1367.
38. Baldisserotto, A., G. Malisardi, E. Scalambra, E. Andreotti, C. Romagnoli, C.B. Vicentini, S. Manfredini, and S. Vertuani, *Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of a new phloridzin derivative for dermo-cosmetic applications*. *Molecules*, 2012. **17**(11): p. 13275-13289.
39. Biljali, S., V.A. Hadjimitova, M.N. Topashka-Ancheva, D.B. Momekova, T.T. Traykov, and M.H. Karaivanova, *Antioxidant and antiradical properties of esculin, and its effect in a model of epirubicin-induced bone marrow toxicity*. *Folia medica*, 2012. **54**(3): p. 42-49.
40. Witaicenis, A., L.N. Seito, A. da Silveira Chagas, L.D. de Almeida Junior, A.C. Luchini, P. Rodrigues-Orsi, S.H. Cestari, and L.C. Di Stasi, *Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives*. *Phytomedicine*, 2014. **21**(3): p. 240-246.

41. Hanasaki, Y., S. Ogawa, and S. Fukui, *The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids*. Free Radical Biology and Medicine, 1994. **16**(6): p. 845-850.
42. Ratty, A. and N. Das, *Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship*. Biochemical medicine and metabolic biology, 1988. **39**(1): p. 69-79.
43. Tzeng, S.-H., W.-C. Ko, F.-N. Ko, and C.-M. Teng, *Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids*. Thrombosis research, 1991. **64**(1): p. 91-100.
44. Torel, J., J. Cillard, and P. Cillard, *Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical*. Phytochemistry, 1986. **25**(2): p. 383-385.
45. Burda, S. and W. Oleszek, *Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(6): p. 2774-2779.
46. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radical Biology and Medicine, 1996. **20**(7): p. 933-956.
47. Pietta, P.-G., *Flavonoids as antioxidants*. Journal of natural products, 2000. **63**(7): p. 1035-1042.
48. Cos, P., L. Ying, M. Calomme, J.P. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, L. Pieters, A.J. Vlietinck, and D.V. Berghe, *Structure–Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers*. Journal of Natural Products, 1998. **61**(1): p. 71-76.
49. Lotito, S.B. and B. Frei, *Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?* Free Radical Biology and Medicine, 2006. **41**(12): p. 1727-1746.
50. Day, A. and D. Stansbie, *Cardioprotective effect of red wine may be mediated by urate*. Clinical Chemistry, 1995. **41**(9): p. 1319-20.
51. Halliwell, B., *Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?* Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008. **476**(2): p. 107-112.

52. Tereschuk, M.a.L., M.V. Riera, G.R. Castro, and L.R. Abdala, *Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of Tagetes minuta*. Journal of Ethnopharmacology, 1997. **56**(3): p. 227-232.
53. Wächter, G.A., J.J. Hoffmann, T. Furbacher, M.E. Blake, and B.N. Timmermann, *Antibacterial and antifungal flavanones from Eysenhardtia texana*. Phytochemistry, 1999. **52**(8): p. 1469-1471.
54. Zheng, W., R. Tan, L. Yang, and Z. Liu, *Two flavones from Artemisia giraldii and their antimicrobial activity*. Planta Medica, 1996. **62**: p. 160-162.
55. Li, B.Q., T. Fu, Y. Dongyan, J.A. Mikovits, F.W. Ruscetti, and J.M. Wang, *Flavonoid Baicalin Inhibits HIV-1 Infection at the Level of Viral Entry*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **276**(2): p. 534-538.
56. Critchfield, J., Butera. ST, and T. Folks, *Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds*. AIDS Research and Human Retroviruses, 1996. **12**: p. 39-46.
57. Amoros, M., C.M.O. Simões, L. Girre, F. Sauvager, and M. Cormier, *Synergistic Effect of Flavones and Flavonols Against Herpes Simplex Virus Type 1 in Cell Culture. Comparison with the Antiviral Activity of Propolis*. Journal of Natural Products, 1992. **55**(12): p. 1732-1740.
58. Cushnie, T.P.T. and A.J. Lamb, *Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011. **38**(2): p. 99-107.
59. Cushnie, T.P.T. and A.J. Lamb, *Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in Staphylococcus aureus by measuring potassium loss*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. **101**(1-3): p. 243-248.
60. Sirk, T.W., E.F. Brown, A.K. Sum, and M. Friedman, *Molecular Dynamics Study on the Biophysical Interactions of Seven Green Tea Catechins with Lipid Bilayers of Cell Membranes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(17): p. 7750-7758.
61. Kusuda, M., K. Inada, T.-o. Ogawa, T. Yoshida, S. Shiota, T. Tsuchiya, and T. Hatano, *Polyphenolic Constituent Structures of *Zanthoxylum piperitum* Fruit and the Antibacterial Effects of Its Polymeric Procyanidin on Methicillin-Resistant*

- <I>*Staphylococcus aureus*</I>. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006. **70**(6): p. 1423-1431.
62. Gradišar, H., P. Pristovšek, A. Plaper, and R. Jerala, *Green Tea Catechins Inhibit Bacterial DNA Gyrase by Interaction with Its ATP Binding Site*. Journal of Medicinal Chemistry, 2007. **50**(2): p. 264-271.
63. Navarro-Martínez, M.D., E. Navarro-Perán, J. Cabezas-Herrera, J. Ruiz-Gómez, F. García-Cánovas, and J.N. Rodríguez-López, *Antifolate Activity of Epigallocatechin Gallate against Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49**(7): p. 2914-2920.
64. Tsai, W.-J., W.-C. Hsin, and C.-C. Chen, *Antiplatelet flavonoids from seeds of Psoralea corylifolia*. Journal of natural products, 1996. **59**(7): p. 671-672.
65. Lin, C.-N., S.-H. Kuo, M.-I. Chung, F.-N. Ko, and C.-M. Teng, *A new flavone C-glycoside and antiplatelet and vasorelaxing flavones from Gentiana arisanensis*. Journal of natural products, 1997. **60**(8): p. 851-853.
66. Harborne, J.B. and C.A. Williams, *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry, 2000. **55**(6): p. 481-504.
67. Kaneda, N., J.M. Pezzuto, D.D. Soejarto, A.D. Kinghorn, N.R. Farnsworth, T. Santisuk, P. Tuchinda, J. Udchachon, and V. Reutrakul, *Plant anticancer agents, XLVIII. New cytotoxic flavonoids from Muntingia calabura roots*. Journal of Natural Products, 1991. **54**(1): p. 196-206.
68. Ryu, S.H., B.Z. Ahn, and M.Y. Pack, *The cytotoxic principle of Scutellariae radix against L1210 cell*. Planta medica, 1985(4): p. 355.
69. Adlercreutz, P., *Immobilisation and application of lipases in organic media*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6406-6436.
70. Hidalgo, A. and U.T. Bornscheuer, *Directed Evolution of Lipases and Esterases for Organic Synthesis*. 2006, Research Gate.
71. Bezbradica, D., *Sinteza estara katalizovana slobodnim lipazama i lipazama imobilisanim na polimernim nosačima*. 2007, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, Srbija.

72. Schmid, R.D. and R. Verger, *Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications*. Angewandte Chemie International Edition, 1998. **37**(12): p. 1608-1633.
73. Uppenberg, J., M.T. Hansen, S. Patkar, and T.A. Jones, *The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica*. Structure, 1994. **2**(4): p. 293-308.
74. Veld, M.A.J., *Candida antarctica Lipase B catalysis in organic, polymer and supramolecular chemistry*. 2010, PhD Thesis, University of Technology, Eindhoven, Netherlands.
75. Katsoura, M.H., A.C. Polydera, L. Tsironis, A.D. Tselepis, and H. Stamatis, *Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency*. Journal of Biotechnology, 2006. **123**(4): p. 491-503.
76. Salem, J.H., C. Humeau, I. Chevalot, C. Harscoat-Schiavo, R. Vanderesse, F. Blanchard, and M. Fick, *Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters*. Process Biochemistry, 2010. **45**(3): p. 382-389.
77. Ferrario, V., H. Veny, E. De Angelis, L. Navarini, C. Ebert, and L. Gardossi, *Lipases Immobilization for Effective Synthesis of Biodiesel Starting from Coffee Waste Oils*. Biomolecules, 2013. **3**(3): p. 514.
78. Skjøt, M., L. De Maria, R. Chatterjee, A. Svendsen, S.A. Patkar, P.R. Østergaard, and J. Brask, *Understanding the Plasticity of the α/β Hydrolase Fold: Lid Swapping on the Candida antarctica Lipase B Results in Chimeras with Interesting Biocatalytic Properties*. ChemBioChem, 2009. **10**(3): p. 520-527.
79. Idris, A. and A. Bukhari, *Immobilized Candida antarctica lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis*. Biotechnology advances, 2012. **30**(3): p. 550-563.
80. Cabrera, Z., G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Palomo, and J.M. Guisan, *Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from Candida antarctica B adsorbed on other hydrophobic supports*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009. **57**(1-4): p. 171-176.

81. Mohamad, N.R., N.H.C. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop, and R.A. Wahab, *An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015. **29**(2): p. 205-220.
82. Knežević-Jugović, Z., *Enzimsko inženjerstvo*. 2008, Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet.
83. Brena, B., Batista-Viera, F., *Immobilization of Enzymes*, in *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, J.M. Guisan, Editor. 2006, Humana Press Inc: Totowa, New Jersey.
84. Knežević, Z., *Imobilizacija lipaze iz Candida rugosa na polimernim nosačima i na vlaknima od regenerisane celuloze u dijalizatoru*. 2003, Tehnološko-metalurški fakultet: Beograd.
85. Nguyen, H.H. and M. Kim, *An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization*. *Applied Science and Convergence Technology*, 2017. **26**(6): p. 157-163.
86. Sassolas, A., L.J. Blum, and B.D. Leca-Bouvier, *Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors*. *Biotechnology advances*, 2012. **30**(3): p. 489-511.
87. Graebin, N.G., A.B. Martins, A.S. Lorenzoni, C. Garcia-Galan, R. Fernandez-Lafuente, M.A. Ayub, and R.C. Rodrigues, *Immobilization of lipase B from Candida antarctica on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis*. *Biotechnology progress*, 2012. **28**(2): p. 406-412.
88. Friedrich, J.L., F.P. Peña, C. Garcia-Galan, R. Fernandez-Lafuente, M.A. Ayub, and R.C. Rodrigues, *Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from Candida antarctica*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2013. **88**(6): p. 1089-1095.
89. Li, D., W. Wang, P. Liu, L. Xu, M. Faiza, B. Yang, L. Wang, D. Lan, and Y. Wang, *Immobilization of Candida antarctica Lipase B Onto ECR1030 Resin and its Application in the Synthesis of n-3 PUFA-Rich Triacylglycerols*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2017. **119**(12): p. 1700266.

