Razvoj nanoemulzija sojinog ulja stabiliziranih neionskim surfaktantima

Parmać, Glorija

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:163:870444

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

Glorija Parmać

Razvoj nanoemulzija sojinog ulja stabiliziranih neionskim surfaktantima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Ponajviše se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasmini Lovrić na uloženom vremenu, razumijevanju, trudu i savjetovanju pri izradi ovog Diplomskog rada.
Nadalje, zahvaljujem se Biseri Jurišić Dukovski, mag. pharm., na svakoj pomoći pri snalaženju u eksperimentalnom radu.
Posebno se zahvaljujem Danki Bračko, mag. pharm. na omogućavanju suradnje s tvrtkom PLIVA HRVATSKA d.o.o i pristupa tehnologiji ključnoj u izradi ovog rada. Također, veliko hvala i Ani Jurić Simčić, mag. pharm., te Željku Vincelju tech. pharm., na pomoći i odvojenom vremenu.

Veliko hvala i mojim roditeljima i obitelji na neizmjernoj i bezuvjetnoj podršci i strpljenju tokom cijelog studija.
Hvala i svim mojim prijateljima, suputnicima i supatnicima, koji su uvijek bili podrška i pomoć na mom putu do ovog cilja.

SADRŽAJ

1.UVOD 1
1.1.Nanoemulzije 1
1.2. Surfaktanti 2
1.3. Stabilnost nanoemulzija i zeta-potencijal 4
1.4. Metode dobivanja nanoemulzija 5
1.5. Nanoemulzije i mikroemulzije 8
1.6. Prednosti primjene nanoemulzija 8
2.OBRAZLOŽENJE TEME 10
3. MATERIJALI I METODE 11
3.1. Materijali 11
3.2. Metode 12
3.2.1. Priprema nanoemulzija 12
3.2.2. Ispitivanje veličine i indeksa polidisperznosti 12
3.2.3. Mjerenje zeta-potencijala 15
3.2.4. Ispitivanje stabilnosti 16
4. REZULTATI I RASPRAVA 17
4.1. Određivanje veličine kapljica nanoemulzija i indeksa polidisperznosti 17
4.1.1 Nanoemulzije s Polisorbatom 80 17
4.1.2. Nanoemulzije s Polisorbatom 60 19
4.1.3. Nanoemulzije s Pluronicom F68 21
4.1.4. Nanoemulzije s Cremophorom EL 23
4.2. Ispitivanje zeta potencijala 25
4.2.1. Zeta-potencijal nanoemulzija s Polisorbatom 80 25
4.2.2. Zeta-potencijal nanoemulzija s Polisorbatom 60 26
4.2.3. Zeta-potencijal nanoemulzija s Pluronicom F68 27
4.2.4. Zeta-potencijal nanoemulzija s Cremophorom EL 28
5. ZAKLJUČAK 30
6. LITERATURA 32
7. SAŽETAK/SUMMARY 36

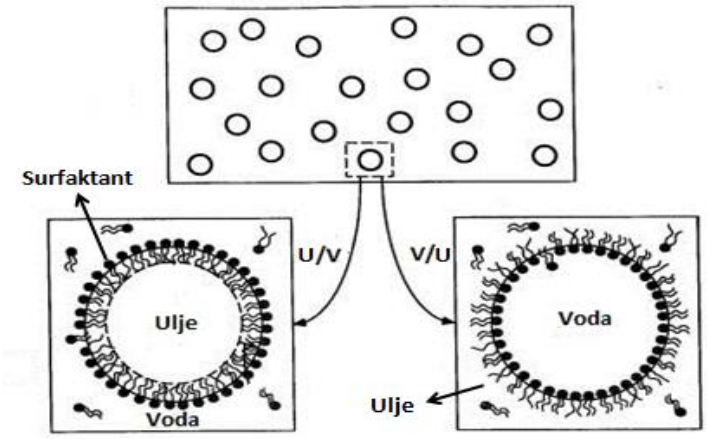
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1.Nanoemulzije

Prema definiciji Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) emulzije su koloidi u kojima je tekućina (ili tekući kristali) dispergirana u drugoj tekućini u obliku kapi (International Union of Pure and Applied Chemistry, 1972.). Nanoemulzije su emulzijski sustavi veličine kapljica disperzne faze ispod 500 nm (Li i sur., 2013). U posljednje vrijeme pridaje im se sve veća pažnja, zbog karakterističnih svojstava koja im osiguravaju prednost pred konvencionalnim emulzijama. Mala veličina kapljica disperzne faze, velika kinetička stabilnost te optička transparentnost koju imaju, pridonose širokom spektru njihove primjene. Također, ide im u prilog i manja koncentracija surfaktanta potrebna u izradi u odnosu na onu koju zahtjevaju mikroemulzije. S druge strane, nanoemulzije pokazuju termodinamičku nestabilnost, zbog čega je nužan velik utrošak energije prilikom njihove priprave (García-Celma i sur., 2016).

Tipična nanoemulzija u sastavu ima ulje, vodu i surfaktant (Gupta i sur., 2016a). Razlikujemo nanoemulzije U/V tipa (ulje kao disperzna faza, voda kao vanjska faza), V/U tipa (voda kao disperzna faza, ulje kao kontinuirana faza) (McClements, 2012). Tip emulzije, između ostalog, ovisi o svojstvima surfaktanta. Funkcija surfaktanta u smjesi iznimno je bitna, zbog smanjenja površinske napetosti (definirana kao energija po jedinici površine na granici faza) između dvije faze koje se inače ne miješaju (Gupta i sur., 2016b). Smanjenjem površinske napetosti smanjuje se i količina energije potrebna za usitnjavanje kapi. Nadalje, uloga surfaktanta leži i u stabilizaciji nastale kapi disperzne faze te, dodatno, u sprječavanju flokulacije/koalescencije. Elektrostatska repulzija kapljica obloženih surfaktantom, kao i uzrokovanje gradijenta površinske napetosti, spriječit će međusobni kontakt kapljica te će održati stabilan film vanjske faze između njih (Tadros i sur., 2004).



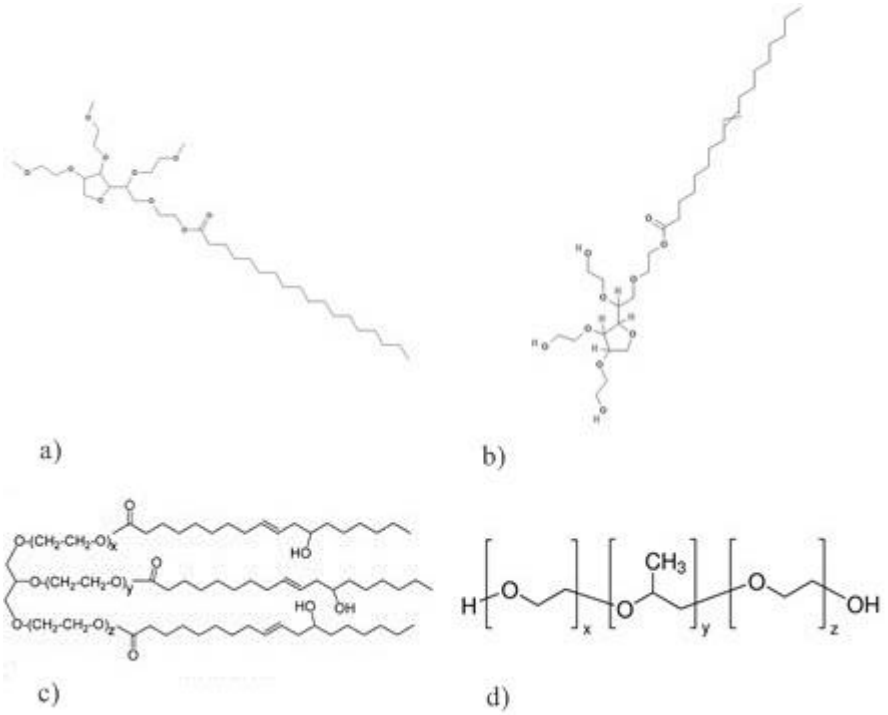
Slika 1. Prikaz U/V (ulje kao disperzna faza, voda kao kontinuirana faza) i V/U tipa emulzija (voda kao disperzna faza, ulje kao kontinuirana faza) (preuzeto i prilagođeno sa http://wwwcourses.sens.buffalo.edu/).

