Utjecaj procesnih parametara visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije na svojstva i stabilnost nanoemulzija

Popović, Anđela

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:580671

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Anđela Popović

Utjecaj procesnih parametara visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije na svojstva i stabilnost nanoemulzija

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, lipanj 2017.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv.prof.dr.sc. Jasmini Lovrić na strpljenju, trudu i stručnom vodstvu prilikom izrade i pisanja ovoga rada.

Hvala Biseri Jurišić Dukovski, mag.pharm., na neposrednom mentoriranju i podršci pri samom provođenju eksperimentalnog dijela rada i pomoći pri započinjanju pisanja rada.

Posebna hvala Danki Bračko, mag.pharm., na omogućavanju izrade nanoemulzija u suradnji s tvrtkom PLIVA d.o.o., te Ani Jurić Simčić, mag.pharm. i Matiji Đuričiću, koji su sudjelovali u izradi formulacija.

Hvala obitelji na bezuvjetnoj podršci i potpori tijekom studiranja, bez vas bi sve ovo bilo teže.

Hvala Vlatku na strpljenju dok me podučavao kako raditi u MATLAB-u.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. NANOEMULZIJE 1
1.1.1. VISOKOTLAČNA HOMOGENIZACIJA 4
1.1.2. MIKROFLUIDIZACIJA 5
1.2. NANOEMULZIJE I MIKROEMULZIJE – RAZLIKE 6
1.3. PREDNOSTI NANOEMULZIJA U OFTALMIČKOJ PRIMJENI 7
1.4. KITOZAN 9
1.4.1. PREDNOSTI KITOZANA U OFTALMIČKOJ PRIMJENI 9
2. OBRAZLOŽENJE TEME 10
3. MATERIJALI I METODE 11
3.1. MATERIJALI 11
3.2 METODE 11
3.2.1 IZRADA 1%-TNE OTOPINE KITOZANA 11
3.2.2 IZRADA PRIMARNE EMULZIJE 11
3.2.3 PRIPRAVA NANOEMULZIJA METODOM VISOKOTLAČNE HOMOGENIZACIJE 11
3.2.4 PRIPRAVA NANOEMULZIJA METODOM MIKROFLUIDIZACIJE 12
3.2.5. ODREĐIVANJE VELIČINE KAPLJICA, INDEKSA POLIDISPERZNOSTI I ZETA-POTENCIJALA NANOEMULZIJA 13
4. REZULTATI I RASPRAVA 15
4.1. PRIPRAVA NANOEMULZIJA 15
4.2. UTJECAJ TLAKA NA SVOJSTVA I STABILNOST NANOEMULZIJA 18
4.2.1. VELIČINA KAPLJICA 18
4.2.2. INDEKS POLIDISPERZNOSTI 23
4.2.3. ZETA-POTENCIJAL 29
4.3. UTJECAJ BROJA PROPUŠTANJA (CIKLUSA) NA SVOJSTVA I STABILNOST NANOEMULZIJA 32
4.3.1. VELIČINA KAPLJICA 32
4.3.2. INDEKS POLIDISPERZNOSTI 37

4.3.3. ZETA-POTENCIJAL 42
4.4. MODELI ZA PROCJENU VELIČINE KAPLJICA I INDEKSA POLIDISPERZNOSTI NANOEMULZIJA IZRAĐENIH VISOKOENERGETSKIM METODAMA 44
4.4.1. VISOKOTLAČNA HOMOGENIZACIJA 44
4.4.2. MIKROFLUIDIZACIJA 45
5. ZAKLJUČCI 46
6. LITERATURA 48
7. SAŽETAK/SUMMARY 53
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

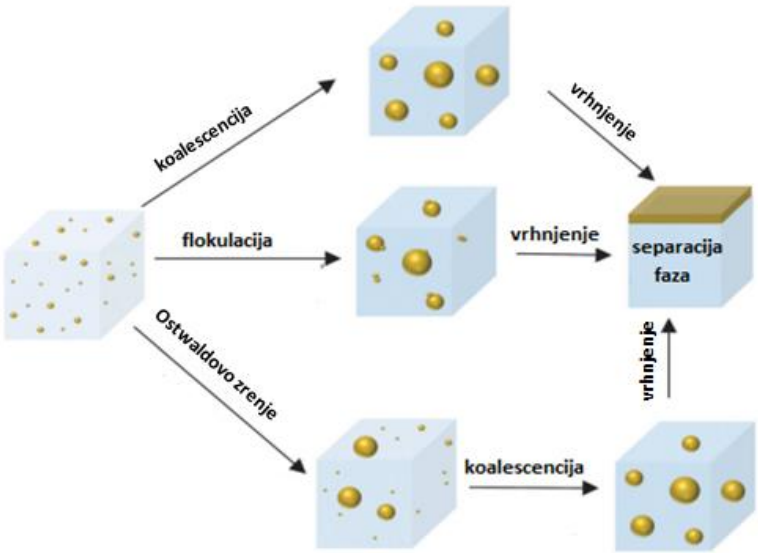
1. UVOD

1.1. NANOEMULZIJE

Nanoemulzije su disperzni sustavi dviju tekućina koje se ne miješaju pri čemu je veličina kapljica unutarnje faze 50 nm do 200 nm (transparentne) ili do 500 nm (mliječno bijele boje) (Tadros i sur., 2004). Ako je ulje raspršeno u obliku kapljica u vodi, nanoemulzija je U/V tipa, a ako su kapljice vode raspršene u ulju, nanoemulzija je V/U tipa (McClements, 2012). Nanoemulzije pokazuju monomodalnu, simetričnu lognormalnu funkciju raspodjele veličina. Raspodjela veličina izražava se indeksom polidisperznosti (engl. *polydispersity indeks, PDI*). Ako je PDI manji od 0,1, nanoemulzija se smatra monodisperznom i stabilnom (García-Celma i sur., 2016).

Budući da je promjena Gibbsove slobodne energije za nastanak nanoemulzija pozitivna, sustav želi smanjiti površinsku energiju težeći razdvajanju faza, stoga su nanoemulzije termodinamički nestabilni sustavi (Koroleva i Yurtov, 2012).

Iako termodinamički nestabilne, zbog male veličine kapljica koja sprječava flokulaciju i koalescenciju, nanoemulzije su kinetički stabilne, a Ostwaldovo zrenje (engl. *Ostwald ripening*) glavni je mehanizam nestabilnosti nanoemulzija (Anton i Vandamme 2009; Anton i sur., 2008; Solans i sur., 2005; Salager i sur., 2004; Izquierdo i sur., 2002). U tom procesu, povećavaju se veće kapljice disperzne faze na račun manjih (García-Celma i sur., 2016).



Slika 1: Mehanizmi destabilizacije nanoemulzija (preuzeto i prilagođeno iz Gupta i sur., 2016)

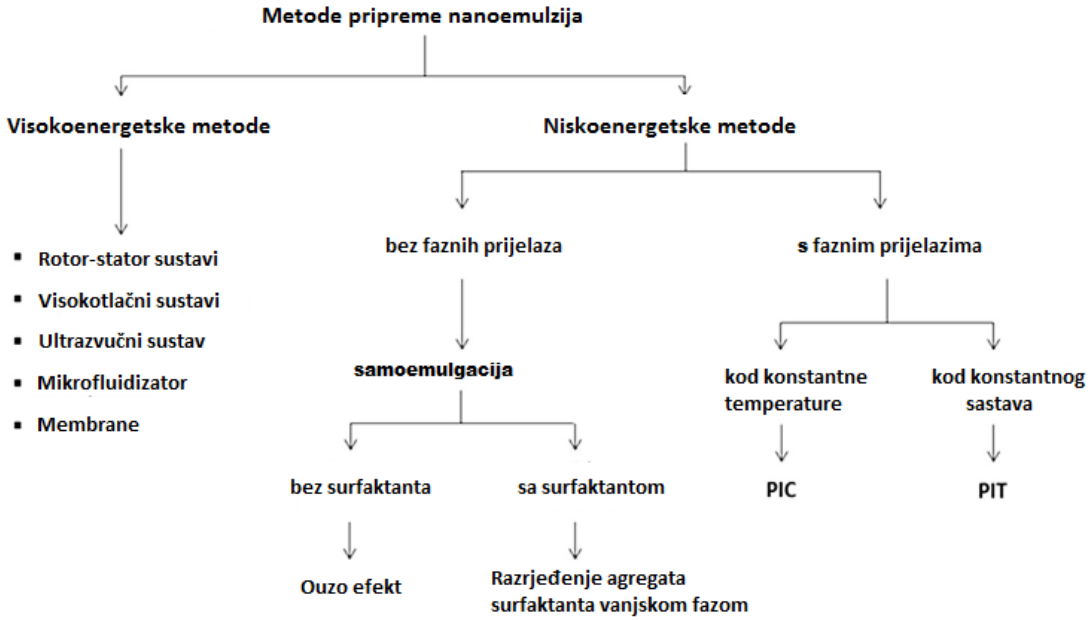
Nanoemulzije su stabilizirane prikladnim surfaktantima, koji se smještaju na međupovršinu između faza i tvore elastičan film koji ne puca prilikom sudara kapljica. Njihov

smještaj na međupovršini između faza omogućava njihova specifična građa, odnosno hidrofilni i lipofilni dio njihove molekule. Hidrofilni dijelovi orijentiraju se prema vodenoj fazi, a lipofilni prema uljnoj fazi. Ovisno o HLB-vrijednosti (engl. *Hydrophile-lipophile balance*), surfaktanti mogu biti V/U tipa (HLB 3-8) ili U/V tipa (HLB 10-18). Za pripravu nanoemulzija prikladni su kationski (stearilamin, oleilamin, benzalkonijev klorid, didodecil amonijev bromid, heksadeciltrimetil amonijev bromid), anionski (natrijev dodecil sulfat), amfoterni (fosfolipidi) i neionski surfaktanti (Poloxameri, Tyloxapol, Miranol C2M, Ryotol, Spanovi, Tweenovi) (Qadir i sur.,2016; Tamilavanan i sur., 2004).

Ionski surfaktanti povećavaju površinski naboj, što može usporiti vrhnjenje jer se tako povećavaju elektrostatske odbojne sile među kapljcama. Zeta-potencijal razlika je električnog potencijala vodene faze i stacionarnog sloja koji se nalazi na kapljici uljne faze. (Daul i sur., 2013). Vrijednost zeta-potencijal trebala biti veća od 30 mV kako bi se sustav smatrao stabilnim na flokulaciju i koalescenciju (García-Celma i sur., 2016; Evans i Wennerström, 1999).

Neionski surfaktanti osiguravaju stabilnost steričkom stabilizacijom. Učinkoviti surfaktanti brzo se adsorbiraju na površinu novonastalih kapljica, smanjuju međupovršinsku napetost i stvaraju membranu koja sprječava agregaciju kapljica (Silva i sur., 2015; McClements, 2002).

Za stvaranje malih kapljica nanoemulzije potrebno je uložiti energiju iz vanjskih izvora (visokoenergetske metode) ili iz kemijskog potencijala sastavnica (niskoenergetske metode) (García-Celma i sur., 2016).



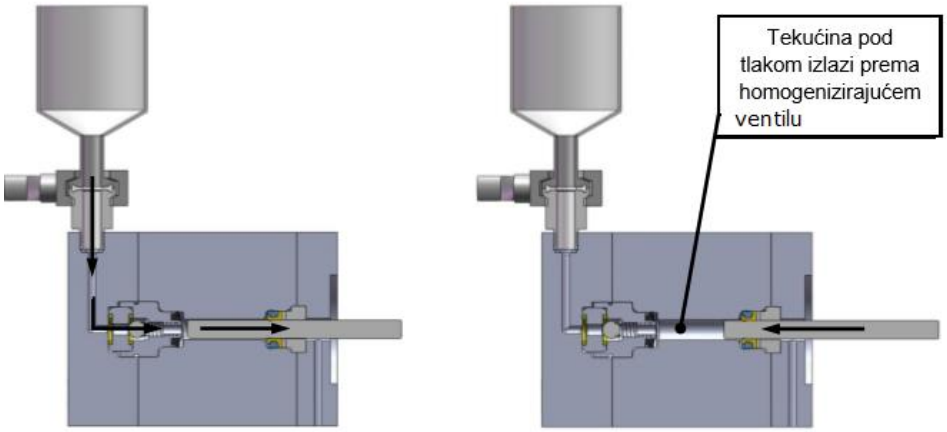
Slika 2: Metode izrade nanoemulzija (preuzeto i prilagođeno iz García-Celma i sur., 2016)

Za pripravu nanoemulzija visokoenergetskim metodama, prvo treba napraviti primarnu, grubu emulziju. Izrađuje se tako da se uljna i vodena faza zagriju na istu temperaturu, a zatim se, uz miješanje magnetskim mješačem, uljna faza doda vodenoj. Nakon toga slijedi miješanje visoko-učinkovitim dispergatorom. Tako izrađena primarna emulzija dalje se obrađuje visokoenergetskim uređajima (Jumma i Müller, 1999).

1.1.1. VISOKOTLAČNA HOMOGENIZACIJA

Visokotlačna homogenizacija visokoenergetska je metoda za pripravu nanoemulzija, prikladna za industrijske formulacije zbog lakoće rada, skalabilnosti i ponovljivosti (Silva i sur., 2015; Cerqueria i sur., 2014; Donsi i sur., 2011).

Visokotlačni homogenizator služi za obradu uzoraka raznih vrsta tekućih proizvoda pod visokim tlakom. Kompresijska je glava glavni dio stroja u koju se proizvod pumpa pod visokim tlakom. Nakon otvaranja usisnog ventila, proizvod ulazi u kompresijsku komoru, gdje mu se tlak povećava do najveće predviđene vrijednosti, a zatim potiskuje prema homogenizirajućem ventilu.



Slika 3: Slijed pumpanja u visokotlačnom homogenizatoru (Upute za uporabu i održavanje, HPHPanda PLUS2000, GEA Niro Soavi)

Homogenizirajući ventil regulacijski je visokotlačni ventil u kojem se uzorak transformira pomoću kombinacije efekata kao što su turbulencija, lokalna kavitacija, smično naprezanje i sudar kapljica ulja pri velikoj brzini.

Kako bi se stvorio tlak, potrebno je primijeniti silu *F* koja djelomično onemogućuje protok tekućine kroz homogenizirajući otvor koji nikad nije potpuno zatvoren. Postoji procijep koji omogućava odvijanje protoka, a njegova veličina određuje iznos tlaka – što je procijep veći, tlak je manji (Upute za uporabu i održavanje, HPHPandaPLUS2000).

U dosadašnjim radovima pokazano je da se povećanjem tlaka i broja ciklusa smanjuje promjer kapljica, kao i da je u prvom ciklusu najveći utjecaj koncentracije surfaktanta (El Kinawy i sur., 2012). Pokazano je i da su vrlo stabilne nanoemulzije s najmanjim hidrodinamičkim promjerom dobivene pri tlaku od 1380 bara i 20 ciklusa homogenizacije.

Kinetička stabilnost dokazana je za nanoemulzije različitog zeta-potencijala, a pokazano je i da povećanje površinskog naboja usporava brzinu vrhnjenja (Silva i sur., 2015).

Floury i sur. 2000 pokazali su da se povećanjem broja ciklusa pri tlaku od 200 bara do 1500 bara smanjuje veličina kapljica, kao i da se pri tlaku većem od 3000 bara kapljice povećavaju jer se povećanja stupanj koalescencije.

1.1.2. MIKROFLUIDIZACIJA

Mikrofluidizacija je visokoenergetska metoda koja, koristeći visoki tlak, usmjerava emulziju kroz mikrokanale, a pokazano je da pripravlja homogenije nanoemulzije manjih kapljica unutarnje faze od tradicionalnih metoda homogenizacije (Jafari i sur., 2006). Provodi se u mikrofluidizatoru.

Bitniji dijelovi mikrofluidizatora sustav su za hidraulički prijenos snage (engl. *Hydraulic PowerSystem*), visokotlačno pojačalo (engl. *High Pressure Intensifier*), interakcijska komora (engl. *Interaction Chamber*) i pomoćni modul za obradu (engl. *Auxiliary Processing Module*). Sustav za hidraulički prijenos snage dovodi hidrauličko ulje pod visokim tlakom do visokotlačnog pojačala koje amplificira tlak i prenosi ga na uzorak. Tijekom usisa, pojačalo uvlači uzorak u komoru preko ulaznog ventila, koji se zatim zatvara. Mlaz proizvoda pod tlakom ulazi u interakcijsku komoru i prolazi kroz mikrokanale, zbog čega se značajno ubrzava. Dva značajna procesa koji utječu na rezultat su smicanje i sudari. Nakon izlaska iz interakcijske komore, uzorak se dalje obrađuje prolaskom kroz pomoćni modul za obradu.

Gothsch i sur., 2011 zaključili su kako je pri obradi emulzije bolje koristiti veći tlak s manjim brojem ciklusa nego manji tlak uz više ciklusa.

Zamijećeno je smanjenje veličine kapljica pri tlakovima od 350 bara do 700 bara, a iznad 700 bara, kapljice su se povećale (Jafari i sur., 2006). To je objašnjeno fenomenom pretjerane obrade (engl. o*ver-processing*), prema kojem se zbog povećanog Brownova gibanja povećava vjerojatnost sudara, odnosno koalescencije. Tako je konačna veličina kapljica rezultat dvaju procesa, razbijanja kapljica i koalescencije. Koalescencija se događa i ovisno o tome je li se tijekom razbijanja kapljica dovoljno surfaktanta adsorbiralo na novonastalu kapljicu. O ovome fenomenu pisano je u više radova (Jafari i sur., 2007; Jafari i sur., 2006; Desrumaux i Marcand 2002; Schulz i Daniels 2000).