90. Asgher, M., M. Shahid, S. Kamal, and H.M.N. Iqbal, *Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014. **101**: p. 56-66.
91. Wang, P., S. Dai, S.D. Waezsada, A.Y. Tsao, and B.H. Davison, *Enzyme stabilization by covalent binding in nanoporous sol-gel glass for nonaqueous biocatalysis*. Biotechnology and Bioengineering, 2001. **74**(3): p. 249-255.
92. Silva, J., G. Macedo, D. Rodrigues, R. Giordano, and L. Gonçalves, *Immobilization of Candida antarctica lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies*. Biochemical Engineering Journal, 2012. **60**: p. 16-24.
93. Chebil, L., J. Anthoni, C. Humeau, C. Gerardin, J.-M. Engasser, and M. Ghoul, *Enzymatic Acylation of Flavonoids: Effect of the Nature of the Substrate, Origin of Lipase, and Operating Conditions on Conversion Yield and Regioselectivity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(23): p. 9496-9502.
94. Ghoul, M., J.M. Engasser, P. Moussou, G. Pauly, M. Ardhaoui, and A. Falcimaigne, *Enzymatic production of acyl flavonoid derivatives*. 2006, Patent US 20060115880.
95. Bok, S.H., T.S. Jeong, S.K. Lee, J.R. Kim, S.S. Moon, M.S. Choi, B.H. Hyun, C. Lee, and Y.K. Choi, *Flavanone derivatives and composition for preventing or treating blood lipid level-related diseases comprising same*. 2001, Patent US 6455577.
96. Viskupicová, J., M. Ondrejovic, and E. Sturdík, *The potential and practical applications of acylated flavonoids*. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **64**(6): p. 355-360.
97. Ardhaoui, M., A. Falcimaigne, S. Ognier, J.M. Engasser, P. Moussou, G. Pauly, and M. Ghoul, *Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids*. Journal of Biotechnology, 2004. **110**(3): p. 265-272.
98. Katsoura, M.H., A.C. Polydera, P. Katapodis, F.N. Kolisis, and H. Stamatis, *Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids*. Process Biochemistry, 2007. **42**(9): p. 1326-1334.

99. Ardhaoui, M., A. Falcimaigne, J.-M. Engasser, P. Moussou, G. Pauly, and M. Ghoul, *Acylation of natural flavonoids using lipase of candida antarctica as biocatalyst*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004. **29**(1–6): p. 63-67.
100. Ishihara, K. and N. Nakajima, *Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **23**(2–6): p. 411-417.
101. Kontogianni, A., V. Skouridou, V. Sereti, H. Stamatis, and F.N. Kolisis, *Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2001. **103**(10): p. 655-660.
102. Kontogianni, A., V. Skouridou, V. Sereti, H. Stamatis, and F.N. Kolisis, *Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **21**(1–2): p. 59-62.
103. Viskupicova, J., M. Danihelova, M. Ondrejovic, T. Liptaj, and E. Sturdik, *Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods*. Food Chemistry, 2010. **123**(1): p. 45-50.
104. Viskupicova, J., M. Ondrejovic, and T. Maliar, *Enzyme-Mediated Preparation of Flavonoid Esters and Their Applications*, in *Biochemistry*, D. Ekinici, Editor. 2012, InTech.
105. Danieli, B., P. De Bellis, G. Carrea, and S. Riva, *Enzyme-mediated acylation of flavonoid monoglycosides*. Heterocycles, 1989. **29**(11): p. 2061-2064.
106. Danieli, B., P. De Bellis, G. Carrea, and S. Riva, *Enzyme-Mediated Regioselective Acylations of Flavonoid Disaccharide Monoglycosides*. Helvetica Chimica Acta, 1990. **73**(7): p. 1837-1844.
107. Sakai, M.C.O.R.L., M.C.O.R.L. Suzuki, F.C.O.R.L. Nanjo, and Y.C.O.R.L. Hara, *3-O-acylated catechins and method of producing same*. 1994, Google Patents.
108. Ardhaoui, M., A. Falcimaigne, J.M. Engasser, P. Moussou, G. Pauly, and M. Ghoul, *Enzymatic synthesis of new aromatic and aliphatic esters of flavonoids using Candida antarctica lipase as biocatalyst*. Biocatalysis & Biotransformation, 2004. **22**(4): p. 253-259.
109. Danieli, B., M. Luisetti, G. Sampognaro, G. Carrea, and S. Riva, *Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by Candida antarctica lipase B*

- (Novozym 435) in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1997. **3**(1–4): p. 193-201.
110. Gayot, S., X. Santarelli, and D. Coulon, *Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content*. *Journal of Biotechnology*, 2003. **101**(1): p. 29-36.
111. Hu, Y., Z. Guo, B.-M. Lue, and X. Xu, *Enzymatic Synthesis of Esculin Ester in Ionic Liquids Buffered with Organic Solvents*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. **57**(9): p. 3845-3852.
112. Lambusta, D., G. Nicolosi, A. Patti, and M. Piattelli, *Enzyme-Mediated Regioprotection-Deprotection of Hydroxyl Groups in (+)-Catechin*. *Synthesis*, 1993. **1993**(11): p. 1155-1158.
113. Mozhaev, V.V., C.L. Budde, J.O. Rich, A.Y. Usyatinsky, P.C. Michels, Y.L. Khmelnitsky, D.S. Clark, and J.S. Dordick, *Regioselective enzymatic acylation as a tool for producing solution-phase combinatorial libraries*. *Tetrahedron*, 1998. **54**(16): p. 3971-3982.
114. Ziaullah, K.S. Bhullar, S.N. Warnakulasuriya, and H.P.V. Rupasinghe, *Biocatalytic synthesis, structural elucidation, antioxidant capacity and tyrosinase inhibition activity of long chain fatty acid acylated derivatives of phloridzin and isoquercitrin*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013. **21**(3): p. 684-692.
115. Ziaullah and H.P.V. Rupasinghe, *An efficient microwave-assisted enzyme-catalyzed regioselective synthesis of long chain acylated derivatives of flavonoid glycosides*. *Tetrahedron Letters*, 2013. **54**(15): p. 1933-1937.
116. Céliz, G. and M. Daz, *Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside prunin in organic media*. *Process Biochemistry*, 2011. **46**(1): p. 94-100.
117. Enaud, E., C. Humeau, B. Piffaut, and M. Girardin, *Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004. **27**(1): p. 1-6.
118. Ishihara, K., Y. Nishimura, T. Kubo, C. Okada, H. Hamada, and N. Nakajima, *Enzyme-catalyzed Acylation of Plant Polyphenols for Interpretation of Their Functions*. *Plant Biotechnology*, 2002. **19**(3): p. 211-214.

119. Passicos, E., X. Santarelli, and D. Coulon, *Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized Candida antarctica lipase under reduced pressure*. Biotechnology Letters, 2004. **26**(13): p. 1073-1076.
120. Milisavljević, A., M. Stojanović, M. Carević, M. Mihailović, D. Veličković, N. Milosavić, and D. Bezbradica, *Lipase-Catalyzed Esterification of Phloridzin: Acyl Donor Effect on Enzymatic Affinity and Antioxidant Properties of Esters*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2014.
121. Nakajima, N., K. Ishihara, T. Itoh, T. Furuya, and H. Hamada, *Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999. **87**(1): p. 105-107.
122. Mbatia, B., S.S. Kaki, B. Mattiasson, F. Mulaa, and P. Adlercreutz, *Enzymatic Synthesis of Lipophilic Rutin and Vanillyl Esters from Fish Byproducts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(13): p. 7021-7027.
123. Gao, C., P. Mayon, D.A. MacManus, and E.N. Vulfson, *Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. **71**(3): p. 235-243.
124. Nakajima, N., K. Ishihara, H. Hamada, S.-I. Kawabe, and T. Furuya, *Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of Ipomoea batatas*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000. **90**(3): p. 347-349.
125. Pleiss, J., M. Fischer, and R.D. Schmid, *Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site*. Chem Phys Lipids, 1998. **93**(1-2): p. 67-80.
126. Almeida, V.M., C.R. Branco, S.A. Assis, I.J. Vieira, R. Braz-Filho, and A. Branco, *Synthesis of naringin 6''-ricinoleate using immobilized lipase*. Chemistry Central Journal, 2012. **6**(1): p. 41.
127. Villeneuve, P., *Lipases in lipophilization reactions*. Biotechnology Advances, 2007. **25**(6): p. 515-536.
128. Stergiou, P.-Y., A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L.G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E.M. Papamichael, *Advances in*

- lipase-catalyzed esterification reactions*. *Biotechnology Advances*, 2013. **31**(8): p. 1846-1859.
129. Watanabe, Y., M. Nagai, K. Yamanaka, K. Jose, and M. Nomura, *Synthesis of lauroyl phenolic glycoside by immobilized lipase in organic solvent and its antioxidative activity*. *Biochemical Engineering Journal*, 2009. **43**(3): p. 261-265.
130. Park, S. and R.J. Kazlauskas, *Biocatalysis in ionic liquids - Advantages beyond green technology*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003. **14**(4): p. 432-437.
131. Jastorff, B., R. Stormann, J. Ranke, K. Molter, F. Stock, B. Oberheitmann, W. Hoffmann, J. Hoffmann, M. Nuchter, B. Ondruschka, and J. Filser, *How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation*. *Green Chemistry*, 2003. **5**(2): p. 136-142.
132. Lue, B.-M., Z. Guo, and X. Xu, *Effect of room temperature ionic liquid structure on the enzymatic acylation of flavonoids*. *Process Biochemistry*, 2010. **45**(8): p. 1375-1382.
133. Stevenson, D.E., R. Wibisono, D.J. Jensen, R.A. Stanley, and J.M. Cooney, *Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by Candida antarctica lipase B (Novozym 435®)*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006. **39**(6): p. 1236-1241.
134. Alluis, B. and O. Dangles, *Acylation of Flavone Glucosides: Synthesis, Conformational Investigation, and Complexation Properties*. *Helvetica Chimica Acta*, 1999. **82**(12): p. 2201-2212.
135. Parejo, I., J. Bastida, F. Viladomat, and C. Codina, *Acylation of quercetin glycosides with antioxidant activity from Tagetes maxima*. *Phytochemistry*, 2005. **66**(19): p. 2356-2362.
136. Calis, I., M. Ozipek, and P. Ruedi, *Enzyme-mediated regioselective acylation of flavonoid glycosides*. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1995. **20**: p. 55-59.
137. Duarte-Almeida, J.M., G. Negri, A. Salatino, J.E. de Carvalho, and F.M. Lajolo, *Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (Saccharum officinarum) juice*. *Phytochemistry*, 2007. **68**(8): p. 1165-1171.
138. Nakayama, T., H. Suzuki, and T. Nishino, *Anthocyanin acyltransferases: specificities, mechanism, phylogenetics, and applications*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003. **23**(2-6): p. 117-132.