1.2. Surfaktanti

Surfaktanti (površinski aktivne tvari, PAT) organske su molekule koje imaju sposobnost adsorpcije na površine i granice faza. U strukturi im je prepoznatljiva polarna (hidrofilna) ″glava″ te nepolarni (lipofilni) ″rep″. Takva molekula jednim je dijelom topljiva u polarnim otapalima, poput vode, a drugim u nepolarnim otapalima i uljima (Gecol, 2006). Bitan parametar koji opisuje polarna/nepolarna svojstva surfaktanta je HLB vrijednost (engl. *Hydrophile-Lipophile Balance*), definirana kao odnos veličine i jakosti hidrofilnih i lipofilnih skupina u strukturi molekule. Surfaktanti niske HLB vrijednosti (HLB<9,0) lipofilnog su karaktera, dok su oni visoke HLB vrijednosti (HLB>11,0) hidrofilni (ICI Americas Inc., 1976).

Hidrofilni dio molekule surfaktanta uglavnom sadrži ione (sulfonati, karboksilati, kvaterni amonijev ion), polarne skupine (primarni amini, sulfoksidi) ili nepolarne skupine s atomima izražene elektronegativnosti (npr. kisikov atom u aldehidima, eterima i ketonima te dušikov atom u amidima, aminima). Ovisno o prisutnim hidrofilnim skupinama u molekuli surfaktanti se kategoriziraju u nekoliko skupina: anionski, kationski, neionski i amfoterni (Gecol, 2006).

Neionski emulgatori imaju prednost manje toksičnosti u usporedbi s ostalim skupinama, ne iritiraju, neosjetljivi su na promjene pH-vrijednosti ili ionske jakosti sustava. Također, kompatibilni su s brojnim aktivnim i pomoćnim tvarima, što olakšava pripravu različitih formulaciju (Florence i Rogers., 1971). U skupinu neionskih surfaktanata svrstavaju se, među ostalima, polioksietilen-20-sorbitan monooleat (Polisorbat 80, Tween 80), polioksietilen-20-sorbitan monostearat (Polisorbat 60, Tween 60), kopolimer etilenoksida i propilenoksida Pluronic F68, te polietilenglikol-35-ricinoleat (Cremophor EL). Strukture navedenih emulgatora su prikazane na slici 2.



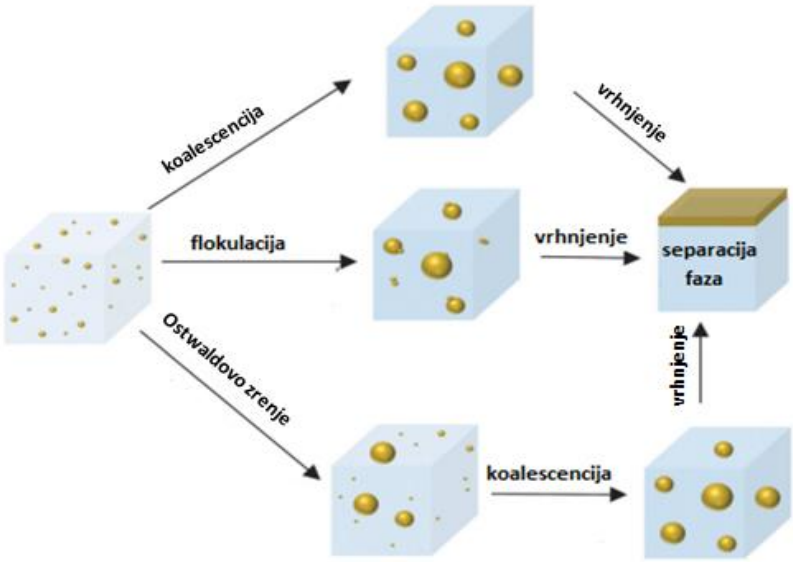
Slika 2. Prikaz struktura u radu korištenih surfaktanata

a) Polisorbat 60 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)
b) Polisorbat 80 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)
c) Cremophor EL (Miyamoto i sur., 2012)
d) Pluronic F68 (http://www.sigmaaldrich.com)

1.3. Stabilnost nanoemulzija i zeta-potencijal

Stabilnost se može definirati kao sposobnost sustava da ostane nepromijenjenih svojstava tokom vremena ili pod utjecajem neke vanjske sile. Nanoemulzije svoju visoku kinetičku stabilnost zahvaljuju izrazito maloj veličini kapljica, zbog čega su otpornije na procese sedimentacije, vrhnjenja i flokulacije/koalescencije (García-Celma i sur., 2016). Mogući mehanizmi destabilizacije prikazani su na slici 3.

Glavni problem uočen kod stabilnosti nanoemulzijskih sustava jest tzv. Ostwaldovo zrenje (*Ostwald ripening*), gdje je uočljiv rast većih kapljica emulzije na račun manjih (García-Celma i sur., 2016). Ostwaldovo zrenje javlja se kao posljedica razlike kemijskih potencijala između kapljica disperzne faze različitih veličina. Manje kapljice pokazuju veći kemijski potencijal od onih većeg radijusa, što dovodi do transfera mase u smjeru manjeg kemijskog potencijala. Veće kapljice stoga rastu, dok manje dodatno gube na masi i volumenu. S obzirom da molekule disperzne faze putuju kroz kontinuiranu fazu, topljivost disperzne faze u vanjskoj igra kritičnu ulogu u brzini navedenog procesa (Gupta i sur., 2016b). Primjerice, korištenje ulja s velikim udjelom dugolančanih masnih kiselina u strukturi, koje su u vodi netopljivi spojevi, stvorit će kinetičku barijeru Ostwaldovom zrenju (Wooster i sur., 2008).



