Priprava, karakterizacija i ispitivanje stabilnosti kationskih nanoemulzija

Jović, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:200156

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Filip Jović

Priprava, karakterizacija i ispitivanje stabilnosti kationskih nanoemulzija

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasmine Lovrić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Jasmini Lovrić, na stručnom vodstvu, savjetovanju, uloženom vremenu i strpljenju prilikom izrade ovoga rada.

Hvala asistentici Biseri Jurišić Dukovski, mag. pharm., na pruženoj pomoći i pristupačnosti tijekom eksperimentalne izrade i pisanja ovog rada, koji je izrađen u sklopu njenog doktorskog istraživanja.

Posebna hvala Danki Bračko, mag. pharm, na omogućavanju izrade nanoemulzija u suradnji s tvrtkom PLIVA d.o.o., te Željku Vincelju, tech. pharm, na pomoći i izdvojenom vremenu.

Najveće hvala mojim roditeljima i obitelji koji su mi omogućili studiranje te na neizmjernoj podršci i potpori tijekom cijelog studija.

Hvala i mojim prijateljima na podršci i pomoći.

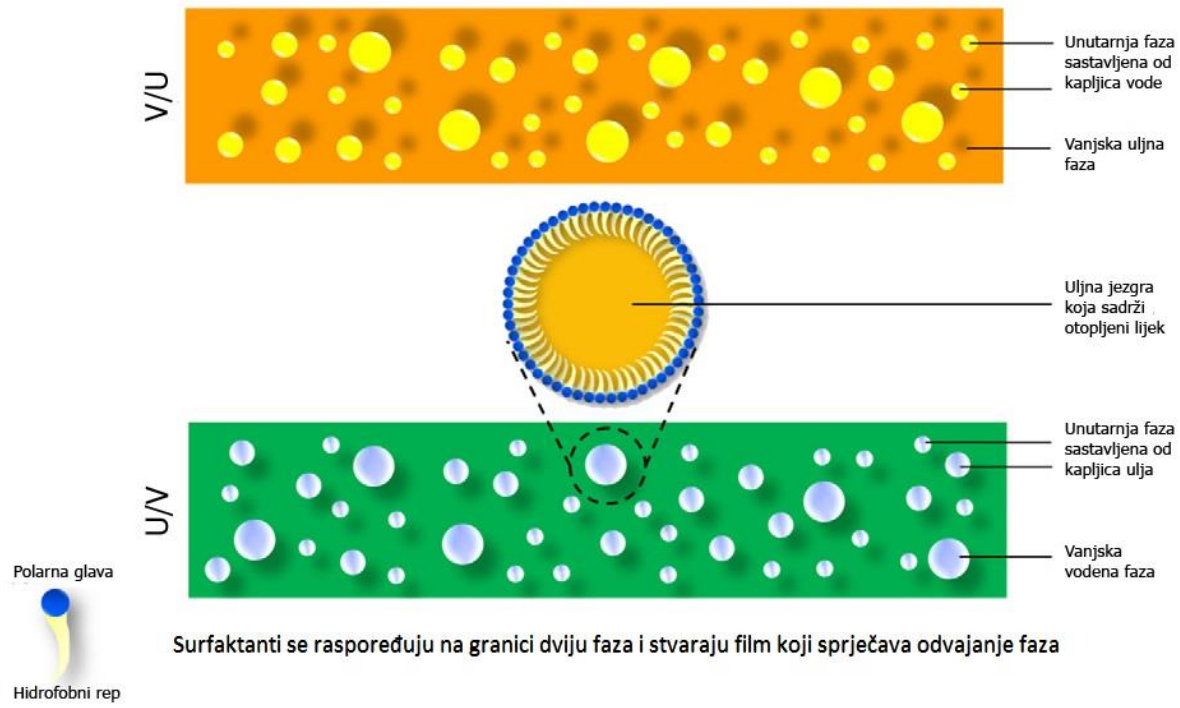
SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Nanoemulzije 1
1.2. Komponente nanoemulzija 4
1.2.1. Ulja / lipidi 4
1.2.2. Surfaktnati 4
1.2.3. Konzervansi, antioksidansi i ostali stabilizatori 5
1.3. Metode priprave nanoemulzija 6
1.3.1. Visokoenergetske metode 8
1.3.2. Niskoenergetske metode 9
1.4. Stabilnost nanoemulzija 10
2. OBRAZLOŽNJE TEME 14
3. MATERIJALI I METODE 15
3.1. Materijali 15
3.2. Metode 16
3.2.1. Izrada nanoemulzija 16
3.2.2. Mjerenje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti 17
3.2.3. Mjerenje zeta potencijala 18
3.2.4. Ispitivanje stabilnosti 19
4. REZULTATI I RASPRAVA 20
4.1. Priprava nanoemulzija stabiliziranih ionskim surfaktantom 20
4.2. Dodatak neionskog surfaktanta 23
4.3. Dodatak kitozana 27
4.3.1. Kitozan niske molekulske mase 27
4.3.2. Kitozan srednje molekulske mase 30
5. ZAKLJUČAK 34
6. LITERATURA 36
7. SAŽETAK / SUMMARY 38
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Nanoemulzije

Nanoemulzije su definirane kao koloidne disperzije stabilizirane odgovarajućim surfaktantom koje se sastoje od dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju (Singh i sur., 2017). Molekule surfaktanta nalaze se na granici između unutarnje i vanjske faze, a osim što osiguravaju stabilizaciju sustava, omogućuju i sam nastanak nanoemulzija (Singh i sur., 2017; Jaiswal i sur., 2015; McClements, 2012). Veličina kapljica unutarnje faze nanoemulzija obično je manja od 500 nanometara (Singh i sur., 2017; Sun i sur., 2012). Unutarnja (diskontinuirana) ili disperzna faza nalazi se raspršena u vanjskoj (kontinuiranoj) fazi zvanoj još i disperzno sredstvo. Ovisno o polarnosti, faze mogu biti polarne (vodena – V) i nepolarne (uljna - U) te u tome smislu razlikujemo 3 tipa nanoemulzija: U/V nanoemulzije u kojima je uljna faza dispergirana u vodenoj fazi, V/U nanoemulzije u kojima je vodena faza dispergirana u uljnoj fazi te višestruke nanoemulzije (V/U/V). Najviše se istražuju nanoemulzije U/V tipa. U/V i V/U nanoemulzije prikazane su na slici 1. S obzirom na površinski naboj kapljica, nanoemulzije se dijele na neutralne, anionske i kationske. Moguće su također i razne modifikacije pa tako postoje i primarne, sekundarne i tercijarne nanoemulzije. Kod primarnih nanoemulzija, uljna faza je emulgirana vodenom fazom pomoću (ionskog) surfaktanta, dok se kod sekundarnih nanoemulzija oko kapljica nalazi suprotno nabijeni elektrolit. Oblaganjem sekundarnih nanoemulzija suprotno nabijenim polielektrolitom ili polimerom nastaju tercijarne nanoemulzije (Rai i sur., 2017).



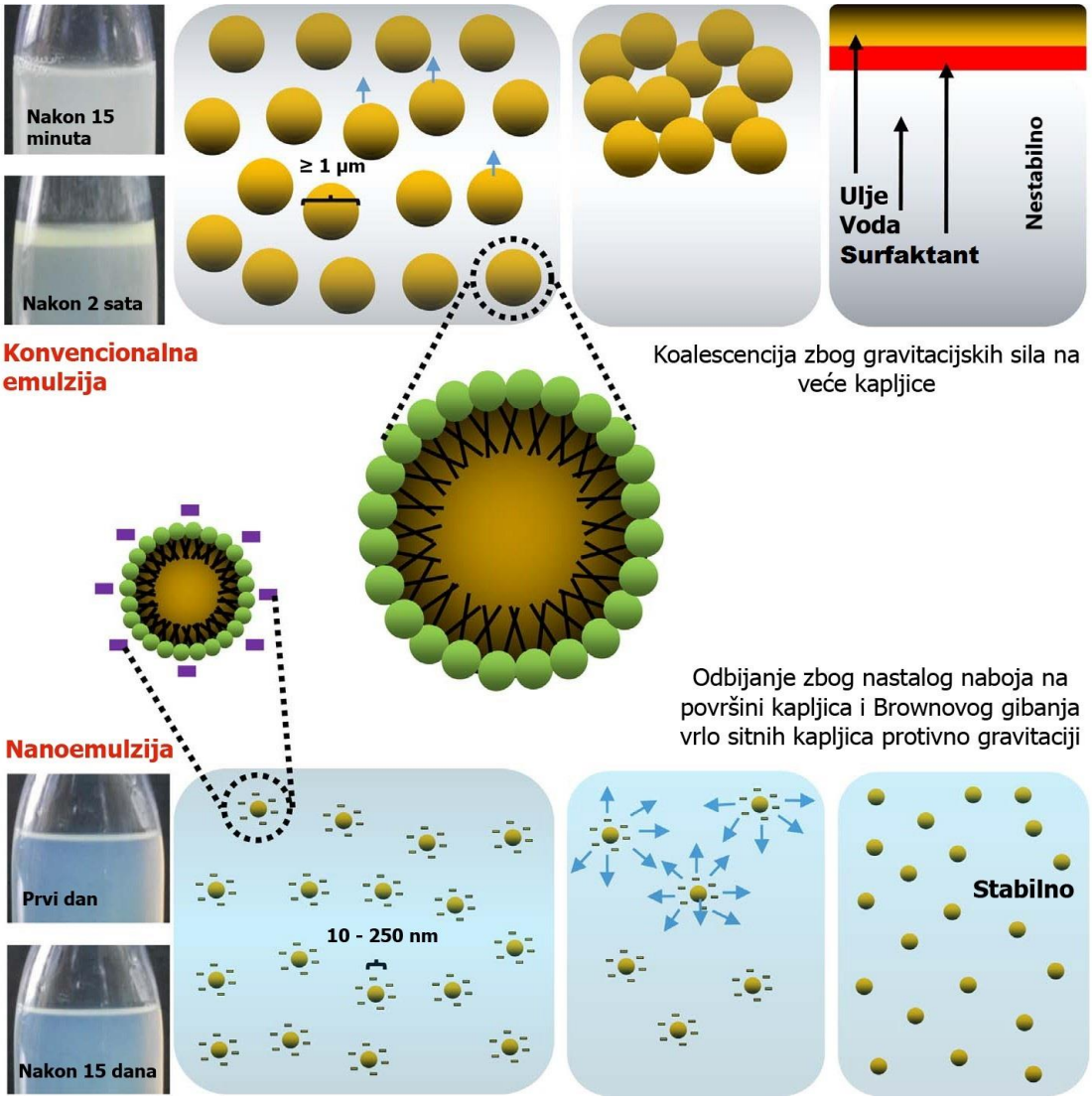
Slika 1. Struktura U/V i V/U nanoemulzija (preuzeto iz reference (Singh i sur., 2017))

U usporedbi s konvencionalnim emulzijama, nanoemulzije posjeduju brojne prednosti kao što su visoka stabilnost, značajno veća ukupna međupovršina između faza, potreba za manjom količinom organskog otapala u pripravi, značajnije povećanje topljivosti lijekova i posljedično bioraspoloživosti te visok kapacitet uklapanja i hidrofilnih i hidrofobnih lijekova zbog prisutnosti filma molekula surfakatnata na granici faza (Rai i sur., 2017). Visoka stabilnost posljedica je površinskog naboja, Brownovog gibanja vrlo malih kapljica i kinetičke stabilnosti prema sedimentaciji, flokulaciji i koalescenciji što povećava otpornost prema vrhnjenju (slika 2). Mala veličina kapljica i manja međufazna površinska napetost poboljšavaju interakciju sa staničnim membranama, solubilizaciju lipidne barijere ili fuziju s lipidnim dvoslojem što rezultira boljom apsorpcijom i bioraspoloživošću uklopljenog lijeka.

Nanoemulzije se mogu oblikovati u nekoliko farmaceutskih oblika odnosno tekuće oblike, kreme, sprejeve, gelove, aerosole i pjene (Singh i sur., 2017). Mogu se primjenjivati različitim putovima primjene što uključuje topikalnu primjenu na kožu, oralnu, intravensku, intranazalnu, pulmonalnu i oftalmičku primjenu.

Nanoemulzije za parenteralnu primjenu otapaju i štite lijek od oksidacije, pH i hidrolize, omogućuju ciljanu dostavu te izbjegavanje mononuklearno-fagocitnog sustava. Prilikom oralne primjene povećana je bioraspoloživost slabo topljivih lijekova zbog povećane topljivosti lijeka

u nanoemulzijama te poboljšane apsorpcije. Pri oralnoj primjeni, neke nanoemulzije dodatno podliježu direktnoj limfatičkoj apsorpciji izbjegavajući time metaboliziranje prvim prolaskom kroz jetru što rezultira većom bioraspoloživošću i smanjenjem doze lijekova koji podliježu hepatičkoj transformaciji. Također mogu maskirati gorak i metalan okus lijekova u ustima što inače uzrokuje mučninu i smanjenu suradljivost pacijenata (Singh i sur., 2017).



Slika 2. Razlike između konvencionalnih emulzija i nanoemulzija (preuzeto iz reference (Rai i sur., 2017))

1.2. Komponente nanoemulzija

Glavne komponente nanoemulzija su ulja, surfaktanti i vodena faza (Jaiswal i sur., 2015). Bitno je da komponente koje se koriste za pripravu nanoemulzija za ljudsku upotrebu budu netoksične te je poželjno da se nalaze na GRAS (engl. *Generally recognized as safe*) listi (Singh i sur., 2017).

1.2.1. Ulja / lipidi

Izbor uljne faze pri izradi nanoemulzija uglavnom ovisi o topljivosti lijeka u njoj te toksičnosti odnosno biokompatibilnosti samog ulja. Osim toga, vrsta ulja u formulaciji može utjecati i na bioraspoloživost lijeka. Nanoemulzije U/V tipa općenito sadrže između 2 i 20% ulja, ovisno o mjestu primjene (Singh i sur., 2017; Rai i sur., 2017). Moguća je upotreba i kombinacije različitih ulja. Najčešće se koriste reesterificirane frakcije ulja kao što su sojino, sezamovo, kokosovo i rižino ulje te ulje šafranike i sjemenki pamuka (Singh i sur., 2017) koje se označavaju kao dugolančani (engl. *long chain triglycerides*, LCT), srednjelančani (engl. *medium chain triglycerides*, MCT) i kratkolančani (engl. *short chain triglycerides*, SCT) trigliceridi.

1.2.2. Surfaktnati

Surfaktanti omogućuju nastanak i stabiliziraju nanoemulzije smanjujući međufaznu površinsku napetost i sprječavajući agregaciju kapljica (Singh i sur., 2017). To su organske amfipatske molekule koje sadrže barem jednu polarnu (hidrofilnu) i nepolarnu (hidrofobnu) skupinu u svojoj strukturi. Hidrofilnim dijelom surfaktant je topljiv u polarnim otapalima, primjerice voda, dok je lipofilnim dijelom topljiv u nepolarnim otapalima kao što su ulja. Polarna skupina može biti bez naboja ili može nositi pozitivan ili negativan naboj ili kombinaciju. Shodno tome razlikujemo neionske, kationske, anionske i amfoterne surfaktante (Gecol, 2006). Parametar koji opisuje udio hidrofilnih i lipofilnih dijelova u strukturi surfaktanta je HLB (engl. *hydrophilic*/*lipophilic balance*) vrijednost. Pomoću te vrijednosti moguće je pretpostaviti topljivost surfaktanta i ponašanje na granici faza ulje/voda (Klang i Valenta, 2011). Što je HLB vrijednost viša, to je surfaktant hidrofilniji. Za pripravu U/V nanoemulzija najprikladniji su neionski surfaktanti HLB vrijednosti 8-16 (Rai i sur., 2017).