Bouaouina i sur., 2006, s druge strane, ističu kako visokoenergetski uvjeti poboljšavaju emulgatorske sposobnosti biopolimera jer se takvom obradom izlaže više hidrofobnih skupina.

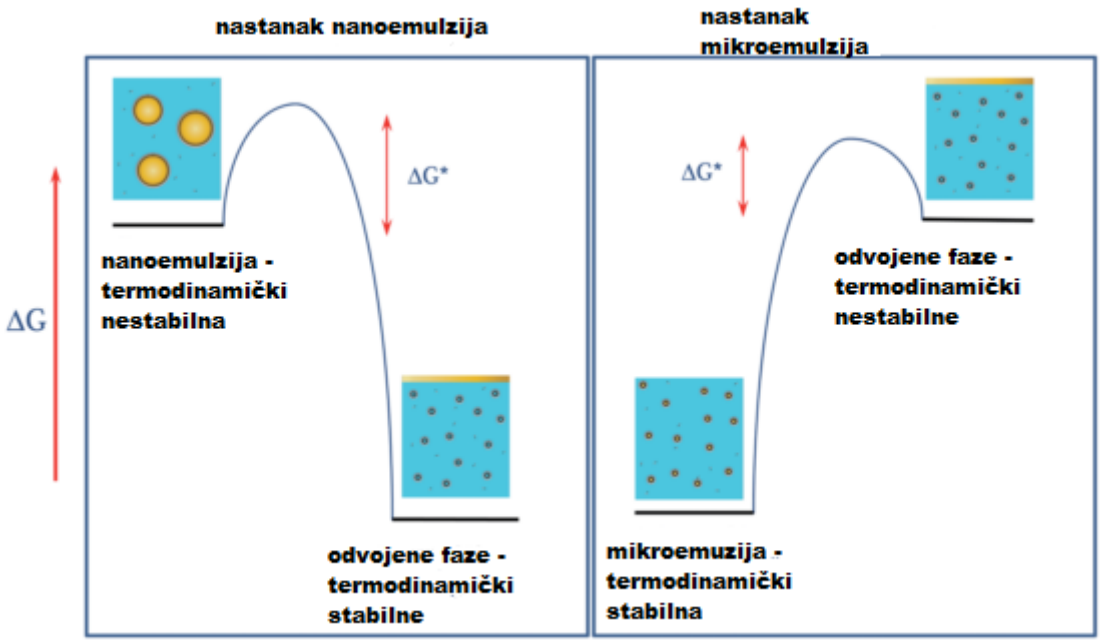
1.2. NANOEMULZIJE I MIKROEMULZIJE – RAZLIKE

Zbog njihovih sličnih svojstava, bitno je naglasiti razlike između nanoemulzija i mikroemulzija (García-Celma i sur., 2016; Gupta i sur., 2016; McClements 2012; Anton i Vandamme 2011).

Mikroemulzije su termodinamički stabilne izotropne tekućine pripravljene od ulja, vode i surfaktanta, sa strukturama koje mogu biti sferoidne, cilindrične, spužvaste i dr. (Jonsson, 1998). Mikroemulzije U/V tipa zovu se i sustavom izbubrenih micela (engl. *swollen micelle system*) (Wennerström i sur., 2006). Micele su organizirane tako da su hidrofobni repovi surfaktanta okrenuti jedni prema drugima, a hidrofilne glave prema vodenoj fazi. Uljna se faza može nalaziti u hidrofobnoj unutrašnjosti ili između hidrofobnih repova. Najveća količina ulja koja se može dodati na određenu koncentraciju surfaktanta jest saturacijska koncentracija. Dodatak ulja iznad te koncetracije dovodi do razdvajanja viška uljne faze na površini emulzije ili do nastanka nanoemulzije ako se primijeni dovoljno energije. Iako su termodinamički stabilne, nastanak mikroemulzija ne mora biti potpuno spontan zbog visokih energija aktivacije, odnosno energetske barijere, te fenomena prijenosa mase, stoga je potrebno uložiti energiju u obliku zagrijavanja ili mehaničkog pobuđivanja. Udio surfaktanta potreban za pripravu mikroemulzije veći je od onog potrebnog za pripravu nanoemulzije, i to u koncentraciji od barem 10% (McClements, 2012).

Za razliku od termodinamički stabilnih mikroemulzija, nanoemulzije su termodinamički nestabilne jer je Gibbsova slobodna energija veća za oblik nanoemulzije od Gibbsove slobodne energije razdvojenih faza. Unutarnja je faza u obliku sferičnih kapljica jer je takav oblik termodinamički najpovoljniji. Nanoemulzije se mogu pripraviti s većim brojem surfaktanata (mikroemulzijama odgovaraju samo surfaktanti manje molekulske mase), a mogu se stabilizirati proteinima ili polisaharidima (McClements, 2012). Bitno je naglasiti i da nanoemulzije mogu sadržavati puno veću koncentraciju ulja od mikroemulzija. Također, nanoemulzije se pripravljaju otapanjem surfaktanta u uljnoj fazi, dok je kod mikroemulzija takav redoslijed nebitan (Anton i Vandamme, 2010).

Glavna razlika između mikroemulzija i nanoemulzija njihova je termodinamička stabilnost, što je prikazano slikom 5:



Slika 4: Termodinamička stabilnost nanoemulzija i mikroemulzija (preuzeto i prilagođeno iz McClements, 2012)

1.3. PREDNOSTI NANOEMULZIJA U OFTALMIČKOJ PRIMJENI

Zbog dinamike suzne tekućine i nazolakrimalne drenaže, što rezultira kratkim vremenom dodira farmaceutskog pripravka s površinom oka, te relativne nepermeabilnosti rožnice i neproduktivne konjunktivalne i nazalne apsorpcije, konvencionalne farmaceutske pripravke (kapi za oko) karakterizira niska bioraspoloživost lijeka u oku. Nanoemulzije su pokazale poželjna svojstva za oftalmičku primjenu: produljeno prekornealno zadržavanje pripravka, poboljšanu apsorpciju kroz rožnicu, smanjenje sistemskih nuspojava te smanjeno zamućenje vida (Pepić, 2004). Kationske nanoemulzije mogu doći u interakciju s negativno nabijenom površinom oka i tako poboljšati apsorpciju lijeka (Lallemand i sur., 2012).

Tablica 1: Pregled odabranih originalnih znanstvenih publikacija koje svjedoče o potencijalu nanoemulzija u oftalmičkoj primjeni lijekova (preuzeto i prilagođeno iz Reimondez-Troitiño i sur., 2015)

SASTAV NANOEMULZIJE	PREDNOSTI NANOEMULZIJE	REFERENCE
indometacin 0,1% *m/m* srednjelančani trigliceridi 8,5% Lipoid E-80 1,2% stearilamin 0,3% α-tokoferol 0,02% Pluronic F68 2% glicerol 2,25% pročišćena voda do 100 g	Bolja apsorpcija indometacin kroz rožnicu u obliku kationske nanoemulzije nego u obliku anionske nanoemulzije; visoke koncentracije lijeka u očnoj vodici i bjeloočnici i mrežnici; dobra podnošljivost *in vivo.* (animalni model – mužjaci albino kunića)	Klang i sur., 2000
indometacin 0,125 % *m/m* Lipoid E-80 80% α-tokoferol 0,02% srednjelančani trigliceridi 10,0% glicerin 2,25% Miranol MHT 0,5% voda za injekcije do 100%	Visoke koncentracije lijeka u očnoj vodici i bjeloočnici i mrežnici; dobra tolerancija *in vivo.* (animalni model – mužjaci albino kunića)	Muchtar i sur., 1997
flurbiprofenaksetil 0,1% *m/v* ricinusovo ulje (0,1 – 2,5%) Tween 80 (0,08 – 4%) glicerol 2,2% Carbopol 974 0,125% (Pripravljene su 4 formulacije s različitim kombinacijama ricinusova ulja i Tweena 80.)	Poboljšan farmakološki učinak. (animalni model – mužjaci albino kunića)	Shen i sur., 2011
prolijek pilokarpina 1,2% 10 g sojina ulja 1,2 g lecitina 1,8 g glicerola voda za injekcije do 100 ml	Povećan i produljen terapijski učinak.	Sznitowska i sur., 1999
delta-8-tetrahidrokanabinol 0,4% (*m/m*) uljna faza 20% (70% sojino ulje, 30% oleinska kiselina) fosfolipidi žumanjka 1,0% Pluronic F68 2% glicerin 2,25% α-tokoferol 0,02% voda za injekcije do 100 g	Povećan antihipertenzivni učinak na intraokularni tlak.	Muchtar i sur., 1992.

1.4. KITOZAN

Kitozan je kopolimer N-acetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoze i 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoze, koje su povezane β (1→4) glikozidnim vezama. Dobiva se termokemijskom deacetilacijom hitina, polisaharida iz ljuštura rakova i kukaca. Uvjeti deacetilacije određuju molekulsku masu i stupanj deacetilacije, što direktno utječe na na kemijska i biološka svojstva polimera (Dash i sur., 2011). Komercijalno su dostupni kitozan niske, srednje i velike molekulske mase i niskog, srednjeg i visokog stupnja deacetilacije.

1.4.1. PREDNOSTI KITOZANA U OFTALMIČKOJ PRIMJENI

Kitozan je zbog svog pozitivnog naboja ima izražena svojstva mukoadhezivnosti na negativno nabijenu površinu oka (Lehr i sur., 1992), a pretpostavlja se da mukoadhezivnu ulogu imaju i vodikove veze te hidrofobne interakcije (Sogias i sur., 2008). Otopine kitozana pokazuju pseudoplastična svojstva, što je poželjno za oftalmičke formulacije jer omogućuje lako širenje formulacije po površini oka treptanjem, a između treptaja zbog povećanja viskoznosti omogućava se dulje zadržavanje formulacije po površini oka (Mucha 1997; Wang i Xu 1994; Greaves i sur.,1992).

Kitozan također poboljšava paracelularnu apsorpciju otvarajući čvrste veze (engl. *tight junctions*) (Van Der Merwe i sur., 2004; Schipper i sur., 1997). Usto, pokazao je odličnu toleranciju (Felt i sur., 1999) i nisku toksičnost (de la Fuente i sur., 2010). Razgrađuje se u suznoj tekućini djelovanjem enzima lizozima (Temel i sur., 1991). Dodatna prednost primjene kitozana njegovo je antimikrobno djelovanje, čiji mehanizam još nije razjašnjen (de la Fuente i sur., 2010).

Emulzije stabilizirane kitozanom i surfaktantom pokazale su bolju stabilnost u odnosu na emulzije stabilizirane samo surfaktantom. Bitno je naglasiti da stabilne emulzije mogu nastati samo ako je u formulaciji dovoljno kitozana kako bi potpuno prekrio površinu kapljica (Mun i sur., 2006).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog istraživanja je priprava nanoemulzija stabiliziranih neionskim surfaktatima i kitozanom kao terapijskih sustava namijenjenih oftalmičkoj primjeni lijekova. Nanoemulzije su pripravljene koristeći visokoenergetske metode, odnosno visokotlačnom homogenizacijom i mikrofluidizacijom. U diplomskom radu ispitan je utjecaj procesnih parametara na fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija.

Specifični ciljevi diplomskog rada bili su:

- odrediti utjecaj tlaka i broja ciklusa na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije;
- ispitati stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije dva tjedna nakon izrade, mjerenjem veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala nanoemulzija;
- odrediti utjecaj tlaka i broja ciklusa na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije;
- ispitati stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije dva tjedna nakon izrade, mjerenjem veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala nanoemulzija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Za izradu 1%-tne otopine kitozana korišteni su kitozan (Sigma Aldrich; srednja molekulska masa 190 – 310 kDa; stupanj deacetilacije 75% - 85%), ledena octena kiselina te pročišćena voda. Za izradu nanoemulzije korišteni su Miglyol 812 (KEMIG d.o.o.) i ricinusovo ulje (Ricini oleum virginale, KEMIG d.o.o.) kao smjesa ulja, Pluronic F68 (Kolliphor P 188, SIGMA Life Science) kao neionski surfaktant te 1%-tna otopina kitozana i pročišćena voda za vodenu fazu.

3.2 METODE

3.2.1 IZRADA 1%-TNE OTOPINE KITOZANA

U čašu je odvagnuto 2 g kitozana te se dodalo 197 g pročišćene vode (do 199 g), a na kraju je dodan 1 g ledene octene kiseline. Kako bi se kitozan potpuno otopio, dobivena se smjesa miješala 24 sata magnetskim mješačem. Otopina se filtrirala te skladištila pri +4°C zatvorena parafilmom.

3.2.2 IZRADA PRIMARNE EMULZIJE

Princip izrade temelji se na metodi predloženoj u radu autora Jumaa i Müllera (Jumaa i Müller, 1999). Uljna se faza priredila otapanjem surfaktanta (ukupnog masenog udjela 2,5%) u smjesi ricinusova ulja (ukupnog masenog udjela 2,5%) i Miglyola 812 (ukupnog masenog udjela 2,5%) uz zagrijavanje i miješanje magnetskim mješačem. Za potpuno otapanje surfaktanta u uljnoj fazi bila je potrebna temperatura od 70°C. Vodena se faza pripremila miješanjem 1%-tne otopine kitozana i pročišćene vode, tako da konačni udio kitozana bude 0,5%, te se zagrijala na 70°C. Uljna se faza dodala u vodenu fazu uz miješanje koje se nastavilo još 30 minuta. Nakon toga, dobivena se primarna emulzija miješala 3 minute pri 8000 rpm koristeći visoko-učinkoviti dispergator IKA Magic Lab (ULTRA-TURRAX®, IKA®-Werke GmbH & Co., Staufen, Njemačka).

3.2.3 PRIPRAVA NANOEMULZIJA METODOM VISOKOTLAČNE HOMOGENIZACIJE

Za pripravu nanoemulzija metodom visokotlačne homogenizacije korišten je visokotlačni homogenizator HPH PandaPLUS 2000 (Gea Niro Suavi).

Primarna se emulzija podijelila u tri dijela. Svaki je dio prošao pet ciklusa pod različitim iznosima tlaka, s podtlakom koji je iznosio 10% tlaka. Nakon prvog, trećeg i petog ciklusa uzimani su uzorci od 5 ml. Rasponi iznosa korištenog tlaka tijekom obrade bili su redom 600 – 700 bar, 960 – 1030 bar i 1260 – 1290 bar.

3.2.4 PRIPRAVA NANOEMULZIJA METODOM MIKROFLUIDIZACIJE

Za pripravu nanoemulzija metodom mikrofluidizacije korišten je mikrofluidizator Model M-110EH-30 Microfluidizer (Microfluidics).

Primarna se nanoemulzija podijelila u tri dijela. Svaki je dio obrađen različitim tlakovima koji su redom iznosili 700 bar, 1000 bar i 1300 bar, a uzorci od 5 ml uzimani su nakon prvog, trećeg i petog ciklusa. Kako bi se odredilo vrijeme uzorkovanja, prvo se izmjerio protok vode pri svakom od navedenih tlakova, a ti su protoci bili 215 ml/min za 700 bar, 240 ml/min za 1000 bar i 268 ml/min za 1300 bar. Prema formuli 1

$$trajanje\ \ homogenizacije = \frac{V[ml]}{protok\left[\frac{ml}{\min}\right]} \cdot broj\ propuštanja \qquad (1)$$

izračunata su sljedeća vremena uzorkovanja:

Tablica 2: Vremena uzorkovanja nanoemulzije pripravljene metodom mikrofluidizacije

	t_1	**t_3**	**t_5**
700 bar	42 s	2 min 3 s	3 min 21 s
1000 bar	37,5 s	1 min 50 s	3 min
1300 bar	33,6 s	1 min 38,6 s	2 min 41 s

3.2.5. ODREĐIVANJE VELIČINE KAPLJICA, INDEKSA POLIDISPERZNOSTI I ZETA-POTENCIJALA NANOEMULZIJA

Veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal mjereni su uz pomoć uređaja Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, UK). Ovaj uređaj mjeri veličinu kapljica i PDI primjenom fotonske korelacijske spektroskopije (engl. *photon correlation spectroscopy*, *PCS*). Uzorak se obasjava monokromatskom koherentnom laserskom zrakom, a zatim se detektira intenzitet svjetlosti koja je raspršena na kapljicama pod kutom od 90º. Mjerenje se ponavlja u tri ciklusa po deset mjerenja, a ispisani je rezultat aritmetička sredina svih mjerenja. Mjerenje zeta-potencijala temelji se na mjerenju elektroforetske pokretljivosti čestica. Primjenom električnog polja na tekućinu, nabijene se čestice stalnom brzinom kreću prema elektrodi suprotnoga naboja nakon uspostave ravnoteže sa silama viskoznosti. Ta je brzina, između ostalog, ovisna o zeta-potencijalu. Nabijene čestice gibajući se raspršuju svjetlost, a frekvencija svjetlosti mijenja se ovisno o brzini gibanja. Nakon obrade podataka i određivanja spektra frekvencija, izračunava se elektroforetska pokretljivost, a iz nje zeta-potencijal (ZETASIZER 2000/3000, Manual).

Fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija određena su odmah nakon priprave nanoemulzija te dva tjedna nakon priprave kako bi se ispitala stabilnost pripravljenih nanoemulzija. Za mjerenje veličine kapljica i indeksa polidispernosti, uzorak nanoemulzije razrijeđen je 500 puta u pročišćenoj vodi, a za mjerenje zeta potencijala, uzorak je razrijeđen 125 puta u 10 mM otopini natrijeva klorida. Ta su razrjeđenja određena mjerenjem traženih svojstava nanoemulzije izrađene na mikrofluidizatoru pod tlakom od 700 bara i nakon jednog ciklusa, pri različitim razrjeđenjima, što je prikazano **Tablicom 3:**

Tablica 3: Veličina kapljica i indeksa polidisperznosti nanoemulzije pripravljene metodom mikrofluidizacije pri pri tlaku od 700 bar pri različitim razrjeđenjima

Razrjeđenje	**Veličina kapljica/nm**	**PDI**
100x	285,1 ± 6,6	0,598 ± 0,161
200x	269,4 ± 5,8	0,600 ± 0,028
400x	240,5 ± 1,2	0,455 ± 0,025
800x	220,8 ± 1,4	0,273 ± 0,028
1000x	201,6 ± 1,0	0,269 ± 0,030
2500x	199,6 ± 2,3	0,248 ± 0,037

Veličine kapljica i zeta-potencijal odmah nakon priprave nanoemulzija na visokotlačnom homogenizatoru nisu izmjereni pri točno određenim razrjeđenjima.

Budući da je prvo mjerenje svojstava nanoemulzije pripravljene metodom visokotlačne homogenizacije bilo pri nedefiniranim razrjeđenjima, na temelju opalescencije mjerenog uzorka procijenjeno je da se radilo o razrjeđenju od 200 puta. Koristeći podatke iz **Tablice 3**, dobivena je jednadžba ovisnosti izmjerene veličine o razrjeđenju. Jednadžba je dobivena koristeći MATLAB funkcija *polyfit* i *polyval*. U jednadžbu je uvršteno razrjeđenje *500* i dobivena je procijenjena veličina kapljice za nanoemulziju koja je iznosila 235,17 nm. Taj se iznos podijelio s veličinom izmjerenom pri razrjeđenju od 200 puta i dobiveno je da je on 87,29% veličine kapljica pri manjem razrjeđenju, što bi odgovaralo 286,92 nm za formulaciju dobivenu nakon jednog ciklusa visokotlačne homogenizacije pri 700 bara. Kako bi se dobile vrijednosti za preostale formulacije, od svake je vrijednosti oduzeta razlika izmjerene i procijenjene vrijednosti kako bi se dobivene vrijednosti slagale s krivuljama izmjerenih vrijednosti.

Koristeći podatke iz **Tablice 3,** dobivena je jednadžba ovisnosti izmjerenog indeksa polidisperznosti o razrjeđenju. Izračunato je da je za nanoemulziju izrađenu nakon jednog ciklusa visokotlačne homogenizacije pri 700 bara PDI pri razrjeđenju od 500 puta za 30% manji od onog pri razrjeđenju od 200 puta, te iznosi 0,275. Kako bi se dobile vrijednosti za preostale formulacije, od svake je vrijednosti oduzeta razlika izmjerene i procijenjene vrijednosti kako bi se procijenjene vrijednosti slagale s krivuljama izmjerenih vrijednosti.

Procijenjene vrijednosti dodane su u grafičke prikaze za formulacije dobivene visokotlačnom homogenizacijom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRIPRAVA NANOEMULZIJA

Nanoemulzije su pripremljene tako da se najprije pripremila primarna emulzija dodavanjem uljne faze (koja je sadržavala Pluronic F68 ukupnog masenog udjela 2,5%, ricinusovo ulje ukupnog masenog udjela 2,5% i Miglyol 812 ukupnog masenog udjela 2,5%) u vodenu fazu (koja je sadržavala 1%-tnu otopinu kitozana i pročišćenu vodu, tako da je ukupni maseni udio kitozana 0,5%), pri čemu su obje zagrijane na istu temperaturu. Zatim se primarna emulzija dodatno miješala 30 minuta magnetskim mješačem te dodatne 3 minute na visoko-učinkovitom dispergatoru. Poslije toga, emulzija je obrađena na visokotlačnom homogenizatoru i mikrofluidizatoru pri tlakovima od 700 bara, 1000 bara i 1300 bara, a uzorci su uzimani nakon prvog, trećeg i petog propuštanja. Za svaki je od oba uređaja dobiveno 9 formulacija sa sljedećim kombinacijama tlakova i broja ciklusa (**Tablica 4**):

Tablica 4: Formulacije nanoemulzija nakon obrade visokoenergetskim metodama

	BROJ PROPUŠTANJA (CIKLUSA)	**TLAK [bar]**
Formulacija 1	1	700
Formulacija 2	3	700
Formulacija 3	5	700
Formulacija 4	1	1000
Formulacija 5	3	1000
Formulacija 6	5	1000
Formulacija 7	1	1300
Formulacija 8	3	1300
Formulacija 9	5	1300

Dobivene nanoemulzije (**Slika 5, 6, 7, 8**) bile su mliječno bijele boje i nije bilo primijećeno odvajanje faza nakon dva tjedna ni za jednu od pripravljenih formulacija.



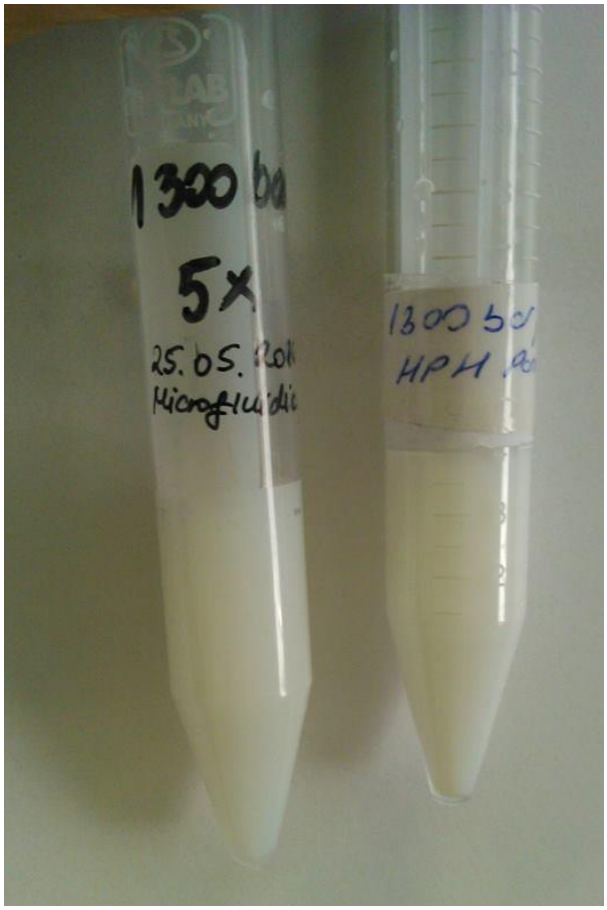
Slika 5: Nanoemuzije izrađene pri tlaku od 700 bara i tri ciklusa - mikrofluidizacija (lijevo); visokotlačna homogenizacija (desno)



Slika 6: Nanoemuzije izrađene pri tlaku od 1300 bara i jednim ciklusom - mikrofluidizacija (lijevo); visokotlačna homogenizacija (desno)



Slika 7: Nanoemuzije izrađene pri tlaku od 1000 bara i tri ciklusa - mikrofluidizacija (lijevo); visokotlačna homogenizacija (desno)

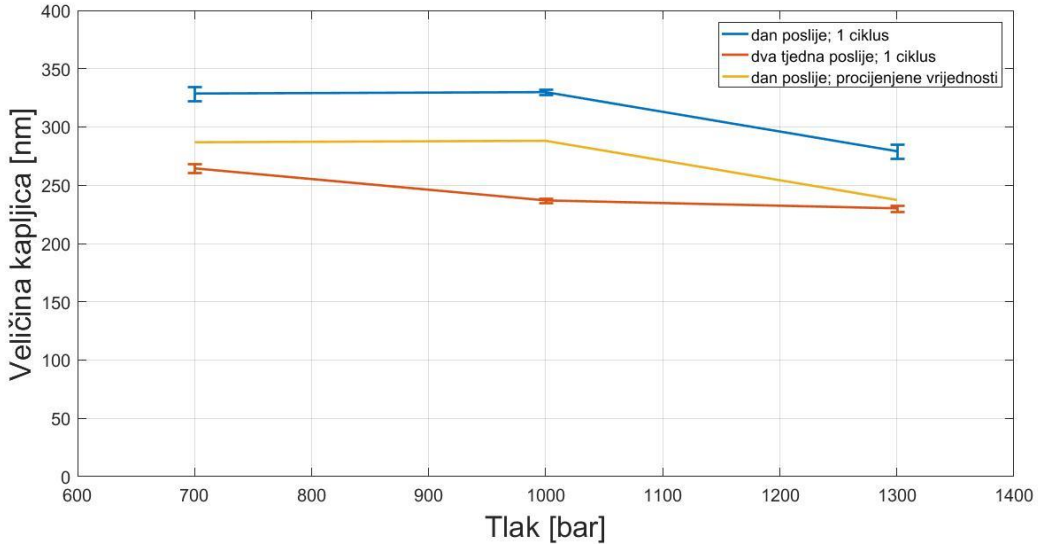


Slika 8: Nanoemuzije izrađene pri tlaku od 1300 bara i pet ciklusa - mikrofluidizacija (lijevo); visokotlačna homogenizacija (desno)

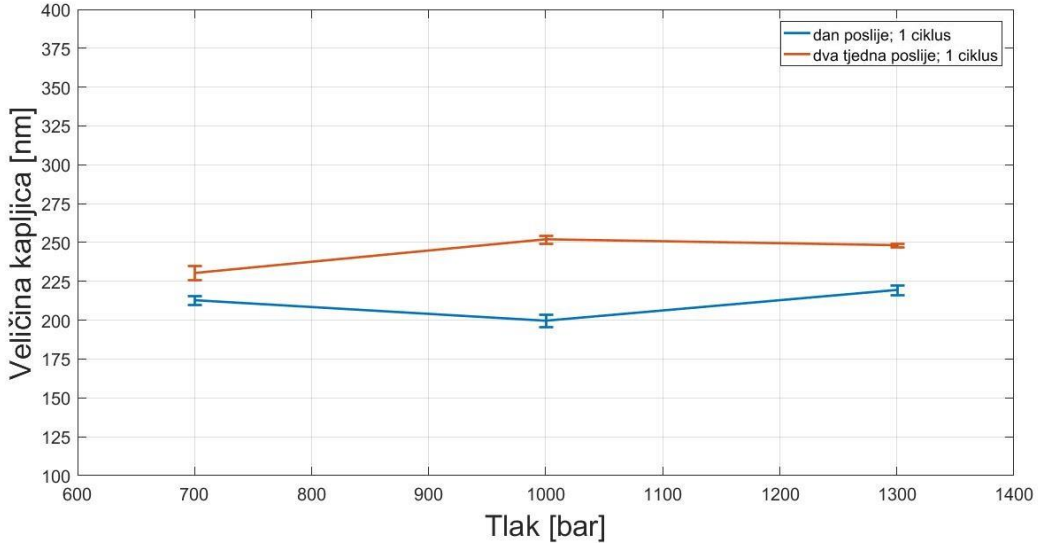
4.2. UTJECAJ TLAKA NA SVOJSTVA I STABILNOST NANOEMULZIJA

4.2.1. VELIČINA KAPLJICA

Na **Slici 9** i **Slici 10** vidi se utjecaj tlaka na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija nakon jednog ciklusa obrade na visokotlačnom homogenizatoru, odnosno mikrofluidizatoru. Prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 9: Utjecaj tlaka na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije jednim propuštanjem (1 ciklus).



Slika 10: Utjecaj tlaka na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije jednim propuštanjem (1 ciklus).

Prvo mjerenje veličine kapljica nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije jednim propuštanjem pokazalo je kako promjena tlaka sa 700 bara na 1000 bara nije dovela do promjene, ali da su se povećanjem tlaka s 1000 bara na 1300 bara kapljice smanjile.

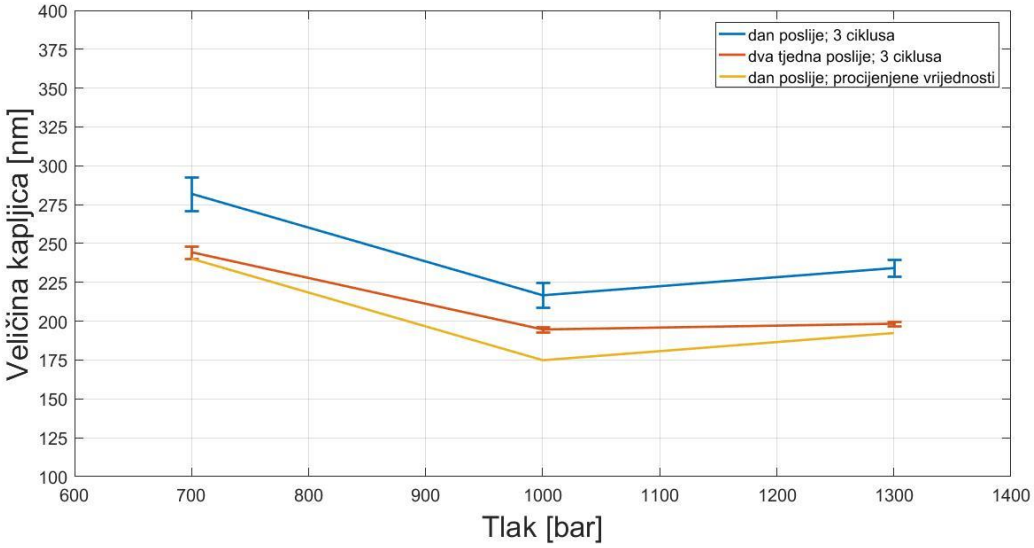
Nakon prvog mjerenja veličine kapljica nanoemulzije izrađene na mikrofluidizatoru, povećanje tlaka sa 700 bara na 1000 bara dovelo je do blagog smanjenja veličine kapljica, a uočeno je povećanje veličine kapljica pri tlaku od 1300 bara, što se može pripisati fenomenu pretjerane obrade (Jafari i sur., 2007; Jafari i sur., 2006; Desrumaux i Marcand 2002; Schulz i Daniels 2000).

Najmanja je veličina kapljica nanoemulzije pripravljene metodom mikrofluidizacije pri jednom propuštanju postignuta pri tlaku od 1000 bara (199,7 ± 4,0 nm).

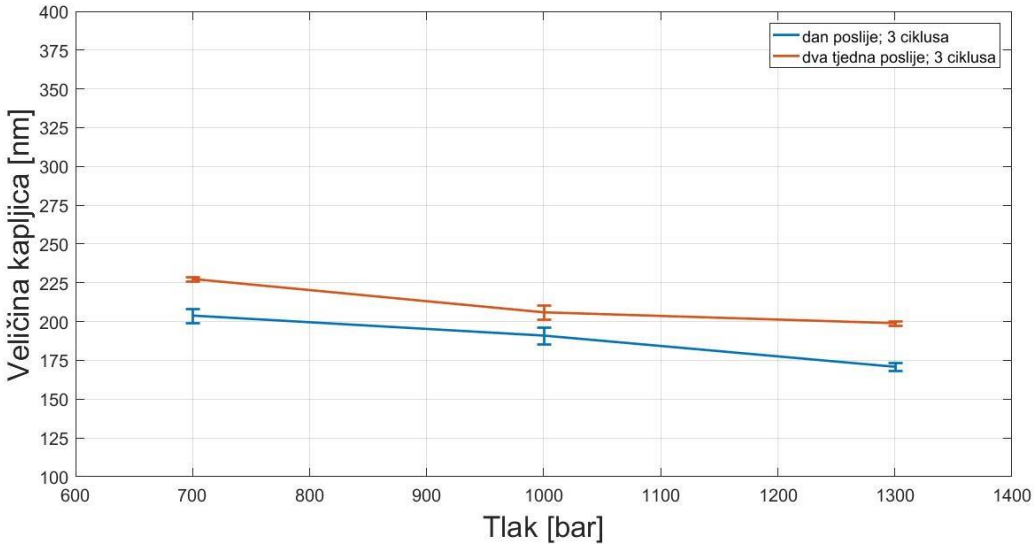
Međutim, nakon dva tjedna, kapljice nanoemulzije pripravljene mikrofluidizacijom pri tlaku od 1000 bara najviše su se povećale, dok su one pripravljene pri 700 bara pokazale najmanje povećanje.

Zanimljivo je primijetiti kako se veličina kapljica nanoemulzije izrađene na visokotlačnom homogenizatoru smanjila nakon dva tjedna. Mogući je uzrok takvom rezultatu neujednačenost razrjeđenja prilikom prvog mjerenja veličine. Utjecaj razrjeđenja na izmjerenu veličinu kapljica prikazan je **Tablicom 3.** Međutim, vrijednosti koje su procijenjene za isto razrjeđenje bile su veće od onih nakon drugog mjerenja, ali bitno je naglasiti da je nanoemulzija koja je pripravljena pri 1300 bara imala skoro jednaku veličinu nakon dva tjedna u usporedbi s prvim mjerenjem (prvo mjerenje 237,42 nm, drugo mjerenje 230,2 ± 2,8 nm).

Na **Slici 11** i na **Slici 12** vidi se utjecaj tlaka na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih visokotlačnom homogenizacijom, odnosno mikrofluidizacijom i trima propuštanjima (3 ciklusa). Prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 11: Utjecaj tlaka na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije trima propuštanjima (3 ciklusa).



Slika 12: Utjecaj tlaka na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije trima propuštanjima (3 ciklusa).