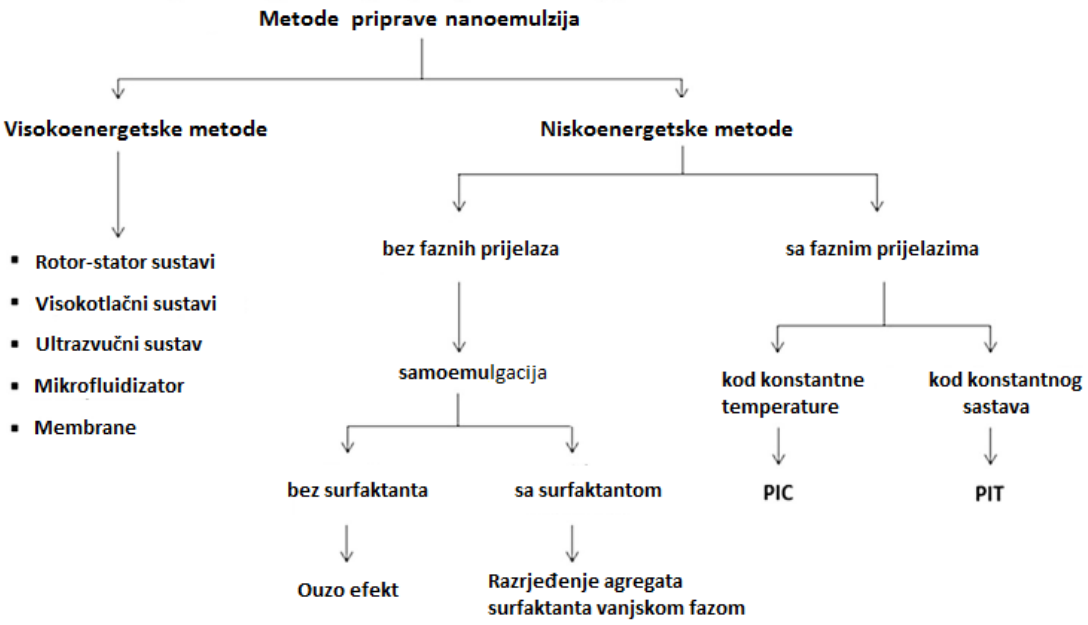
Slika 3. Prikaz različitih mehanizama destabilizacije nanoemulzija. Iako je destabilizacija moguća preko bilo kojeg od navedenih procesa, najizraženiji je vid nestabilnosti rast kapljica putem Ostwaldovog zrenja. Flokulacija i koalescencija dobivaju na značaju nakon rasta primarnih kapljica (preuzeto i prilagođeno: Gupta i sur., 2016b).

Dobra mjera stabilnosti emulzija je zeta-potencijal, definiran kao potencijal na granici smicanja, tj. dodira čestice (s njoj pridruženom ionskom atmosferom i dijelom vanjske faze) i okolnog medija (Honary i Zahir, 2013). Njegova vrijednost pokazatelj je otpornosti emulzije prema flokulaciji/koalescenciji. Prisutnost naboja dovodi do elektrostatske repulzije među kapljicama i sprječavanja bliskog kontakta. Ukoliko nema neke steričke stabilizacije kapljica, smatra se da je apsolutna vrijednost zeta-potencijala veća od 30mV pokazatelj stabilnosti nanoemulzije prema flokulaciji (García-Celma i sur., 2016).

Zeta-potencijal određuje se fotonskom korelacijskom spektroskopijom (*photon correlation spectroscopy*, PCS). Mjerenje se temelji na elektroforetskoj pokretljivosti nabijenih čestica izloženih vanjskom električnom polju. Čestice ispitivanog uzorka putuju prema elektrodama ovisno o svom površinskom naboju pri čemu u jednom trenutku sijeku lasersku zraku mjernog uređaja. Pritom dolazi do raspršivanja svjetlosti koja se onda detektira i čiji intenzitet varira ovisno o frekvenciji povezanoj s brzinom gibanja nabijene čestice. Nakon obrade podataka i određivanja spektra frekvencija, izračunavaju se odgovarajuće vrijednosti zeta-potencijala (Zetasizer 2000/3000 Zeta potential measurements Manual, 2000).

1.4. Metode dobivanja nanoemulzija

Formiranje nanoemulzija zahtjeva određenu količinu energije, zbog njihove karakteristične termodinamičke nestabilnosti. Ista može potjecati iz nekog vanjskog izvora, što je princip tzv. visokoenergetskih metoda dobivanja nanoemulzija (*high-energy methods*), ili pak biti posljedica kemijskog potencijala sastavnica smjese, kao kod niskoenergetskih metoda (*low-energy methods*) (García-Celma i sur., 2016). Shematski prikaz metoda dobivanja nanoemulzija prikazan je na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz metoda priprave nanoemulzija. PIC, inverzija faza promjenom sastava smjese; PIT, inverzija faza promjenom temperature (preuzeto i prilagođeno od García-Celma i sur., 2016)

Visokoenergetske metode emulgiranja, uz pomoć mehaničkih uređaja, izlažu emulzije jakim silama, što dovodi do njihovog usitnjavanja i nastanka sitnih kapljica (García-Celma i sur., 2016). Glavne prednosti ovakvih metoda priprave uključuju fleksibilniju kontrolu distribucije veličine dobivenih kapljica, mogućnost priprave submikronskih emulzija iz različitih vrsta materijala te potrebu za manjom količinom surfaktanta u usporedbi s niskoenergetskim metodama. S druge strane, najveći nedostatak pojava je rasta dobivenih kapljica koalescencijom, zbog velike primjenjene energije (Li i sur., 2013). Nekoliko je tipova uređaja koji se koriste za pripravu nanoemulzija, s tim da su najčešće korišteni ultrabrzi mješači, visokotlačni homogenizatori te ultrazvučni uređaji (Silva i sur., 2011).

Visokotlačni homogenizatori uglavnom su prvi izbor. Rade po principu pumpe koja pod visokim tlakom gura uzorak kroz uski otvor, što, posljedično, dovodi do smanjenja veličine kapljica emulzije (Gupta i sur., 2016b).

Usitnjavanje kapljica emulzije uz pomoć ultrazvuka temelji se na izlaganju uzorka visokoenergetskom valu frekvencije 20 kHz ili veće, što dovodi do kavitacije i smanjenja veličine kapljica (Mason i sur., 2006).

Ultrabrzi mješači su manje popularni zbog nedovoljne uniformnosti postignute veličine kapljica (Silva i sur., 2011).

U novije vrijeme prednost u pripravi nanoemulzija daje se mikrofluidizaciji, također jednoj od visokoenergetskih metoda emulgiranja. Kao glavna prednost navodi se jednoličnija raspodjela veličine dobivenih kapljica koja se kontrolira odabirom broja propuštanja (recirkulacije) uzorka u mikrofluidizatoru (Jafari i sur., 2006; Mason i sur., 2006). Sam uređaj funkcionira po principu povišenja tlaka unešenog uzorka uz pomoć ugrađene hidraulične pumpe. Uzorak pod tlakom tada ulazi u komore uređaja, gdje prolazi kroz sustav mikrokanala, što mu dodatno povećava brzinu protoka. Smanjenje veličine kapljica emulzije temelji se na dva različita fenomena. Prvi od njih odnosi se na pojavu trenja u dodiru sa stijenkama kanalića uređaja. Druga bitna pojava je međusobna kolizija kapljica unutar struje uzorka, zbog velike postignute brzine prolaska (M-110EH-30 User Manual, 2012).