139. Fukami, H., M. Nakao, K. Namikawa, and M. Maeda, *Esterified catechin, process for producing the same, food and drink or cosmetic containing the same*. 2007, Google Patents.
140. Lee, S., C.-H. Lee, S.-S. Moon, E. Kim, C.-T. Kim, B.-H. Kim, S.-H. Bok, and T.-S. Jeong, *Naringenin derivatives as anti-atherogenic agents*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003. **13**(22): p. 3901-3903.
141. Xanthakis, E., E. Theodosiou, S. Magkouta, H. Stamatis, H. Loutrari, C. Roussos, and F. Kolisis, *Enzymatic transformation of flavonoids and terpenoids: structural and functional diversity of the novel derivatives*. *Pure and Applied Chemistry*, 2010. **82**(1): p. 1-16.
142. Theodosiou, E., H. Loutrari, H. Stamatis, C. Roussos, and F.N. Kolisis, *Biocatalytic synthesis and antitumor activities of novel silybin acylated derivatives with dicarboxylic acids*. *New biotechnology*, 2011. **28**(4): p. 342-348.
143. Salem, J.H., I. Chevalot, C. Harscoat-Schiavo, C. Paris, M. Fick, and C. Humeau, *Biological activities of flavonoids from Nitraria retusa (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives*. *Food Chemistry*, 2011. **124**(2): p. 486-494.
144. Lue, B.-M., N.S. Nielsen, C. Jacobsen, L. Hellgren, Z. Guo, and X. Xu, *Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays*. *Food Chemistry*, 2010. **123**(2): p. 221-230.
145. Ma, X., R. Yan, S. Yu, Y. Lu, Z. Li, and H. Lu, *Enzymatic acylation of isoorientin and isovitexin from bamboo-leaf extracts with fatty acids and antiradical activity of the acylated derivatives*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2012. **60**(43): p. 10844-10849.
146. Xu, J., J. Qian, and S. Li, *Enzymatic acylation of isoorientin isolated from antioxidant of bamboo leaves with palmitic acid and antiradical activity of the acylated derivatives*. *European Food Research and Technology*, 2014. **239**(4): p. 661-667.
147. Zhu, S., Y. Li, Z. Li, C. Ma, Z. Lou, W. Yokoyama, and H. Wang, *Lipase-catalyzed synthesis of acetylated EGCG and antioxidant properties of the acetylated derivatives*. *Food research international*, 2014. **56**: p. 279-286.

148. Sudan, S. and H.V. Rupasinghe, *Antiproliferative activity of long chain acylated esters of quercetin-3-O-glucoside in hepatocellular carcinoma HepG2 cells*. *Experimental Biology and Medicine*, 2015. **240**(11): p. 1452-1464.
149. Warnakulasuriya, S.N. and H.V. Rupasinghe, *Novel long chain fatty acid derivatives of quercetin-3-O-glucoside reduce cytotoxicity induced by cigarette smoke toxicants in human fetal lung fibroblasts*. *European journal of pharmacology*, 2016. **781**: p. 128-138.
150. Warnakulasuriya, S.N. and H. Rupasinghe, *Long Chain Fatty Acid Esters of Quercetin-3-O-glucoside Attenuate H₂O₂-induced Acute Cytotoxicity in Human Lung Fibroblasts and Primary Hepatocytes*. *Molecules*, 2016. **21**(4): p. 452.
151. Sekhon-Loodu, S., Z. Ziaullah, H.V. Rupasinghe, Y. Wang, M. Kulka, and F. Shahidi, *Novel quercetin-3-O-glucoside eicosapentaenoic acid ester ameliorates inflammation and hyperlipidemia*. *Inflammopharmacology*, 2015. **23**(4): p. 173-185.
152. Gatto, M.T., S. Falcocchio, E. Grippa, G. Mazzanti, L. Battinelli, G. Nicolosi, D. Lambusta, and L. Saso, *Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C₂-C₁₆ 3-O-acyl-esters*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2002. **10**(2): p. 269-272.
153. Viskupicova, J., M. Majekova, and L. Horakova, *Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA1) by rutin derivatives*. *Journal of muscle research and cell motility*, 2015. **36**(2): p. 183-194.
154. Bhullar, K.S., Z. Ziaullah, and V. Rupasinghe, *In vitro regulation of enzymes of the renin-angiotensin-aldosterone system by isoquercitrin, phloridzin and their long chain fatty acid derivatives*. *Functional Foods in Health and Disease*, 2014. **4**(5): p. 208-221.
155. Saija, A., A. Tomaino, D. Trombetta, M. Luisa Pellegrino, B. Tita, C. Messina, F.P. Bonina, C. Rocco, G. Nicolosi, and F. Castelli, *'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003. **56**(2): p. 167-174.
156. Lin, S.F., Y.-H. Lin, M. Lin, Y.-F. Kao, R.-W. Wang, L.-W. Teng, S.-H. Chuang, J.-M. Chang, T.-T. Yuan, K.C. Fu, K.P. Huang, Y.-S. Lee, C.-C. Chiang, S.-C. Yang, C.-L. Lai, C.-B. Liao, P. Chen, Y.-S. Lin, K.-T. Lai, H.-J. Huang, J.-Y. Yang, C.-W. Liu, W.-Y. Wei, C.-K. Chen, R.A. Hiipakka, S. Liao, and J.-J. Huang, *Synthesis and structure–activity*

- relationship of 3-O-acylated (-)-epigallocatechins as 5 α -reductase inhibitors*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010. **45**(12): p. 6068-6076.
157. Bombardelli, E. and G.F. Patri, *Complex compounds of bioflavonoids with phospholipids, their preparation and use, and pharmaceutical and cosmetic compositions containing them*. 1991, Google Patents.
158. Caldwell, S.T., C.J. Bennett, R.C. Hartley, D.B. McPhail, and G.G. Duthie, *Flavonoid compounds as therapeutic antioxidants*. 2009, Google Patents.
159. Geers, B., R. Otto, A. Weiss, D. Petersohn, K. Schroeder, and K. Schlotmann, *Novel flavone glycoside derivatives for use in cosmetics, pharmaceuticals and nutrition*. 2003, Google Patents.
160. Perrier, E., A.M. Mariotte, A. Boumendjel, and D. Bresson-Rival, *Flavonoide esters and their use notably in cosmetics*. 2001, Patent US 6235294.
161. Cushman, M.S., J.M. Pezzuto, and A. Mati, *Chemotherapeutic flavonoids, and syntheses thereof*. 2015, Google Patents.
162. Degenhardt, A., F. Ullrich, T. Hofmann, and T. Stark, *Flavonoid sugar addition products, method for manufacture and use thereof*. 2007, Patent US 20070269570.
163. Asen, S., R.N. Stewart, and K.H. Norris, *Stable foods and beverages containing the anthocyanin, peonidin 3-(dicaffeoylsophoroside)-5-glucoside*. 1979, Patent US 4172902.
164. Fox, G.J., *Natural red sunflower anthocyanin colorant with naturally stabilized color qualities, and the process of making*. 2000, Patent US 6132791.
165. Giusti, M.M. and R.E. Wrolstad, *Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems*. Biochemical Engineering Journal, 2003. **14**(3): p. 217-225.
166. Moussou, P., A. Falcimaigne, M. Ghoul, L. Danoux, and G. Pauly, *Esters of flavonoids with w-substituted c6-c22 fatty acids*. 2007, Patent US 20070184098 A1.
167. Cleland, W.W., *The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects, 1963. **67**: p. 104-137.

168. Segel, I., *Steady-state kinetics of multireactant enzymes, Chapter 9, Enzyme kinetics, behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. 1975, John Wiley and Son, Inc., New York.
169. Céliz, G., M.R. Martearena, E. Scaroni, and M. Daz, *Kinetic study of the alkyl flavonoid ester prunin 6''-O-laurate synthesis in acetone catalysed by immobilised Candida antarctica lipase B*. *Biochemical Engineering Journal*, 2012. **69**(0): p. 69-74.
170. Bezbradica, D., M. Stojanović, D. Veličković, A. Dimitrijević, M. Carević, M. Mihailović, and N. Milosavić, *Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester*. *Biochemical engineering journal*, 2013. **71**: p. 89-96.
171. Paiva, A.L., V.M. Balcao, and F.X. Malcata, *Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases* ☆. *Enzyme and microbial technology*, 2000. **27**(3-5): p. 187-204.
172. Yadav, G.D. and K.M. Devi, *Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling*. *Chemical Engineering Science*, 2004. **59**(2): p. 373-383.
173. Pjanović, R., *Prenos mase aktivne komponente u heterogenim sistemima sa mikročesticama*. Doktorska disertacija, TMF Beograd, 2010.
174. Csizmazia, E., *Drug permeation study through biological membrane barriers*. 2011, szte.
175. Nalenz, H., *Dependence of skin drug permeation on microstructure and time dependent alterations following application of more-phasic dermatological formulations studied by the continuous phase drug concentration concept*. 2006, University_of_Basel.
176. Wiechers, J.W., *Skin barrier: chemistry of skin delivery systems*. 2008: Allured Publishing Corporation.
177. Williams, A., *Transdermal and Topical Drug Delivery from Theory to Clinical Practice*. 2003: Pharmaceutical Press.
178. Scheuplein, R., I. Blank, G. Brauner, and D.J. Macfarlane, *Percutaneous absorption of steroids*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1969. **52**(1): p. 63-70.