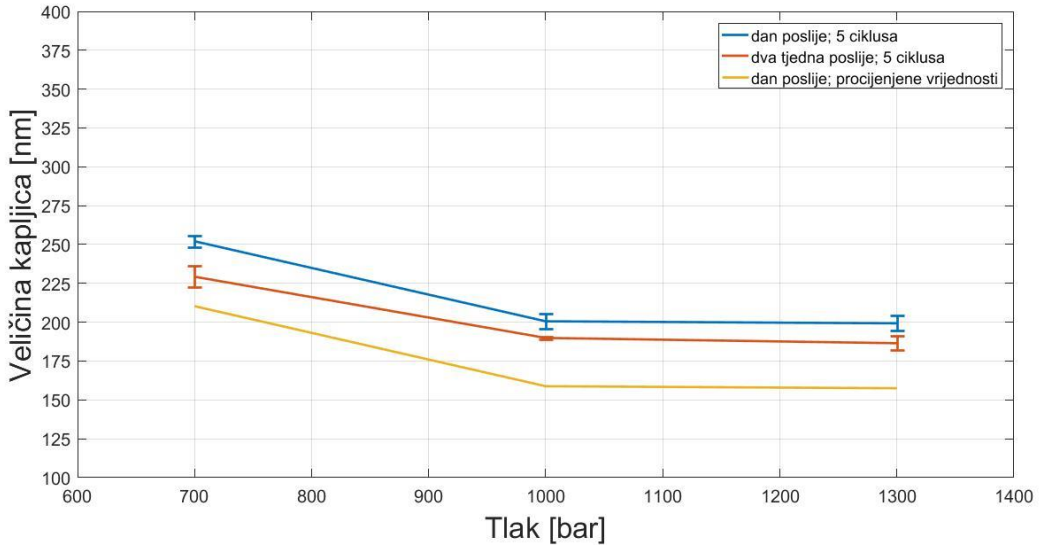
Za nanoemulziju pripravljenu metodom visokotlačne homogenizacije, povećanje tlaka sa 700 bara na 1000 bara uzrokovalo je smanjenje kapljica. Međutim, daljnje povećanje tlaka uzrokovalo je blago povećanje veličine.

Za razliku od **Slike 10**, na **Slici 12** primijećeno je smanjenje kapljica povećanjem tlaka mikrofluidizatora. Najmanje kapljice izmjerene su za nanoemulziju izrađenu mikrofluidizacijom pri tlaku od 1300 bara (170,9 ± 2,4 nm).

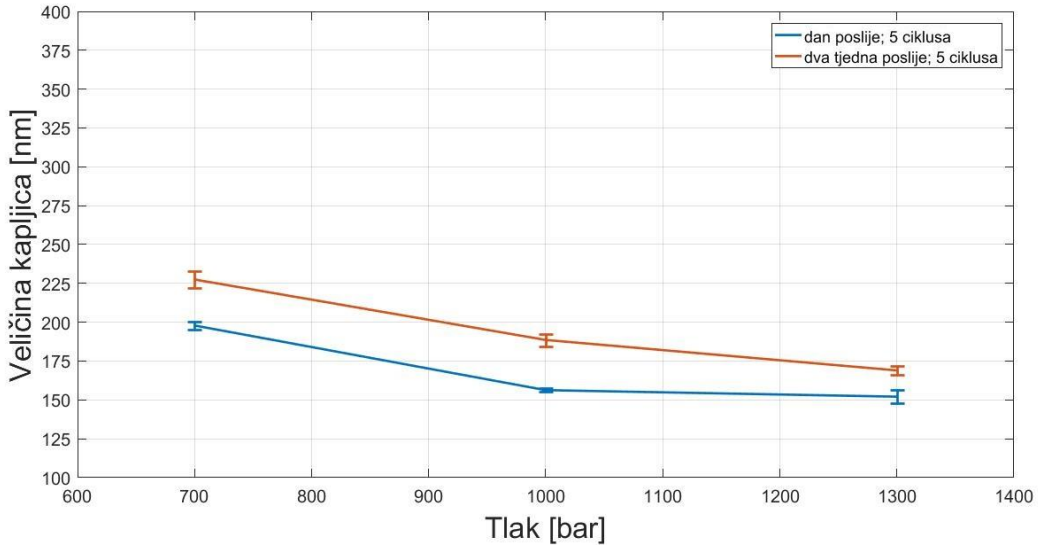
Kao i nakon mjerenja stabilnosti nakon jednog propuštanja na visokotlačnom homogenizatoru, zamijećeno je smanjenje kapljica nakon dva tjedna. Najmanja promjena veličine nakon visokotlačne homogenizacije bila je za nanoemulziju pripravljenu pri 1000 bara. Međutim, usporede li se vrijednosti izmjerene nakon dva tjedna s procijenjenim vrijednostima, pri tlaku od 700 bara, promjena je bila u granicama standardne devijacije (prvo mjerenje 240,22 nm, drugo mjerenje 244,4 ± 3,9 nm), a pri tlaku od 1300 bara, promjena je bila malena (prvo mjerenje 192,42, drugo mjerenje 198,4 ± 1,2 nm). Značajnija je promjena bila pri tlaku od 1000 bara.

Najmanja promjena nakon dva tjedna za nanoemulziju pripravljenu mikrofluidizacijom bila je pri 1000 bara, a najmanje izmjerene veličine kapljica bile su za nanoemulziju pripravljenu metodom visokotlačne homogenizacije pri 1000 bara (194,7 ± 1,6 nm). Uzmu li se u obzir procijenjene vrijednosti, najmanja je promjena bila za nanoemulziju pripravljenu visokotlačnom homogenizacijom pri 1300 bara.

Na **Slici 13** i **Slici 14** prikazan je utjecaj tlaka na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija koje su prošle kroz pet propuštanja (ciklusa) visokotlačne homogenizacije, odnosno mikrofluidizacije. Prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 13: Utjecaj tlaka na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije i pet propuštanja (5 ciklusa).



Slika 14: Utjecaj tlaka na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije i pet propuštanja (5 ciklusa).

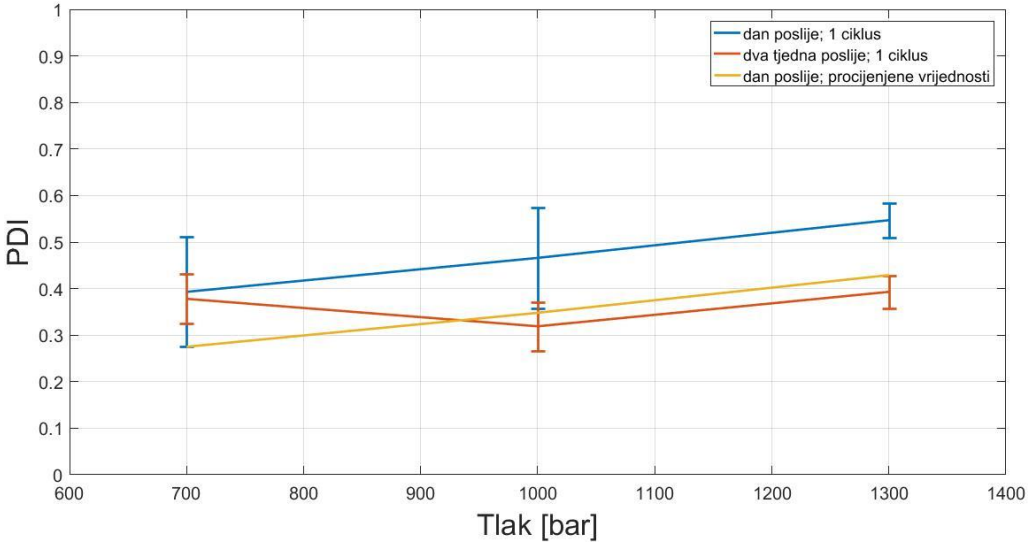
Nakon visokotlačne homogenizacije ponovno je uočeno smanjenje veličine kapljica povećanjem tlaka sa 700 bara na 1000 bara, ali daljnje povećanje tlaka nije uzrokovalo i daljnje smanjenje veličine. Isti trend uočen je za nanoemulziju pripravljenu mikrofluidizacijom. Najmanja je veličina kapljica nanoemulzije izrađene mikrofluidizacijom pri 1300 bara (152,1 ± 4,1 nm).

Ponovno je uočeno smanjenje kapljica nanoemulzije izrađene na visokotlačnom homogenizatoru nakon dva tjedna. Međutim, uzmu li se u obzir vrijednosti dobivene procjenjivanjem veličine, može se primjetiti da su se kapljice povećale stajanjem, ali je povećanje bilo najmanje za formulaciju pripravljenu pri 700 bara. To se može povezati s literaturnim podatkom da je pri tlaku većem od 700 bara zamijećeno povećanje kapljica (Jafari i sur., 2006). Određivanjem stabilnosti nanoemulzije pripravljene mikrofluidizacijom, uočeno je kako je najmanja promjena veličine bila za formulaciju koja je pripravljena pri 1300 bara, što nije u skladu s očekivanim fenomenom pretjerane obrade (Jafari i sur., 2007; Jafari i sur., 2006; Desrumaux i Marcand 2002; Schulz i Daniels 2000).

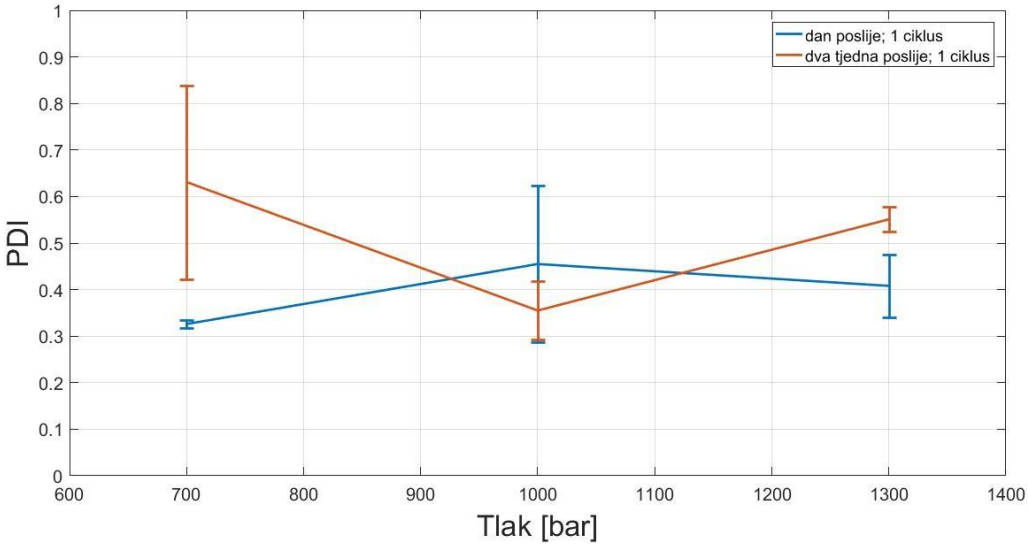
Najmanja izmjerena veličina kapljica nakon dva tjedna bila je za nanoemulziju izrađenu mikrofluidizacijom pri 1300 bara (169,0 ± 3,1 nm).

4.2.2. INDEKS POLIDISPERZNOSTI

Na **Slici 15** i na **Slici 16** prikazan je utjecaj tlaka na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodama visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije jednim propuštanjem. Prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 15: Utjecaj tlaka na indeks polidisperznosti (PDI) i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije jednim propuštanjem (1 ciklus).



Slika 16: Utjecaj tlaka na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije jednim propuštanjem (1 ciklus).

PDI izmjeren dan nakon prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene na visokotlačnom homogenizatoru linearno se povećavao povišenjem tlaka.

Kod nanoemulzije pripravljene metodom mikrofluidizacije zanimljivo je kako se PDI povećao povišenjem tlaka sa 700 bara na 1000 bara, a povišenjem tlaka s 1000 bara na 1300 bara smanjio.

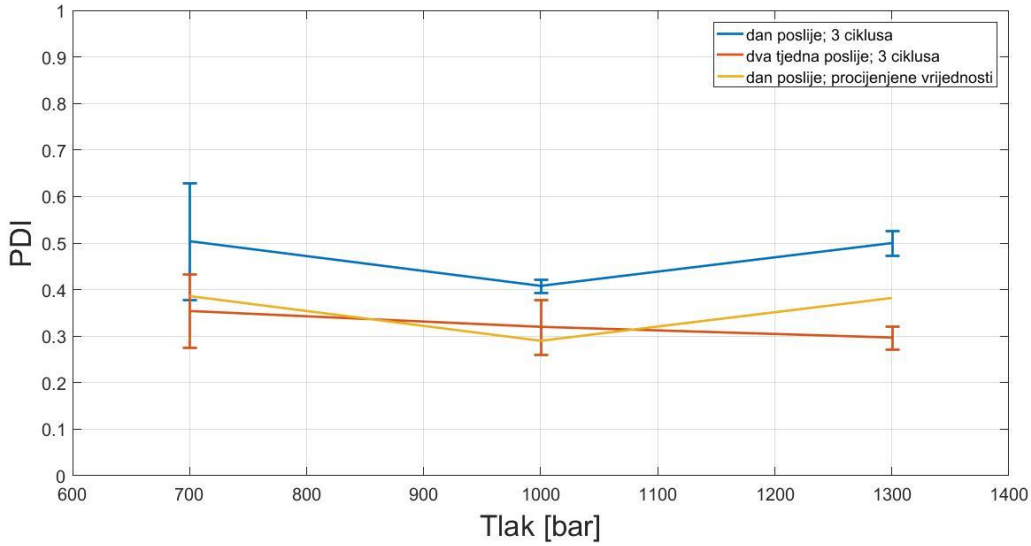
Uzorci pripravljeni na visokotlačnom homogenizatoru pokazali su smanjenje vrijednosti PDI nakon dva tjedna u odnosu na prvo mjerenje. Ovakav se rezultat može objasniti različitim razrjeđenjima pri prvom i drugom mjerenju. Međutim, uzmu li se u obzir procijenjene vrijednosti, PDI nanoemulzije pripravljene metodom visokotlačne homogenizacije ostao je u granicama standardne devijacije, osim za onu formulaciju pripravljenu pri 700 bara.

Dva tjedna nakon mikrofluidizacije, primijećeno je povećanje vrijednosti PDI nanoemulzije obrađene tlakom od 700 bara. Manje je povećanje vrijednosti PDI uočeno za uzorke pripravljene pri tlaku od 1300 bara, dok se PDI smanjio uzorcima obrađenima pri tlaku od 1000 bara.

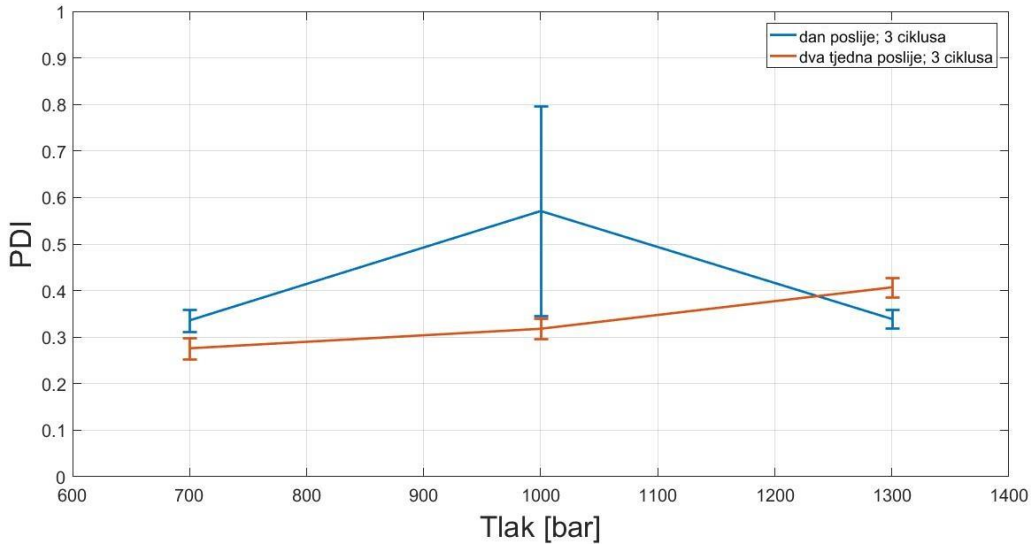
Bitno je naglasiti da je pri određivanju vrijednosti PDI kod mikrofluidizacije standardna devijacija bila značajna, što se može objasniti nedovoljnom obradom uzoraka nakon samo jednog propuštanja.

Najmanji PDI izmjeren je dva tjedna nakon izrade za nanoemulziju izrađenu visokotlačnom homogenizacijom pri 1000 bara (0,319 ± 0,052 nm).

Na **Slici 17** i na **Slici 18** prikazan je utjecaj tlaka na indeks polidisperznosti i stabilnost nanoemulzija koje su prošle tri ciklusa obrade na visokotlačnom homogenizatoru, odnosno mikrofluidizatoru. Prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 17: Utjecaj tlaka na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije trima propuštanjima (3 ciklusa).



Slika 18: Utjecaj tlaka na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije trima propuštanjima (3 ciklusa).

Nakon prvog mjerenja za nanoemulziju pripravljenu visokotlačnom homogenizacijom najmanji je PDI izmjeren pri tlaku od 1000 bara, a bitno je primijetiti i kako je standardna devijacija bila manja povišenjem tlaka.