Surfaktanti stabiliziraju nanoemulzije tako što se adsorbiraju na međupovršini između faza i smanjuju površinsku napetost, s time da se hidrofilni dio orijentira prema vodenoj fazi, a hidrofobni prema uljnoj fazi. Nakon adsorpcije trebaju pružiti dovoljne sile odbijanja da spriječe agregaciju kapljica. To mogu postići steričkim i elektrostatskim odbijanjem, ili pak

kombinacijom navedenih (Slika 1) (Singh i sur., 2017). Ionski surfaktanti pružaju elektrostatsku stabilizaciju, a neionski steričku (Silva i sur., 2015). Neionski surfaktanti su također manje toksični i iritirajući od ionskih surfaktanata, naročito kationskih. Vrlo često koristi se kombinacija različitih surfaktanata.

Surfaktani osim što određuju fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija (npr. veličina kapljica, polidisperznost) i njihovu stabilnost također mogu utjecati na njihovu toksičnost, farmakokinetička i farmakodinamička svojstva lijeka (Singh i sur., 2017).

Kao surfaktanti često se koriste lecitin, natrijev deoksilat, Cremophor EL, polisorbati (surfaktanti iz skupine Tween), sorbitanski esteri (surfaktanti iz skupine Span), poloksameri, natrijev dodecilsulfat, kazein, β-laktogobulin, polisaharidi i kopolimeri koji sadrže polietilenglikol (PEG) (Singh i sur., 2017).

Surfaktantima se mogu dodati i kosurfaktanti koji dodatno stabiliziraju površinu između faza i povećavaju mobilnost ugljikovodičnih lanaca te entropiju cijelog koloidnog sustava. Najčešće se kao kosurfaktanti koriste alkoholi s 3-8 C atoma kao što su propanol, glicerol, etilenglikol i drugi.

Polimeri (hidrofilni koloidi) kao što su primjerice kitozan, arapska guma i alginat koriste se kao pseudoemulgatori odnosno kao polielektroliti za pripravu sekundarnih i tercijarnih nanoemulzija (nanoemulzija temeljenih na biopolimerima). Upotrebljavaju se u svrhu povećanja viskoznosti, kontrole oslobađanja lijeka, modifikacije površinskog naboja kapljica odnosno produljenog zadržavanja na mjestu apsorpcije (Singh i sur., 2017; Rai i sur., 2017).

1.2.3. Konzervansi, antioksidansi i ostali stabilizatori

U svrhu očuvanja mikrobiološke stabilnosti u uljnoj i vodenoj fazi nanoemulzijama se mogu dodati konzervansi u učinkovitoj koncentraciji u obje faze. Konzervansi bi trebali imati nisku toksičnost, stabilnost tijekom zagrijavanja i skladištenja, fizičku i kemijsku kompatibilnost, prihvatljivu cijenu, prihvatljiv miris, okus i boju te širok antimikrobni spektar. Upotreba konzervansa kod parenteralnih nanoemulzija se uglavnom izbjegava zbog potencijalne toksičnosti, dok se kod oftalmičkih nanoemulzija upotrebljavaju alkoholi kao što je klorbutanol i 2-fenoksietanol. Fenoli i kvarterni amonijevi spojevi koriste se kao konzervansi širokog spektra (Singh i sur., 2017).

U kontaktu sa zrakom, ulja i lipidi podliježu autooksidaciji kao i mnogi lijekovi koji se uklapaju u nanoemulzije. Da bi se to spriječilo, u formulaciju se dodaju antioksidansi koji djeluju kao reducirajući agensi (primjerice askorbinska kiselina, tiourea), blokirajući agensi

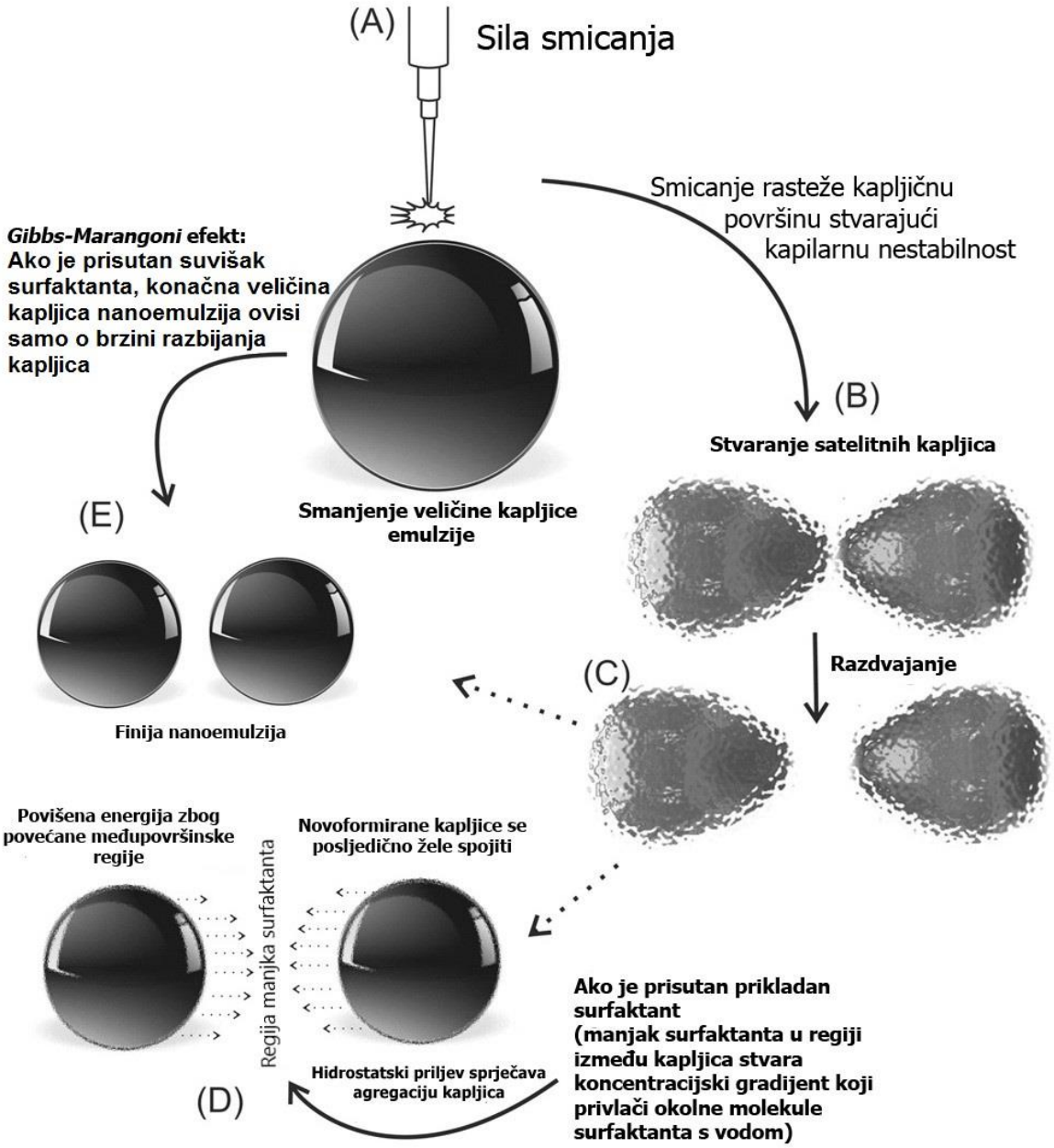
(primjerice esteri askorbinske kiseline, tokoferoli) i sinergisti (primjerice askorbinska, fosforna, limunska i vinska kiselina) (Singh i sur., 2017).

S obzirom da su nanoemulzije uglavnom transparentne, to omogućuje cijelom spektru zračenja, uključujući vidljivo i UV zračenje, da prodire kroz sustav i katalizira fotodegradaciju lijeka. Zbog toga je ponekad potreban dodatak kelirajućih agensa, pH stabilizatora ili UV protektanata (Singh i sur., 2017).

1.3. Metode priprave nanoemulzija

Prije priprave nanoemulzija, bitno je odabrati prikladnu metodu kojom će se pripraviti kao i optimalnu brzinu miješanja odnosno silu smicanja. Osim toga, odabir ekscipijensa i djelatne tvari, njihove koncentracije te i sam redoslijed njihovog dodavanja imaju odlučujući utjecaj na konačna fizičko-kemijska svojstva pripravljenih nanoemulzija (Rai i sur., 2017). Glavni cilj kod priprave nanoemulzija je dobivanje kapljica željene veličine s monomodalnom distribucijom što će osigurati uniformnost svojstava (Singh i sur., 2017).

Nastanak nanoemulzija detaljno je pojašnjen u preglednom radu Singh i suradnika (Singh i sur., 2017). Veličina primijenjene sile smicanja direktno će utjecati na veličinu nastalih kapljica. Velika sila smicanja na disperznu fazu drugom tekućinom kojom se ne miješa rasteže površinu kapljica od sferičnog do elipsoidnog pa sve do plosnatog oblika zvona. Potaknuto međufaznom napetošću stvara se kapilarna nestabilnost koja vodi razdvajanju prvotne kapljice na manje satelitne kapljice što rezultira smanjenjem veličine. Bitnu ulogu u ovom koraku ima surfaktant koji zbog svoje amfipatske strukture i sposobnosti da smanji međufaznu napetost stabilizira novonastale kapljice i omogućuje dugoročnu stabilnost. To postiže Gibbs-Marangoni efektom. Naime, razbijanjem kapljice na dvije manje kapljice stvara se nova površina koja narušava termodinamičku ravnotežu sustava povećanjem površinske energije. Jedan način da se ta energija smanji je ponovno spajanje nastalih kapljica. Na njihovom putu prema ponovnom spajanju kapljice adsorbiraju molekule surfaktanta smanjujući međufaznu napetost. No ta adsorpcija nije ravnomjerna s obzirom da u području između kapljica ima manje molekula surfaktanta nego u okolnoj regiji. Ta neravnomjerna adsorpcija stvara gradijent koji privlači nove molekule surfaktanta u područje između kapljica. Viskozno povlačenje stvoreno naglim naletom molekula surfaktanata povlači vodu stvarajući hidrostatski priljev koji sprječava ponovno spajanje kapljica (slika 3). Jačina Gibbs-Marangoni efekta ovisi o koncentraciji surfaktanta i Gibbsovoj elastičnosti međupovršine. Stoga, ako je prisutan suvišak surfaktanta, ponovno spajanje kapljice postaje neznatno pa konačna veličina kapljica ovisi samo o stupnju razbijanja kapljica.



Slika 3. Gibbs-Marangoni efekt kod priprave nanoemulzija (preuzeto iz reference (Singh i sur., 2017))

Relativne viskoznosti disperzne faze i disperznog sredstva također imaju značajan utjecaj na proces smanjenja veličina kapljica. Ako je relativna viskoznost previsoka, kapljice postaju otporne na razbijanje te se pod utjecajem sile smicanja vrte oko svoje osi. Nanoemulzije pripravljene s viskoznim uljima imaju veće kapljice te se one mogu smanjiti povećanjem viskoznosti disperznog sredstva prilikom priprave (Singh i sur., 2017).

Da bi došlo do stvaranja dovoljno malih kapljica, za pripravu nanoemulzija potrebna je energija. Ovisno o izvoru te energije metode priprave nanoemulzija dijele se u dvije skupine:

visokoenergetske metode kod kojih je potrebna energija dobivena od vanjskog izvora kao što su mehanički uređaji, i niskoenergetske metode kod kojih potrebna energija potječe od kemijskog potencijala komponenata samog sustava. Veličina dobivenih kapljica kod visokoenergetskih metoda ovisi o količini utrošene energije, dok kod niskoenergetskih veličina ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima sustava.

1.3.1. Visokoenergetske metode

Za pripravu nanoemulzija visokoenergetskim metodama potrebni su mehanički uređaji koji će proizvest snažne razorne sile koje razbijaju vodenu i uljnu fazu u sitne kapljice. Najčešće korišteni uređaji ove metode su mikrofluidizatori, visokotlačni homogenizatori i ultrasonikatori. Njihova prednost leži u tome što je moguće koristiti gotovo svako ulje u izradi nanoemulzija ovim metodama (Singh i sur., 2017). Nanoemulzije pripravljene visokoenergetskim metodama su termokinetički stabilne (Rai i sur., 2017; Singh i sur., 2017). Nedostatak visokoenergetskih metoda je visoka cijena uređaja i generiranje visokih temperatura tijekom samog procesa što isključuje upotrebu mnogih termolabilnih lijekova.

Mikrofluidizatori se sastoje od interakcijske komore u kojima se nalazi sustav mikrokanala. Kroz taj sustav mikrokanala se propušta gruba emulzija pod visokim tlakom postižući veliku brzinu što zbog sile smicanja sa stijenkama i sile međusobnog sudaranja kapljica emulzije rezultira smanjenjem veličine kapljica. Gruba emulzija se uglavnom propušta više puta kroz mikrofluidizator dok se ne postigne zadovoljavajuća veličina kapljica i polidisperznost (Singh i sur., 2017).

Visokotlačni homogenizatori imaju sličan princip rada kao i mikrofluidizatori. Visokotlačna pumpa velikom brzinom tjera grubu emulziju kroz vrlo sitan otvor gdje dolazi do razbijanja velikih kapljica u manje pod utjecajem visoke sile smicanja. Proces se, kao i kod mikrofluidizatora, ponavlja do zadovoljavajuće veličine kapljica i polidisperznosti (Gupta i sur., 2016).

Ultrasonikatori se sastoje od piezoelektrične sonde koja se uranja u grubu emulziju i stvara visokoenergetske valove frekvencije iznad 20 kHz. Njihovim djelovanjem dolazi do kavitacije i stvaranja mlaza okolne tekućine koji usitnjava kapljice. U usporedbi s ostalim visokoenergetskim metodama, ultrasonikacija zahtjeva najmanji utrošak energije. Nedostatak te metode je moguća kontaminacija emulzije uzrokovana uranjanjem sonde (Singh i sur., 2017).

1.3.2. Niskoenergetske metode

Niskoenergetske metode se temelje na unutarnjoj kemijskoj energiji sustava za stvaranje kapljica nanometarske veličine. U usporedbi s visokoenergetskim metodama, više su ekološki prihvatljivije jer ne zahtijevaju skupe uređaje te su prikladnije za labilne lijekove i molekule kao što su proteini i nukleinske kiseline s obzirom da zahtijevaju niže radne temperature. Isto tako uglavnom rezultiraju nanoemulzijama kapljica manje veličine od onih dobivenih visokoenergetskim metodama (García-Celma i sur., 2016). Nedostatak tih metoda je ograničavajući izbor ulja i surfaktanata koji se mogu koristiti (Singh i sur., 2017). Nanoemulzija pripravljene niskoenergetskim metodama su termodinamički stabilne (Rai i sur., 2017). Princip emulgiranja ovim metodama temelji se na mijenjanju parametara kao što su temperatura i sastav koji utječu na HLB vrijednost sustava (Rai i sur., 2017). Niskoenergetske metode se dijele u dvije kategorije, metode spontanog emulgiranja i metode fazne inverzije.