Veličina kapljica nanoemulzija kod priprave niskoenergetskim metodama uglavnom ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima sastavnica. Omogućavaju dobivanje emulzija odgovarajućih veličina kapljica uske distribucije. Kod ovih metoda koristi se jednostavnija oprema uz manji utrošak energije, što olakšava uvećanje proizvodnje na industrijsko mjerilo. Također, zbog manje popratne produkcije topline pogodnije su za sustave s termolabilnim komponentama.

Niskoenergetske metode emulgiranja dijele se u dvije kategorije: samoemulgirajuće metode (metode spontanog emulgiranja) i metode s uključenom inverzijom faza. U pripravi nanoemulzija češće su primjenjivane one temeljene na inverziji faza, koje koriste kemijsku energiju oslobođenu pri faznim prijelazima za proces emulgiranja. Jedna od navedenih metoda uključuje inverziju faza promjenom temperature (engl. *phase inversion temperature*, PIT) i koristi se uz surfaktante čija je lipofilnost, odnosno hidrofilnost, ovisna o temperaturi sustava. Drugi primjer iskorištavanja energije faznih prijelaza u svrhu emulgiranja jest inverzija faza zbog promjene sastava smjese (engl. *phase inversion composition*, PIC), gdje se mijenjanjem koncentracije jedne od komponenti emulzije (ulje ili voda) postiže fazni prijelaz (García-Celma i sur., 2016). Kod ovih metoda nužno je paziti na pravilan izbor surfaktanata i kosurfaktanata, ukoliko je potrebno, s obzirom na njihova svojstva te na temperaturu sustava, pogotovo kod PIT metode. Ukoliko promjena temperature nije dovoljno brza, moguća je pojava koalescencije kapljica emulzije (Li i sur., 2013).

1.5. Nanoemulzije i mikroemulzije

U znanstvenoj literaturi uočen je problem zamjene nanoemulzija s mikroemulzijskim sustavima, gdje je iz dobivenih rezultata vidljivo je da su procesom izrade dobivene mikroemulzije umjesto željenih nanoemulzija. Zabuna je, najčešće, posljedica činjenice da mikroemuzije, pod određenim eksperimentalnim uvjetima, mogu morfološki jako sličiti sferičnim kapima nanoemulzija u vidu tzv. izbubrenih micela (*"swollen micelles"*) (Anton i Vandamme, 2010). Potrebno je, stoga napomenuti bitne razlike između navedenih sustava. Glavna razlika leži u njihovoj termodinamičkoj stabilnosti. Mikroemulzije su termodinamički stabilni sustavi koji mogu nastati spontano iz smjese ulja, vode i surfaktanta, dok nanoemulzije nisu te je za njihovu pripravu nužno uložiti više energije. Nanoemulzije, s druge strane, pokazuju kinetičku stabilnost. Nadalje, potrebno je znantno više surfaktanta za pripravu jedne mikroemulzije. One su, također, osjetljive na fluktuacije temperature te proces razrjeđivanja, dok nanoemulzija, u istim slučajevima, zadržava svoja svojstva nepromijenjenima (McClements, 2012).

1.6. Prednosti primjene nanoemulzija

Specifična svojstva nanoemulzijskih sustava čine ih posebno zanimljivima za primjenu u raznim područjima, od prehrambene industrije pa do sinteze materijala, a posebno u farmaceutskoj industriji za razvoj novih nosača lijekova. Estetska svojstva nanoemulzija, primjerice njihova transparentnost i lako kontrolirana viskoznost, čine ih privlačnima i kozmetičkoj industriji. Pokazana je znatno bolja hidratacija kože u usporedbi s konvencionalnim pripravcima (Solans i sur., 2005). Također, viđeno je i povećanje stabilnosti ulja i uljnih mikstura u kozmetičkoj primjeni (Gutiérrez i sur., 2008). Mala veličina formiranih kapljica olakšava prijelaz preko barijera organizma, utječući time na bioraspoloživost uklopljenog lijeka. Samom kontrolom veličine disperzne faze lako se mijenja transparentnost emulzije. Mogućnošću oblaganja kapljica specifičnim tvarima može se postići se ciljana dostava lijeka, smanjiti njegova doza i popratni neželjeni učinci. S obzirom na stabilnost nanoemulzija na promjene ionske jakosti, temperature i razrjeđivanja, omogućena je kontrola viskoznosti sustava (Gupta i sur., 2016b).

Parenteralna primjena lijekova, zbog svojih je specifičnih zahtjeva, jedna od najvažnijih u ispitivanjima lijekova. Ovaj put primjene bitan je u hitnim stanjima, ima izravan

pristup krvotoku s najbržim nastupom djelovanja te omogućuje lakšu dostavu u specifična tkiva i organe. Kod oblikovanja ljekovitog sustava koji sadži hidrofobnu djelatnu tvar potrebno je koristiti suotapala ili ulja kao nosače. Problemi koji se povezuju s ovim sustavima su moguća precipitacija lijeka, zbog razrjeđenja nakon parenteralne primjene te bol i moguća hemoliza koje se javljaju pri injiciranju. Upotreba nanoemulzija kao nosača pokazala se zanimljivom zbog lake manipulacije, sposobnosti solubilizacije hidrofobnih aktivnih tvari, povećanja stabilnosti ljekovitog sustava te velike površine koju je moguće modificirati te time omogućiti ciljanu terapiju. Također, nanoemulzije pokazuju stabilnost na promjene pH, ionske jakosti te razrjeđenje. S druge strane uočena je opasnost od pojave embolije nakon primjene (Li i sur., 2013).

Upotreba nanoemulzija u sustavima za oralnu primjenu povezana je s povećanom topljivošću hidrofobnih lijekova, inhibicijom metabolizma prvog prolaska kroz jetru, smanjenom toksičnošću nekih lijekova te povećanom bioraspoloživošću (Li i sur., 2013.).

Loša bioraspoloživost i nedostatan terapijski učinak često su povezivani s oftalmičkom primjenom lijekova. Slaba propusnost rožnice, refleksno treptanje, stalna proizvodnja suza i ispiranje oka onemogućuju dovoljno dugo zadržavanje lijeka na površini oka. Taj problem slabe bioraspoloživosti pogotovo se veže uz kapi za oči, koje su ujedno i najčešći oblici ljekovitih pripravaka za bolesti oka. Masti, s druge strane, nailaze na problem nesuradljivosti bolesnika zbog zamućivanja vida (Gan i sur., 2012). Nanoemulzijski sustavi nameću se kao dobro rješenje navedenih problema ovog terapijskog puta. Omogućuju bolju solublizaciju djelatnih tvari te olakšavaju apsorpciju kroz rožnicu. Jednostavnom manipulacijom njihove viskoznosti utječe se na zadržavanje pripravka na oku. Također, moguće je i adsorpcija kationskih tvari na površinu kapljica, čime se omogućuje bolja interakcija pripravka s negativno nabijenom površinom oka. Produženo zadržavanje pripravka povećat će udio apsorbirane lijekovite tvari te povećati bioraspoloživost te dovesti do željenog terapijskog učinka (Tamilvanan i Benita, 2004.)