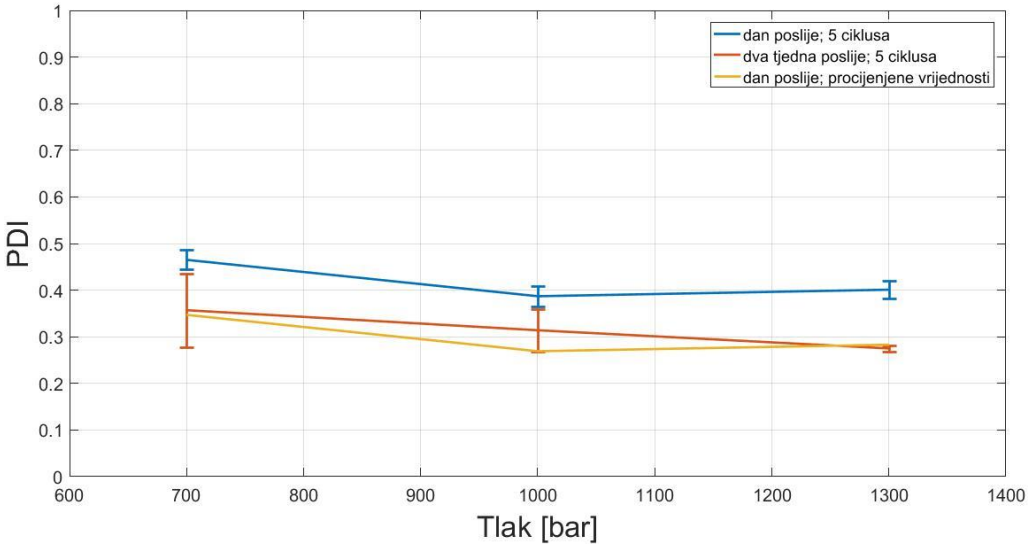
Za razliku od nanoemulzije izrađene na visokotlačnom homogenizatoru, najveći PDI nanoemulzije izrađene na mikrofluidizatoru bio je kod uzorka obrađenog tlakom od 1000 bara, a za isti je zabilježena i velika standardna devijacija.

Uzorci obrađeni na visokotlačnom homogenizatoru pokazali su smanjenje vrijednosti PDI nakon dva tjedna u odnosu na prvo mjerenje, kao što je uočeno kod uzoraka koji su prošli jedan ciklus, a na **Slici 19** vidi se isti trend za pet ciklusa. Uzmu li se u obzir procijenjene vrijednosti prvog mjerenja, kod formulacija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije, PDI je bio približno isti. To se može objasniti literaturnim podatkom da visokoenergetski uvjeti poboljšavaju emulgatorske sposobnosti biopolimera, a samim time i stabilnost (Bouaouina i sur., 2006).

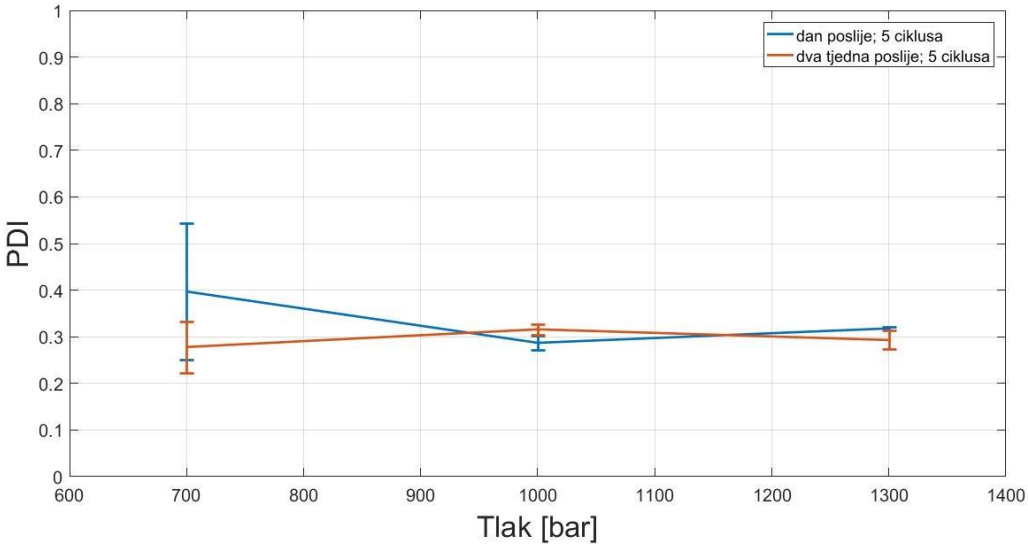
Nakon dva tjedna, uočeno je smanjenje vrijednosti PDI nanoemulzije pripravljene mikrofluidizacijom, posebno za uzorak pripravljen pri tlaku od 1000 bara, iako se nalazi unutar vrijednosti standardne devijacije. Manje je smanjenje uočeno za uzorak obrađen pri tlaku od 700 bar, dok je za uzorak obrađen pri tlaku od 1300 bara primijećeno povećanje vrijednosti PDI.

Najmanji PDI izmjeren je dva tjedna nakon izrade za nanoemulziju izrađenu mikrofluidizacijom pri 700 bara (0,276 ± 0,023 nm).

Na **Slici 19** i na **Slici 20** prikazan je utjecaj tlaka na PDI i stabilnost nanoemulzija koje pripravljene s pet propuštanja (ciklusa) obrade na visokotlačnom homogenizatoru, odnosno mikrofluidizatoru. Prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 19: Utjecaj tlaka na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije i pet propuštanja (5 ciklusa).



Slika 20: Utjecaj tlaka na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije i pet propuštanja (5 ciklusa).

Uzorci obrađeni na visokotlačnom homogenizatoru pokazali su isti trend kao nakon tri ciklusa obrade, odnosno da se povećanjem tlaka smanjuje PDI.

Prvo mjerenje uzorka pripravljenog mikrofluidizacijom pokazalo je da je najmanji indeks polidisperznosti pri tlaku od 1000 bara, slijedi blago povećanje pri tlaku od 1300 bara, dok je najveći indeks polidisperznosti izmjeren pri 700 bara.

Kao i u prethodnim primjerima, nanoemulzija pripravljena visokotlačnom homogenizacijom pokazala je smanjenje PDI mjerenjem stabilnosti. Ako se u obzir uzmu procijenjene vrijednosti, PDI je ostao isti, uz iznimku formulacije pripravljene pri 1000 bara, iako je promjena bila u granicama standardne devijacije.

U drugom je mjerenju nanoemulzije pripravljene mikrofluidizacijom uočen pad PDI u odnosu na početne vrijednosti pri tlakovima od 700 bara i 1300 bara, te blago povećanje pri tlaku od 1000 bara, ali potrebno je naglasiti da te promjene u granicama standardne devijacije te nisu statistički značajne.

Standardne devijacije bile su najveće pri tlaku od 700 bara za nanoemulzije pripravljene na oba uređaja. To se može pojasniti podatkom da visokoenegetski uvjeti poboljšavaju emulgatorske sposobnosti biopolimera, a to dovodi do stabilnijih formulacija (Bouaouina i sur., 2006).

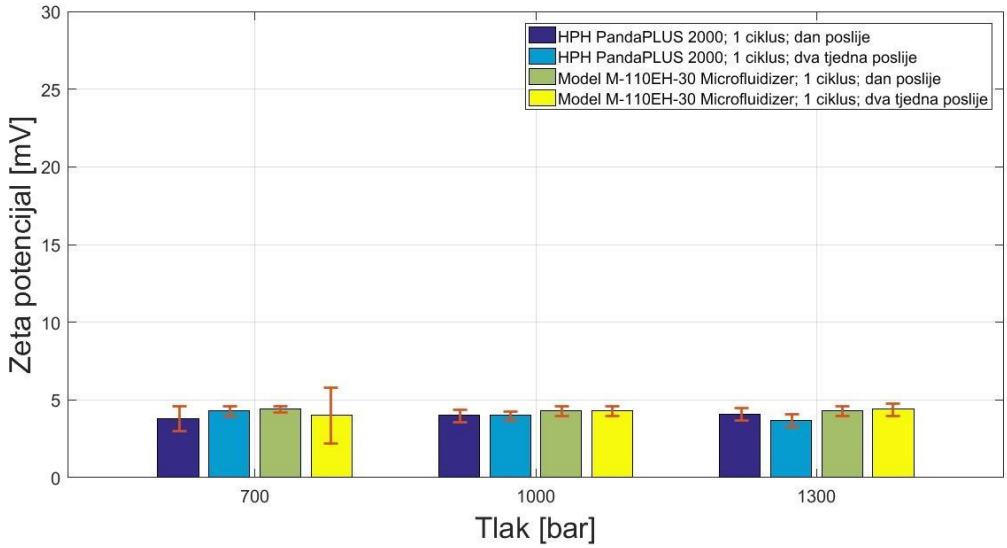
Najmanji PDI izmjeren je dva tjedna nakon izrade nanoemulzije visokotlačnom homogenizacijom pri tlaku od 1300 bara (0,275 ± 0,007 nm).

4.2.3. ZETA-POTENCIJAL

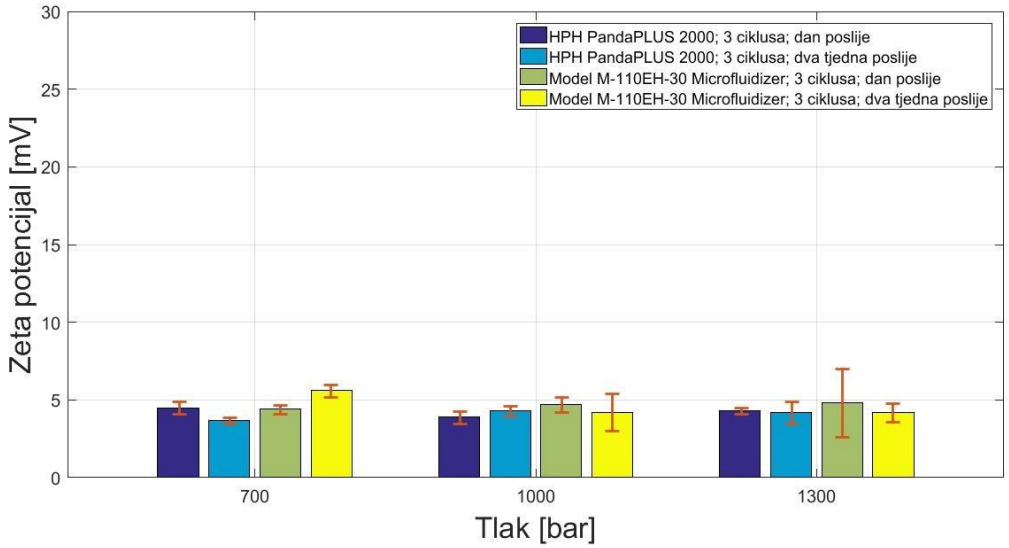
Nanoemuzije su pripravljene uz dodatak kitozana kako bi se postigla pozitivna vrijednost zeta-potencijala. Pozitivna vrijednost zeta-potencijala osigurala bi produljeno zadržavanje na površini oka (Lallemand i sur., 2012; Lehr i sur., 1992). Kitozan se može dodati odmah u primarnu emulziju ili se otopina kitozana može dodati u već pripravljenu nanoemulziju. Prema (Mun i sur., 2006), nanoemulzije s većom koncentracijom kitozana bile su mliječno bijele boje i naboja ~+30 mV. Formulaciju dobivenu nakon pet ciklusa visokotlačne homogenizacije bez dodatka kitozana nazvali su primarnom nanoemulzijom. Sekundarna nanoemulzija dobivena je dodatkom otopine kitozana u primarnu nanoemulziju te sonificiranjem pri 20 kHz dvije minute. U ovom je radu otopina kitozana dodana u primarnu emulziju.

Nanoemulzije su pripravljene uz Pluronic F68 koji je neionski surfaktant. Očekivani zeta-potencijal nanoemulzija s Pluronicom F68 bez kitozana blago je negativan zbog slobodnih masnih kiselina iz uljne faze (Krpan, 2017).

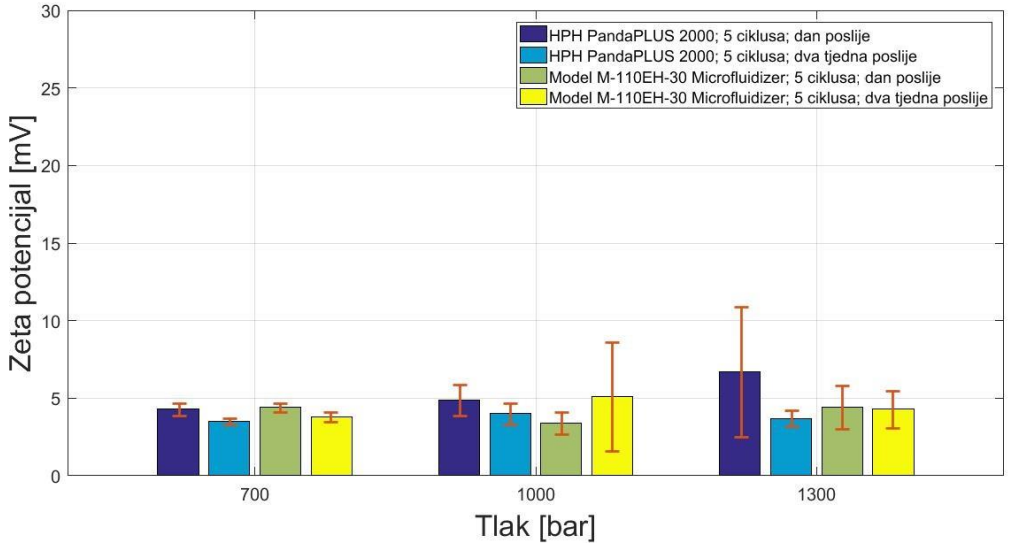
Slike 21, 22 i **23** prikazuju utjecaj tlaka na zeta-potencijal i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodama visokotlačne homogenizacije, odnosno mikrofluidizacije pri različitom broju propuštanja (ciklusa).



Slika 21: Utjecaj tlaka na zeta-potencijal i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri jednom propuštanjem (1 ciklus).



Slika 22: Utjecaj tlaka na zeta-potencijal i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri tri propuštanja (3 ciklusa).



Slika 23: Utjecaj tlaka na zeta-potencijal i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri pet propuštanja (5 ciklusa).

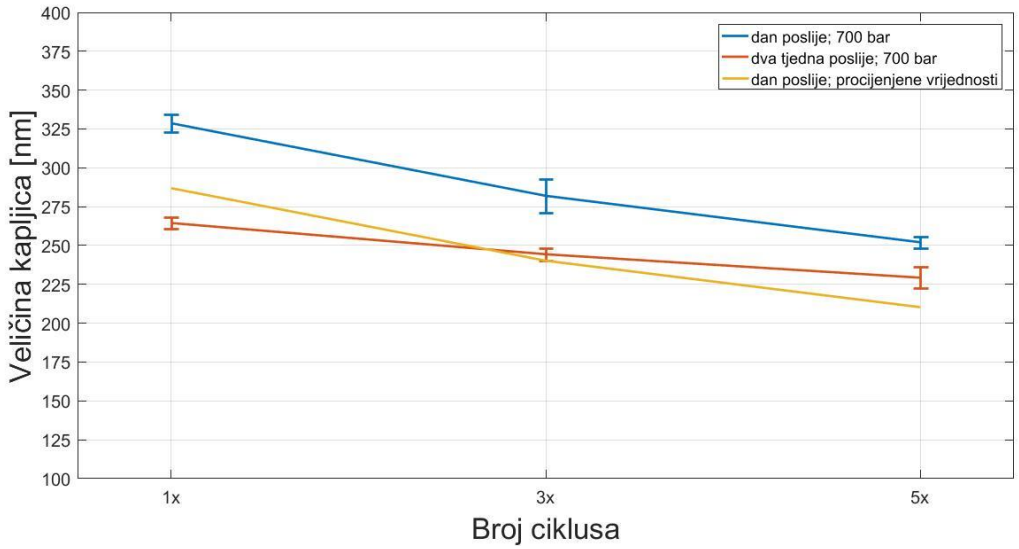
Slike 21, 22 i **23** prikazuju kako promjena tlaka ne utječe na zeta potencijal nanoemulzija niti se zeta-potencijal značajnije mijenjao tijekom dva tjedna.

Izmjerene vrijednosti zeta-potencijala (< 5 mV) nisu odgovarale očekivanim vrijednostima (~20 mV prema Jumma i Müller, ~30 mV prema Mun i sur.). Jumma i Müller koristili su kitozan većeg stupnja deacetilacije, a Mun drukčiji način dodavanja kitozana (otopina kitozana dodana u unaprijed pripravljenu nanoemulziju). Ovakve vrijednosti nisu zadovoljavajuće jer je za elektrostatsku stabilizaciju potreban naboj čija je apsolutna vrijednost 30 mV (Garcia i sur., 2016). Međutim, budući da je u ovom slučaju korišten neoionski surfaktant koji stabilizira nanoemulziju sterički, samo ovi rezultati ne govore o stabilnosti sustava (Silva i sur., 2015; McClements, 2002).