Metoda spontanog emulgiranja uključuje pripravu dvije faze. Jedna je vodena faza, a druga uljna faza s djelomice vodotopljivim organskim otapalom kao što je aceton. Obje faze mogu sadržavati surfaktant. Polaganim dodavanjem uljne faze u vodenu dolazi do difuzije organskog otapala u vodenu fazu ostavljajući za sobom sitne kapljice uljne faze koje odmah bivaju prekrivene molekulama surfaktanta. Ponekad je potrebna upotreba blagog miješanja na magnetnom mješaču. Također je moguće i dodavanje vodene faze u uljnu fazu. Za pripravu jako malih kapljica obično je potreban veći udio organskog otapala u uljnoj fazi (Singh i sur., 2017).

Metoda temperature fazne inverzije (engl. *phase inversion temperature*, PIT) temelji se na specifičnom svojstvu surfaktanata osjetljivih na temperaturu da mijenjaju afinitet odnosno topljivost u vodi i ulju ovisno o temperaturi sustava. Tako primjerice etoksilirani surfaktanti koji su pri niskoj temperaturi hidrofilni i daju U/V emulziju, zagrijavanjem postaju sve hidrofobniji (Rai i sur., 2017). Nakon kritične temperature fazne inverzije ili PIT dolazi do inverzije i sada lipofilni surfaktant daje V/U emulziju. Sustav se zatim naglo ohladi dajući kinetički stabilnu U/V nanoemulziju s uskom raspodjelom veličina kapljica. Isti postupak se može primijeniti i za pripravu V/U nanoemulzija. S obzirom da je potrebno dovođenje topline, upotreba termolabilinh lijekova je ograničena (Singh i sur., 2017; Rai i sur., 2017).

1.4. Stabilnost nanoemulzija

Stabilnost se može definirati kao sposobnost sustava da zadrži svoja svojstva nepromijenjena tijekom vremena ili pod utjecajem vanjskih faktora (García-Celma i sur., 2016).

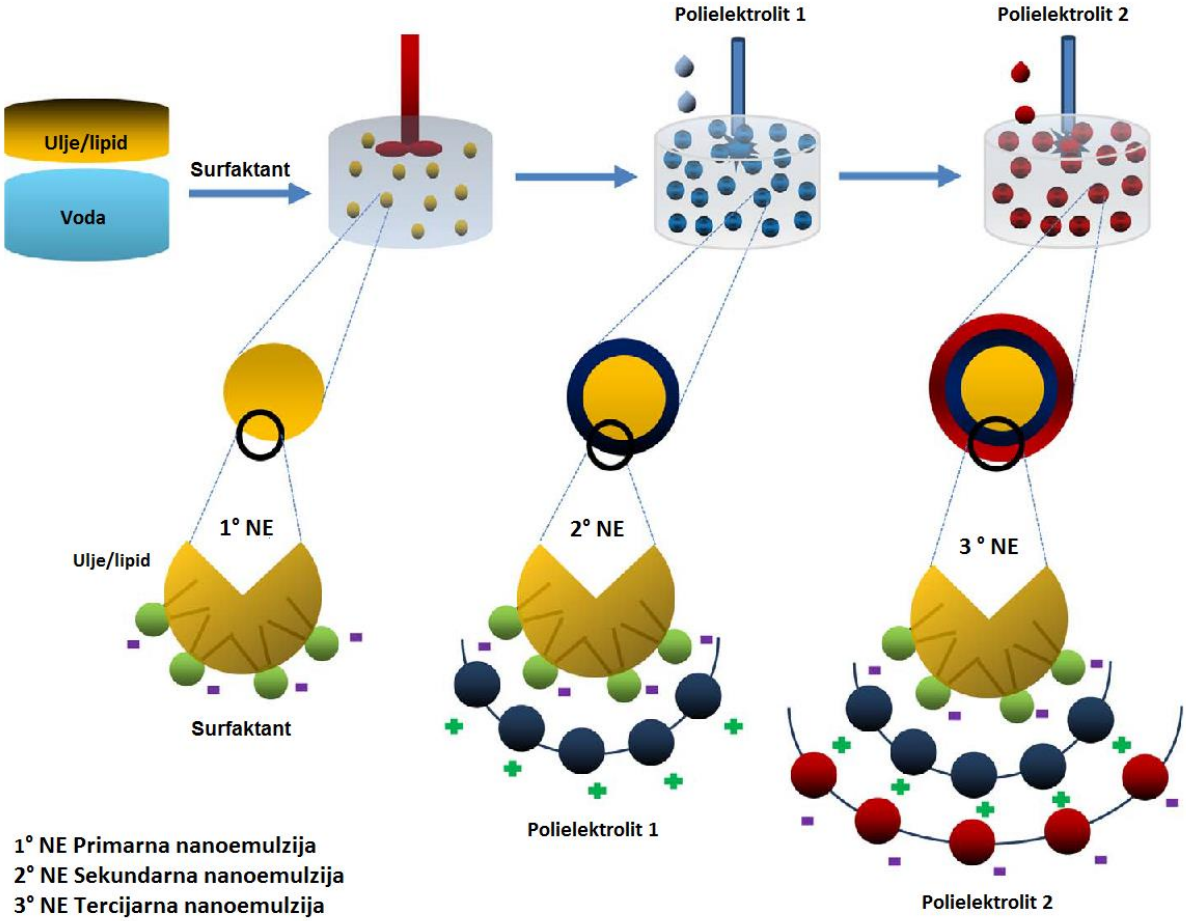
Nanoemulzije su termodinamički nestabilni sustavi jer je slobodna energija nanoemulzije veća od slobodne energije odvojenih faza, dakle vode i ulja. Prema drugome zakonu termodinamike, sustav teži najnižoj mogućoj razini slobodne energije pa s vremenom dolazi do destabilizacije što dovodi do odvajanja faza procesima kao što su flokulacija, vrhnjenje, sedimentacija i koalescencija. Ipak, nanoemulzije mogu biti metastabilne određeni vremenski period ako su kinetički stabilne. Kinetička stabilnost sustava ovisi o energetskim barijerama i fenomenu transporta mase. Ako postoje energetske barijere između dva stanja, disperzije i odvojenih faza, proces prijelaza jednog u drugi će biti sporiji. Što je energetska barijera viša, to će nanoemulzija dulje vrijeme biti stabilna. Visina energetske barijere uglavnom ovisi o fizičko-kemijskim fenomenima koji sprječavaju da kapljice dođu u neposrednu blizinu. To su na primjer odbojne hidrodinamičke i koloidne (steričke, elektrostatske) interakcije. Brzina prijelaza u stanje odvojenih faza također ovisi o učestalosti kojom kapljice dolaze u međusobni kontakt pod utjecajem Brownovog gibanja, smicanja i gravitacijske sile (McClements, 2012).

Flokulacija je uzrokovana kolizijom kapljica. Ako privlačne sile kao što su van der Waalsove nadjačaju odbojne sile dolazi do flokulacije odnosno adherencije kapljica jedne na drugu. Ako se tako flokulirane kapljice sjedine zbog pucanja filma na granici faza, dolazi do povećanja veličine kapljica odnosno koalescencije. Koalescencija je ireverzibilan proces destabilizacije koji rezultira smanjenjem slobodne energije sustava zbog smanjenja međugranične površine. S druge pak strane, flokulacija i vrhnjenje su reverzibilni procesi jer se broj i veličina kapljica ne mijenja, već samo njihova distribucija. Vrhnjenje, kao i sedimentacija, rezultat su različite gustoće faza. Do vrhnjenja dolazi kada se veće kapljice penju prema površini nanoemulzije. Taj proces je moguće neutralizirati blagim protresivanjem (Klang i Valenta, 2011). Dovoljno mala veličina kapljica omogućuje otpornost nanoemulzija prema vrhnjenju i sedimentaciji (García-Celma i sur., 2016).

Glavni mehanizam destabilizacije nanoemulzija je Ostwaldovo zrenje. To je proces kod kojeg dolazi do povećanja veličine većih kapljica na račun manjih kapljica zbog razlike u kemijskom potencijalu kapljica disperzne faze različitih veličina. Kemijski potencijal manjih kapljica je veći od potencijala većih kapljica pa dolazi do prijenosa mase kroz disperzno sredstvo s manjih na veće kapljice. Time se veće kapljice povećavaju, a manje smanjuju (Gupta i sur., 2016). Zato su formulacije s užom raspodjelom veličine kapljica odnosno manjim

indeksom polidisperznosti otpornije na Ostwaldovo zrenje (Klang i Valenta, 2011). Stupanj Ostwaldovog zrenja direktno je proporcionalan topljivosti disperzne faze u disperznom sredstvu. Kod ulja, njihova topljivost u vodi linearno opada povećanjem njihovog molarnog volumena (Wooster i sur., 2008). Ostwaldovo zrenje se javlja u sustavima kod kojih veličina kapljica iznosi između 100 i 500 nm i manje. Stoga je ovaj mehanizam destabilizacije znatno prisutniji kod nanoemulzija u odnosu prema emulzijama (Klang i Valenta, 2011; Gupta i sur., 2016).

Stabilnost nanoemulzija može se povećati povećanjem elektrostatskog odbijanja kapljica. To se može postići uporabom ionskih surfaktanata koji će stvoriti visoko pozitivan ili negativan površinski naboj na kapljicama odnosno zeta potencijal koji će spriječiti njihovo približavanje i spajanje. U načelu, sustavi s jednim emulgatorom i zeta potencijalom od ± 30 mV pokazuju dobru stabilnost, dok je kod vrijednosti zeta potencijala od ± 60 mV njihova stabilnost odlična. Kratkotrajna stabilnost prisutna je ako je zeta potencijal oko ± 20 mV, a vrijednosti do ± 5 mV ukazuju na brzu agregaciju. Ako zeta potencijal nije dovoljno pozitivan ili negativan, mogu se dodati različiti nabijeni aditivi. Kao nositelji pozitivnog naboja u sustav se dodaju primjerice kitozan, stearilamin i oleilamin, dok se za postizanje negativnog upotrebljava deoksikolna kiselina (Klang i Valenta, 2011; Rai i sur., 2017). Kao što je na početku ovoga rada spomenuto, osim primarne nanoemulzije moguće je prirediti i sekundarne i tercijarne nanoemulzije. Sekundarne nastaju dodatkom suprotno nabijenog polielektrolita primarnim nanoemulzijama, a tercijarne dodatkom suprotno nabijenog polielektrolita sekundarnim nanoemulzijama (slika 4). Polielektroliti mogu biti proteini, polisaharidi, surfaktanti, škrob i drugi. Konačan površinski naboj kapljice uglavnom određuje polielektrolit koji stvari vanjski sloj (Rai i sur., 2017).



Slika 4. Prikaz primarne, sekundarne i tercijarne nanoemulzije (preuzeto iz reference (Rai i sur., 2017))

Neionski surfaktanti kao što su Cremophor EL ili Tween te površinski aktivni polimeri kao hidroksipropilmetilceluloza povećavaju stabilnost nanoemulzija steričkim odbijanjem kapljica. Osim steričke stabilizacije, polimeri također povećavaju viskoznost nanoemulzija i time otpornost prema vrhnjenju i agregaciji. Tween 80 i ostali hidrofilniji surfaktanti kao poloksameri uz steričku stabilizaciju povećavaju fleksibilnost filma na granici faza olakšavajući stvaranje kapljica nanometarskih veličina (Klang i Valenta, 2011).

Osim površinskog naboja kapljica, na stabilnost nanoemulzija utječe i izbor surfaktanata i veličina kapljica. Prikladan izbor surfaktanata dati će kapljice male veličine koje su elastične i mogu izdržati visok stupanj napetosti tijekom deformacije te su otporne prema gravitacijskoj sili (Rai i sur., 2017).

Izbor ulja također utječe na ukupnu stabilnost nanoemulzija. Slobodne masne kiseline prisutne u uljima kao što je ricinusovo mogu djelovati kao kosurfaktanti poboljšavajući svojstva uljne faze. Kemijskom degradacijom ulja mogu nastati razni razgradni produkti koji zatim mijenjaju prirodu filma na granici faza te posljedično stabilnost samog sustava. Osim toga, kao što je prije rečeno, formulacije kod kojih je ulje više topljivo u vodenoj fazi biti će podložnije Ostwaldovom zrenju (Klang i Valenta, 2011).

2. OBRAZLOŽNJE TEME

Iako se nanoemulzije intenzivno istražuju kao potencijalni terapijski sustavi još uvijek imamo relativno malo saznanja o njihovom razvoju, proizvodnji i manipulaciji. Naime, njihova svojstva se značajno razlikuju od svojstava emulzija. Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti nanoemulziju U/V tipa stabiliziranu neionskim i ionskim surfaktantom te polielektrolitom odnosno polikationom. Kao neionski surfaktant odabran je Cremophor EL, kao ionski surfaktant lecitin S45, a kao polikation kitozan. Kao uljna faza korišten je Miglyol 812, a same nanoemulzije pripravljene su visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije.

Specifični ciljevi bili su:

- ispitati utjecaj lecitina, Cremophora EL i kitozana te njihovih različitih udjela u formulaciji na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal pripravljenih nanoemulzija;
- ispitati utjecaj molekulske mase kitozana na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal pripravljenih kationskih nanoemulzija;
- ispitati stabilnost pripravljenih nanoemulzija s obzirom na različite udjele komponenata.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U izradi nanoemulzija korišteni su Miglyol 812 (Kemig, Hrvatska), lecitin S45 sojinog porijekla koji sadrži 45% fosfatidilkolina (Lipoid GmbH, Njemačka), Cremophor EL (BASF, Njemačka), kitozan niske molekulske mase (LMW, 50-190 kDa) i stupnja deacetilacije ≥75% (Sigma-Aldrich, SAD), kitozan srednje molekulske mase (MMW, 190-310 kDa) i stupnja deacetilacije ≥75% (Sigma-Aldrich, SAD), ledena octena kiselina (Alkaloid AD, Skopje, Makedonija) i pročišćena voda.

Kod mjerenja veličine kapljica korištena je pročišćena voda, dok je kod mjerenja zeta potencijala korištena 10 mM otopina NaCl.

Miglyol 812 je smjesa srednjelančanih triglicerida, točnije 55% triglicerida C_8 i 45% triglicerida C_{10} masnih kiselina. Pri temperaturi od 0 °C je tekućina te je visoko stabilan na oksidaciju. Blago žute je boje, netopljiv u vodi i bez mirisa (http://www.petercremerna.com).

Lecitin je smjesa fosfolipida koja se široko koristi kao anionski surfaktant u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji i biotehnologiji, naročito u izradi nanosustava. Prirodno je prisutan kao amfipatske molekule u staničnoj membrani biljaka i životinja. Karakterizira ga iznimna netoksičnost i biokompatibilnost te mogućnost uklapanja lipofilnih lijekova i njihovo produljeno oslobađanje (Klang i Valenta, 2011).

Cremophor EL (Kolliphor EL) je neionski surfaktant koji se sintetizira polietoksiliranjem ricinusovog ulja s etilenoksidom u molarnom omjeru 1:35. Njegova glavna komponenta je glicerol polietilenglikol ricinoleat koji zajedno s esterima masnih kiselina i polietilenglikola čine hidrofobni dio. Manji hidrofilni dio čine slobodni polietilenglikoli i etoksilirani glicerol. Na temperaturi iznad +26 °C je blijedo žuta, transparenta tekućina s blagim, ali karakterističnim mirisom (http://www.basf.com). HLB vrijednost mu iznosi 12-14 (Rowe, 2009; Baker i Naguib, 2005).