179. Thomas, A.W., *A Review of the Literature of Emulsions*. Industrial & Engineering Chemistry, 1920. **12**(2): p. 177-181.
180. Khan, B.A., N. Akhtar, H.M.S. Khan, K. Waseem, T. Mahmood, A. Rasul, M. Iqbal, and H. Khan, *Basics of pharmaceutical emulsions: A review*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011. **5**(25): p. 2715-2725.
181. van der Graaf, S., C. Schroen, and R. Boom, *Preparation of double emulsions by membrane emulsification—a review*. Journal of Membrane Science, 2005. **251**(1-2): p. 7-15.
182. Bing, J., Z. Qian-Jie, Z. Zheng, C. Ming-hua, and Z. Wan-ping, *Preparation of liquid crystal emulsion and its application performance study*. Journal of Dispersion Science and Technology, 2018. **39**(1): p. 100-105.
183. Zhang, W. and L. Liu, *Study on the formation and properties of liquid crystal emulsion in cosmetic*. Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications, 2013. **3**(02): p. 139.
184. Clariant. *Aristoflex® AVC*. May 2013; Available from: https://korea.in-cosmetics.com/_novadocuments/474438?v=636606549658500000.
185. De Leeuw, J., H. De Vijlder, P. Bjerring, and H. Neumann, *Liposomes in dermatology today*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2009. **23**(5): p. 505-516.
186. Pravić, R.N., *Difuzija polifenolnih jedinjenja iz mikročestica dobijenih različitim tehnikama inkapsulacije*. 2016, Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет.
187. Poorahmary Kermany, B., *Carbopol hydrogels for topical administration: treatment of wounds*. 2010, Universitetet i Tromsø.
188. Siepmann, J. and N.A. Peppas, *Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse*. International journal of pharmaceutics, 2011. **418**(1): p. 6-12.
189. Wen, H. and K. Park, *Oral controlled release formulation design and drug delivery: theory to practice*. 2011: John Wiley & Sons.

190. Korsmeyer, R.W., R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, and N.A. Peppas, *Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers*. International journal of pharmaceutics, 1983. **15**(1): p. 25-35.
191. Ford, J.L., K. Mitchell, P. Rowe, D.J. Armstrong, P.N. Elliott, C. Rostron, and J.E. Hogan, *Mathematical modelling of drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrices: effect of temperature*. International journal of pharmaceutics, 1991. **71**(1-2): p. 95-104.
192. Peppas, N.A. and J.J. Sahlin, *A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation*. International journal of pharmaceutics, 1989. **57**(2): p. 169-172.
193. Science, P. *Development and Validation of In Vitro Release Testing Methods for Semisolid Formulations*. Technical Brief 2009; Available from: https://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_10.pdf.
194. Bartosova, L. and J. Bajgar, *Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells*. Current medicinal chemistry, 2012. **19**(27): p. 4671-4677.
195. Benson, H.A. and A.C. Watkinson, *Topical and transdermal drug delivery: principles and practice*. 2012: John Wiley & Sons.
196. Simon, A., M.I. Amaro, A.M. Healy, L.M. Cabral, and V.P. de Sousa, *Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation*. International journal of pharmaceutics, 2016. **512**(1): p. 234-241.
197. Kaur, L., K. Singh, S. Paul, S. Singh, S. Singh, and S.K. Jain, *A Mechanistic Study to Determine the Structural Similarities Between Artificial Membrane Strat-M™ and Biological Membranes and Its Application to Carry Out Skin Permeation Study of Amphotericin B Nanoformulations*. AAPS PharmSciTech, 2018. **19**(4): p. 1606-1624.
198. Haq, A., B. Goodyear, D. Ameen, V. Joshi, and B. Michniak-Kohn, *Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin*. International journal of pharmaceutics, 2018. **547**(1): p. 432-437.
199. Sri Janani, N., G. Bharath Kumar, P. Balakrishna, D. Sruthi, M. Srujan Kumar, and S. Mantry, *A review on Strat-M membrane*. Int. J. Innov. Pharm. Sci. Res, 2014. **2**: p. 962.

200. Palai, T., A. Kumar, and P.K. Bhattacharya, *Kinetic studies and model development for the formation of galacto-oligosaccharides from lactose using synthesized thermo-responsive bioconjugate*. Enzyme and microbial technology, 2015. **70**: p. 42-49.
201. Ćorović, M.M., *Sinteza liposolubilnih askorbil-estara karboksilnih kiselina katalizovana imobilisanim lipazama*. 2016, Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет.
202. Banjanac, K.M., *Imobilizacija enzima na nanočestice SiO₂ modifikovane na organosilanima*. 2017, Univerzitet u Beogradu-Tehnološko-metalurški fakultet.
203. Kedare, S.B. and R. Singh, *Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay*. Journal of food science and technology, 2011. **48**(4): p. 412-422.
204. Cronin, M., *Report on the Review of the Status of the Development of Alternatives to using Animals in Chemical Safety Testing and Identification of New Areas for Development or Research in the Context of the Proposed REACH Regulation*. Liverpool John Moores University and The Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments, Liverpool, 2005. **42**.
205. Lomax, E.G., *Amphoteric surfactants*. 1996, USA: CRC Press. 440.
206. Lagarto, A., R. Vega, Y. Vega, I. Guerra, and R. González, *Comparative study of red blood cell method in rat and calves blood as alternatives of Draize eye irritation test*. Toxicology in Vitro, 2006. **20**(4): p. 529-533.
207. Ziullah and H.P.V. Rupasinghe, *Sonochemical enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid glycosides*. Bioorganic chemistry, 2016. **65**: p. 17-25.
208. Otto, R.T., U.T. Bornscheuer, H. Scheib, J. Pleiss, C. Syldatk, and R.D. Schmid, *Lipase-catalyzed esterification of unusual substrates: Synthesis of glucuronic acid and ascorbic acid (vitamin C) esters*. Biotechnology letters, 1998. **20**(11): p. 1091-1094.
209. Yan, Y., U.T. Bornscheuer, and R.D. Schmid, *Lipase-catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters*. Biotechnology Letters, 1999. **21**(12): p. 1051-1054.
210. Stojanović, M., D. Veličković, A. Dimitrijević, N. Milosavić, Z. Knežević-Jugović, and D. Bezbradica, *Lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl oleate in acetone: optimization of reaction conditions and lipase reusability*. Journal of oleo science, 2013. **62**(8): p. 591-603.

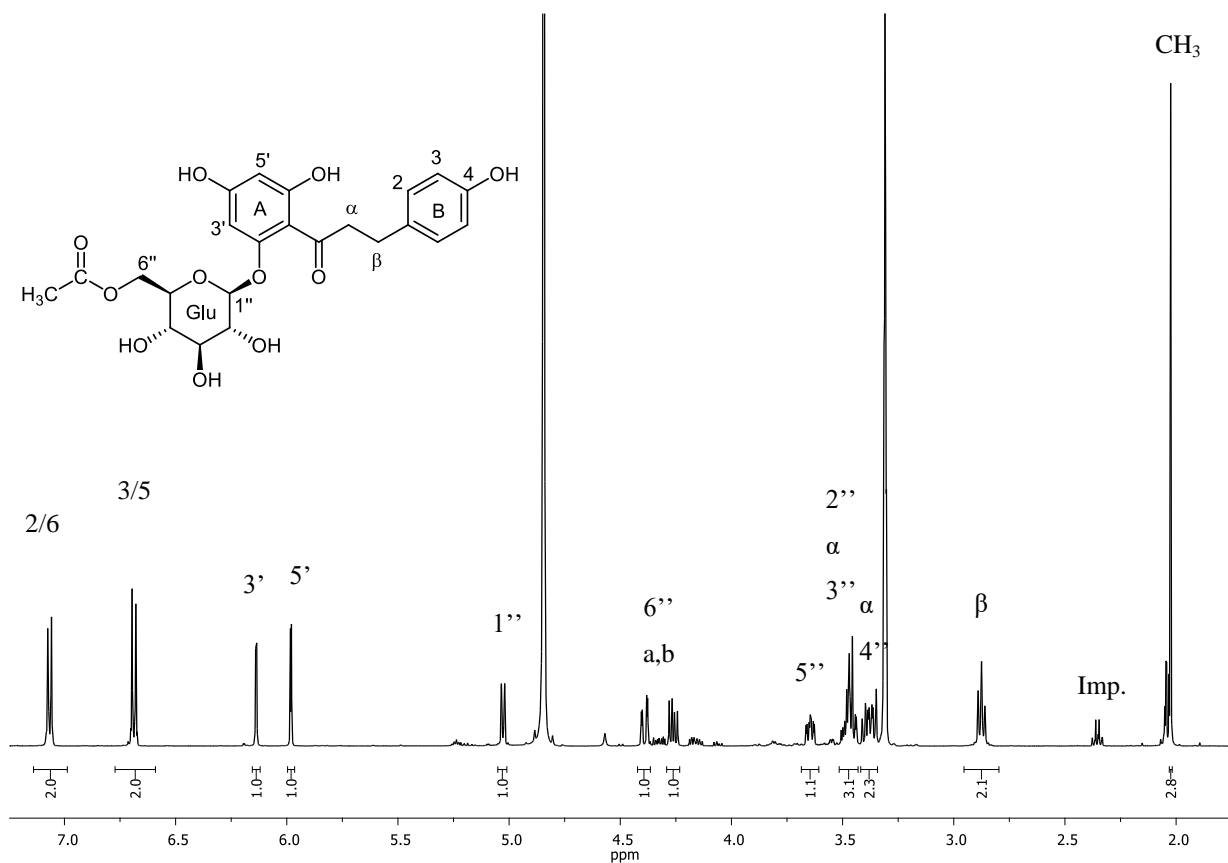
211. Yang, Z., Z. Guo, and X. Xu, *Enzymatic lipophilisation of phenolic acids through esterification with fatty alcohols in organic solvents*. Food chemistry, 2012. **132**(3): p. 1311-1315.
212. De Araújo, M.E.M.B., F.J. Contesini, Y.E.M. Franco, A.C. Sawaya, T.G. Alberto, N. Dalfré, and P.d.O. Carvalho, *Optimized enzymatic synthesis of hesperidin fatty acid esters in a two-phase system containing ionic liquid*. Molecules, 2011. **16**(8): p. 7171-7182.
213. Zheng, M.-M., L. Wang, F.-H. Huang, P.-M. Guo, F. Wei, Q.-C. Deng, C. Zheng, and C.-Y. Wan, *Ultrasound irradiation promoted lipase-catalyzed synthesis of flavonoid esters with unsaturated fatty acids*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013. **95**: p. 82-88.
214. Moreno-Perez, S., M. Filice, J.M. Guisan, and G. Fernandez-Lorente, *Synthesis of ascorbyl oleate by transesterification of olive oil with ascorbic acid in polar organic media catalyzed by immobilized lipases*. Chemistry and physics of lipids, 2013. **174**: p. 48-54.
215. Romero, M., L. Calvo, C. Alba, and A. Daneshfar, *A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane*. Journal of Biotechnology, 2007. **127**(2): p. 269-277.
216. Diaz, M.D.R., J.M. Gómez, B. Díaz-Suelto, and A. García-Sanz, *Enzymatic synthesis of short-chain esters in n-hexane and supercritical carbon dioxide: Effect of the acid chain length*. Engineering in Life Sciences, 2010. **10**(2): p. 171-176.
217. Soutani, S., J.-M. Engasser, and M. Ghoul, *Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001. **11**(4-6): p. 725-731.
218. Bezbradica, D., M. Corovic, S. J Tanaskovic, N. Lukovic, M. Carevic, A. Milivojevic, and Z. Knezevic-Jugovic, *Enzymatic Syntheses of Esters-Green Chemistry for Valuable Food, Fuel and Fine Chemicals*. Current Organic Chemistry, 2017. **21**(2): p. 104-138.
219. Hilt, P., A. Schieber, C. Yildirim, G. Arnold, I. Klaiber, J. Conrad, U. Beifuss, and R. Carle, *Detection of Phloridzin in Strawberries (Fragaria x ananassa Duch.) by HPLC–PDA–MS/MS and NMR Spectroscopy*. Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(10): p. 2896-2899.