Nanoemulzijski sustavi su proučavani i kod dermalnog puta primjene lijekova. Koža, kao najveća barijera ljudskog tijela, često je izazov kod postizanja odgovarajućeg terapijskog učinka primijenjenog lijeka, pogotovo onih s uklopljenom hidrofobnom djelatnom tvari. Surfaktant u nanoemulzijskom sustavu ima svojstvo poboljšivača permeabilnosti lijeka, smanjuje rigidnost lipidne barijere kože. Također, niska površinska napetost sustava omogućuje bolji kontakt s kožom, a niska viskoznost olakšava nanošenje pripravka. No, kod oblikovanja ovakvih sustava, nužno je paziti na izbor i količinu primijenjenog surfaktanta zbog potencijalnog nadraživanja kože (Li i sur., 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripraviti U/V nanoemulzije koristeći sojino ulje kao disperznu fazu uz neionske surfaktante Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68 te Cremophor EL. Odabrana je mikrofluidizacija kao visokoenergetska metoda priprave na uređaju Model M-110eH-30 Microfluidizer (Microfluidics).

Specifični ciljevi bili su:

- ispitati utjecaj četiri različita neionska surfaktanta te njihovih različitih udjela u sustavu na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti te zeta-potencijal dobivenih nanoemulzija;
- ispitati stabilnost dobivenih nanoemulzija 10 dana nakon njihove priprave na mikrofluidizatoru s obzirom na različite udjele i vrste korištenih neionskih surfaktanata;
- odrediti koji je od korištenih neionskih surfaktanata i u kojem udjelu najoptimalniji u pripravi nanoemulzija sa sojinim uljem.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Nanoemulzije U/V tipa pripravljene su koristeći sojino ulje (Sigma- Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka) i četiri različita surfaktanta: Polisorbat 80 (Kemig, Hrvatska); Polisorbat 60 (Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka); Pluronic F68 (Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Njemačka); Cremophor EL (BASF, Njemačka). Kao vanjska faza korištena je pročišćena voda. Sastav pripravljenih nanoemulzijskih sustava prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Prikaz sastava ispitivanih nanoemulzija. Ukupno su pripravljene četiri nanoemulzije s obzirom na izbor emulgatora. Redom su korišteni: Polisorbat 80; Polisorbat 60; Pluronic F68; Cremophor EL.

Sojino ulje	Surfaktant	Voda (pročišćena)
5% (m/m) (7,5g)	0,5% (0,75g)	ad 150g
	1% (1,5g)	
	2,5% (3,75g)	
	5% (7,5g)	
	10% (15g)	

Pri mjerenju veličine kapljica i indeksa polidisperznosti formiranih nanoemulzija korištena je pročišćena voda kao sredstvo za razrijeđivanje. Ista je, prije primjene, propuštena kroz membranski mikrobakteriološki filter veličine pora 0,22 μm (Spritzen-/ Syringe- Filter 0,22 μm, TPP, Švicarska) radi uklanjanja čestica prašine i drugih mogućih onečišćenja koji bi potencijalno mogli interferirati s rezultatima mjerenja.

Za razrijeđivanje uzoraka pri mjerenju zeta-potencijala dobivenih nanoemulzija korištena je 10 mM otopina natrijevog klorida (Kemig, Hrvatska). Prije primjene otopina je propuštena kroz membranski mikrobakteriološki filter veličine pora 0,22 μm (Spritzen-/ Syringe- Filter 0,22 μm, TPP, Švicarska).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema nanoemulzija

Ispitivane nanoemulzije su pripravljene koristeći rastuće koncentracije surfaktanta. Krenulo se s izradom emulzija s Polisorbat-om 80, a zatim redom sa Polisorbat-om 60, Pluronic-om F68 te, u konačnici, Cremophor-om EL po istoj shemi izrade. Određena količina surfaktanta odvaže se u prethodno izračunatu količinu pročišćene vode (prema Tablici 1). Potom se smjesa stavi na magnetnu mješalicu s dodanim magnetnim mješačem te miješa do potpunog otapanja emulgatora u vodi. Kod izrade emulzije s Polisorbat-om 60 kao surfaktantom, bilo je nužno lagano zagrijavanje radi pospješenja njegove topljivosti. Nakon otapanja surfaktanta u pročišćenoj vodi, otopini je dodana prethodno odvagana adekvatna količina sojinog ulja te je ponovno smjesa stavljena na miješanje (magnetna mješalica, s dodanim magnetnim mješačem). Brzina miješanja na magnetnoj mješalici u oba slučaja je bila između 600 i 700 rpm. Postupak je ponovljen pet puta s rastućim koncentracijama ispitivanog emulgatora.

Dobivene grube emulzije su, potom, obrađene Ultra turrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Njemačka) dispergirajućim uređajem brzinom od 6000 rpm, svaki uzorak u trajanju od 5 minuta. Uzorci su prebačeni u IsoLab polipropilenske spremnike volumena 50 ml.

Završni korak priprave nanoemulzija obrada je uzoraka mikrofluidizatorom (Model M-110eH-30 Microfluidizer Processor, Microfluidics, SAD). Priprava mikrofluidizacijom omogućena je suradnjom s farmaceutskom tvrtkom PLIVA HRVATSKA d.o.o. Emulzije su procesuirane kroz deset propuštanja pri tlaku od 1000 bar te brzini protoka 238 ml/min.

3.2.2. Ispitivanje veličine i indeksa polidisperznosti

Ispitivanje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti (PDI) pripravljenih nanoemulzija provedeno je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (PCS) temeljenom na dinamičkom raspršenju svjetlosti (*dynamic light scattering*; DLS) na Zetasizer 3000HS uređaju (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Velika Britanija). Mjerenje se provodi obasjavanjem uzorka monokromatskom koherentnom laserskom zrakom te detektiranjem intenziteta svjetlosti raspršene na kapljicama pod određenim kutem. U ovom slučaju riječ je o

10mW He-Ne laseru, valne duljine 633 nm (Zetasizer 1000/2000/3000: Hardware Manual, 2000). Mjerenje se provodi pod kutem od 90º pri temperaturi od 25 ºC. Uređaj provodi ispitvanje u tri ciklusa po deset mjerenja te ispisuje rezultate aritmetičke sredine svih rezultata određivanja veličine i indeksa polidisperznosti (Zetasizer 1000HS/3000HS: Size measurements, Manual, 2001). Svi su uzorci prije mjerenja razrijeđeni filtriranom pročišćenom vodom (prema shemama prikazanim u tablici 2 i tablici 3).

Optimalno razrjeđenje za mjerenje veličine čestica i indeksa polidisperznosti ispitivano je koristeći nanoemulziju s 2,5% (m/m) Polisorbata 80 (tablica 4). Analizom dobivenih rezultata uzeto je razrjeđenje od 400x kao relevantno i okvirno, uz određene korekcije zbog korigiranja procesnih parametara (vidljivo u tablici 2 i tablici 3).

Za svaku od pripremljenih nanoemulzija ispitivanje veličine i polidisperznosti je provedeno dva puta. Prvo mjerenje obavljeno je odmah nakon njihove obrade mikrofluidizatorom. Drugo je ispitivanje provedeno u svrhu promatranja stabilnosti dobivenih nanoemulzija i obavljeno je 10 dana nakon procesuiranja uzoraka mikrofluidizatorom.

Tablica 2. Procjena najoptimalnijeg razrijeđenja za ispitivanje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti (PDI), mjerenjem navedenih parametara za nanoemulziju s 2,5% (m/m) Polisorbata 80. Uzorak je razrijeđivan filtriranom pročišćenom vodom.