Kitozan je kationski biopolimer sa širokom upotrebom u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. On je heterogeni polisaharid koji se primarno sastoji od nenabijenog acetilglukozamina i glukozamina čiji pK_A amino skupina iznosi 6,3-7. Pri pH manjim od 6,5 kitozan postaje pozitivno nabijen (Helgason i sur., 2009). Dobiva se alkalnom deacetilacijom hitina, glavnog sastojka staničnih stijenki gljiva i egzoskeleta člankonožaca. Proces se može

kontrolirati pa je moguće dobiti kitozan različite molekularne težine (MW) i stupnja deacetilacije (DDA). Te karakteristike kitozana bitno utječu na njegova funkcionalna svojstva uključujući topljivost, viskoznost, površinsku aktivnost i kapacitet vezanja (Mun i sur., 2006). Da bi uklapanje pozitivno nabijenog kitozana na površinu kapljice nanoemulzije bilo moguće, potrebna je dovoljno negativno nabijena površina kapljice što se može postići upotrebom anionskog surfaktanta kao što je lecitin.

3.2. Metode

3.2.1. Izrada nanoemulzija

Sveukupno je izrađeno 21 formulacija U/V nanoemulzija. Pročišćena voda korištena je kao vodena faza, Miglyol 812 kao uljna faza, lecitin S45 kao nositelj negativnog naboja, kitozan kao nositelj pozitivnog naboja, a Cremophor EL kao neionski surfaktant. Točan sastav formulacija nanoemulzija prikazan je u Tablici 1.

Prvi korak u izradi nanoemulzija je odvaga lecitina S45 i ulja Miglyol 812 koji se zatim pomiješaju, otapaju i homogeniziraju na magnetnom mješaču do idućeg dana na brzini miješanja od otprilike 600 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, RPM). Pročišćena voda zagrije se do +50 °C te se doda u prethodno pripravljenu uljnu fazu također zagrijanu do navedene temperature. Pri pripravi formulacije koje sadrže Cremophor EL, u pročišćenu vodu se prije zagrijavanja dodaje Cremophor EL. Grube emulzije dobivene dodavanjem pročišćene vode u uljnu fazu potom su obrađene koristeći Ultra-Turrax dispergirajući uređaj (Ultra-Turrax T45, Janke & Kunkel Kg., Njemačka) u trajanju od 5 minuta pri 6000 RPM. Tako dobivene preemulzije obrađene su koristeći mikrofluidizator (Model M-110EH-30 Microfluidizer, Microfluidics, Newton MA, SAD) kroz 10 propuštanja pri temperaturi od približno +33 °C i tlaku od 1000 bara u trajanju od 6 minuta i 13 sekundi, što rezultira dobivanjem nanoemulzija. Za izradu nanoemulzija koje sadrže kitozan LMW ili MMW pripremi se 1%-tna otopina kitozana u 0,5%-tnoj otopini ledene octene kiseline te se zatim pomiješa s gotovom nanoemulzijom i, ovisno o potrebnom masenom udjelu, pročišćenom vodom. Sve dobivene nanoemulzije se čuvaju u dobro zatvorenim staklenim bočicama u hladnjaku pri +4 °C.

Tablica 1. Sastav izrađenih formulacija nanoemulzija

Naziv formulacije	**Maseni udio sastavnica (%)**				
	Miglyol 812	Lecitin S45	Cremophor EL	Kitozan LMW	Kitozan MMW
L1	5	0,1	-	-	-
L2	5	0,25	-	-	-
L3	5	0,5	-	-	-
L4	5	0,75	-	-	-
L1 C1	5	0,1	0,25	-	-
L1 C2	5	0,1	0,5	-	-
L1 C3	5	0,1	1	-	-
L1 C4	5	0,1	2	-	-
L1 C5	5	0,1	2,5	-	-
L1 C2 KL1	2,5	0,05	0,25	0,05	-
L1 C2 KL2	2,5	0,05	0,25	0,1	-
L1 C2 KL3	2,5	0,05	0,25	0,2	-
L1 C2 KL4	2,5	0,05	0,25	0,3	-
L1 C2 KL5	2,5	0,05	0,25	0,4	-
L1 C2 KL6	2,5	0,05	0,25	0,5	-
L1 C2 KM1	2,5	0,05	0,25	-	0,05
L1 C2 KM2	2,5	0,05	0,25	-	0,1
L1 C2 KM3	2,5	0,05	0,25	-	0,2
L1 C2 KM4	2,5	0,05	0,25	-	0,3
L1 C2 KM5	2,5	0,05	0,25	-	0,4
L1 C2 KM6	2,5	0,05	0,25	-	0,5

3.2.2. Mjerenje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti

Nanoemulzije su prije mjerenja veličine kapljica i indeksa polidisperznosti razrijeđene pročišćenom vodom prethodno filtriranom kroz membranski mikrobakteriološki fiilter veličine pora 0,45μm (Spritzen- /Syringe-Filter 0,45μm, TPP, Švicarska). Razrjeđenja su iznosila 500x, 1000x i 2000x.

Mjerenja su obavljena pomoću uređaja Malvern Zetasizer 3000HSa (Malvern Instruments, Malvern, UK) pri temperaturi od 25 °C u jednokratnim polistirenskim kivetama. Uređaj radi na principu fotonske korelacijske spektroskopije (engl. *Photon Correlation Spectroscopy*, PCS). Kapljice Miglyola 812 su u konstantnom nasumičnom gibanju unutar nanoemulzije zvanom Brownovim gibanjem. Obasjavanjem kapljica s 10 mW He-Ne laserom uređaja dolazi do raspršenja svjetlosti različitim intenzitetom i pod različitim kutem zbog Brownovog gibanja i veličina kapljica. Raspršene zrake svjetlosti se prikupljaju pod kutom od 90°. Mjerenjem i analiziranjem fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti uređaj izračunava veličinu kapljica.

Rezultati se prikazuju kao prosječna veličina kapljica (engl. *Z-Average, Z-Ave*) i indeks polidisperznosti (engl. *Polydispersity index*, PDI) (O'Neal i sur., 1998).

PDI je bezjedinična mjera raspodjele veličine kapljica koja govori o homogenosti disperzije. Može imati vrijednost između 0 i 1, gdje 0 predstavlja monodisperzan sustav, a njegovim povećanjem i približavanjem vrijednosti 1 smanjuje se homogenost sustava.

3.2.3. Mjerenje zeta potencijala

Nanoemulzije su prije mjerenja zeta potencijala razrijeđene 10 mM otopinom NaCl prethodno filtriranom kroz membranski mikrobakteriološki filter veličine pora 0,45μm (Spritzen- /Syringe-Filter 0,45μm, TPP, Švicarska). Razrjeđenja su iznosila 200x, 500x i 1000x.

Mjerenja su obavljena pomoću uređaja Malvern Zetasizer 3000HSa (Malvern Instruments, Malvern, UK) pri temperaturi od 25 °C na principu fotonske korelacijske spektroskopije. Vrijednosti zeta potencijala, koji opisuje potencijal između emulgirane kapljice ulja s njezinim difuzijskim slojem iona i disperznog sredstva, dobiju se mjerenjem elektroforetske pokretljivosti kapljica.

Uzorak razrijeđene nanoemulzije nalazi se unutar elektroforetske čelije. Primjenom električnog polja na nanoemulziju dolazi do gibanja nabijenih čestica prema elektrodi suprotnog naboja pod utjecajem privlačnih elektrostatskih sila. Suprotno na to gibanje čestica djeluju sile viskoznosti. Nakon uspostave ravnoteže između navedenih suprotstavljenih sila, čestice se kreću konstantnom brzinom. Ta brzina, zvana elektroforetska pokretljivost, ovisi o jakosti električnog polja, dielektričnoj konstanti, viskoznosti disperznog sredstva i zeta potencijalu. Čestice u gibanju obasjane laserskim zrakama koje se križaju raspršuju svjetlost čiji intenzitet fluktuira frekvencijom ovisnom o brzini gibanja. Detekcijom fotona svjetlosti dobije se spektar frekvencije iz kojeg se izračuna elektroforetska pokretljivost. Primjenom Smoluchowskijeve aproksimacije, iz izmjerene elektroforetske pokretljivosti dobije se zeta-potencijal (engl. *Zeta-potential*, ZP):

$$U_E = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta}$$

gdje je U_E elektroforetska pokretljivost, ε dielektrična konstanta disperznog sredstva, ζ zeta potencijal, a η viskoznost disperznog sredstva (Zetasizer 2000/3000: Priručnik za uporabu, 2000).

3.2.4. Ispitivanje stabilnosti

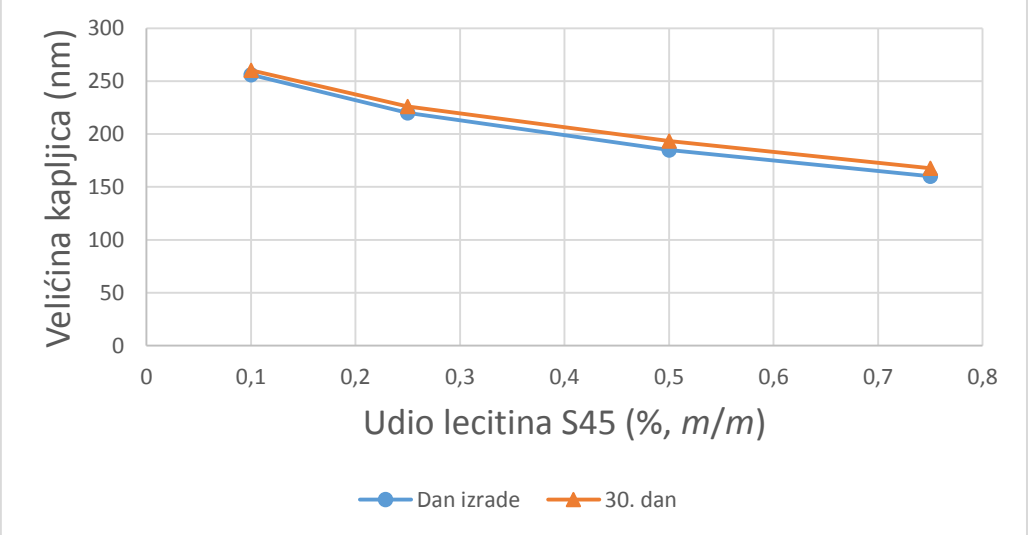
U svrhu ispitivanja stabilnosti, pripremljenim nanoemulzijama su ponovno izmjerene veličine kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal 30 dana nakon njihove izrade. Sve nanoemulzije su između mjerenja čuvane u dobro zatvorenim staklenim bočicama u hladnjaku pri temperaturi od +4°C. Osim toga, neposredno prije opetovanog mjerenja, nanoemulzije su vizualno pregledane s ciljem uočavanja mogućeg odvajanja faza.

4. REZULTATI I RASPRAVA

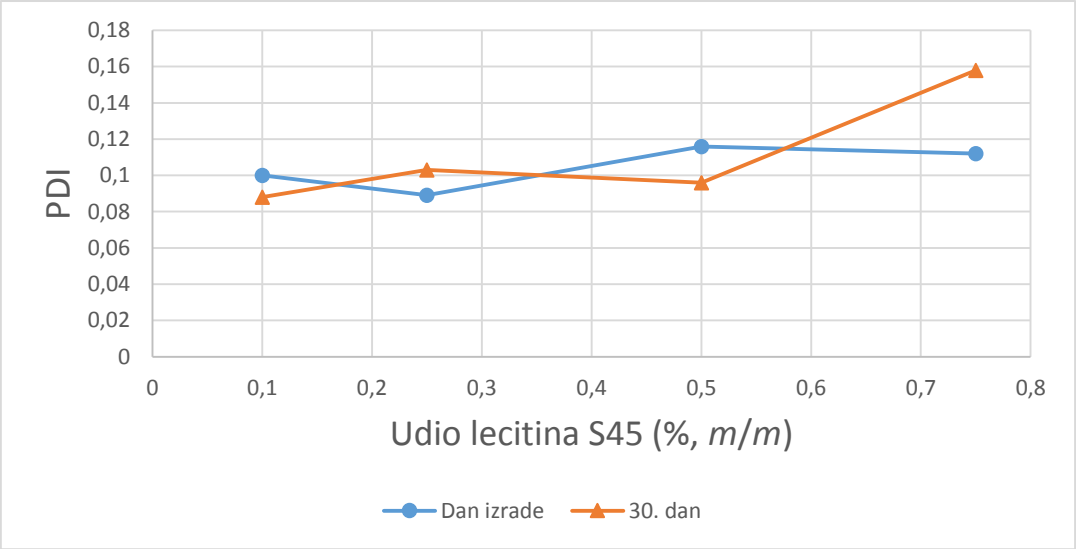
4.1. Priprava nanoemulzija stabiliziranih ionskim surfaktantom

Razvoj nanoemulzije u sklopu ovog diplomskog rada započet je pripravom nanoemulzije s Miglyolom 812 kao uljnom fazom i lecitinom S45 kao ionskim surfaktantom. Udio Miglyola 812 u svakoj nanoemulziji iznosio je 5%, dok je udio lecitina S45 redom iznosio 0,1%, 0,25%, 0,5% i 0,75% (*m*/*m*). Glavni razlog korištenja lecitina S45 je dobivanje negativnog površinskog naboja na kapljicama uljne faze. Taj površinski naboj potječe od negativno nabijenih fosfolipida lecitina, naročito slobodnih masnih kiselina i fosfatidne kiseline (Klang i Valenta, 2011). Dodatak lecitina S45 omogućuje oblaganje dispergiranih kapljica ulja pozitivno nabijenim kitozanom posredovano elektrostatskom interakcijom (Li i sur., 2016).