220. Shanab, K., C. Neudorfer, and H. Spreitzer, *Green Solvents in Organic Synthesis: An Overview II*. Current Organic Chemistry, 2016. **20**(15): p. 1576-1583.
221. Press, M., P. Hartop, and C. Prottey, *Correction of essential fatty-acid deficiency in man by the cutaneous application of sunflower-seed oil*. The Lancet, 1974. **303**(7858): p. 597-599.
222. Brenner, J., *Applications of essential fatty acids in skin care, cosmetics and cosmeceuticals*. Cosmetics and toiletries, 2004. **119**(3): p. 75-80.
223. Darmstadt, G.L., M. Mao-Qiang, E. Chi, S. Saha, V. Ziboh, R. Black, M. Santosham, and P. Elias, *Impact of topical oils on the skin barrier: possible implications for neonatal health in developing countries*. Acta Paediatrica, 2002. **91**(5): p. 546-554.
224. Céliz, G., R. Díaz, and M. Daz, *Obtaining hesperetin 7-O-glucosyl 6''-O-laurate, a high lipophilic flavonoid ester, from Citrus waste*. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 2018. **13**: p. 25-30.
225. Purolite®. *Lifetech™ ECR Enzyme Immobilization Resins*. March 2015; Available from:<https://www.purolite.com/dam/jcr:383bbb5a-96d5-4940-ac8e-b1a049bb3f85/Lifetech%20ECR%20resins.pdf>.
226. Carević, M., *Proizvodnja i imobilizacija mikrobnih β -galaktozidaza za primenu u transgalakozilacionim reakcijama*. 2016, Univerzitet u Beogradu-Tehnološko-metalurški fakultet.
227. Ćorović, M.M., A.D. Milivojević, M.B. Carević, K.M. Banjanac, L.V. Vujisić, R.V. Pjanović, and D.I. Bezbradica, *Enzymatic lipophilization of vitamin C with linoleic acid: Determination of antioxidant and diffusion properties of L-ascorbyl linoleate*. Food and Feed Research, 2018. **45**(1): p. 1-10.
228. Lampen, P., W. Pittermann, H. Heise, and M. Schmitt, *Penetration studies of vitamin E acetate applied from*. J. Cosmet. Sci, 2003. **54**: p. 119-131.
229. Wiechers, J., A. Watkinson, S. Cross, and M. Roberts, *Predicting skin penetration of actives from complex cosmetic formulations: an evaluation of inter formulation and inter active effects during formulation optimization for transdermal delivery*. International journal of cosmetic science, 2012. **34**(6): p. 525-535.

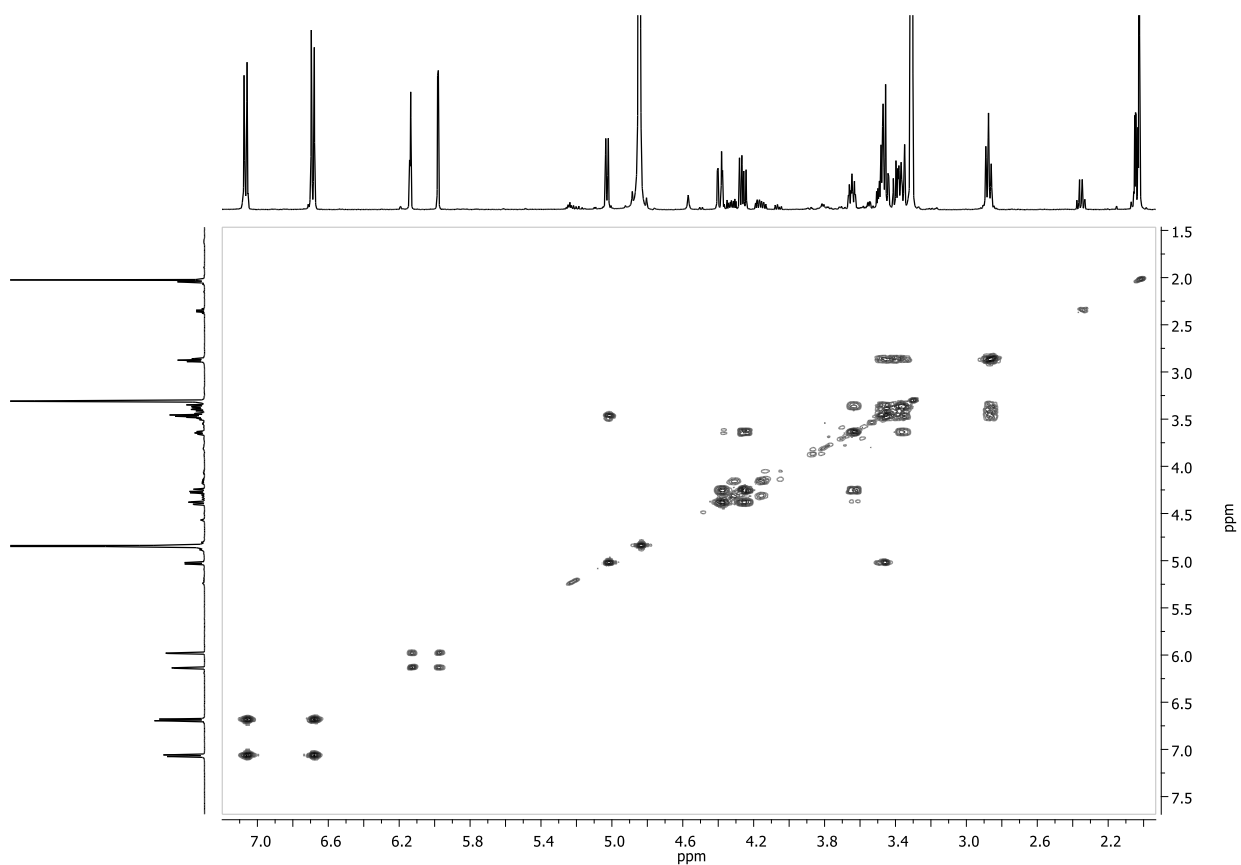
230. Schmid, D., F. Zulli, H.-P. Nissen, and H. Prieur, *Penetration and metabolism of isoflavones in human skin*. *Cosmetics and toiletries*, 2003. **118**(9): p. 71-76.
231. Jurkovič, P., M. Šentjarc, M. Gašperlin, J. Kristl, and S. Pečar, *Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions*. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 2003. **56**(1): p. 59-66.
232. Klein, K., *Formulating cosmetic emulsions: a beginner's guide*. *Cosmetics and toiletries*, 2005. **120**(1): p. 75-78.