Uzorak / Razrijeđenje	Veličina kapljica (nm)	PDI
100x	141,8 ± 2,0	0,270 ± 0,048
200x	147,7 ± 2,9	0,292 ± 0,031
400x	149,2 ± 3,8	0,231 ± 0,007
800x	146,9 ± 2,7	0,238 ± 0,045

Tablica 3. Prikaz razrjeđenja uzoraka nanoemulzija za mjerenje veličine kapljica i indeksa polidiperznosti. Uzorci su razrijeđeni filtriranom pročišćenom vodom. P80 oznaka odnosi se na nanoemulzije s Polisorbatom 80, P60 na nanoemulzije s Polisorbatom 60, PlF68 na one s Pluronicom F68, CrEL na nanoemulzije s Cremophorom EL.

Uzorak / Udio surf. (m/m)	P80	P60	PlF68	CrEL
0,5%	400x	400x	400x	400x
1%	400x	400x	400x	400x
2,5%	400x	400x	400x	400x
5%	400x	200x	400x	100x
10%	50x	100x	100x	50x
	100x			
	200x			

Tablica 4. Prikaz razrjeđenja uzoraka nanoemulzija za mjerenje veličine kapljica i indeksa polidiperznosti u ispitivanju stabilnosti. Razrijeđenja su rađena filtriranom pročišćenom vodom. P80 oznaka odnosi se na nanoemulzije s Polisorbatom 80, P60 na nanoemulzije s Polisorbatom 60, PlF68 na one s Pluronicom F68, CrEL na nanoemulzije s Cremophorom EL.

Uzorak / Udio surf. (m/m)	P80	P60	PlF68	CrEL
0,5%	400x	400x	400x	400x
1%	400x	400x	400x	400x
2,5%	400x	400x	400x	400x
5%	400x	200x	400x	100x
10%	100x	100x	100x	50x

3.2.3. Mjerenje zeta-potencijala

Zeta-potencijal određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (PCS) uz Zetasizer 3000HS uređaj. Kod određivanja sustav koristi 10mW He-Ne laser, valne duljine 633 nm (Zetasizer 1000/2000/3000: Hardware Manual, 2001).

Za svaku od pripravljenih nanoemulzija mjerenje zeta-potencijala je provedeno dva puta. Prvo mjerenje obavljeno je odmah nakon njihove obrade mikrofluidizatorom. Drugo je ispitivanje provedeno u svrhu promatranja stabilnosti dobivenih nanoemulzija i obavljeno je 10 dana nakon procesuiranja uzoraka mikrofluidizatorom.

Svi uzorci prije mjerenja razrijeđeni su filtriranom 10 mM otopinom natrijevog klorida (prema tablici 5.). Ispitivanje je provedeno pri temperaturi od 25 ºC.

Tablica 5. Prikaz razrjeđenja uzoraka nanoemulzija za mjerenje zeta potencijala. Razrijeđenja su rađena filtriranom 10mM otopinom NaCl. P80 oznaka odnosi se na nanoemulzije s Polisorbatom 80, P60 na nanoemulzije s Polisorbatom 60, PlF68 na one s Pluronicom F68, CrEL na nanoemulzije s Cremophorom EL.

Uzorak / Udio surf.(m/m)	P80	P60	PlF68	CrEL
0,5%	200x	200x	200x	200x
1%	200x	200x	200x	200x
2,5%	200x	200x	200x	200x
5%	200x	200x	200x	200x
10%	200x	200x	200x	200x

3.2.4. Ispitivanje stabilnosti

Pripremljenim nanoemulzijama ispitana je i stabilnost ponavljanjem mjerenja veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala 10 dana nakon procesuiranja uzoraka mikrofluidizatorom. Uzorci su između mjerenja čuvani na +4 ºC. Promatran je utjecaj vremena na ispitivane parametre. Također, promatrana je i stabilnost nanoemulzija u smislu razdvajanja faza.

Nanoemulzije pripravljene koristeći Pluronic F68 kao emulgirajući agens, zbog sumnje na potencijalnu adsorpciju ulja na stijenke IsoLab plastične tube, raspodijeljene su u tri vrste spremnika: IsoLab polipropilenski spremnik (50 ml); Falcon polipropilenski spremnik (50 ml); stakleni spremnik od borosilikatnog stakla prve skupine hidrolitičke otpornosti (5 ml). Nanoemulzijama pohranjenim u različite spremnike ispitivani su veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal 10 dana nakon obrade uzorka mikrofluidizatorom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

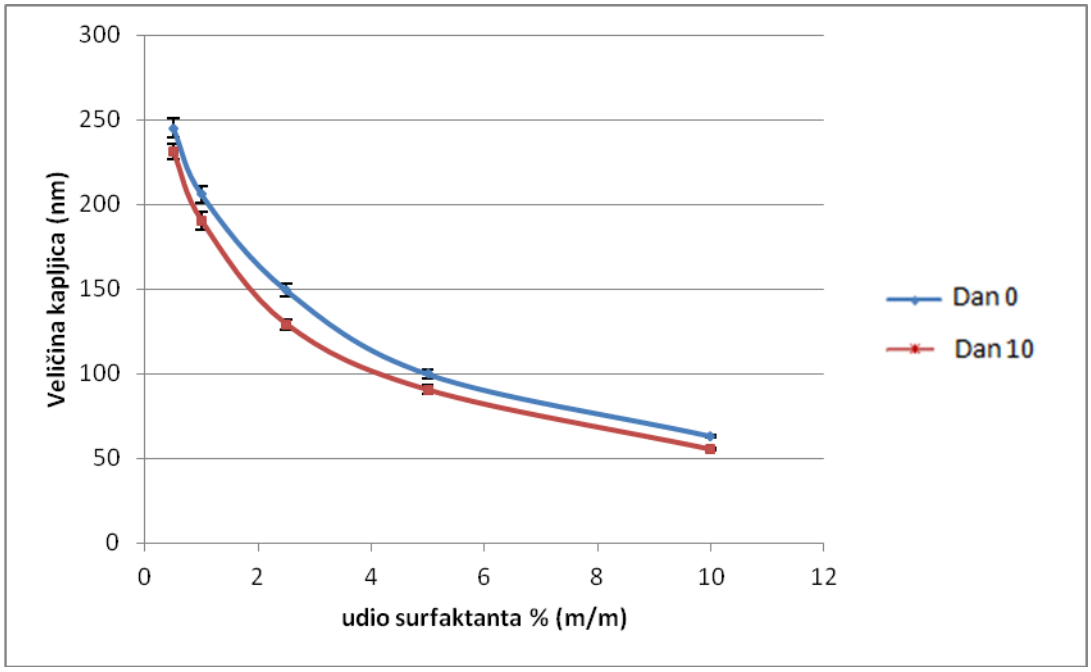
Ispitivane nanoemulzije izrađivane su korištenjem sojinog ulja, kao disperzne faze, te četiri različita surfaktanta: Polisorbata 80, Polisorbata 60, Pluronica F68, Cremophora EL. Korištenje sojinog ulja često je u farmaceutici, pogotovo u pripremi emulzijskih i drugih lipidnih terapijskih sustava. Upotreba sojinog ulja kao uljne faze u pripremi nanoemulzija opisana je u literaturi (Hwang i sur., 2009; Sadurni i sur., 2005; Hamouda i sur., 1999). Za svaki od surfaktanata rađeni su uzorci s pet različitih njihovih koncentracija: 0,5, 1, 2,5, 5 i 10% (m/m). Dobivenim nanoemulzijama određivani su veličina kapljica, indeks polidisperznosti te zeta potencijal. Ispitana je i stabilnost ponovnim mjerenjem navedenih parametara 10 dana nakon obrade mikrofluidizatorom.