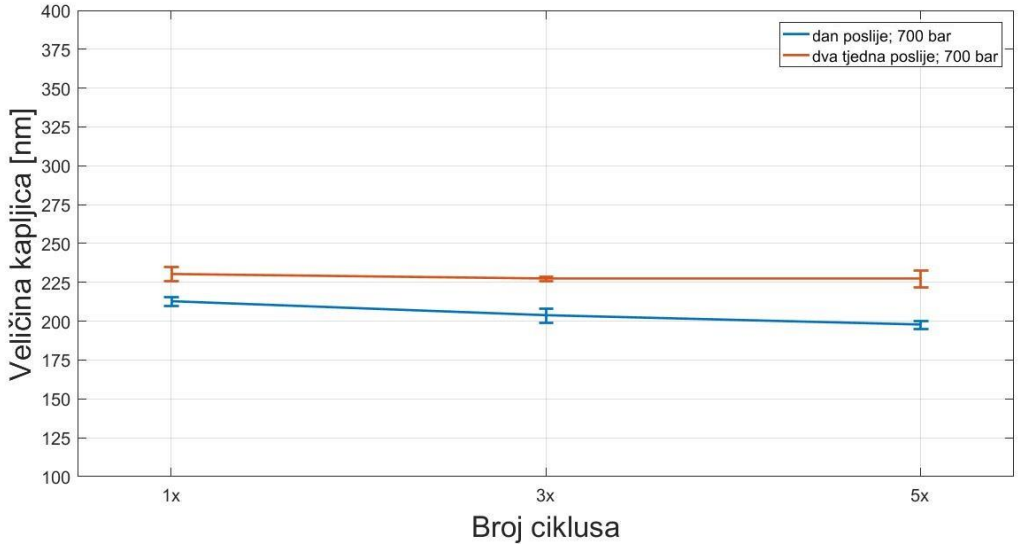
4.3. UTJECAJ BROJA PROPUŠTANJA (CIKLUSA) NA SVOJSTVA I STABILNOST NANOEMULZIJA

4.3.1. VELIČINA KAPLJICA

Na **Slikama 24** i **25** prikazan je utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodama visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri tlaku od 700 bar. Prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 24: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije pri tlaku od 700 bar.



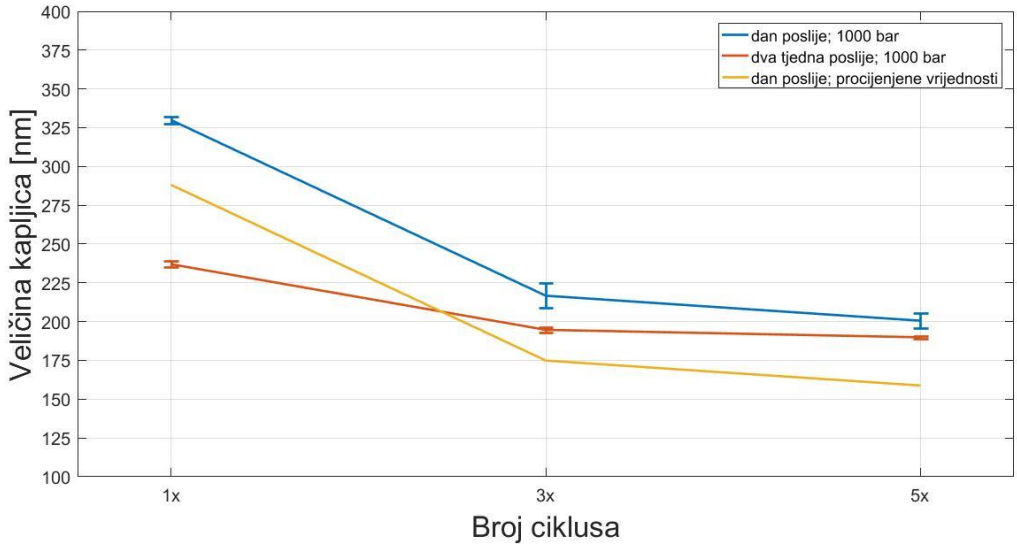
Slika 25: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije pri tlaku od 700 bar.

Na **Slici 24** primijećeno je smanjenje kapljica povećanjem broja propuštanja visokotlačne homogenizacije. **Slika 25** također ukazuje na smanjenje kapljica povećanjem ciklusa obrade, ali značajno manje.

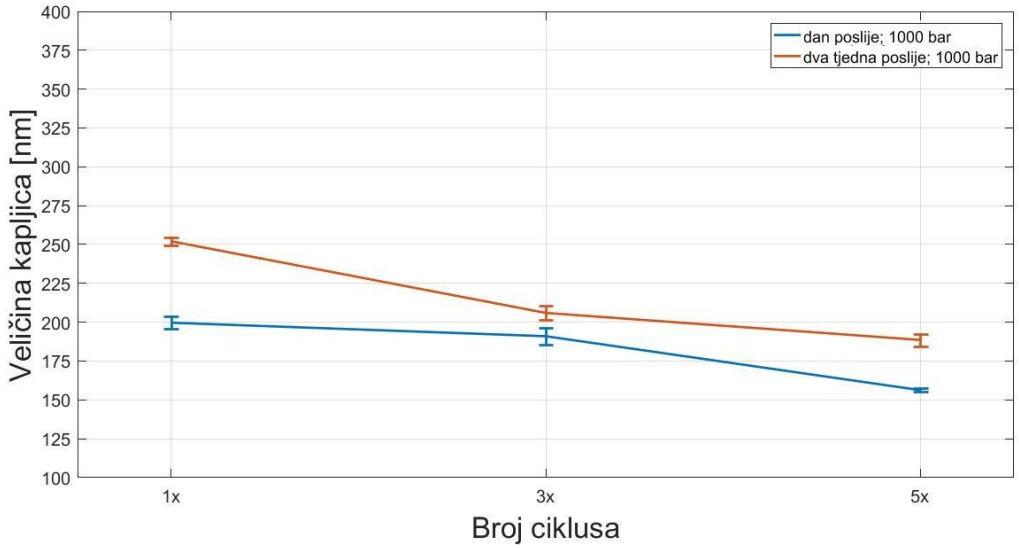
Mjerenje stabilnosti nanoemulzije pripravljene metodom visokotlačne homogenizacije pokazalo je da su se kapljice smanjile, ali uzmu li se u obzir procijenjene vrijednosti, nema promjene za formulaciju dobivenu s tri propuštanja (prvo mjerenje 240,22 nm, drugo mjerenje 244,4 ± 3,9 nm). Veličina kapljica smanjila se za formulaciju dobivenu jednim propuštanjem, a povećala za formulaciju dobivenu trima propuštanjima.

Nakon drugog mjerenja primijećeno je kako su se više povećale kapljice koje su prošle veći broj ciklusa mikrofluidizacije. To se može objasniti fenomenom pretjerane obrade (Jafari i sur., 2007; Jafari i sur., 2006; Desrumaux i Marcand 2002; Schulz i Daniels 2000). Najmanje kapljice izmjerene su za nanoemulziju pripravljenu metodom mikrofluidizacije i pet propuštanja ciklusa (197,9 ± 2,7 nm).

Na **Slikama 26** i **27** prikazan je utjecaj broja propuštanja na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodama visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri tlaku od 1000 bara, a prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 26: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije pri tlaku od 1000 bar.



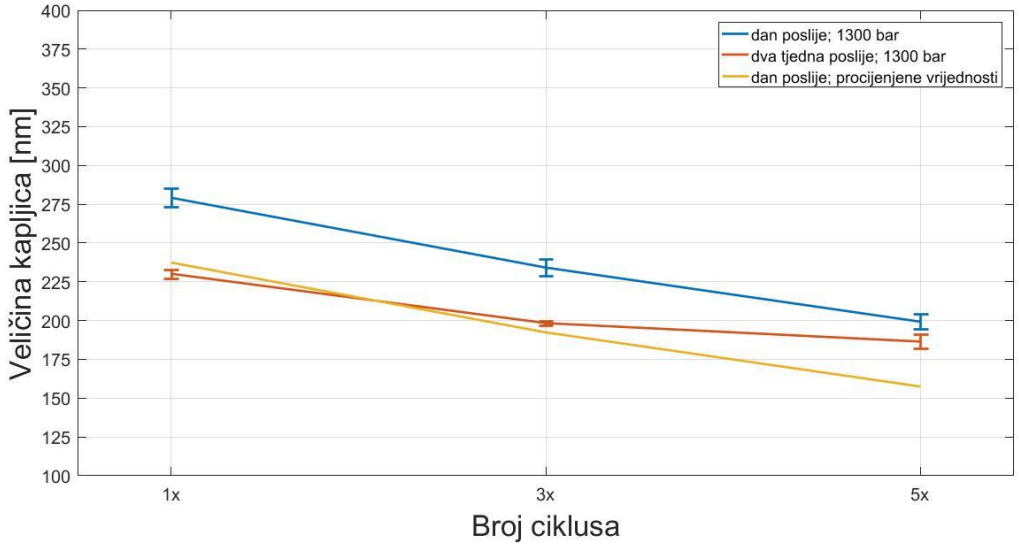
Slika 27: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije pri tlaku od 1000 bar.

Slika 26 pokazuje značajan pad veličine kapljica povećanjem broja ciklusa s jednog na tri ciklusa, dok daljnje povećanje ciklusa nije imalo značajnijeg utjecaja.

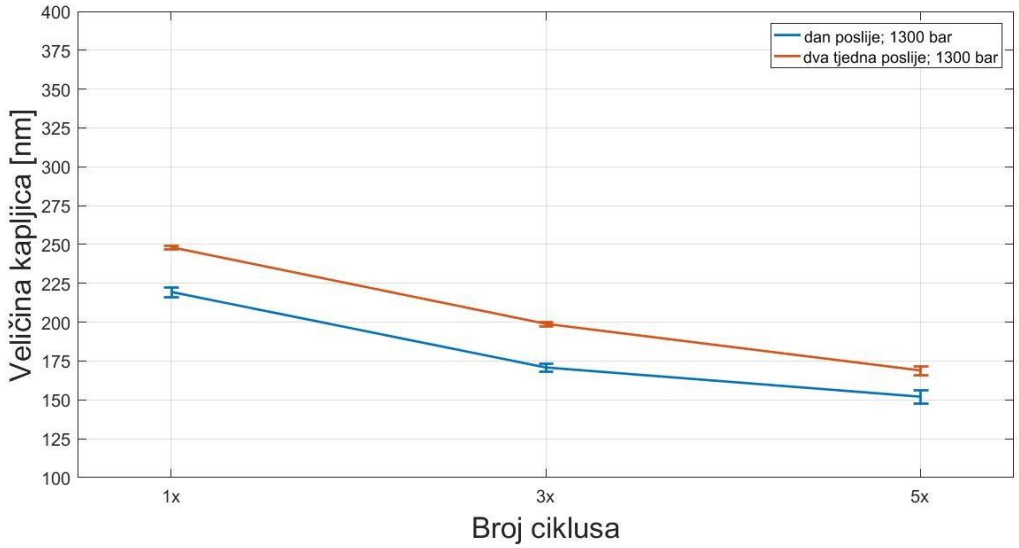
Na **Slici 27** može se vidjeti neznatno smanjenje kapljica nakon tri ciklusa u odnosu na jedan ciklus, dok je smanjenje izraženije nakon pet ciklusa. Najmanja veličina kapljica izmjerena je za nanoemulziju izrađenu nakon pet ciklusa mikrofluidizacije (156,3 ± 1,1 nm), ali ta je vrijednost bila slična procijenjenoj vrijednosti nakon pet ciklusa visokotlačne homogenizacije (158,82 nm).

Nakon drugog mjerenja, najveća je promjena zapažena nakon jednog propuštanja, a najmanja nakon tri ciklusa za nanoemulzije pripravljene objema metodama.

Na **Slikama 28** i **29** prikazan je utjecaj broja propuštanja na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodama visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri tlaku od 1300 bara. Prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 28: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije pri tlaku od 1300 bar.



Slika 29: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije pri tlaku od 1300 bar.

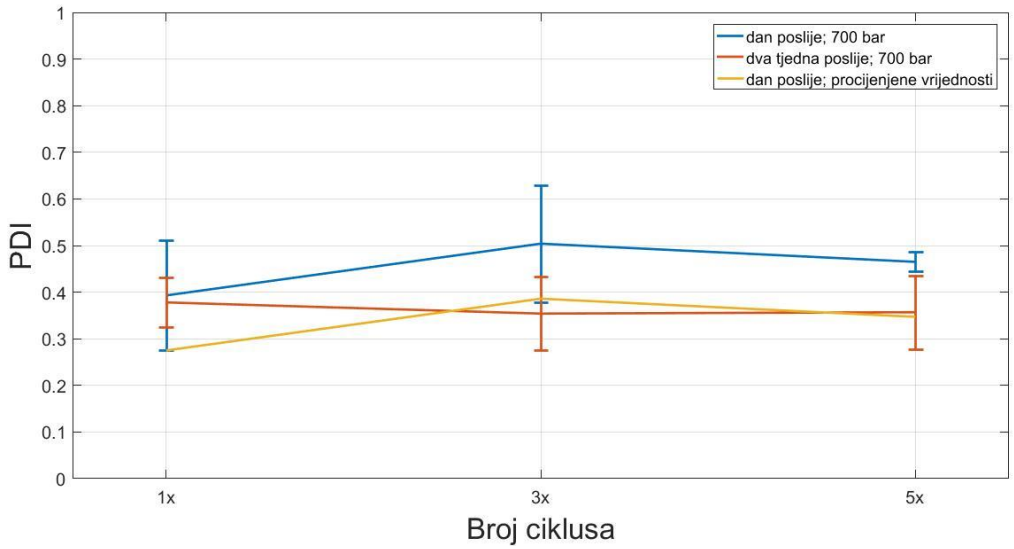
Na **Slici 28** i na **Slici 29** može se primijetiti smanjenje kapljica s povećanjem ciklusa. Najmanje kapljice izmjerene su za nanoemulziju izrađenu s pet ciklusa mikrofluidizacije (152,1 ± 4,1 nm), a te su vrijednosti bile slične procijenjenim vrijednostima za nanoemulziju pripravljenu visokotlačnom homogenizacijom i pet ciklusa (157,52 nm). Ovakve rezultate

potvrđuje literaturni podatak da se pri tlakovima od 200 bara do 1500 bara povećanjem broja propuštanja smanjuje veličina kapljica (Floury i sur., 2000).

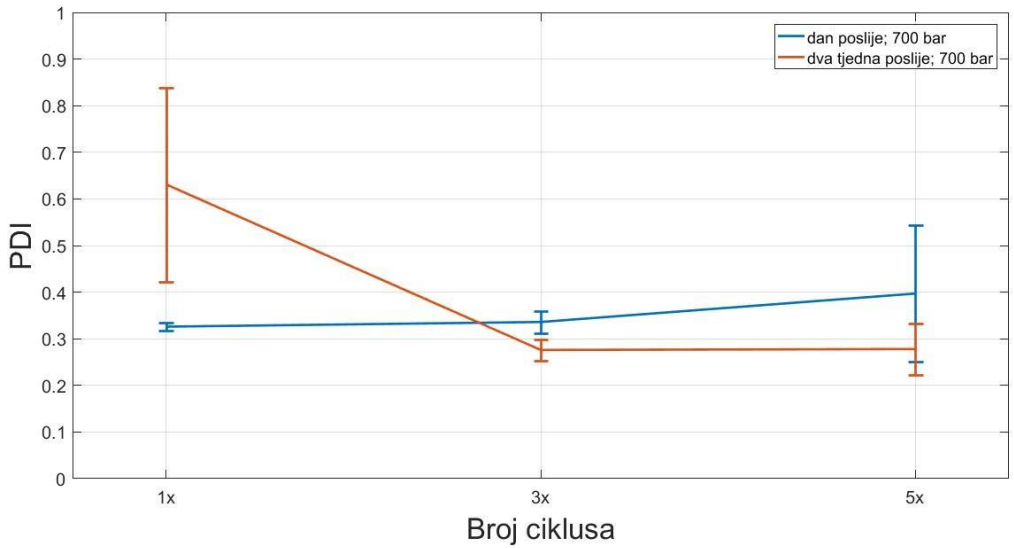
Uzmu li se u obzir procijenjene vrijednosti, dva tjedna nakon izrade metodom visokotlačne homogenizacije jednim (prvo mjerenje 237,42 nm, drugo mjerenje 230,2 ± 2,8 nm) i trima propuštanjima (prvo mjerenje 192,42 nm, drugo mjerenje 198,4 ± 1,2 nm) nije došlo do promjene veličine kapljica, ali je došlo do promjene nakon pet propuštanja. Također je bitno uočiti da su kapljice nanoemulzije izrađene mikrofluidizacijom bile manje od kapljica nanoemulzije izrađene visokotlačnom homogenizacijom dva tjedna nakon izrade. Najmanja promjena veličine kod nanoemulzije pripravljene mikrofluidizacijom bila je pri pet propuštanja, što se ne slaže s fenomenom pretjerane obrade.

4.3.2. INDEKS POLIDISPERZNOSTI

Na **Slikama 31** i **32** prikazan je utjecaj broja propuštanja na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodama visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri tlaku od 700 bar. Prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 33: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije pri tlaku od 700 bar.



Slika 32: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije pri tlaku od 700 bar.