Prilog 1

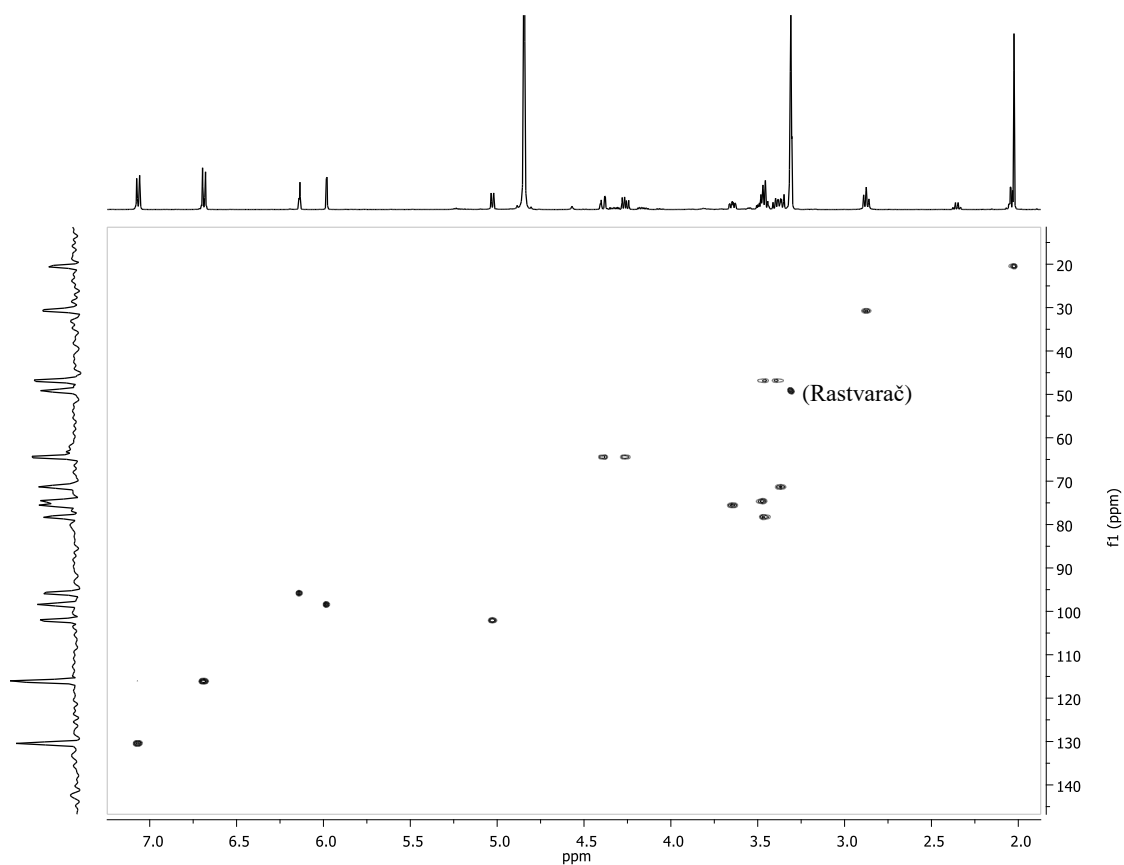
NMR analiza acetil-derivata floridzina



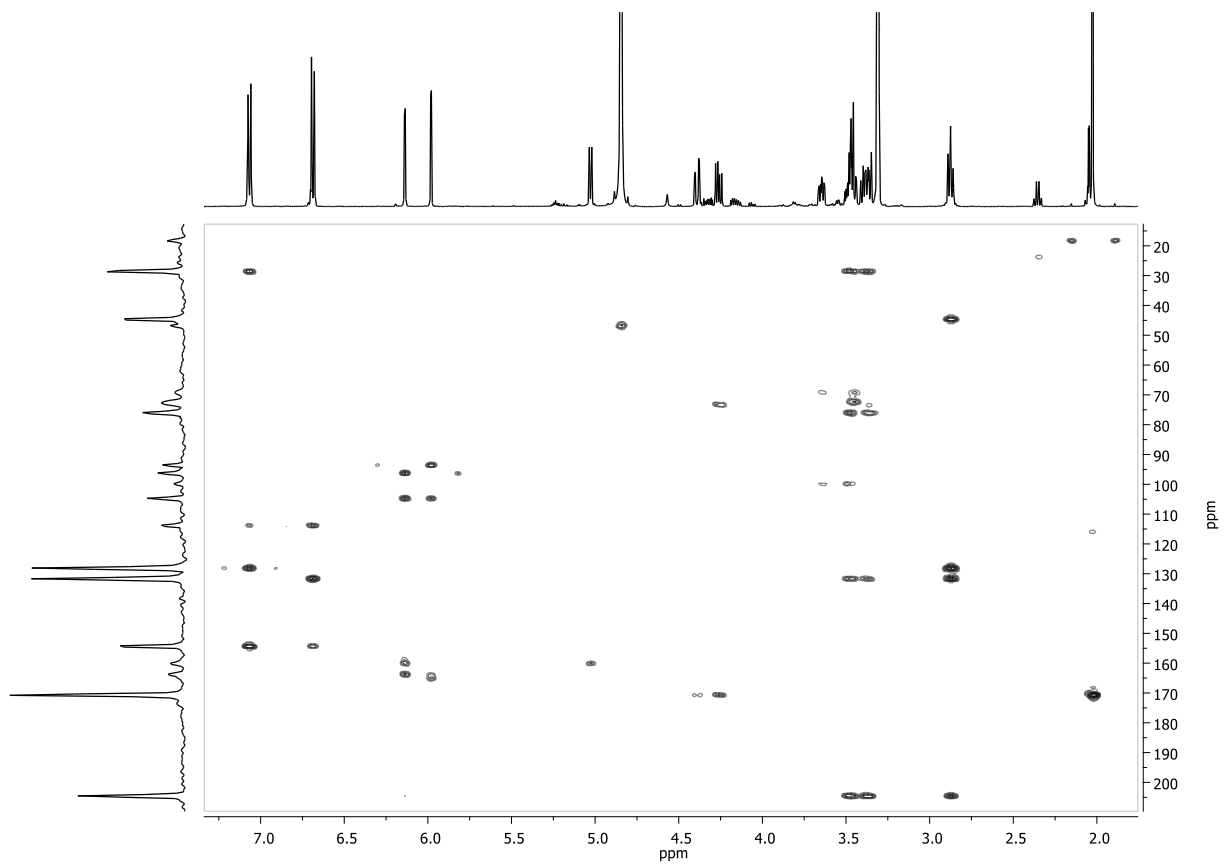
Slika 1. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) spektar floridzin-6''-O-acetata sa potpunim raspodelama.



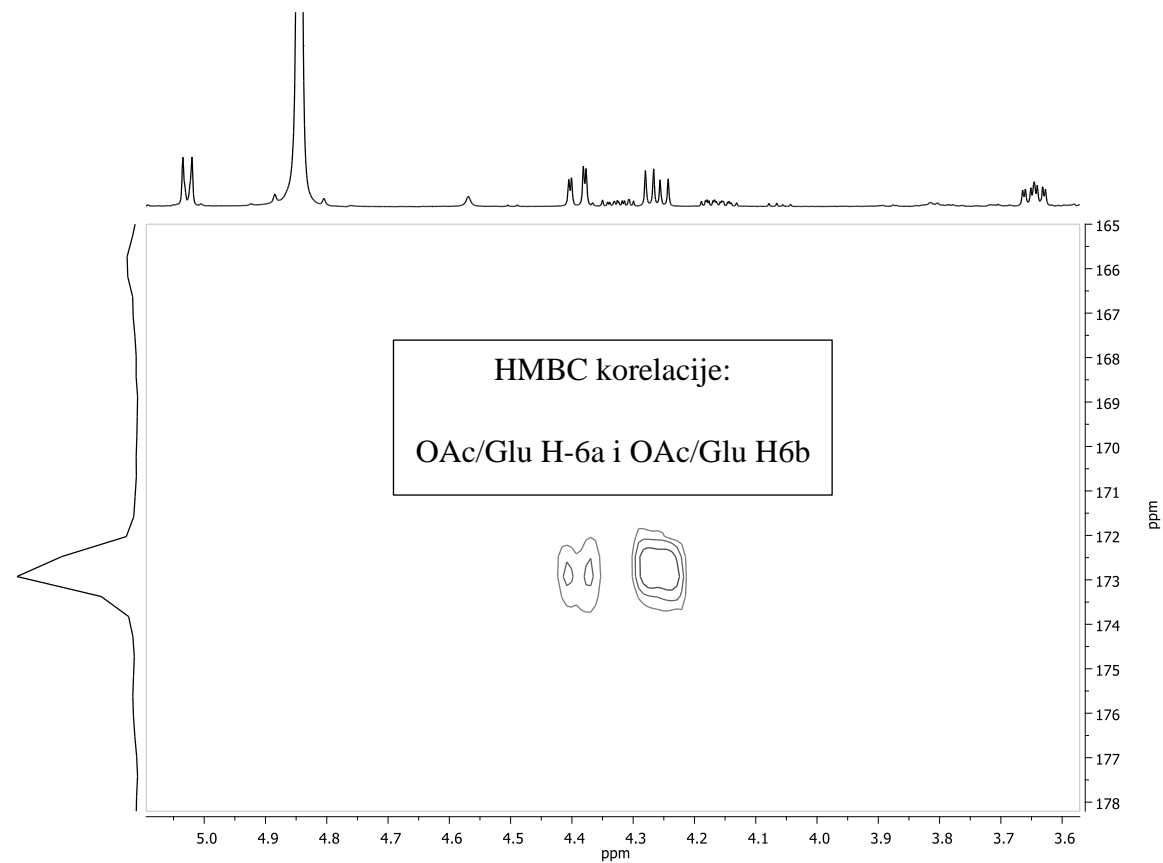
Slika 2. ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CD_3OD) NMR spektr floridzin-6''-*O*-acetata.



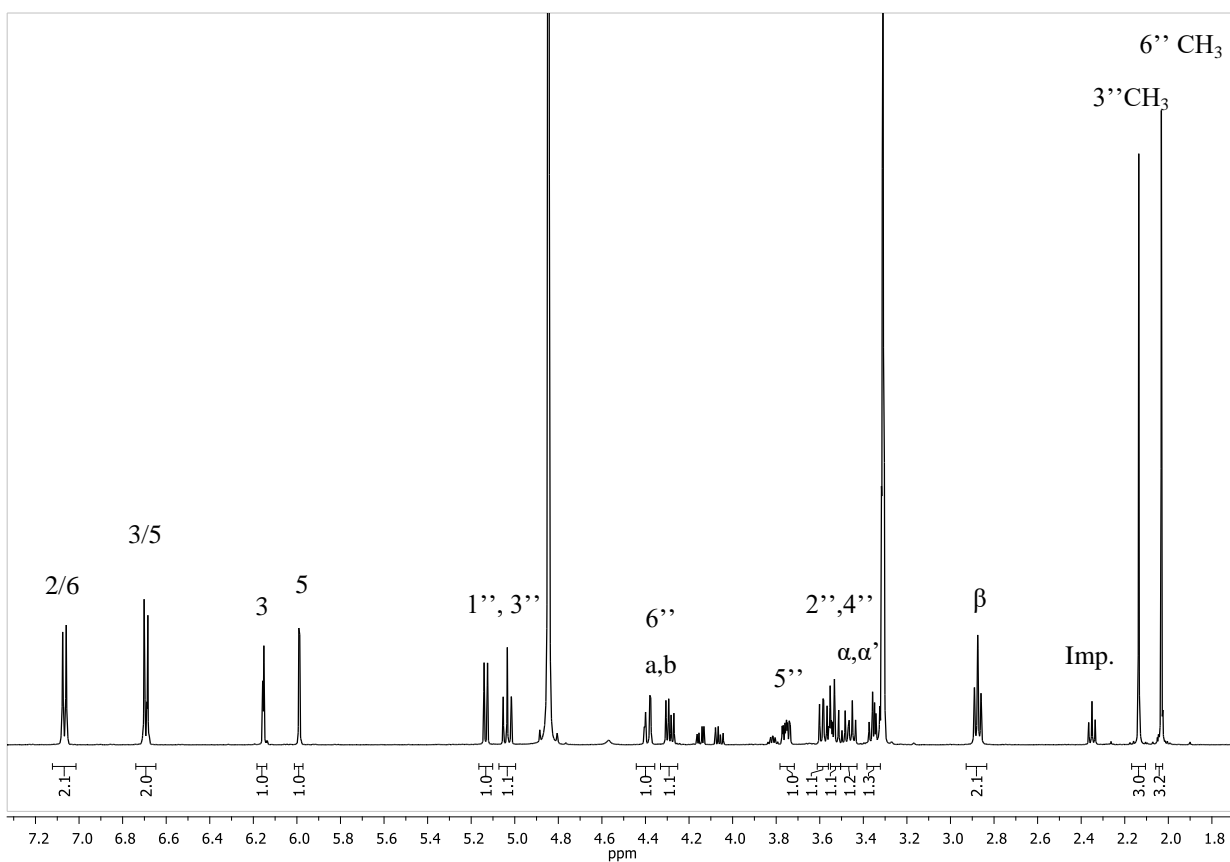
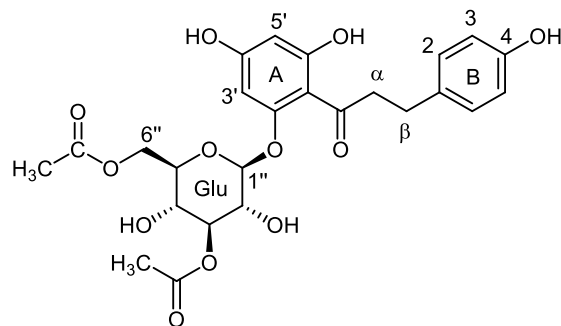
Slika 3. HSQC (500 MHz, CD_3OD) NMR spektar floridzin-6''-*O*-acetata je korišćen za raspodelu 13 protonovanih ugljenikovih atoma (devet CH, tri CH_2 i jedne CH_3)