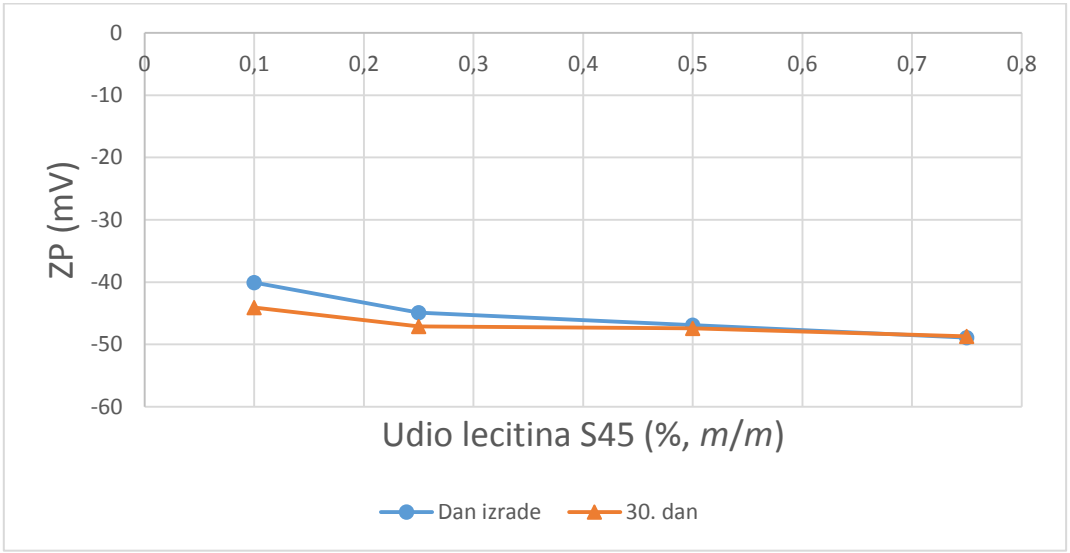
Sve 4 nanoemulzije s lecitinom su nakon obrade mikrofluidizatorom poprimile mliječno bijelu boju s blago plavičastim odsjajem zbog Rayleighovog raspršenja, što je karakteristično za nanoemulzije (slika 5) (Klang i Valenta, 2011). Također nije primijećeno odvajanje faza. Svakoj nanoemulziji je na dan izrade izmjerena veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Nakon 30 dana čuvanja na +4°C mjerenja su ponovljena u svrhu ispitivanja stabilnosti. Rezultati su prikazani u sljedećim grafičkim prikazima:



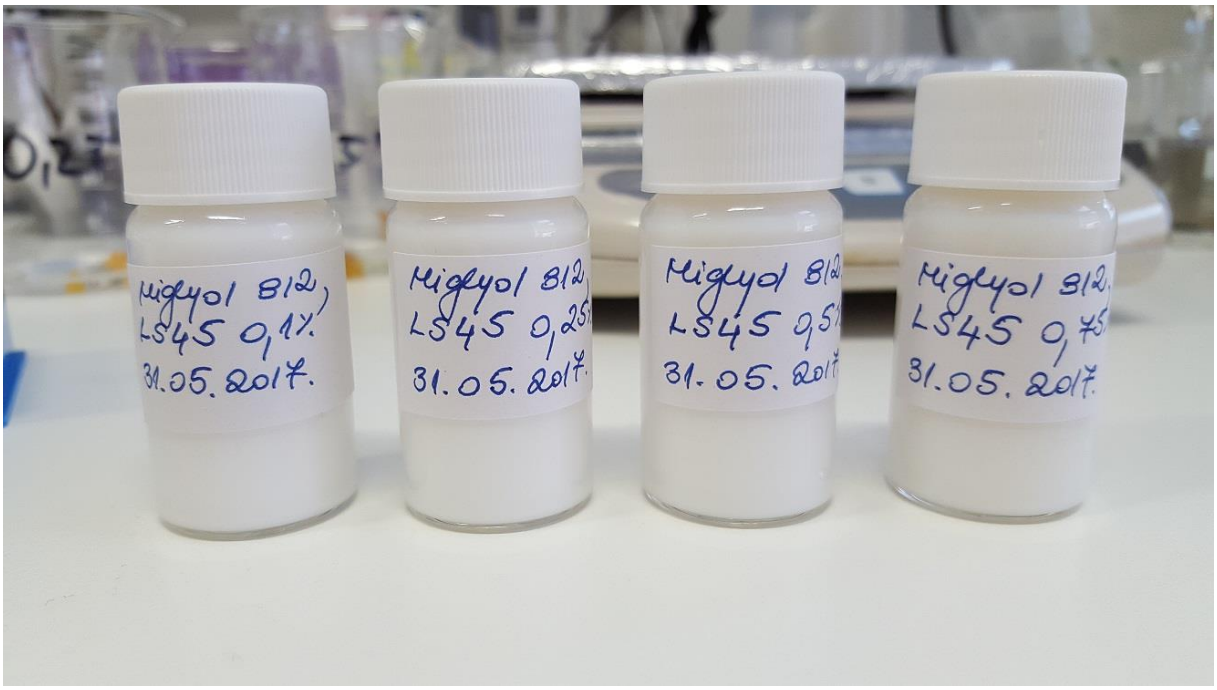
Slika 5. Ovisnost prosječne veličine kapljica ulje faze nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45) o udjelu lecitina S45.



Slika 6. Ovisnost indeksa polidisperznosti nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45) o udjelu lecitina S45.



Slika 7. Ovisnost zeta potencijala nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45) o udjelu lecitina S45.



Slika 8. Nanoemulzije s Migloylom 812 i lecitinom S45, dan izrade.

Iz dobivenih rezultata daje se zaključiti da su uspješno pripremljene nanoemulzije prosječne veličine kapljica uljne faze u nanometarskom području. Isto tako se može primijetiti pad srednje veličine kapljica od 256 nm do 160 nm s porastom koncentracije lecitina od 0,1% do 0,75% što je u skladu s očekivanjima u usporedbi s rezultatima istraživanja Zhou i sur. (Zhou i sur., 2009) te Đorđević i sur. (Đorđevic i sur., 2013). Mjerenja 30 dana nakon izrade nanoemulzija pokazuju neznatni porast veličine kapljica te se shodno tome može smatrati da su nanoemulzije ostale stabilne nakon 30 dana.

Mjerenjem indeksa polidisperznosti dobiveni su rezultati s vrijednostima oko 0,1 što ukazuje na zadovoljavajuću kvalitetu nanoemulzije odnosno visoku homogenost te usku raspodjelu veličine kapljica (Klang i Valenta, 2011; Đorđevic i sur., 2013). Iz rezultata se još može vidjeti da PDI ne ovisi o koncentraciji lecitina što također vrijedi i za rezultate dobivene mjerenjem 30 dana nakon izrade nanoemulzija koji se nisu znatno promijenili te su i dalje imali vrijednost manju od 0,2.

Vrijednosti zeta potencijala dobivenih mjerenjem nalaze se između -40 i -50 mV što su zadovoljavajuće negativne vrijednosti za kasnije uklapanje pozitivno nabijenog kitozana u formulaciju te također ukazuju na dobru fizičku stabilnost nanoemulzija i otpornost prema flokulaciji i koalescenciji. Tome doprinosi elektrostatsko odbijanje kapljica s negativnim površinskim nabojem koji potječe od lecitina odnosno njegovih negativno nabijenih fosfolipida

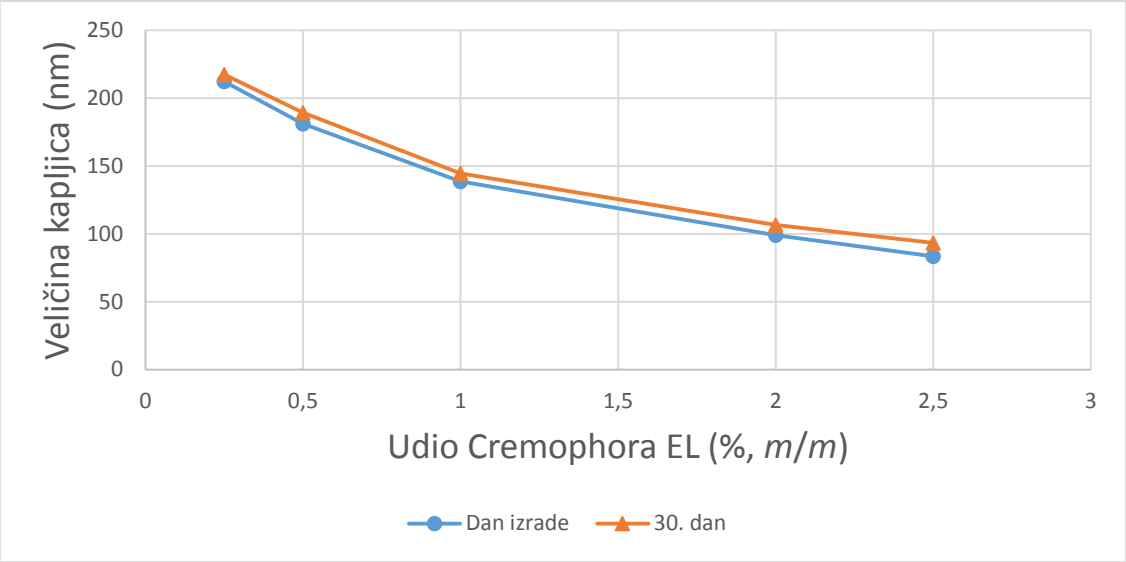
(Klang i Valenta, 2011; Đorđevic i sur., 2013; Pathak i sur., 2015). Stoga i ne iznenađuje povećanje negativnih vrijednosti zeta potencijala s povećanjem udjela lecitina u nanoemulziji. Isto se može vidjeti i u rezultatima mjerenja nakon 30 dana koji se nisu znatno promijenili od početnih.

Vizualnim pregledom nanoemulzija 30 dana nakon izrade nije uočeno odvajanje faza.

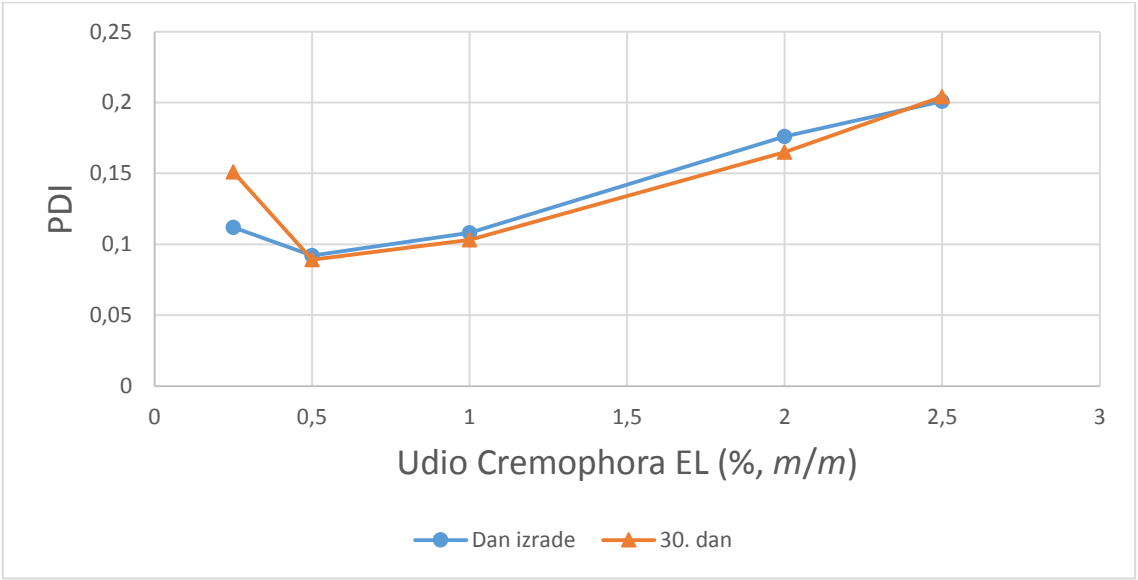
Od ovih 4 nanoemulzija s lecitinom odabrana je ona s najidealnijim udjelom lecitina za daljnji razvoj formulacije s obzirom na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti, zeta potencijal, stabilnost te potencijalnu toksičnost odnosno biokompatibilnost. Na temelju dobivenih rezultata odabrana je nanoemulzija s najnižim udjelom lecitina (0,1% *m*/*m*). Osim što je to najniža količina lecitina kod ispitivanih nanoemulzija što rezultira i najmanjom toksičnošću i najvećom biokompatibilnošću, prosječna veličina kapljica tog sustava iznosila je 256,1 nm. Indeks polidisperznosti koji je iznosio 0,1 ukazuje na stabilnu i visoku homogenu nanoemulziju. Zeta potencijal od -40,1 mV također ukazuje na stabilni sustav te na dovoljnu negativnu vrijednost potrebnu za kasnije uklapanje kitozana. Isto tako stajanjem nanoemulzije nakon 30 dana nije došlo do odvajanja faza.

4.2. Dodatak neionskog surfaktanta

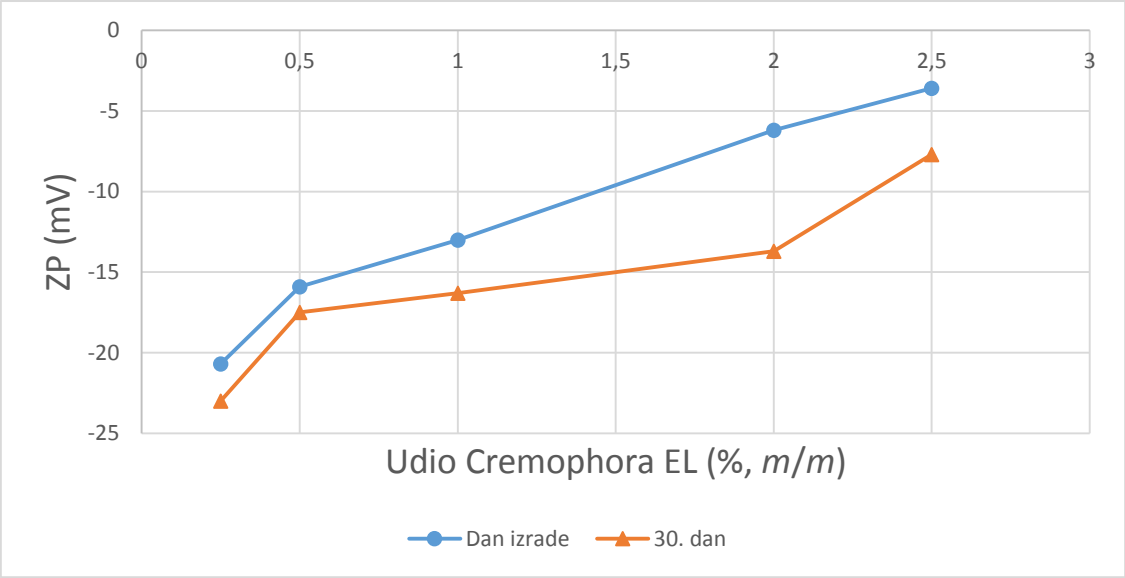
Nakon odabira najoptimalnijeg udjela lecitina koji je uspješno rezultirao dovoljno negativnim površinskim nabojem slijedi dodatak Cremophora EL. Kao glavni sufaktant u formulacijama ovog diplomskog rada, dodan je u svrhu emulgiranja i stabiliziranja kapljica uljne faze i same nanoemulzije zbog steričkog efekta s obzirom da je neionski surfaktant. Cremophor EL nije dodan u već pripremljenu nanoemulziju s 0,1% lecitina, već je *de novo* izrađeno 5 nanoemulzija s Miglyolom 812, lecitinom S45 i Cremophorom EL. Udio Miglyola 812 i lecitina S45 u svih 5 novih nanoemulzija bio je jednak udjelu odabrane optimalne nanoemulzije s lecitinom, dakle 5% Miglyola i 0,1% lecitina. Udio Cremophora EL iznosio je redom 0,25%, 0,5%, 1%, 2% i 2,5%. Nakon obrade mikrofluidizatorom svih 5 nanoemulzija je poprimilo mliječno bijelu boju s blago plavičastim odsjajem, naročite emulzije s 2% i 2,5% Cremophora EL koje su više transparente i plavičaste od ostalih (slika 12). Nije primijećeno odvajanje faza. Svakoj nanoemulziji na dan izrade i nakon 30 dana izmjereni su veličina kapljica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal te su rezultati prikazani u sljedećim grafičkim prikazima:



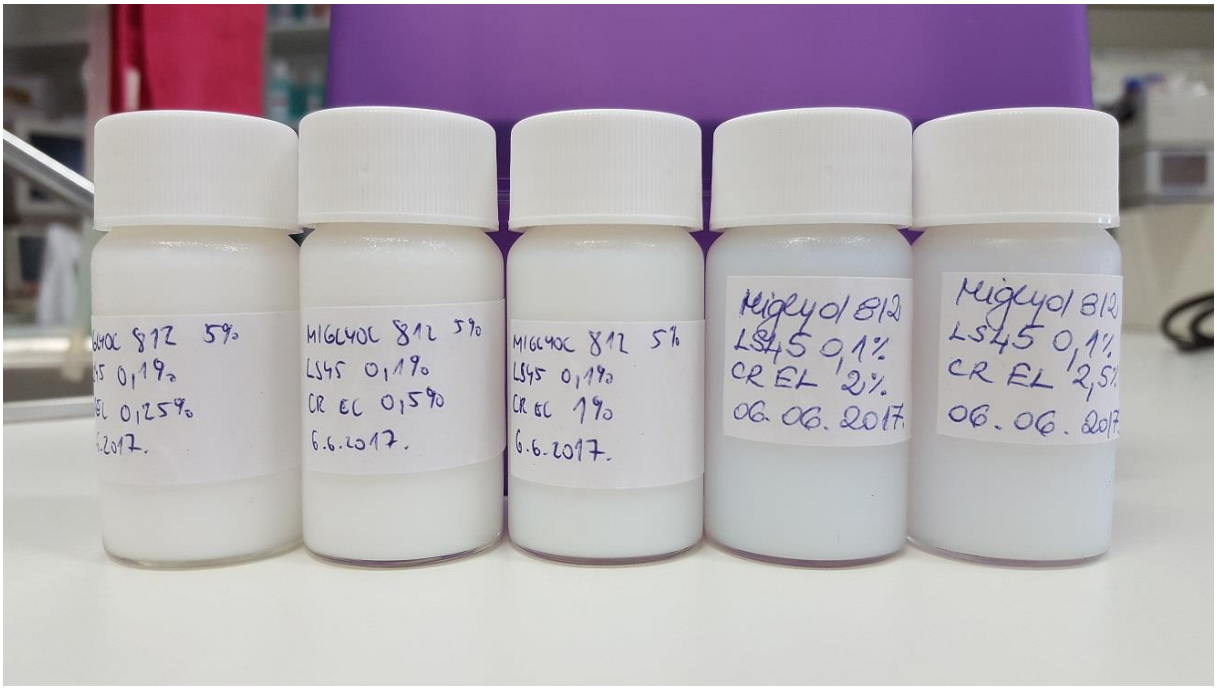
Slika 9. Ovisnost prosječne veličine kapljica ulje faze nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45, Cremophor EL) o udjelu Cremophora EL.