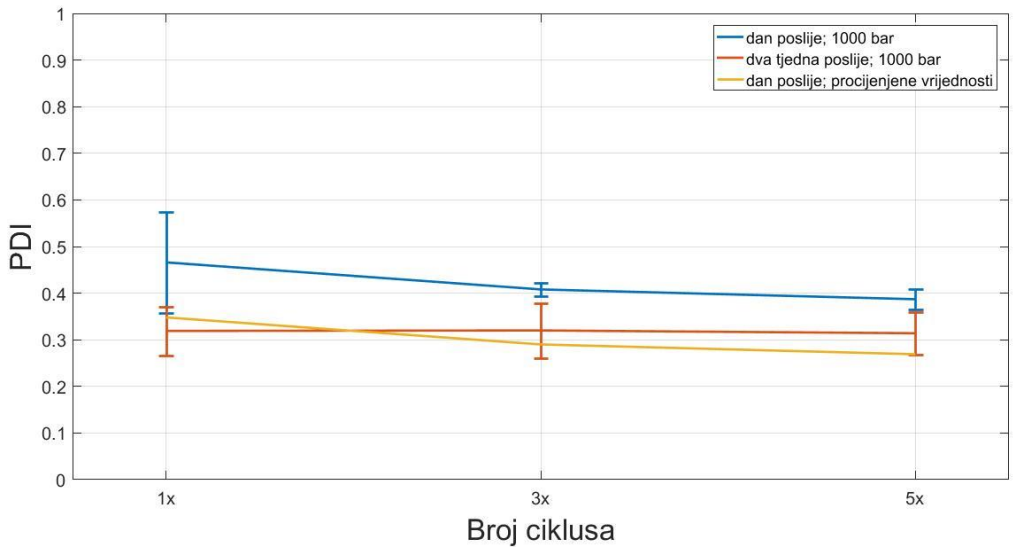
Prvo mjerenje nanoemulzije izrađene visokotlačnom homogenizacijom pokazalo je najmanji PDI nakon jednog ciklusa, dok je najveći PDI bio nakon tri ciklusa.

Na **Slici 32** uočeno je blago povećanje PDI i standardne devijacije s povećanjem broja ciklusa nakon prvog mjerenja. Najmanji PDI bio je za nanoemulziju pripravljenu jednim propuštanjem kroz visokotlačni homogenizator (0,275).

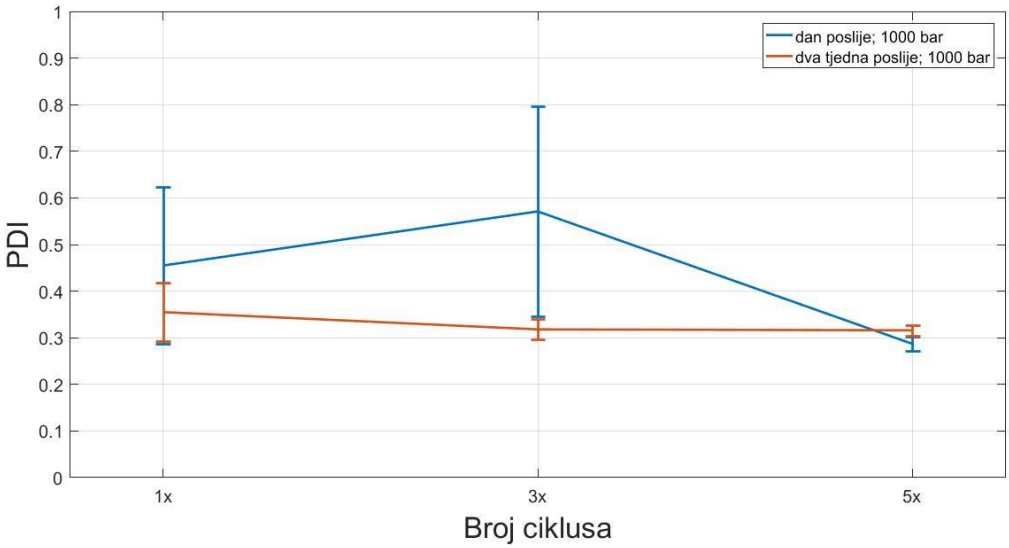
Zanimljivo je kako je nakon drugog mjerenja vrijednosti PDI nanoemulzije uočeno značajno povećanje za uzorak koji je prošao jedan ciklus (prvo mjerenje 0,326 ± 0,008 nm, drugo mjerenje 0,631 ± 0,208 nm), a zatim su, nakon tri i pet ciklusa mikrofluidizacije, vrijednosti indeksa polidisperznosti bile manje nego početne. Najmanja standardna devijacija bila je za uzorak koji je prošao kroz tri ciklusa.

Za visokotlačnu je homogenizaciju primijećeno smanjenje vrijednosti PDI nakon drugog mjerenja. Ipak, ako se uzmu u obzir procijenjene vrijednosti, drugo je mjerenje pokazalo povećanje vrijednosti PDI pri jednom propuštanju, ali nije zamijećena razlika povećanjem na tri, odnosno na pet propuštanja.

Slike 33 i **34** prikazuju utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodama visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri tlaku od 1000 bar, a prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 334: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije pri tlaku od 1000 bar.



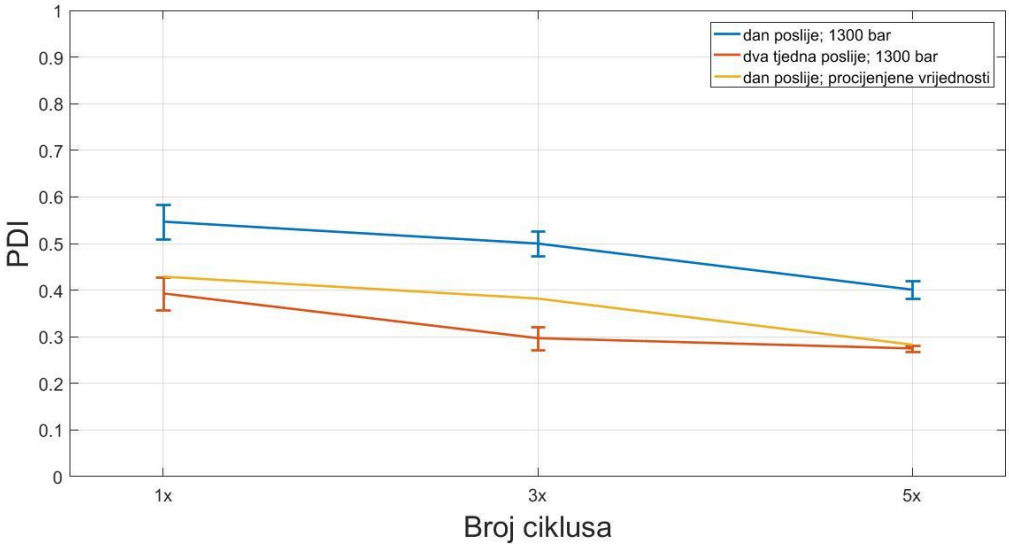
Slika 34: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije pri tlaku od 1000 bar.

Slika 33 pokazuje smanjenje PDI povećanjem broja ciklusa visokotlačne homogenizacije nakon prvog mjerenja, a **Slika 34** pokazuje da je najveći PDI izmjeren je za uzorak obrađen trima ciklusima mikrofluidizacije, a najmanji za uzorak obrađen u pet ciklusa.

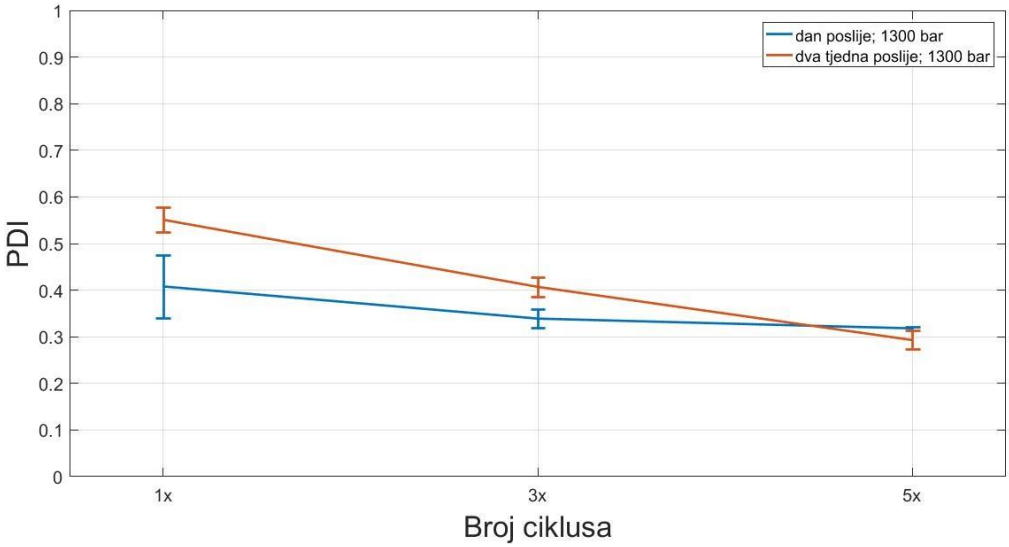
Drugo mjerenje nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom pokazalo je smanjenje PDI, ali uzmu li se u obzir procijenjene vrijednosti, promjene vrijednosti PDI kretale su se unutar okvira standardne devijacije.

Smanjenje vrijednosti PDI nakon dva tjedna uočeno je i za nanoemulzije pripravljene mikrofluidizacijom jednim i trima propuštanjima, a pri pet propuštanja PDI je ostao gotovo jednak.

Slike 35 i **36** prikazuju utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na PDI nanoemulzija pripravljenih metodama visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri tlaku od 1300 bara. Prikazane su i procijenjene vrijednosti prvog mjerenja nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom za razrjeđenje od 500 puta.



Slika 35: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije pri tlaku od 1300 bar.



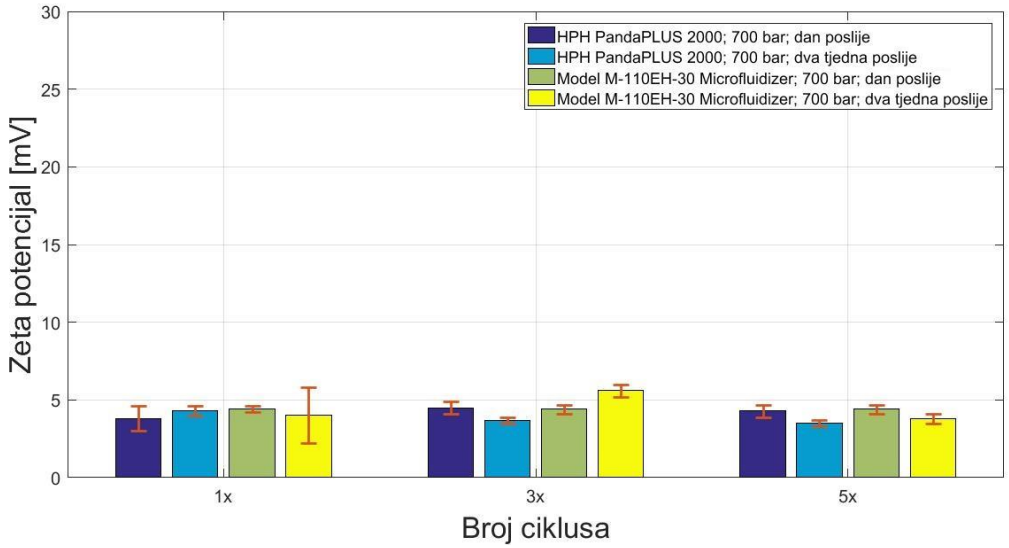
Slika 365: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na PDI i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom mikrofluidizacije pri tlaku od 1300 bar.

Na **Slici 35** i na **Slici 36** primijećeno je smanjenje PDI s većim brojem propuštanja. Zanimljivo je uočiti kako je PDI nanoemulzije pripravljene mikrofluidizacijom u pet ciklusa ostao gotovo jednak nakon drugog mjerenja. Za taj je uzorak uočena najmanja promjena vrijednosti PDI, dok je najveće povećanje bilo za uzorak obrađen samo jednim ciklusom.

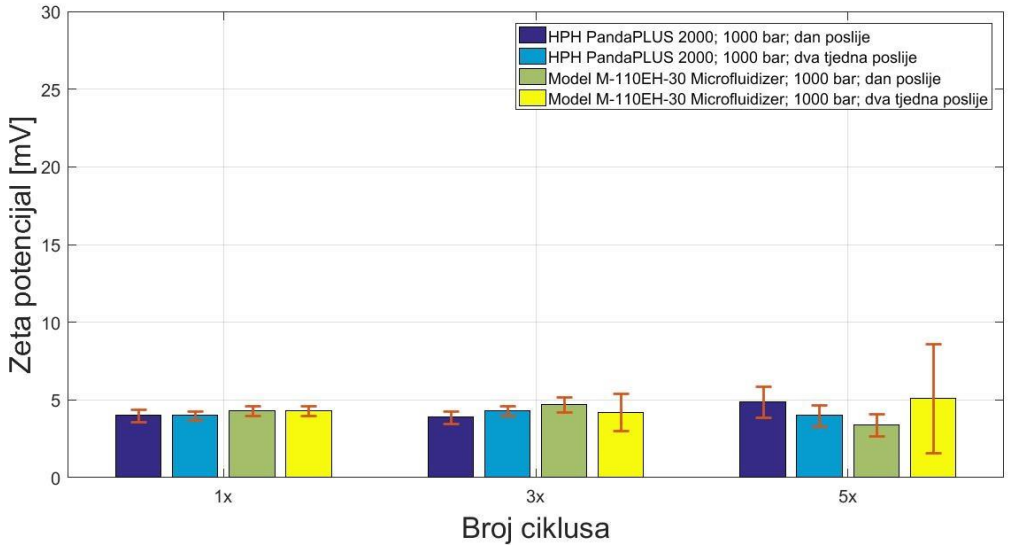
PDI nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom bio je manji dva tjedna nakon prvog mjerenja. Uzmu li se u obzir procijenjene vrijednosti, PDI pri jednom propuštanju bio je u granicama standardne devijacije nakon prvog mjerenja, a PDI pri pet propuštanja bio je isti kao nakon prvog mjerenja.

4.3.3. ZETA-POTENCIJAL

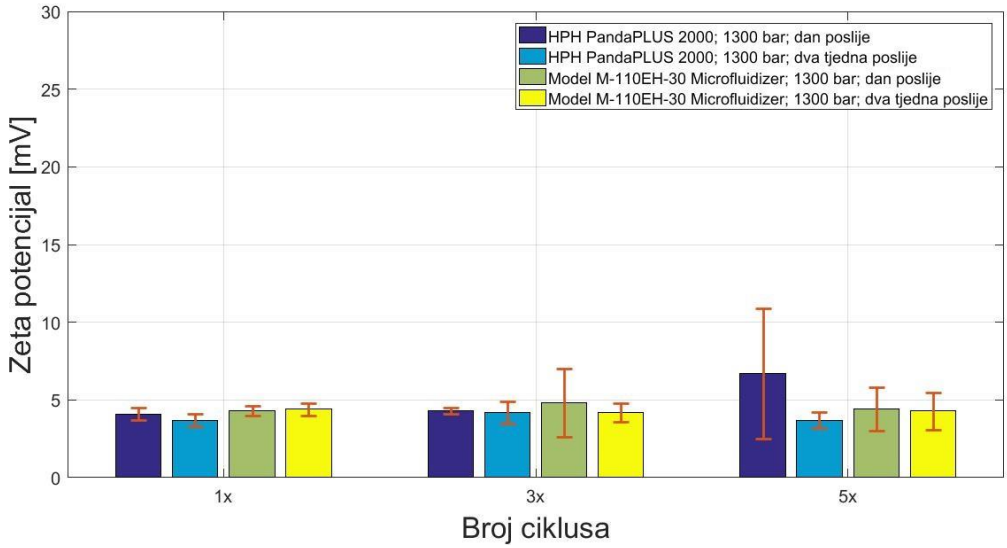
Na **Slikama 37, 38** i **39** prikazan je utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na zeta-potencijal nanoemulzija pripravljenih metodama visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri tlaku od 700, 1000 i 1300 bara.



Slika 37: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na zeta-potencijal i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri 700 bar.



Slika 386: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na zeta-potencijal i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri tlaku od 1000 bar.



Slika 39: Utjecaj broja propuštanja (ciklusa) na zeta-potencijal i stabilnost nanoemulzija pripravljenih metodom visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pri tlaku od 1300 bar.

Broj propuštanja nije imao utjecaja na zeta-potencijal jer izmjerene vrijednosti zeta-potencijala (< 5 mV) nisu odgovarale očekivanim vrijednostima (~20 mV prema Jumma i Müller, ~30 mV prema Mun i sur.). Jumma i Müller koristili su kitozan većeg stupnja deacetilacije, a Mun drukčiji način dodavanja kitozana (otopina kitozana dodana u unaprijed pripravljenu nanoemulziju). Ovakve vrijednosti nisu zadovoljavajuće jer je za elektrostatsku stabilizaciju potreban naboj čija je apsolutna vrijednost 30 mV (Garcia i sur., 2016). Međutim, budući da je u ovom slučaju korišten neoionski surfaktant koji stabilizira nanoemulziju sterički, samo ovi rezultati ne govore o stabilnosti sustava (Silva i sur., 2015; McClements, 2002)

4.4. MODELI ZA PROCJENU VELIČINE KAPLJICA I INDEKSA POLIDISPERZNOSTI NANOEMULZIJA IZRAĐENIH VISOKOENERGETSKIM METODAMA

Koristeći MATLAB funkcije *polyfitn* i *polyvaln* (funkcije napisao John D'Errico) dobivene su jednadžbe koje opisuju ovisnost veličine kapljica, odnosno vrijednosti PDI o dvama parametrima, tlaku i broju propuštanja (ciklusa). Odabrane jednadžbe imaju zadovoljavajući R^2 i RMSE (engl. *root mean square error*). Opisuju procjenu veličine kapljica i PDI nakon prvog i drugog mjerenja. Izrađeno je ukupno osam modela, četiri za visokotlačnu homogenizaciju i četiri za mikrofluidizaciju.