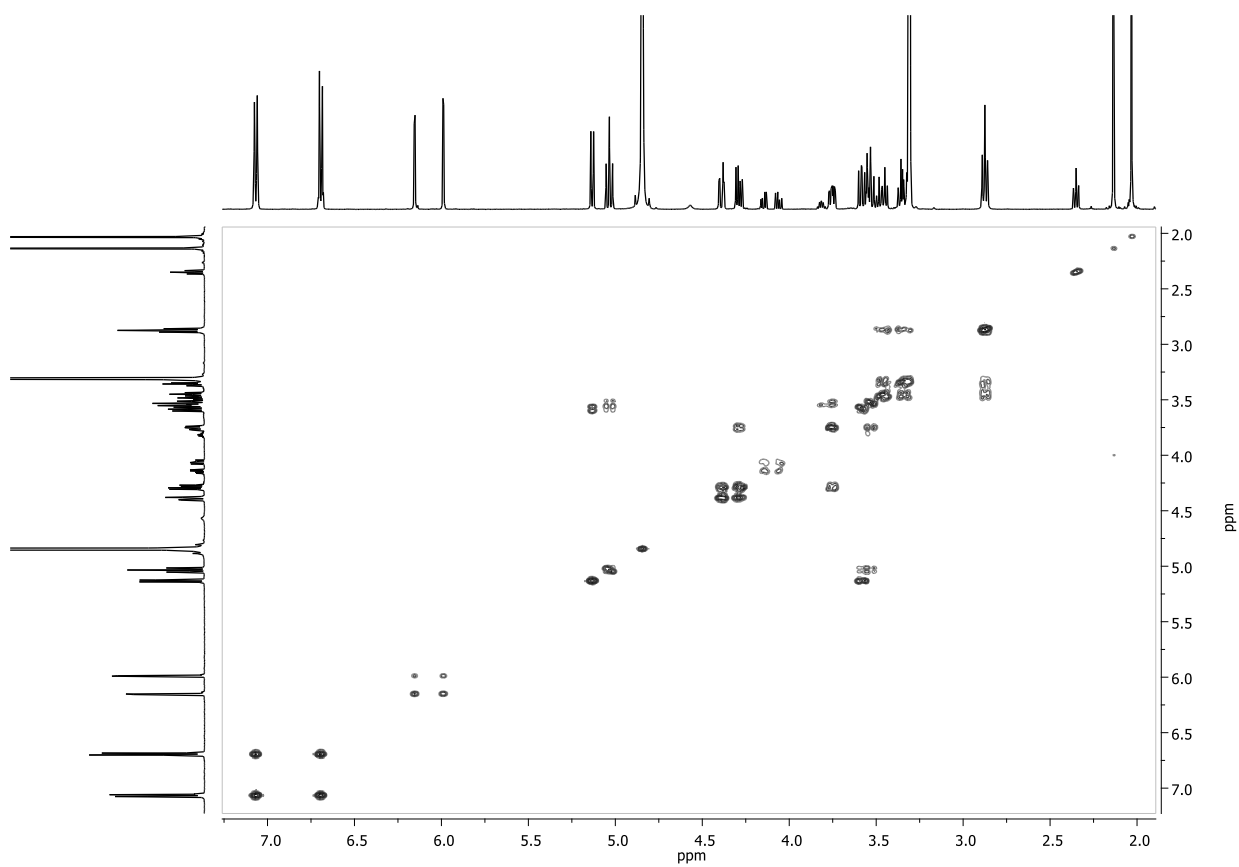
Slika 4. HMBC (500 MHz, CD₃OD) NMR spektar floridzin-6''-O-acetata.



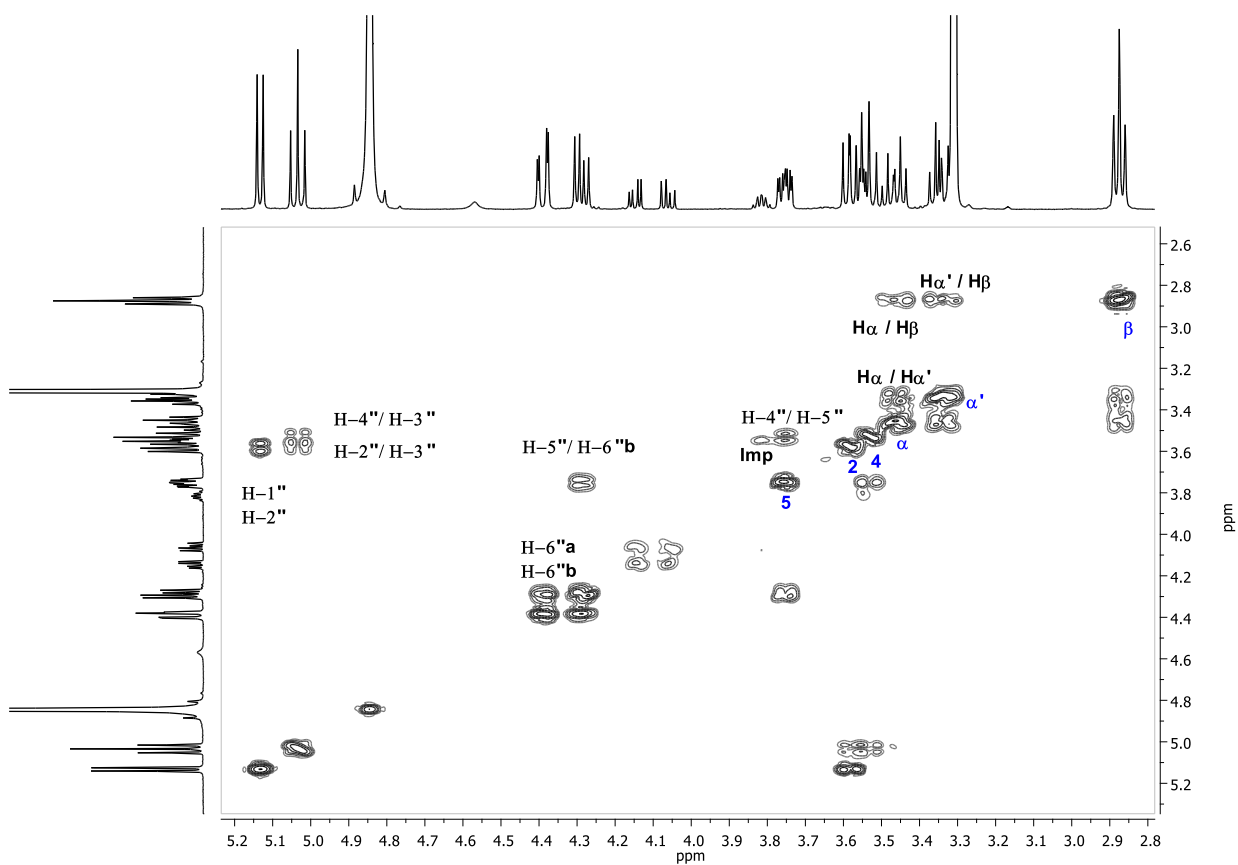
Slika 5. Parcijalni HMBC (CD₃OD) NMR spektar floridzin-6''-*O*-acetata koji pokazuje najvažnije korelacije između ugljenikovog atoma estarske veze i oba protona Glu H-6.



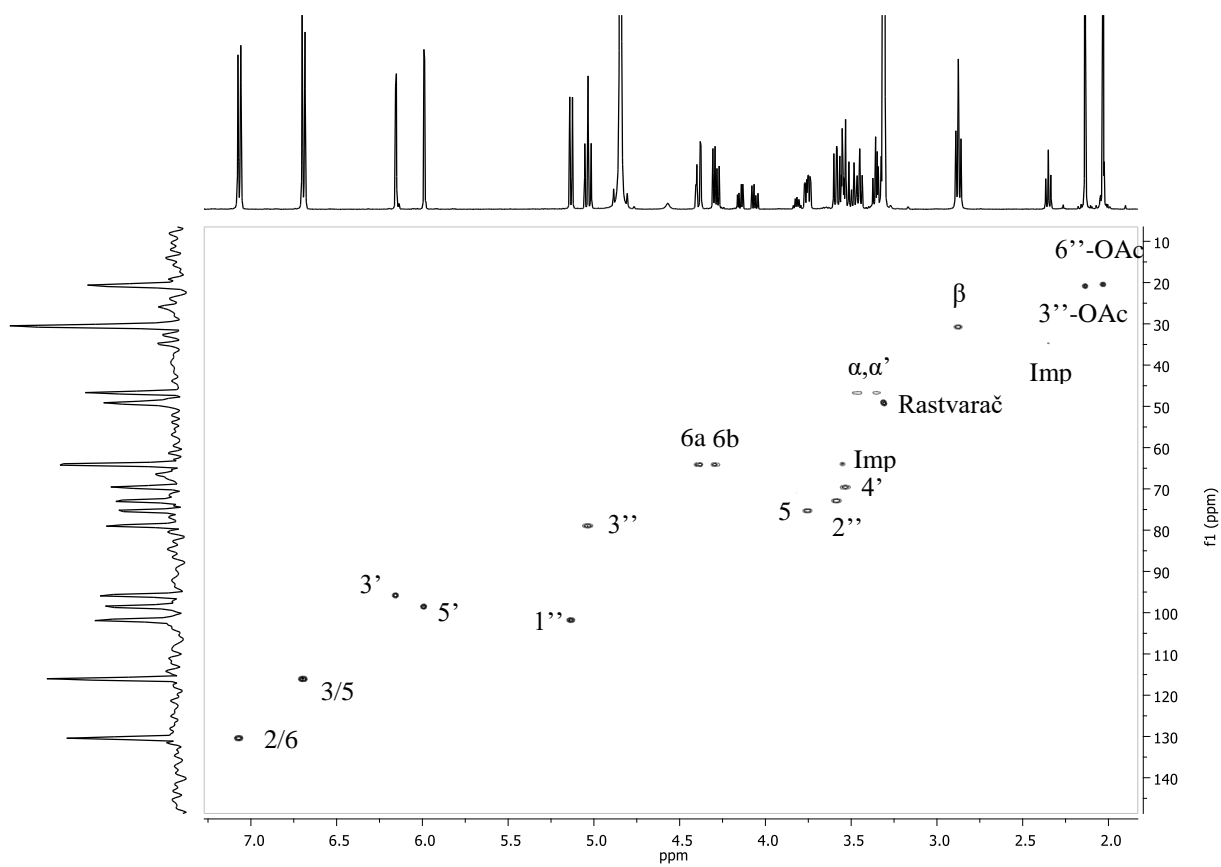
Slika 6. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) spektar floridzin-3'',6''-*O*-diacetata sa kompletnom raspodelom.