Slika 10. Ovisnost indeksa polidisperznosti nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45, Cremophor EL) o udjelu Cremophora EL.



Slika 11. Ovisnost zeta potencijala nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45, Cremophor EL) o udjelu Cremophora EL.



Slika 12. Nanoemulzije s Miglyolom 812, 0,1% lecitina S45 i Cremophorom EL, dan izrade.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su uspješno pripremljene nanoemulzije odgovarajuće prosječne veličine kapljica. Također je vidljiv pad prosječne veličine kapljica uljne faze od 212

nm do 83 nm porastom udjela Cremophora EL od 0,25% do 2,5%. Ponovnim mjerenjem nakon 30 dana prosječna veličina kapljica neznatno se povećala kod svih 5 nanoemulzija pa se prema tome može smatrati da su u tom periodu one stabilne. U usporedbi s prethodnim nanoemulzijama koje su sadržavale samo lecitin, veličina kapljica nanoemulzija kojima je dodan još Cremophor EL je manja.

Rezultati mjerenja indeksa polidisperznosti pokazuju vrijednosti manje od 0,2 što ukazuje na prihvatljivu homogenost i kvalitetu nanoemulzija. Najniža vrijednost zabilježena je kod nanoemulzije s 0,5% Cremophora EL koja je iznosila 0,092, dok se kod ostalih nanoemulzija može primijetiti porast vrijednosti indeksa polidisperznosti povećanjem udjela Cremophora EL. Nakon 30 dana indeks polidisperznosti nije se znatno promijenio.

Iz rezultata mjerenja zeta potencijala vidljivo je smanjenje negativnih vrijednosti od -20,7 mV do -3,6 mV povećanjem udjela Cremophora EL od 0,25% do 2,5%. S obzirom da je Cremophor EL neionski surfaktant, povećanjem njegovog udjela smanjuje se udio lecitina na površini kapljica ulja te se samim time smanjuje i negativni naboj na površini. Iako bi se prema dobivenim vrijednostima zeta potencijala dalo zaključiti da pripremljene nanoemulzije nisu stabilne, to ovdje nije slučaj kao što se vidi iz rezultata mjerenja veličina kapljica i indeksa polidisperznosti nakon 30 dana koji se nisu znatno promijenili. Razlog tome je sterička stabilizacija Cremophorom EL (Klang i Valenta, 2011; Đorđevic i sur., 2013; Silva i sur., 2015; García-Celma i sur., 2016). Ponovnim mjerenjima nakon 30 dana vidljivo je povećanje negativnih vrijednosti zeta potencijala. Moguće objašnjenje za to može biti hidroliza fosfolipida lecitina u negativno nabijene slobodne masne kiseline (Klang i Valenta, 2011).

Kod nijedne nanoemulzije nije primijećeno odvajanje faza nakon 30 dana.

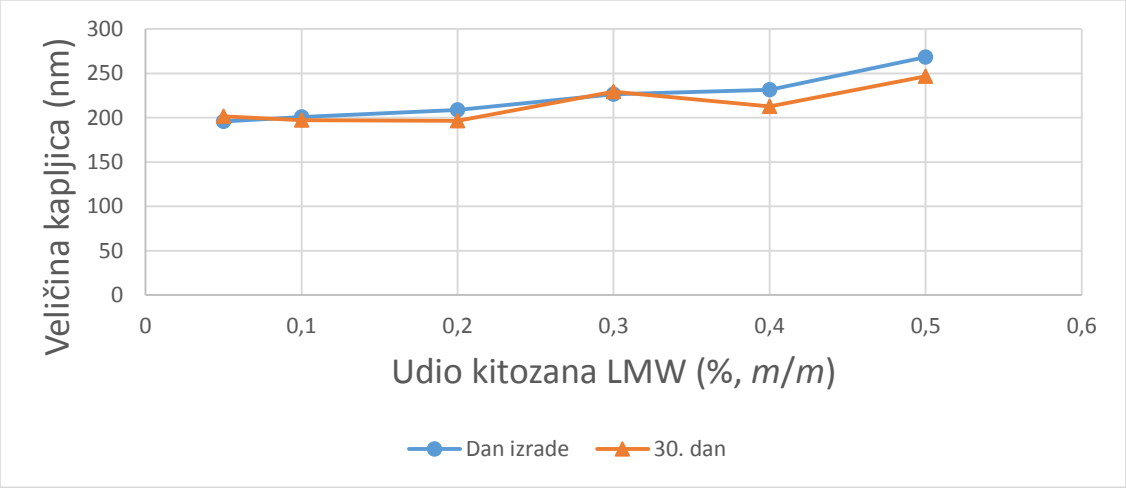
Kao i kod prethodnih nanoemulzija s lecitinom, odabrana je nanoemulzija s optimalnim udjelom Cremophora EL s obzirom na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti, zeta potencijal, stabilnost te potencijalnu biokompatibilnost. Uzevši u obzir ove parametre, najoptimalniji udio Cremophora EL je 0,5%. Prosječna veličina kapljica tog sustava iznosila je 181,1 nm. Indeks polidisperznosti iznosio je 0,092 što je najniža vrijednost od svih 5 ispitivanih nanoemulzija te samim time ukazuje na najužu raspodjelu veličina kapljica te najveću otpornost prema Ostwaldovom zrenju (Klang i Valenta, 2011). Zeta potencijal ove nanoemulzije iznosio je -15,9 mV što je dovoljno negativna vrijednost za uklapanje kitozana. Isto tako nije došlo do odvajanja faza nakon 30 dana te je 0,5% drugi najniži udio Cremophora EL u ispitivanim nanoemulzijama. Sljedeći i zadnji korak je dodavanje kitozana niske i srednje molekulske mase u odabranu nanoemulziju s 0,1% lecitina S45 i 0,5% Cremophora EL.

4.3. Dodatak kitozana

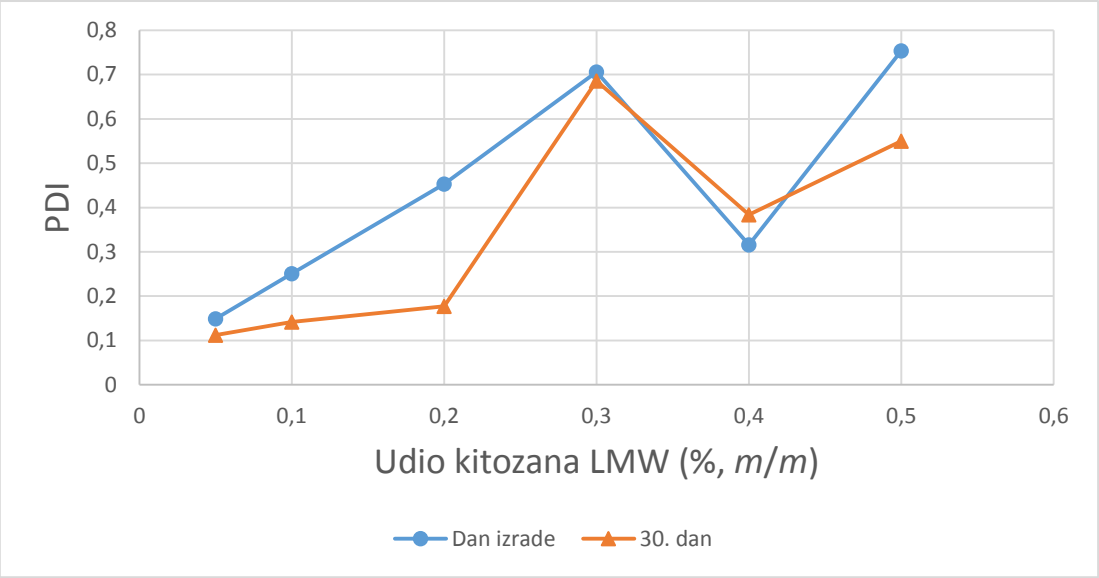
Nakon što je razvijena formulacija s optimalnim udjelom lecitina S45 od 0,1% i Cremophora EL od 0,5% te s dovoljno negativnim zeta-potencijalom, slijedi dodatak kitozana niske odnosno srednje molekulske mase u svrhu postizanja pozitivnog površinskog naboja. Kitozan se odabranoj optimalnoj formulaciji dodaje kao 1%-tna otopina u 0,5%-tnoj otopini ledene octene kiseline.

4.3.1. Kitozan niske molekulske mase

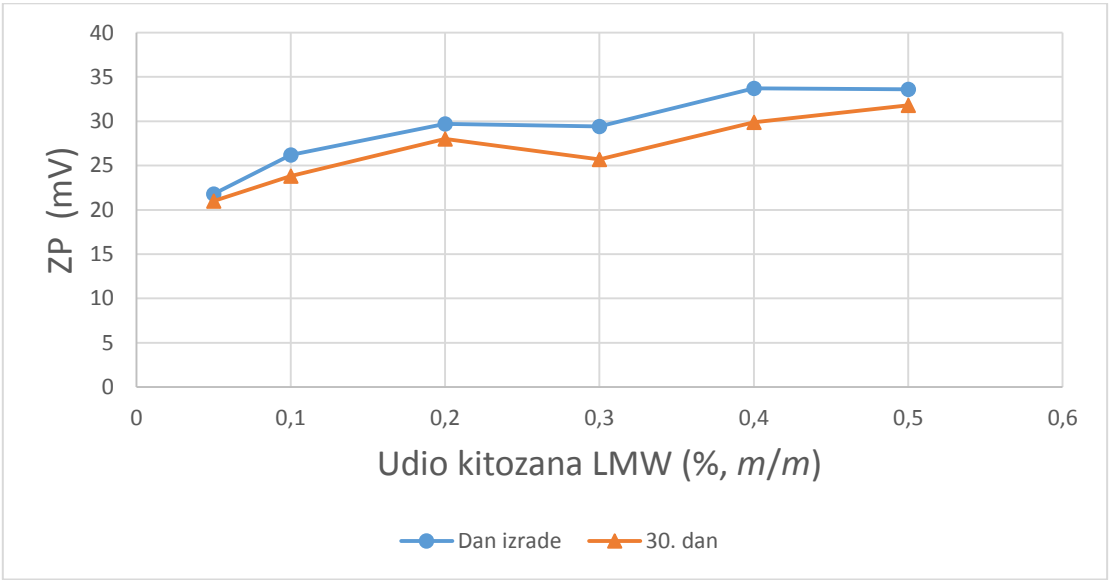
U sklopu ovog diplomskog rada priređeno je 6 nanoemulzija s kitozanom niske molekulske mase (LMW). S obzirom da se odabrana nanoemulzija s 5% Miglyola 812, 0,1% lecitina S45 i 0,5% Cremophora EL miješa s otopinom kitozana i po potrebi s pročišćenom vodom do dvostrukog razrjeđenja, konačan maseni udio Miglyola 812 iznosi 2,5%, lecitina S45 0,05%, Cremophora EL 0,25%, a udio kitozana LMW redom 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% i 0,5%. Sve nanoemulzije su nakon izrade imale mliječno bijelu boju s blago plavičastim odsjajem te nije bilo primijećeno odvajanje faza. Na dan izrade i nakon 30 dana izmjerene su im veličine kapljica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Rezultati su prikazani u sljedećim grafičkim prikazima:



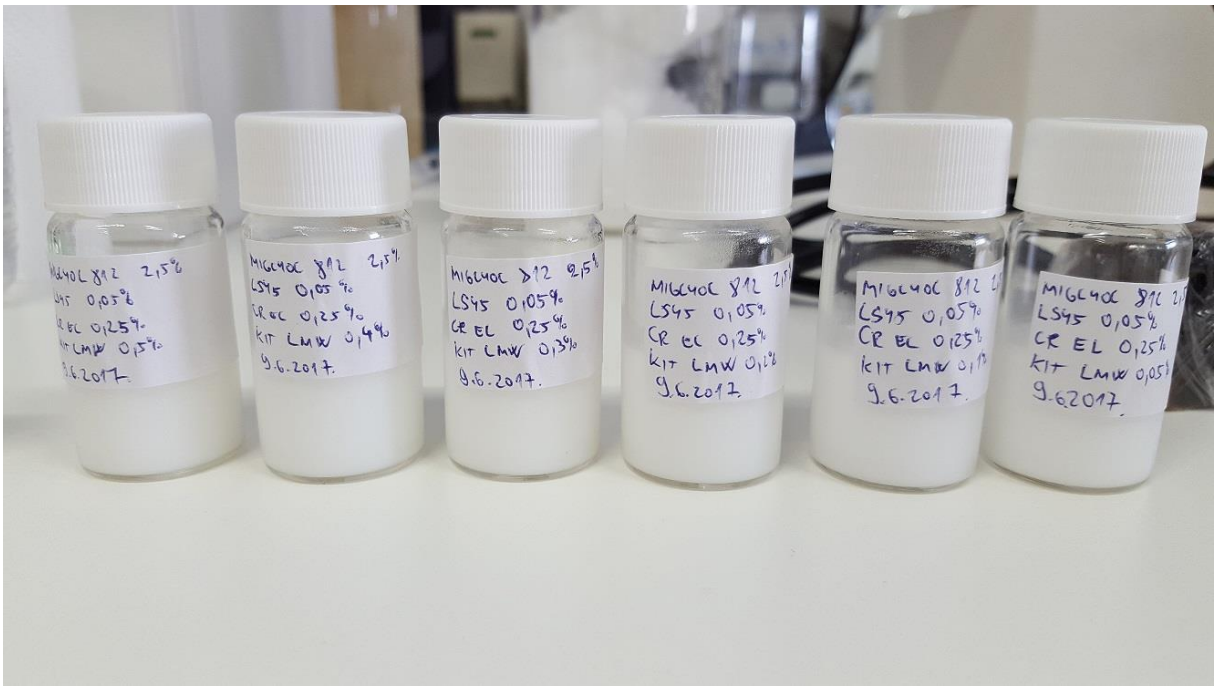
Slika 13. Ovisnost prosječne veličine kapljica ulje faze nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45, Cremophor EL, kitozan LMW) o udjelu kitozana LMW.



Slika 14. Ovisnost indeksa polidisperznosti nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45, Cremophor EL, kitozan LMW) o udjelu kitozana LMW.