4.4.1. VISOKOTLAČNA HOMOGENIZACIJA

Model procjene veličine kapljica nakon prvog mjerenja prikazan je formulom 2:

$$velicina\ kapljice = 164{,}7 + \frac{5088{,}7}{\sqrt{tlak}} - 23{,}8 \cdot ciklus \tag{2}$$

uz R^2 = 0,8702 i RMSE = 17,086.

Model procjene veličine kapljica nakon drugog mjerenja prikazan je formulom 3:

$$velicina\ kapljice = 112{,}3 + \frac{4281{,}7}{\sqrt{tlak}} - 10{,}5 \cdot ciklus \tag{3}$$

uz R^2 = 0,8852 i RMSE = 8,8853.

Model procjene vrijednosti PDI nakon prvog mjerenja prikazan je formulom 4:

$$PDI = 4{,}8094 \cdot 10^{-4} \cdot tlak + 0{,}1219 \cdot ciklus - 1{,}3215 \cdot 10^{-4} \cdot ciklus \cdot tlak \tag{4}$$

uz R^2 = 0,9930 i RMSE = 0,0380.

Model procjene vrijednosti PDI nakon drugog mjerenja prikazan je formulom 5:

$$PDI = 3{,}5213 \cdot 10^{-4} \cdot tlak + 0{,}1101 \cdot ciklus - 1{,}1750 \cdot 10^{-4} \cdot ciklus \cdot tlak \tag{5}$$

uz R^2 = 0,9849 i RMSE = 0,0414.

4.4.2. MIKROFLUIDIZACIJA

Model procjene veličine kapljica nakon prvog mjerenja prikazan je formulom 6:

$$velicina\ kapljice = 245{,}5 - \frac{762{,}9}{\sqrt{tlak}} + 8{,}11 \cdot ciklus - 0{,}0186 \cdot ciklus \cdot tlak \quad (6)$$

uz R^2 = 0,8838 i RMSE = 7,77.

Model procjene veličine kapljica nakon drugog mjerenja prikazan je formulom 7:

$$velicina\ kapljice = 352{,}7 - \frac{3082{,}6}{\sqrt{tlak}} + 18{,}30 \cdot ciklus - 0{,}0304 \cdot ciklus \cdot tlak \quad (7)$$

uz R^2 = 0,9319 i RMSE = 6,8296.

Model procjene vrijednosti PDI nakon prvog mjerenja prikazan je formulom 8:

$$PDI = 4{,}1596 \cdot 10^{-4} \cdot tlak + 0{,}1091 \cdot ciklus - 1{,}2144 \cdot 10^{-4} \cdot ciklus \cdot tlak \quad (8)$$

uz R^2 = 0,9595 i RMSE = 0,0787.

Model procjene vrijednosti PDI nakon drugog mjerenja prikazan je formulom 9:

$$PDI = 5{,}0767 \cdot 10^{-4} \cdot tlak + 0{,}0670 \cdot ciklus - 1{,}1207 \cdot 10^{-4} \cdot ciklus \cdot tlak \quad (9)$$

uz R^2 = 0,9286 i RMSE = 0,1067.

5. ZAKLJUČCI

- Metodom visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije pripravljene su nanoemulzije u kojima je uljnu fazu činila kombinacija Miglyola 812 i ricinusovog ulja (1:1, 5% *m*/*m*), a kao stabilizatori korišteni su neoinski surfaktant Pluronic F68 (2,5% *m*/*m*) i kitozan (0,5% *m*/*m*).
- Nakon pripravljanja primarne emulzije, kombinacijom različitih tlakova i broja propuštanja (ciklusa) izrađeno je sveukupno 18 formulacija, 9 visokotlačnom homogenizacijom i 9 mikrofluidizacijom.
- Procijenjen je utjecaj procesnih parametara (tlaka i broja ciklusa) na veličinu kapljica, PDI i zeta-potencijal nanoemulzija, a stabilnost formulacija praćena je tijekom dva tjedna.
- Povećanjem broja propuštanja kod visokotlačne homogenizacije smanjivala se i veličina kapljica pri konstantnom tlaku, no nije bilo značajne promjene veličine pri povećanju tlaka s 1000 bara na 1300 bara uz konstantan broj propuštanja. Najmanje vrijednosti dobivene su s pet propuštanja pri 1300 bar (157,52 nm).
- Kod mikrofluidizacije, povećanje broja ciklusa nije imalo značajnog utjecaja pri 700 bara. Značajno smanjenje dogodilo se povećanjem s jednog na tri propuštanja pri 1000 bara, dok je pri 1300 bara svako povećanje broja propuštanja dovelo do smanjenja veličine kapljica. Najmanje vrijednosti dobivene su s pet propuštanja pri 1300 bar (152,1 ± 4,1 nm).
- Općenito su manje veličine kapljica jednim propuštanjem dobivene metodom mikrofluidizacije, ali povećanjem broja propuštanja objema su metodama dobivene kapljice sličnih dimenzija.
- Tlak i broj ciklusa nisu imali značajan utjecaj na PDI, a veći PDI izmjeren je kod nanoemulzije pripravljene mikrofluidizacijom pri višim tlakovima. Nijedna formulacija nije imala zadovoljavajuće nizak PDI.
- Uzevši u obzir procijenjene vrijednosti, stabilnijima su se pokazale nanoemulzije pripravljene visokotlačnom homogenizacijom.
- Niska vrijednost zeta-potencijala (< 5 mV) ukazuje da nije došlo do stabilizacije nanoemulzije kitozanom koji je korišten u ovom istraživanju (srednja molekulska masa, srednji stupanj deacetilacije).

- Potrebno je ispitati utjecaj različitih kitozana (mala i visoka molekulska masa te visoki stupanj deacetilacije) na postizanje veće vrijednosti zeta-potencijala, a s ciljem povećanja mukoadhezivnosti pripravljenih nanoemulzija.

6. LITERATURA

Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *J Controlled Release*, 2008, 128, 185-199

Anton N, Vandamme TF. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int J Pharm*, 2009, 377, 142–147.

Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharm Res*, 2011, 28, 978–985.

Bouaouina H, Desrumaux A, Loisel C, Legrand J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *Int Dairy J*, 2006, 16, 275–284.

Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci (Oxford)*, 2011, 36, 981–1014.

de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso MJ. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62, 100–117.

Desrumaux A, Marcand J. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): Effect of pressure on emulsion characteristics. *Int J Food Sci Tech*, 2002, 37, 263–269.

Daull P, Lallemand F, Garrigue JS. Benefits of cetalkonium chloride cationic oil-in-water nanoemulsions for topical ophthalmic drug delivery. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66, 531-541

El Kinawy OS, Petersen S, Helmdach L, Ulrich J. Parameter Selection of Emulsification Processes: Conditions for Nano- and Macroemulsions. *Chem Eng Technol*, 2012, 35, 1604–1608

Evans DF, Wennerström H. The Colloidal Domain: Where physics, chemistry, biology and

technology meet. Wiley, 1999, str. 600

Felt O, Furrer P, Mayer JM, Plazonnet B, Buri P, Gurny R. Topical use of chitosan in ophthalmology: Tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *Int J Pharm*, 1999, 180, 185–193.

Floury J, Desrumaux A, Lardières J. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2000, 1, 127–134.

García-Celma MJ, Homs M, Morales D, Solans C. Nano-emulsions for Pharmaceutical Applications. *Nanocolloids*, 2016, *2*, 365–388.

Gothsch T, Finke JH, Beinert S, Lesche C, Schur J, Büttgenbach S, Müller-Goymann C, Kwade, A. Effect of Microchannel Geometry on High-Pressure Dispersion and Emulsification. *Chem Eng Technol*, 2011, 34, 335–343.

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

Izquierdo P, Esquena J, Tadros TF, Dederen C, Garcia MJ, Azemar N, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. *Langmuir*, 2002, 18, 26–30.

Jafari SM, He Y, Bhandari B. Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. *Int J Food Prop*, 2006, 9, 475–485.

Jafari SM, He Y, Bhandari B. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *Eur Food Res Technol*, 2007, 225, 733–741.

Jumaa M, Müller BW. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. *Int J Pharm*, 1999, 183, 175–184.

Klang S, Abdulrazik M, Benita S. Influence of emulsion droplet surface charge on indomethacin ocular tissue distribution. *Pharm Dev Technol*, 2000, 5, 521-531.

Koroleva MY, Yurtov EV. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russ Chem Rev*, 2012, 81, 21–43.

Krpan M, Razvoj oftalmičkih nanoemulzija ricinusovog ulja stabiliziranih neionskim surfaktantima, 2017, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Lallemand F, Daull P, Benita S, Buggage R, Garrigue JS. Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb. *J Drug Deliv*, 2012, 1–16.

Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger HE. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm*, 1992, 78, 43–48.

McClements, DJ. Food Emulsions Principles, Practices, and Techniques Second Edition. *Food Emulsions Principles, Practices, and Technique*, 2005.

Mathworks, 2012., https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/34765-polyfitn?requestedDomain=www.mathworks.com, pristupljeno 12.6.2017.

Model M-110EH-30 Microfluidizer® Processor: User Manual. USA, Microfluidics, 2012, str. 2.1-2.2.

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

Mucha M. Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions. *Macromol Chem Phys*, 1997, 198, 471–484.

Muchtar S, Abdulrazik M, Frucht-Pery J, Benita S. Ex-vivo permeation study of indomethacin from a submicron emulsion through albino rabbit cornea. *J Controlled Release*, 1997, 44, 55-64.

Muchtar S, Almog S, Torracca MT, Saettane MF, Benita S. A Submicron Emulsion as Ocular Vehicle for Delta-8-Tetrahydrocannabinol: Effect on Intraocular Pressure in Rabbits. *Ophtalmic Res*, 1992, 24, 142-149.

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.

Pepić I. Novi sustavi za primjenu lijeka u oko. *Farm Glas*, 2004, 60, 523–539.

Qadir A, Faiyazuddin MD, Hussain MDT, Alshammari TM, Shakeel F. Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. *J Mol Liq*, 2016, 214, 7-18.

Reimondez-Troitiño S, Csaba N, Alonso MJ, de la Fuente M. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 95, 279-293

Salager JL, Forgiarini A, Marquez L, Pena A, Pizzino A, Rodriguez MP, Rondon-Gonzalez M. Using emulsion inversion in industrial processes. *Adv Colloid Interface Sci*, 2004, 108–109, 259–272.

Schipper NG, Olsson S, Hoogstraate J, DeBoer G, Vårum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharm Res*, 1997, 14, 923–929.

Schulz MB, Daniels R. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: Influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 49, 231–236.

Shen J, Gan L, Zhu C, Zhang X, Dong Y, Jiang M, Zhu J, Gan Y. Novel NSAIDs ophthalmic formulation: Flurbiprofen axetil emulsion with low irritancy and improved anti-inflammation effect. *Int J Pharm*, 412, 115-122.

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

Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy VV. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 2008, 9, 1837–1842.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Current Opin Colloid In*, 2005, 10, 102–110.

Sznitowska M, Zurowska-Pryczkowska K, Janicki S, Jarvinen T. Miotic effect and irritation potential of pilocarpine prodrug incorporated into a submicron emulsion vehicle. *Int J Pharm,* 1999, 184, 115-120.

Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and Stability of Nano-emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci*. 2004, 108-109, 303-318.

Temel A, Kazokoglu H, Taga Y. Tear lysozyme levels in contact lens wearers. *Ann Ophthalmol*, 1991, 23, 191–194.

Upute za uporabu i održavanje, HPHPanda PLUS 2000, GEA Niro Soavi, str.2.1.-2.2.

Van Der Merwe SM, Verhoef JC, Verheijden JHM, Kotzé AF, Junginger HE. Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58, 225-235

Wang W, Xu D. Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *Int J Biol Macromol*, 1994, 16, 149–152.

Wennerström H, Balogh J, Olsson U. Interfacial tensions in microemulsions. *Colloid Surface A*, 2006, 291, 69–77.

ZETASIZER 2000/3000: Zeta potential measurements; Manual number MAN0150. UK, Malvern Instruments Ltd., 2000, str. 1.2-1.3.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Nanoemulzije zbog svojih su svojstava zanimljive kao formulacije namijenjene oftalmičkoj primjeni. Mogu biti izrađene niskoenergetskim i visokoenergetskim metodama. Za potrebe ovog rada korištene su dvije visokoenergetske metode, visokotlačna homogenizacija i mikrofluidizacija. Nanoemulzije su pripremljene tako da se najprije izradila primarna emulzija, koja je zatim prošla kroz jedan, tri i pet ciklusa visokotlačne homogenizacije, odnosno mikrofluidizacije. Veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal određeni su nakon izrade i dva tjedna nakon izrade kako bi se mogla procijeniti stabilnost nanoemulzija. Dobivene nanoemulzije bile su mliječno bijele boje i nisu pokazale odvajanje faza tijekom dva tjedna. Općenito su pri većem tlaku i pri većem broju ciklusa izmjerene najmanje veličine kapljica, dok je najmanja veličina kapljica izmjerena za nanoemulziju izrađenu nakon pet ciklusa mikrofluidizacije pri tlaku od 1300 bara. PDI nijednom nije bio manji od 0,1. Zeta-potencijal bio je približno sličan kod svakog uređaja, pri svakom tlaku i broju ciklusa. Bitno je naglasiti da su izmjerene vrijednosti (~4 mV) daleko od očekivanih vrijednosti (~30 mV). Nijedna formulacija nije pokazala željena svojstva.

Nanoemulsions are interesting as pharmaceutical formulations for ophthalmic use because of their specific properties. They can be made with low-energy and high-energy methods. High-pressure homogenization and microfluidization were two high-energy methods used in this research. Nanoemulsions were prepared as follows: firstly, the primary emulsion was made, which was then passed through one, three and five cycles of high-pressure homogenization or microfluidization. Droplet size, PDI and zeta-potential were measured one day after preparation and two weeks after preparation to assess the stability of nanoemulsions. Prepared nanoemulsions were milky white and phase separation did not occur in two weeks. In general, using higher pressure and greater number of cycles resulted with smaller droplet size, with the smallest droplet size measured for nanoemulsion produced after five microfluidization cycles at 1300 bar. PDI was never less than 0.1. The zeta-potential was approximately the same in nanoemulsions prepared using both devices, regardless of pressure and number of cycles. It is important to note that the measured values (~ 4 mV) are far from the expected values (~ 30 mV). None of the formulations showed the desired properties.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj procesnih parametara visokotlačne homogenizacije i mikrofluidizacije na svojstva i stabilnost nanoemulzija

Anđela Popović

SAŽETAK

Nanoemulzije zbog svojih su svojstava zanimljive kao formulacije namijenjene oftalmičkoj primjeni. Mogu biti izrađene niskoenergetskim i visokoenergetskim metodama. Za potrebe ovog rada korištene su dvije visokoenergetske metode, visokotlačna homogenizacija i mikrofluidizacija. Nanoemulzije su pripremljene tako da se najprije izradila primarna emulzija, koja je zatim prošla kroz jedan, tri i pet ciklusa visokotlačne homogenizacije, odnosno mikrofluidizacije. Veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal određeni su nakon izrade i dva tjedna nakon izrade kako bi se mogla procijeniti stabilnost nanoemulzija. Dobivene nanoemulzije bile su mliječno bijele boje i nisu pokazale odvajanje faza tijekom dva tjedna. Općenito su pri većem tlaku i pri većem broju ciklusa izmjerene najmanje veličine kapljica, dok je najmanja veličina kapljica izmjerena za nanoemulziju izrađenu nakon pet ciklusa mikrofluidizacije pri tlaku od 1300 bara. PDI nijednom nije bio manji od 0,1. Zeta-potencijal bio je približno sličan kod svakog uređaja, pri svakom tlaku i broju ciklusa. Bitno je naglasiti da su izmjerene vrijednosti (~4 mV) daleko od očekivanih vrijednosti (~30 mV). Nijedna formulacija nije pokazala željena svojstva.

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

Rad sadrži: 53 stranice, 31 grafički prikaz, 4 tablice i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanoemulzije, kitozan, visokotlačna homogenizacija, mikrofluidizacija, oftalmička primjena, mikroemulzije

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. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutics
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The effect of process conditions of high pressure homogenization and microfluidization on properties and stability of nanoemulsions

Anđela Popović

SUMMARY

Nanoemulsions are interesting as pharmaceutical formulations for ophthalmic use because of their specific properties. They can be made with low-energy and high-energy methods. High-pressure homogenization and microfluidization were two high-energy methods used in this research. Nanoemulsions were prepared as follows: firstly, the primary emulsion was made, which was then passed through one, three and five cycles of high-pressure homogenization or microfluidization. Droplet size, PDI and zeta-potential were measured one day after preparation and two weeks after preparation to assess the stability of nanoemulsions. Prepared nanoemulsions were milky white and phase separation did not occur in two weeks. In general, using higher pressure and greater number of cycles resulted with smaller droplet size, with the smallest droplet size measured for nanoemulsion produced after five microfluidization cycles at 1300 bar. PDI was never less than 0.1. The zeta-potential was approximately the same in nanoemulsions prepared using both devices, regardless of pressure and number of cycles. It is important to note that the measured values (~ 4 mV) are far from the expected values (~ 30 mV). None of the formulations showed the desired properties.

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

Thesis includes: 54 pages, 31 figures, 4 tables and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoemulsions, chitosan, high-pressure homogenization, microfluidization, ophatlmic application, microemulsions

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

Reviewers: **Anita Hafner**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasmina Lovrić, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2017.