4.1. Određivanje veličine kapljica nanoemulzija i indeksa polidisperznosti

4.1.1 Nanoemulzije s Polisorbatom 80

Polisorbat 80 (HLB=15,0) neionski je tip surfaktanta, monooleatni ester polioksietilen (20) sorbitana. Prema svojoj HLB vrijednosti pogodan je za pripravu U/V tipa emulzija (ICI Americas Inc., 1976). Njegova primjena u nanoemulzijskim sustavima opisana je u literaturi. Često se navodi kombinacija sa Span surfaktantima u dobivanju stabilnih nanoemulzija veličina kapljica ispod 100 nm (Solans i Sole, 2012; Hwang i sur., 2009). Komaiko i sur. u svom istraživanju primjećuju da su veličine kapljica nanoemulzija dobivenih samoemulgirajućim metodama u prosjeku manje kod korištenja Polisorbata 80 u usporedbi s drugim surfaktantima iz njegove skupine (Polisorbat 20, 60 i 85). To objašnjavaju prisustvom jednolančane nezasićene kiseline u njegovoj strukturi (Komaiko i sur., 2016).

Obradom emulzija s Polisorbatom 80 mikrofluidizatorom postignute su veličine kapljica ispod 250 nm, s tim da je vidljivo kako sama veličina opada porastom udjela surfaktanta u sustavu (slika 5). Na slici 5 također je vidljiv neznatan pomak vrijednosti izmjerenih 10 dana nakon priprave u odnosu na rezultate dobivene odmah nakon mikrofluidizacije, iz čega se može zaključiti kako je ispitivana emulzija ostala stabilna 10 dana nakon pripreme.



Slika 5. Ovisnost veličine kapljica nanoemulzije (srednja vrijednost ± standardna devijacija, izražene u nm, o udjelu (%, m/m) Polisorbata 80, mjerene neposredno nakon priprave (Dan 0) te 10 dana nakon pripreme nanoemulzije (Dan 10).

Indeks polidisperznosti mjera je stupnja heterogenosti veličine kapljica emulzije (García-Celma i sur., 2016). Poželjna je njegova što niža vrijednost, zbog povezanosti sa Ostwaldovim zrenjem, kao glavnim mehanizmom destabilizacije nanoemulzija (Solans i sur., 2005). Smatra se da je indeks polidisperznosti niži od 0,2 dobar pokazatelj homogenosti veličine kapljica emulzije (Sadurni i sur., 2005). Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 6. Vidljivo je da uzorci s 0,5, 1 te 2,5% (m/m) surfaktanta u sastavu imaju povoljniji indeks polidisperznosti u odnosu na one s 5 i 10% (m/m), što ih čini stabilnijima s obzirom na Ostwaldovo zrenje. Vrijednosti indeksa polidisperznosti ostaju relativno nepromijenjene i nakon 10 dana.

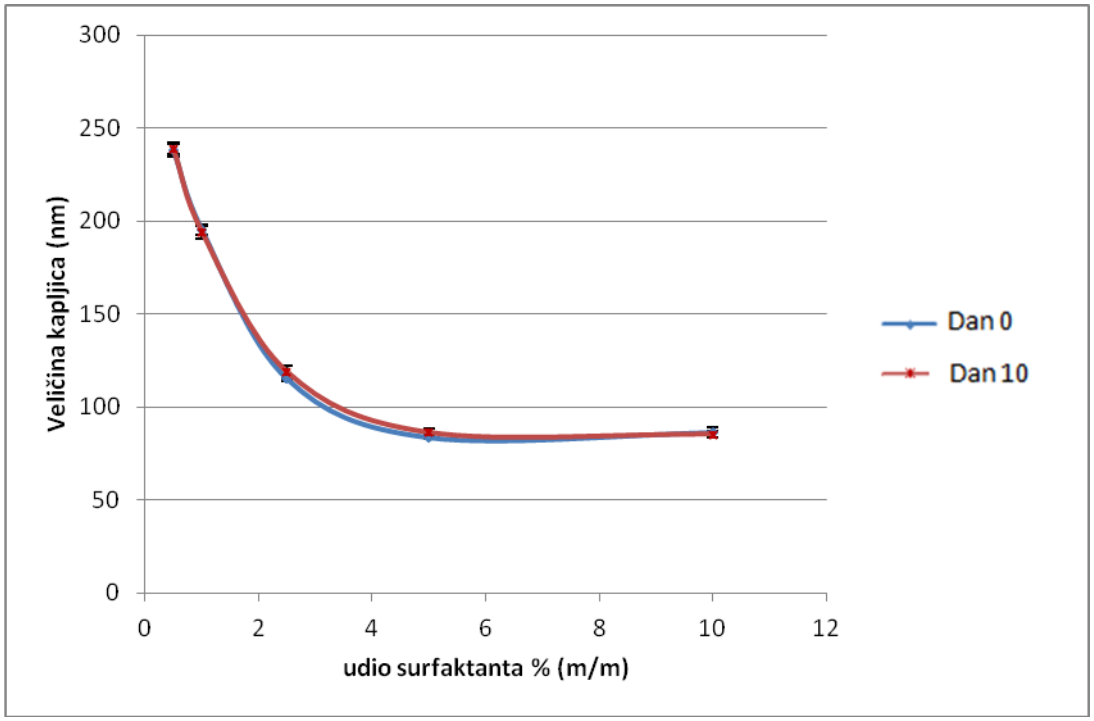
Tablica 6. Prikaz izmjerenih vrijednosti indeksa polidisperznosti (PDI) (srednja vrijednost ± standardna devijacija) pripravljenih nanoemulzija za različite udjele (%, m/m) Polisorbata 80. Mjerenja su provedena odmah nakon priprave nanoemulzija (Dan 0) te 10 dana nakon mikrofluidizacije (Dan 10).

UZORAK	PDI	
	Dan 0	Dan 10
0,5%	0,076 ± 0,055	0,099 ± 0,025
1%	0,131 ± 0,021	0,087 ± 0,024
2,5%	0,231 ± 0,007	0,181 ± 0,022
5%	0,314 ± 0,017	0,319 ± 0,040
10%	0,462 ± 0,007	0,398 ± 0,005
	0,438 ± 0,012	
	0,442 ± 0,029	

4.1.2. Nanoemulzije s Polisorbatom 60

Polisorbat 60 (HLB=14,9) neionski je surfaktant koji tvori U/V emulzije, po strukturi polioksietilen-20-sorbitan monostearat. Na sobnoj je temperaturi bjelkasta do žuta viskozna tekućina, topljiv je u vodi (http://www.sigmaaldrich.com).