Slika 15. Ovisnost zeta potencijala nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45, Cremophor EL, kitozan LMW) o udjelu kitozana LMW.



Slika 16. Nanoemulzije s 2,5% Miglyola 812, 0,05% lecitina S45, 0,25% Cremophora EL i kitozanom niske molekulske mase (LMW), 30 dana nakon izrade.

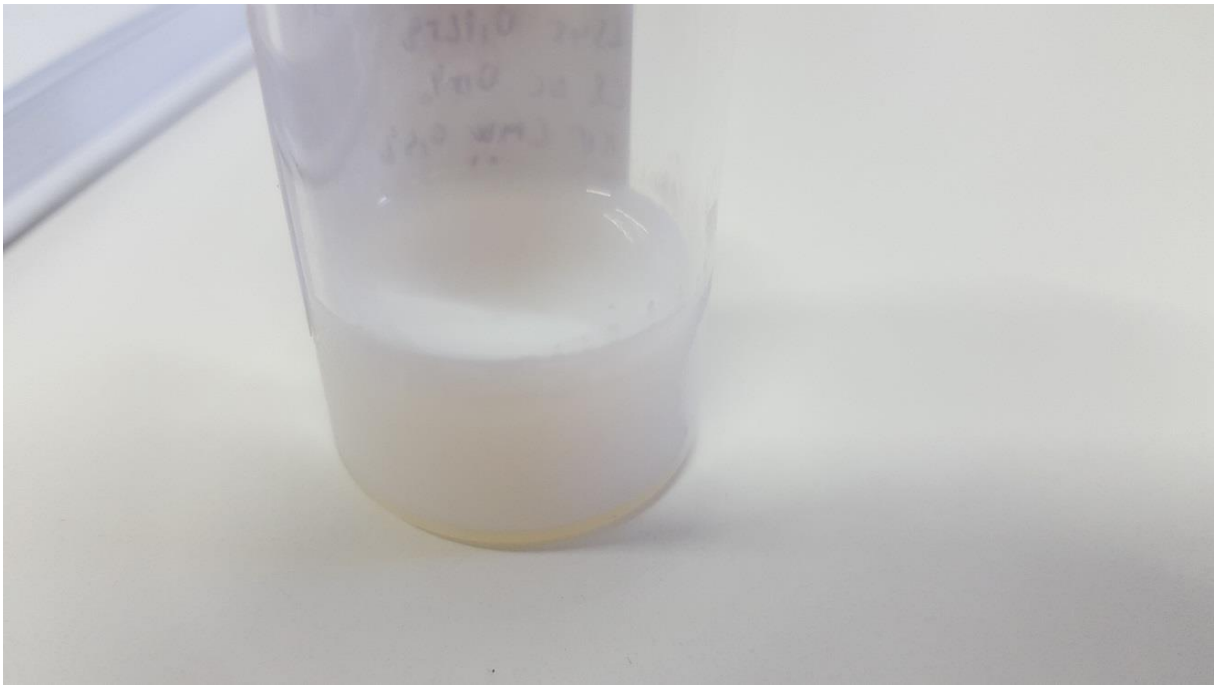
Iz priloženih rezultata mjerenja vidljivo je da su pripremljene nanoemulzije prihvatljive veličine kapljica. Jasno je vidljivo i povećanje prosječne veličine kapljica od 195,7 nm do 268,4 nm povećanjem udjela kitozana od 0,05% do 0,5%. Iako bi se prema istraživanju Li i sur. (Li i sur., 2016) očekivalo povećanje veličine kapljica nakon 30 dana, u ovom slučaju došlo je do povećanja jedino kod formulacija s 0,05% i 0,3% kitozana LMW, dok se kod ostalih veličina kapljica smanjila. Moguće objašnjenje za to može biti preraspodjela surfaktanta i kitozana što rezultira manjom veličinom kapljica (Li i sur., 2016).

Vrijednost indeksa polidisperznosti je manja od 0,2 jedino kod nanoemulzije s 0,05% kitozana, dok je kod ostalih formulacija previsoka te ukazuje na preširoku raspodjelu veličina kapljica to jest nedovoljno visoku homogenost te moguću nestabilnost. Ponovnim mjerenjem nakon 30 dana indeks se smanjio kod svih formulacija osim kod nanoemulzije s 0,4% kitozana kod koje se povećao. Razlog smanjenja može biti premještanje kitozana na površini kapljica u termodinamički stabilnije položaje (Li i sur., 2016).

U usporedbi s prethodnim nanoemulzijama, dodatkom kitozana zeta potencijal se mijenja iz negativne u pozitivne vrijednosti koji s povećanjem udjela kitozana od 0,05% do 0,5% generalno raste od +21,8 mv do +33,6 mV. Stajanjem 30 dana zeta potencijal se snizio kod svih formulacija što bi se moglo objasniti hidrolizom fosfolipida lecitina na negativno nabijene

slobodne masne kiseline (Klang i Valenta, 2011) i preraspodjelom surfaktanta i kitozana na površini (Li i sur., 2016).

Nakon 30 dana primijećeno je vrhnjenje na površini nanoemulzija s 0,2%, 0,3%, 0,4% te 0,5% LMW kitozana (slika 14)



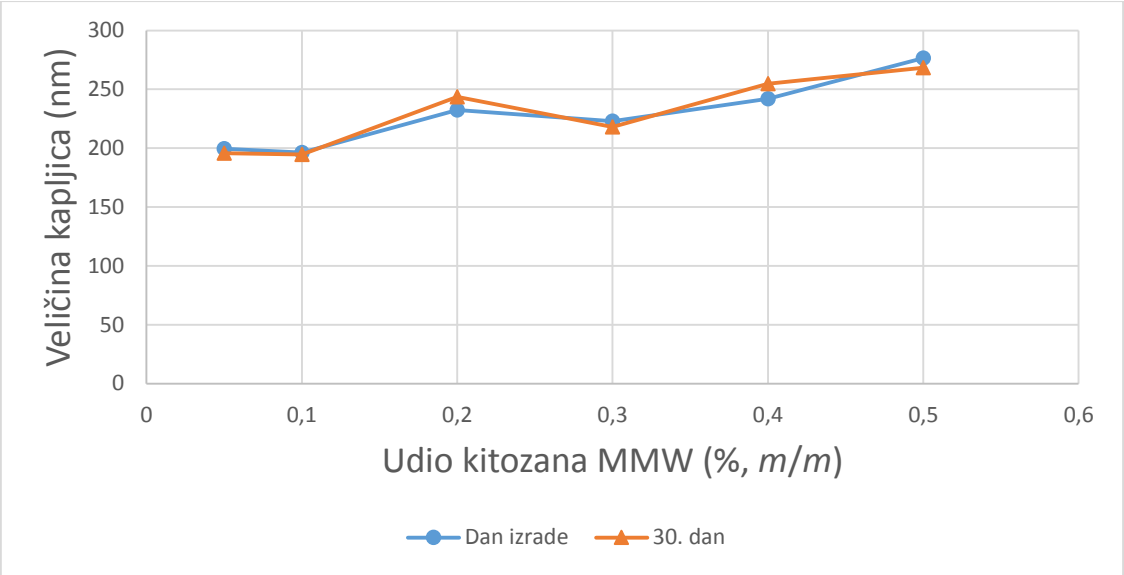
Slika 17. Vrhnjenje nanoemulzije s kitozanom 30 dana nakon izrade.

Uzevši u obzir biokompatibilnost, stabilnost i dobivene rezultate mjerenja veličine kapljica, indeksa polidisperznosti, zeta potencijala kao optimalna ispitivana formulacija odabrana je formulacija s 0,05% kitozana niske molekulske mase. Osim što sadrži najmanji udio kitozana i time potencijalno najveću biokompatibilnost, ostala je stabilna nakon 30 dana. Prosječna veličina kapljica iznosila je 195,7 nm, a indeks polidisperznosti 0,149 što su najniže vrijednosti od ispitivanih formulacija te ukazuju na stabilnu i homogenu nanoemulziju. Zeta potencijal iznosio je 21,8 mV što je dovoljno pozitivna vrijednost za stabilnu nanoemulziju u slučaju stabilizacije s polielektrolitom (Rai i sur., 2017).

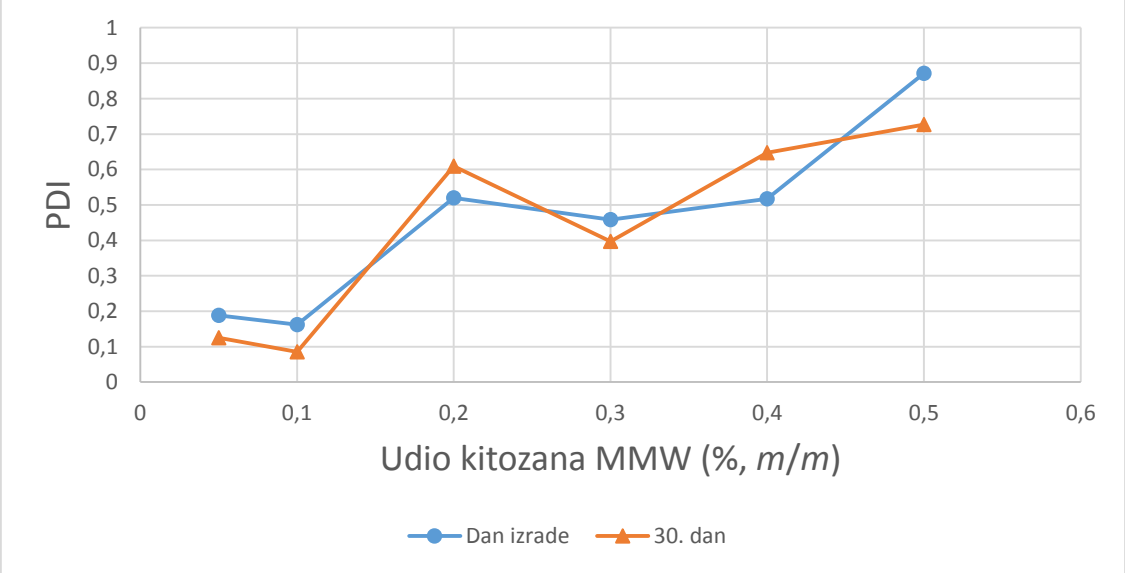
4.3.2. Kitozan srednje molekulske mase

U sklopu ovog diplomskog rada priređeno je i 6 nanoemulzija s kitozanom srednje molekulske mase (MMW) na isti način kao nanoemulzije s kitozanom niske molekulske mase. Udio Miglyola 812 u svih 6 nanoemulzija iznosio je 2,5%, lecitina S45 0,05%, Cremophora EL 0,25%, a udio kitozana MMW redom 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% i 0,5%. Nakon izrade

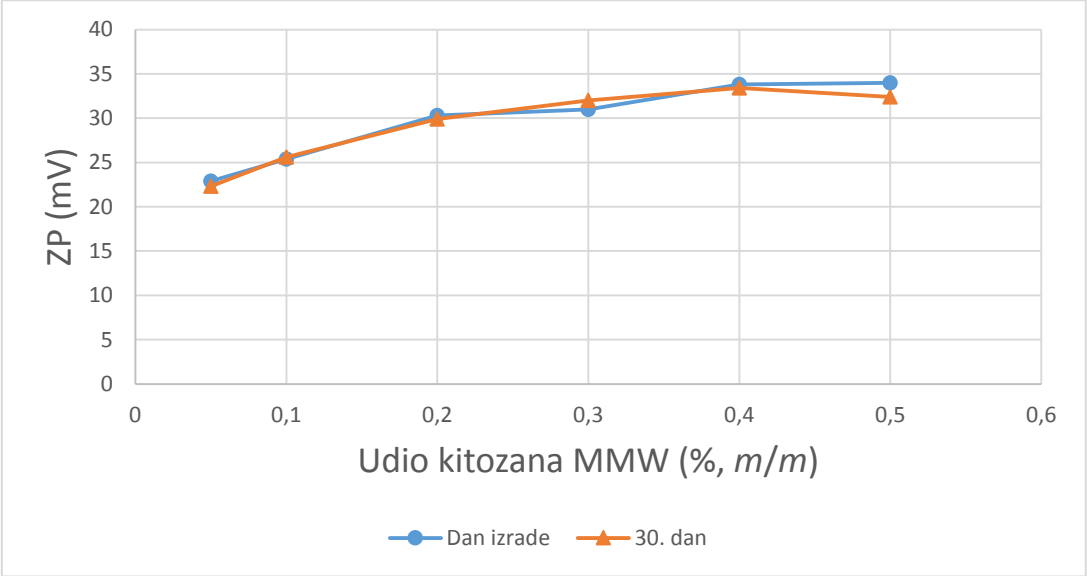
sve nanoemulzije imale su mliječno bijelu boju s blago plavičastim odsjajem te nije bilo primijećeno odvajanje faza. Na dan izrade i nakon 30 dana izmjerene su im veličine kapljica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal te su rezultati prikazani u sljedećim grafičkim prikazima:



Slika 18. Ovisnost prosječne veličine kapljica ulje faze nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45, Cremophor EL, kitozan MMW) o udjelu kitozana MMW.



Slika 19. Ovisnost indeksa polidisperznosti nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45, Cremophor EL, kitozan MMW) o udjelu kitozana MMW.



Slika 20. Ovisnost zeta potencijala nanoemulzija (Miglyol 812, lecitin S45, Cremophor EL, kitozan MMW) o udjelu kitozana MMW.



Slika 21. Nanoemulzije s 2,5% Miglyola 812, 0,05% lecitina S45, 0,25% Cremophora EL i kitozanom srednje molekulske mase (MMW), 30 dana nakon izrade.

Prema grafičkom prikazu rezultata vidljivo je generalno povećanje srednje veličine kapljica od 199,4 nm do 276,4 nm povećanjem udjela kitozana od 0,05% do 0,5%. Ponovnim mjerenjima nakon 30 dana došlo je do povećanja veličina kapljica kod formulacija s 0,2% i 0,4% kitozana, dok se kod ostalih veličina smanjila što je suprotno rezultatima istraživanja Li i sur. (Li i sur., 2016). Isto tako prema njihovom istraživanju nanoemulzije s kitozanom srednje molekulske mase imaju veću veličinu kapljica od nanoemulzija s kitozanom niske molekulske mase. To je zabilježeno i kod pripravljenih nanoemulzija ovog diplomskog rada, osim kod formulacija s 0,1% i 0,3% kitozana gdje je veličina kapljica nanoemulzija s kitozanom srednje molekulske mase bila manja od one s kitozanom niske molekulske mase.

Vrijednosti indeksa polidisperznosti manje su od 0,2 te su prihvatljive kod nanoemulzija s 0,05% i 0,1% kitozana. Kod ostalih formulacija PDI je previsok što rezultira niskom homogenošću i stabilnošću sustava. Ponovnim mjerenjem nakon 30 dana PDI se smanjio, osim kod formulacija s 0,2% i 0,4% kitozana kod kojih se povećao. U usporedbi s nanoemulzijama s kitozanom LMW, PDI nanoemulzija s kitozanom MMW je veći, osim kod formulacija s 0,1% i 0,3% kitozana kod kojih je manji. Iste formulacije imaju i manju veličinu kapljica kao što je i maloprije rečeno.

Iz grafičkog prikaza vidljiv je porast zeta potencijala od +22,9 mv do +34 mV povećanjem udjela kitozana od 0,05% do 0,5%. U skladu s rezultatima istraživanja Li i sur. (Li i sur., 2016), zeta potencijal se nakon 30 dana smanjio. Iznimka su formulacije s 0,1% i 0,3% kitozana kod kojih se zeta potencijal stajanjem povećao. Zeta potencijal nanoemulzija s kitozanom MMW veći je od nanoemulzija s kitozanom LMW. Iznimka je formulacija s 0,1% kitozana gdje je zeta potencijal veći u nanoemulziji s kitozanom niske molekulske mase.