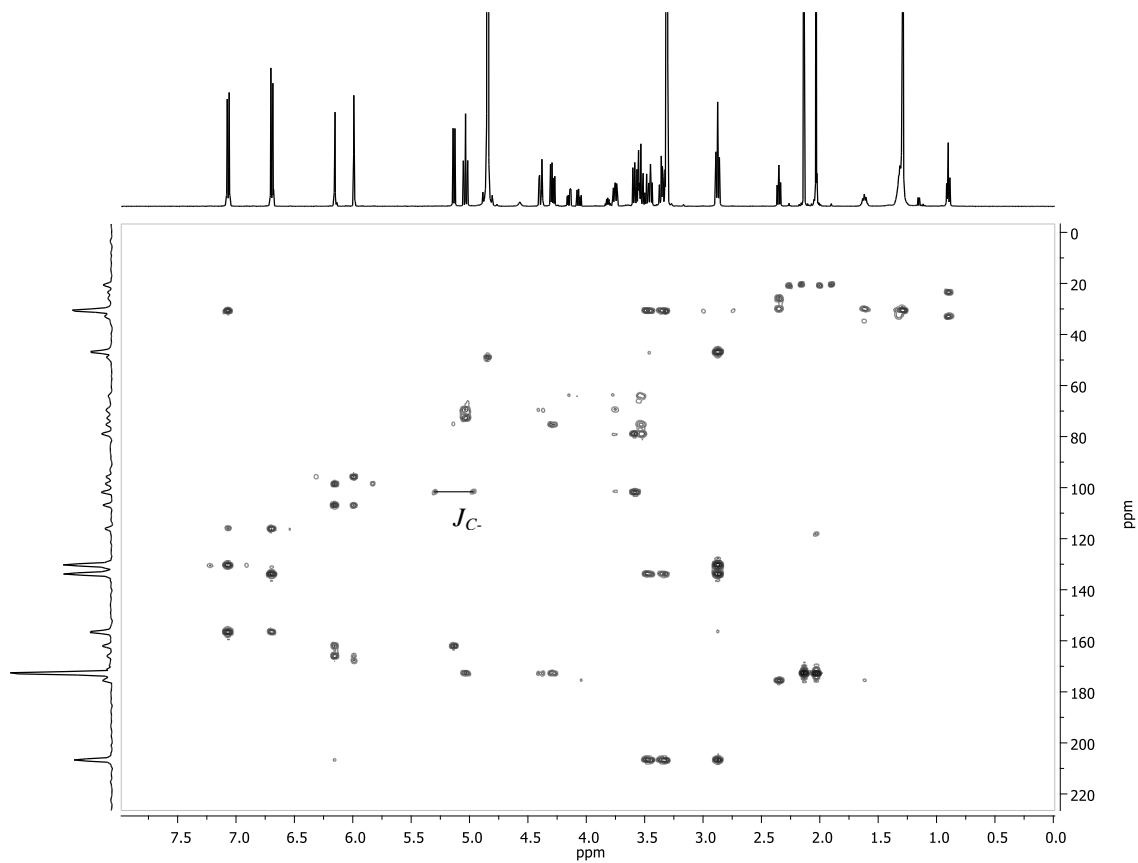
Slika 7. ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CD_3OD) NMR spektar flordizin-3'',6''-*O*-diacetata.



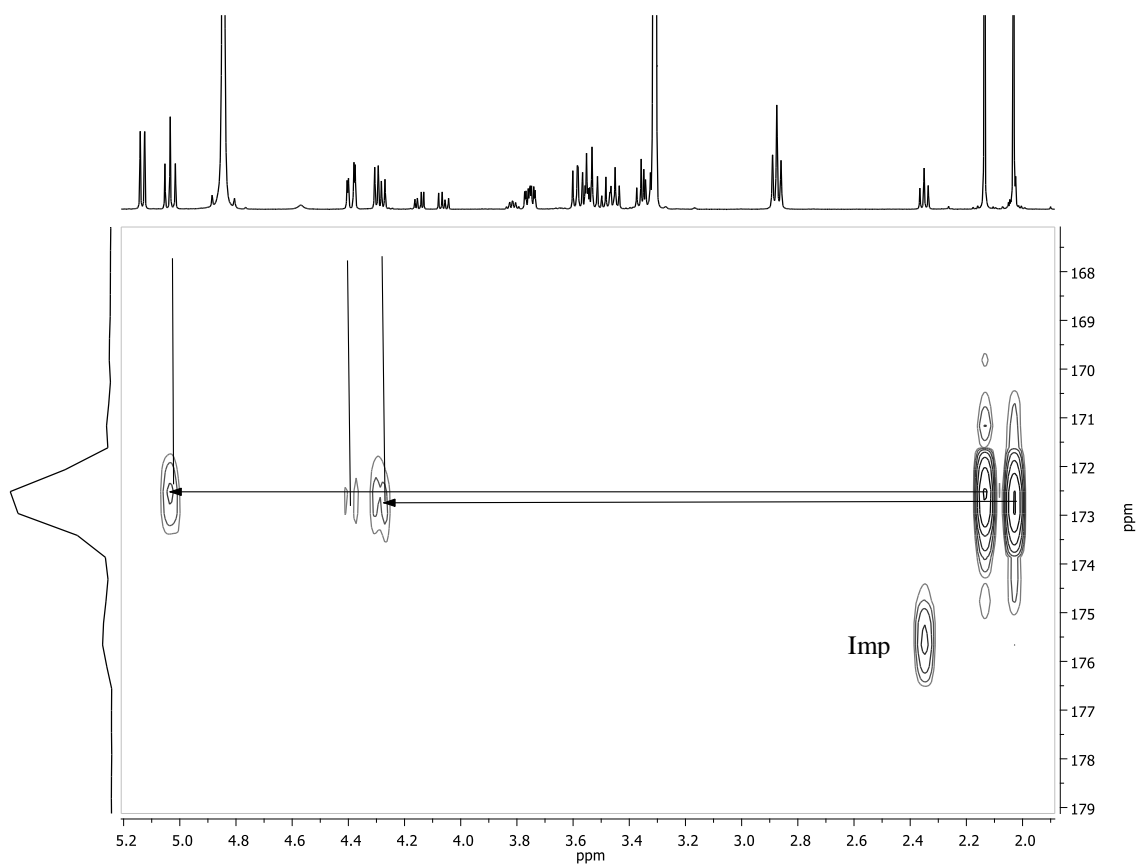
Slika 8. Parcijalni ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CD_3OD) NMR spektar flordizin-3'',6''-*O*-diacetat koji pokazuje najbitnije korelacije.



Slika 9. HSQC (500 MHz, CD₃OD) NMR spektar floridzin-3'',6''-*O*-diacetata koji pokazuje sve delove(raspodelu) protonovanih ugljenikovih atoma.



Slika 10. HMBC (500 MHz, CD_3OD) NMR spektar floridzin-3'',6''-*O*-diacetata. Oznaka pokazuje HSQC artefakt anomernog signala sa konstantom kuplovanja od 164 Hz između protona i atoma ugljenika, karakterističnog za β -anomere.



Slika 11. Parcijalni HMBC (CD_3OD) NMR spektar floridzin-3'',6''-*O*-diacetatakoji pokazuje najvažnije korelacije između ugljenikovog atoma estarske veze i H-3 i H-6 protona glukoze.

BIOGRAFIJA

Ana Milivojević (rođ. Milisavljević) rođena je 16. aprila 1989. godine u Kraljevu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Osnovne akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2008. godine. Diplomirala je na istom fakultetu 2012. godine sa ocenom 10 i prosečnom ocenom u toku studija 9,85. Tokom studija postizala je odlične rezultate zbog kojih je četiri puta nagrađivana nagradom „Panta S. Tutundžić“. U periodu od avgusta do oktobra 2012. godine pohađala je IAESTE praksu na Nacionalnom institutu hrane, Danski Tehnički Univerziteti, Kopenhagen. Master akademske studije upisala je 2012. godine na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Master rad je odbranila 2013. godine sa ocenom 10 i prosečnom ocenom tokom master studija 10,00. Doktorske akademske studije, na istom fakultetu, upisala je 2013. godine. U periodu 2014. do 2018. godine bila je angažovana na projektu ev. br. III 46010 kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. U zvanje istraživača-saradnika izabrana je u julu 2015. godine, a reizabrana u junu 2018. godine. Od februara 2018. godine zaposlena je na Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta u zvanju istraživač-saradnik na projektu „Primena biotehnoških metoda u održivom iskorišćenju nusproizvoda agroindustrije“ (TR 31035). Koautor je 11 radova u međunarodnim časopisima (jedan M21a, sedam M21, dva M22, i jedan M24), 3 rada u časopisima nacionalnog značaja i 8 saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima (pet M33 i tri M34). Od oktobra 2017. godine angažovana je u nastavi na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija na laboratorijskim vežbama iz predmeta Biotehnoški praktikum I.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ана Миливојевић

Број индекса 4023/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из
козметичких формулација

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

Потпис аутора

У Београду, 27.02.2019.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Миливојевић

Број индекса 4023/2013

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано
отпуштање из козметичких формулација

Ментори проф.др Дејан Безбрадица и проф. др Рада Пјановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 27.02.2019.

Изјава о коришћењу

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

Ензимска синтеза естара флавоноида и контролисано отпуштање из козметичких формулација

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 27.02.2019.