Nakon 30 dana primijećeno je vrhnjenje na površini nanoemulzija s 0,2%, 0,3%, 0,4% te 0,5% MMW kitozana.

Kao i kod svih prethodnih nanoemulzija, na temelju potencijalne biokompatibilnosti, stabilnosti, prosječne veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala odabran je optimalan udio kitozana MMW kod ispitivanih formulacija. U ovom slučaju to je 0,1% kitozana MMW. To je drugi po redu najniži udio kitozana te nakon 30 dana nije došlo do odvajanja faza. Uz to, kod ove formulacije izmjerena je najmanja prosječna veličina kapljica od 196,2 nm i najniži indeks polidisperznosti od 0,162 što ukazuje na homogenu i stabilnu nanoemulziju. Zeta potencijal od +25,4 mV dovoljno je pozitivan za stabilnu nanoemulziju (Rai i sur., 2017).

5. ZAKLJUČAK

- U sklopu ovog diplomskog rada uspješno su pripravljene U/V nanoemulzije koje su sadržavale Miglyol 812 kao uljnu disperznu fazu, Cremophor EL kao neionski surfaktant, lecitin S45 kao ionski surfaktant i kitozan niske odnosno srednje molekulske mase kao polielektrolit.
- Prema dobivenim rezultatima istraživanja kao optimalna nanoemulzija s kitozanom niske molekulse mase odabrana je formulacija s 2,5% Migloyla 812, 0,05% lecitina S45, 0,25% Cremophora EL i 0,05% kitozana LMW. U slučaju nanoemulzija s kitozanom srednje molekulse mase, optimalna formulacija sadržavala je 2,5% Miglyola 812, 0,05% lecitina S45, 0,25% Cremophora EL i 0,1% kitozana MMW.
- Kod razvojnih formulacija koje su sadržavale samo lecitin S45 dolazi do smanjenja prosječne veličine kapljica nanoemulzija s povećanjem udjela lecitina u formulaciji. Indeks polidisperznosti nije pokazao ovisnost o udjelu lecitina. Povećanjem udjela lecitina dolazi do povećanja negativnih vrijednosti zeta potencijala. Ponovljena mjerenja 30 dana nakon izrade nisu pokazala znatne promjene vrijednosti od početnih te se ove formulacije mogu smatrati stabilnima u ovom vremenskom periodu.
- Dodatkom Cremophora EL u razvojnu formulaciju s lecitinom dolazi do smanjenja prosječne veličine kapljica povećanjem udjela Cremophora EL. Vrijednosti indeksa polidisperznosti generalno rastu povećanjem udjela Cremophora EL. Negativne vrijednosti zeta potencijala opadaju povećanjem udjela Cremophora EL. Ove formulacije su se također pokazale stabilne tijekom perioda od 30 dana.
- Konačne kationske nanoemulzije s kitozanom niske i srednje molekulske mase pokazale su jednaku ovisnost mjerenih parametara o njegovom udjelu u formulacijama. Povećanjem masenog udjela kitozana u nanoemulziji, neovisno o njegovoj molekulskoj masi, dolazi do porasta prosječne veličine kapljica nanoemulzija, kao i indeksa polidisperznosti te zeta potencijala.
- Formulacije s 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% i 0,5% kitozana LMW te formulacije s 0,2%, 0,3%, 0,4% i 0,5% kitozana MMW pokazale su nezadovoljavajuće vrijednosti indeksa polidisperznosti pa se mogu smatrati nedovoljno homogene i otporne prema destabilizaciji. Isto tako, kod formulacija s 0,2%, 0,3%, 0,4% i 0,5% kitozana LMW i MMW primijećeno je vrhnjenje 30 dana nakon izrade. Rezultati

ponovljenih mjerenja 30 dana nakon izrade nisu pokazali znatne promjene u odnosnu na prvotna mjerenja pa shodno svemu navedenome jedino formulacije s 0,05% kitozana LMW i 0,05% te 0,1% kitozana MMW pokazuju zadovoljavajuća svojstva i stabilnost.

- Uspoređujući rezultate mjerenja između formulacija s kitozanom niske i kitozanom srednje molekulske mase, moguće je zaključiti da razlika u molekulskoj masi kitozana nije rezultirala značajnom razlikom u veličini kapljica, indeksu polidisperznosti ili zeta potencijalu nanoemulzija. Iako nanoemulzije s kitozanom srednje molekulske mase uglavnom imaju nešto veću veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal u odnosu na nanoemulzije s kitozanom niske molekulske mase, ta razlika je neznatna.

6. LITERATURA

Kolliphor® EL, http://www.basf.com, pristupljeno 04.02.2018.

Miglyol® 812, http://www.petercremerna.com, pristupljeno 04.02.2018.

Zetasizer 2000/3000: Zeta potential measurements; Manual number MAN0150, UK, Malvern Instruments Ltd, 2000, str. 1.2.

Baker MT, Naguib M. Propofol: The Challenges of Formulation. *Anestesiology 10,* 2005, 103, 861-862.

Đorđevic S, Cekić N, Isailović T, Milić J, Vuleta G, Lazić M, Savić S. Nanoemulsions produced with varied type of emulsifier and oil content: An influence of formulation and process parameters on the characteristics and physical stability. *Hemijska industrija,* 2013, 67, 795-809.

García-Celma MJ, Homs M, Morales D, Solans C. Nano-emulsions for Pharmaceutical Applications. 2016, 365-388.

Gecol H. The Basic Theory. U: Chemistry and Technology of Surfactants. Farn RJ, urednik, Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 2006, str. 24-25.

Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter,* 2016, 12, 2826-2841.

Helgason T, Gislason J, Mcclements DJ, Kristbergsson K, Weiss J. Influence of molecular character of chitosan on the adsorption of chitosan to oil droplet interfaces in an in vitro digestion model. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23, 2243-2253.

Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech,* 2015, 5, 123-127.

Klang V, Valenta C. Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 2011, 21, 55-76.

Li J, Hwang I-C, Chen X, Park HJ. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. *Food Hydrocolloids,* 2016, 60, 138-147.

Mcclements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter,* 2012, 8, 1719-1729.

Mun S, Decker EA, Mcclements DJ. Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan membranes. *J Colloid Interface Sci*, 2006, 296, 581-590.

O'neal D, Harrip P, Dragicevic G, Rae D, Best JD. A comparison of LDL size determination using gradient gel electrophoresis and light-scattering methods. *J Lipid Res*, 1998, 39, 2086-2090.

Pathak L, Kanwal A, Agrawal Y. Curcumin loaded self assembled lipid-biopolymer nanoparticles for functional food applications. *J Food Sci Technol*, 2015, 52, 6143-6156.

Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav NP. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J Control Release*, 2017, 270, 203-225.

Rowe RS, Pj; Quinn, Me. Handbook of pharmaceutical excipients. 2009, 6th, 542-548.

Silva HD, Cerqueira MA, Vicente AA. Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *Journal of Food Engineering*, 2015, 167, 89-98.

Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, Chourasia MK. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*, 2017, 252, 28-49.

Sun H, Liu K, Liu W, Wang W, Guo C, Tang B, Gu J, Zhang J, Li H, Mao X, Zou Q, Zeng H. Development and characterization of a novel nanoemulsion drug-delivery system for potential application in oral delivery of protein drugs. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7, 5529-5543.

Wooster TJ, Golding M, Sanguansri P. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. 2008, 24, 12758-12765.

Zhou H, Yue Y, Liu G, Li Y, Zhang J, Gong Q, Yan Z, Duan M. Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system. *Nanoscale Res Lett*, 2009, 5, 224-230.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti nanoemulziju U/V tipa stabiliziranu neionskim i ionskim surfaktantom te polielektrolitom. Nanoemulzije U/V tipa pripravljene su visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije s Miglyolom 812 kao uljnom disperznom fazom, Cremophor-om EL kao neionskim, lecitinom S45 kao ionskim surfaktantom i kitozanom kao polielektrolitom. Pripravljenim nanoemulzijama mjerene su prosječna veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal ovisno o rastućim udjelima lecitina S45, Cremophora EL i kitozana niske odnosno srednje molekulske mase. Nanoemulzije s najboljim svojstvima i stabilnošću bile su formulacije s 2,5% Migloyla 812, 0,05% lecitina S45, 0,25% Cremophora EL i 0,05% kitozana niske odnosno 0,1% kitozana srednje molekulske mase. Povećanjem udjela lecitina i Cremophora EL dolazi do smanjenja veličine kapljica sustava, dok u suprotnosti povećanje udjela kitozana rezultira većim kapljicama. Vrijednosti indeksa polidisperznosti nisu pokazale ovisnost o udjelu lecitina, dok rastućim udjelom Cremophora EL i kitozana PDI generalno raste. Rastućim udjelom lecitina postiže se sve negativniji zeta potencijal, no dodavanjem Cremophora EL taj negativni zeta potencijal opada. Dodatkom kitozana pak zeta potencijal se mijenja u pozitivne vrijednosti i raste sve većim udjelom kitozana. Sve razvojne formulacije s lecitinom i Cremophorom EL pokazale su stabilnost 30 dana nakon izrade. Konačne nanoemulzije koje su sadržavale još i kitozan pokazale su se nedovoljno stabilnima pri masenim udjelima kitozana niske molekulske mase od 0,1% i više te masenom udjelu kitozana srednje molekulske mase od 0,2% i više. Usporedbom rezultata mjerenja veličine kapljica, indeksa polidispoerznosti i zeta potencijala između nanoemulzija s kitozanom niske i nanoemulzija s kitozanom srednje molekulske mase nisu zabilježene značajne razlike u vrijednostima ovih parametara.

The aim of this diploma thesis was to develop a nanoemulsion of O/W type stabilized by nonionic and ionic surfactant and polyelectrolyte. Nanoemulsions of O/W type were prepared using the high energy method of microfluidisation with Miglyol 812 as the oily dispersed phase. The prepared nanoemulsions were subjected to measurments of thier average droplet size, polydispersity index and zeta potential depending on the rising mass fraction of lecithin S45, Cremophor EL and low, as well as medium molecular weight chitosan. The final nanoemulsions with the best properties and stability were formulations containing 2,5% Miglyol 812, 0,05% lecithin S45, 0,25% Cremophor EL and 0,05% low and 0,1% medium molecular weight chitosan respectively. By increasing the fraction of lecithin and Cremophor EL, droplet size of the system decreases, while, on the contrary, increasing the fraction of chitosan results in bigger droplets. The values of the polydispersity index did not show dependence on the lecithin share, while the growing share of Cremophor EL and chitosan generally increases the PDI values. Zeta potential gets more and more negative with the increase of lecithin share, but by adding Cremophor EL that negative zeta potential diminishes and approaches zero. The addition of chitosan sees the shift of zeta potential into positive values that grow with an increasing share of chitosan. All of the developmental formulations containing lecithin and Cremophor EL expressed stability thirty days after their preparation. The final nanoemulsions with low molecular weight chitosan share of 0,1% and above and medium molecular weight chitosan share of 0,2% and above were found to be not stable enough during the same period of thirty days. Comparison of the results of average droplet size, polydispersity index and zeta potential measurments between low and medium molecular weight chitosan nanoemulsions did not show significant differences in the values of these parameters.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Priprava, karakterizacija i ispitivanje stabilnosti kationskih nanoemulzija

Filip Jović

SAŽETAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti nanoemulziju U/V tipa stabiliziranu neionskim i ionskim surfaktantom te polielektrolitom. Nanoemulzije U/V tipa pripravljene su visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije s Miglyolom 812 kao uljnom disperznom fazom. Pripravljenim nanoemulzijama mjerene su prosječna veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal ovisno o rastućim udjelima lecitina S45, Cremophora EL i kitozana niske odnosno srednje molekulske mase. Nanoemulzije s najboljim svojstvima i stabilnošću bile su formulacije s 2,5% Migloyla 812, 0,05% lecitina S45, 0,25% Cremophora EL i 0,05% kitozana niske odnosno 0,1% kitozana srednje molekulske mase. Povećanjem udjela lecitina i Cremophora EL dolazi do smanjenja veličine kapljica sustava, dok u suprotnosti povećanje udjela kitozana rezultira većim kapljicama. Vrijednosti indeksa polidisperznosti nisu pokazale ovisnost o udjelu lecitina, dok rastućim udjelom Cremophora EL i kitozana PDI generalno raste. Rastućim udjelom lecitina postiže se sve negativniji zeta potencijal, no dodavanjem Cremophora EL taj negativni zeta potencijal opada. Dodatkom kitozana pak zeta potencijal se mijenja u pozitivne vrijednosti i raste sve većim udjelom kitozana. Sve razvojne formulacije s lecitinom i Cremophorom EL pokazale su stabilnost 30 dana nakon izrade. Konačne nanoemulzije koje su sadržavale još i kitozan pokazale su se nedovoljno stabilnima pri masenim udjelima kitozana niske molekulske mase od 0,1% i više te masenom udjelu kitozana srednje molekulske mase od 0,2% i više. Usporedbom rezultata mjerenja veličine kapljica, indeksa polidispoerznosti i zeta potencijala između nanoemulzija s kitozanom niske i nanoemulzija s kitozanom srednje molekulske mase nisu zabilježene značajne razlike u vrijednostima ovih parametara.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 39 stranica, 21 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanoemulzija, mikrofluidizacija, Miglyol 812, lecitin S45, Cremophor EL, kitozan

Mentor: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasmina Lovrić,** *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lovorka Vujić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Preparation, characterization and stability testing of cationic nanoemulsions

Filip Jović

SUMMARY

The aim of this diploma thesis was to develop a nanoemulsion of O/W type stabilized by nonionic and ionic surfactant and polyelectrolyte. Nanoemulsions of O/W type were prepared using the high energy method of microfluidisation with Miglyol 812 as the oily dispersed phase. The prepared nanoemulsions were subjected to measurments of thier average droplet size, polydispersity index and zeta potential depending on the rising mass fraction of lecithin S45, Cremophor EL and low, as well as medium molecular weight chitosan. The final nanoemulsions with the best properties and stability were formulations containing 2,5% Miglyol 812, 0,05% lecithin S45, 0,25% Cremophor EL and 0,05% low and 0,1% medium molecular weight chitosan respectively. By increasing the fraction of lecithin and Cremophor EL, droplet size of the system decreases, while, on the contrary, increasing the fraction of chitosan results in bigger droplets. The values of the polydispersity index did not show dependence on the lecithin share, while the growing share of Cremophor EL and chitosan generally increases the PDI values. Zeta potential gets more and more negative with the increase of lecithin share, but by adding Cremophor EL that negative zeta potential diminishes and approaches zero. The addition of chitosan sees the shift of zeta potential into positive values that grow with an increasing share of chitosan. All of the developmental formulations containing lecithin and Cremophor EL expressed stability thirty days after their preparation. The final nanoemulsions with low molecular weight chitosan share of 0,1% and above and medium molecular weight chitosan share of 0,2% and above were found to be not stable enough during the same period of thirty days. Comparison of the results of average droplet size, polydispersity index and zeta potential measurments between low and medium molecular weight chitosan nanoemulsions did not show significant differences in the values of these parameters.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 39 pages, 21 figures, 1 table and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoemulsion, microfluidisation, Miglyol 812, lecithin S45, Cremophor EL, chitosan

Mentor: **Jasmina Lovrić**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Jasmina Lovrić**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Hafner, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2018.