Kao što je vidljivo na slici 6, postignuta veličina kapljica nanoemulzija također ne prelazi 250 nm. Veličina opada povećanjem udjela surfaktanta te prelazi u plato iz čega bi se moglo zaključiti da daljnje povećanje udjela polisorbata 60 ne bi dovelo do dodatnog smanjenja veličine kapljica. Ponovljeno mjerenje nakon 10 dana ne odskače od prethodnog, što je dobar pokazatelj stabilnosti nanoemulzije prema rastu kapljica disperzne faze. Veličina je nešto manja u odnosu na nanoemulzije s Polisorbatom 80, izuzev udjela surfaktanta od 10% gdje veličina kapljica pada i do 55 nm (mjerenje s Polisorbatom 80, 10 dana nakon priprave).



Slika 6. Ovisnost veličine kapljica nanoemulzije (srednja vrijednost ± standardna devijacija), izražene u nm, o udjelu (%, m/m) surfaktanta Polisorbata 60, mjerene neposredno nakon priprave (Dan 0) te 10 dana nakon priprave nanoemulzije (Dan 10).

Indeks polidisperznosti, ukupno gledano, nešto je nepovoljniji u odnosu na nanoemulzije s ostalim surfaktantima, pogotovo u višim koncentracijama surfaktanta, što bi indiciralo povećanu osjetljivost ovih nanoemulzija na destabilizaciju putem Ostwaldovog zrenja te kasnije flokulacije i koalescencije.

Tablica 7. Prikaz izmjerenih vrijednosti indeksa polidisperznosti (PDI) (srednja vrijednost ± standardna devijacija) pripravljenih nanoemulzija za različite udjele (%, m/m) surfaktanta Polisorbata 60. Mjerenja su provedena odmah nakon priprave nanoemulzija (Dan 0) te 10 dana nakon mikrofluidizacije (Dan 10).

UZORAK	PDI	
	Dan 0	Dan 10
0,5%	0,127 ± 0,022	0,081 ± 0,033
1%	0,167 ± 0,003	0,110 ± 0,038
2,5%	0,336 ± 0,039	0,306 ± 0,013
5%	0,429 ± 0,049	0,433 ± 0,006
10%	0,621 ± 0,103	0,628 ± 0,094

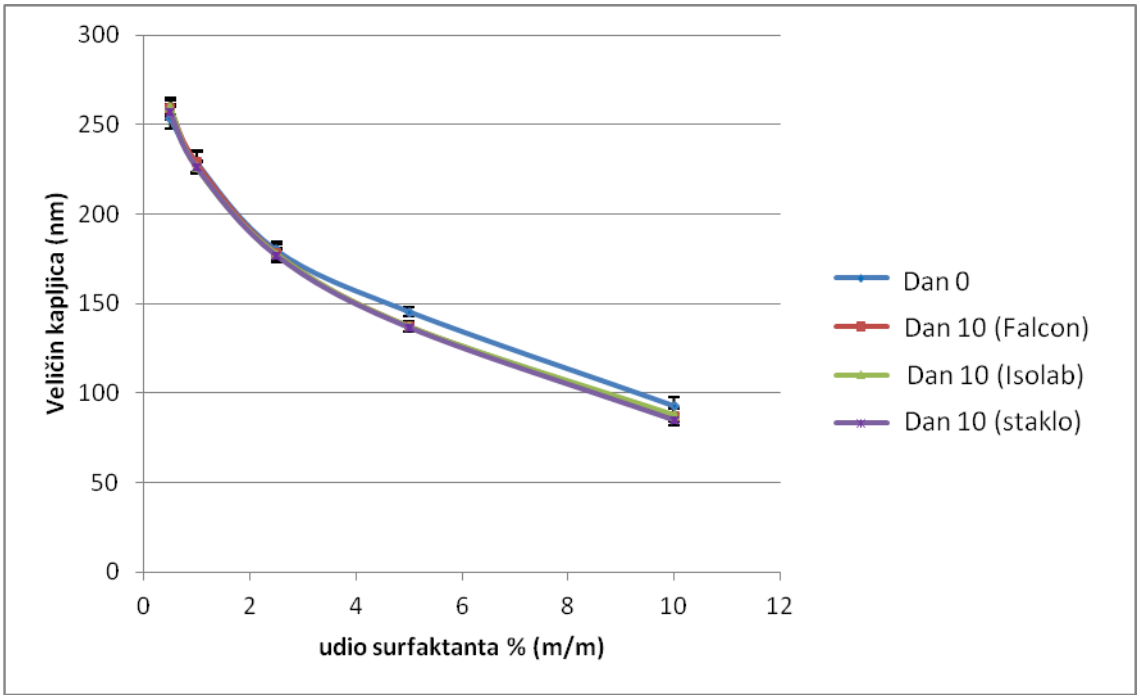
4.1.3. Nanoemulzije s Pluronicom F68

Pluronic F68 (HLB=29) kopolimer je etilenoksida i propilenoksida. Neionski je surfaktant koji se koristi za pripravu U/V tipa emulzija. Topljiv je u vodi, a pri sobnoj temperaturi (25ºC) je u čvrstom stanju (http://www.sigmaaldrich.com). Polipropilenoksidni blok Pluronic F68 surfaktanta predstavlja hidrofobni, u vodi netopljivi dio molekule, dok je polietilenoksidni dio kopolimera hidrofilnog karaktera (Hepworth, 2006).

Nakon prvog mjerenja (odmah po obradi mikrofluidizatorom) nanoemulzija formiranih uz Pluronic F68, uzorak je raspodijeljen u tri vrste spremnika (Isolab plastične tuba za centrifugiranje, Falcon sterilne tube za centrifugiranje, staklene spremnike), zbog sumnje na potencijalnu adsorpciju ulja na stijenke Isolab plastične tube. Za svaki od spremnika obavljeno je mjerenje 10 dana nakon mikrofluidizacije i uspoređeni rezultati su vidljivi na slici 7. Postignuta veličina kapljica ostala je relativno nepromijenjena kod ponovljenih mjerenja za sva tri tipa spremnika, u usporedbi s prvim ispitivanjem. Kapljice su, također, nešto veće u odnosu na emulzije pripremljene sa ostalim surfaktantima.

Kod nanoemulzija s Pluronicom F68, nakon 10 dana, primjećena je pojava vrhnjenja u sva tri tipa spremnika kod udjela surfaktanta od 10%. Uzorci su, stoga, prije drugog

mjerenja dobro promućkani. Wulff-Pérrez i sur. u svom su ispitivanju također primijetili razdvajanje faza kod nanoemulzija sa sojinim uljem i višim koncentracijama Pluronica F68. No, njihovi uzorci sadrže znatno veći udio uljne faze (25%, V/V) (Wulff-Pérrez i sur., 2009).



Slika 7. Ovisnost veličine kapljica nanoemulzije (srednja vrijednost ± standardna devijacija), izražene u nm, o udjelu (%, m/m) surfaktanta Pluronica F68, mjerene neposredno nakon priprave (Dan 0) te 10 dana nakon priprave nanoemulzije (Dan 10) u različitim tipovima spremnika.

Što se tiče rezultata ispitivanja veličine kapljica nanoemulzija s Pluronicom F68 kao surfaktantom, nema nekih značajnih razlika u veličini kapljica i vrijednosti indeksa polidisperznosti kod uzoraka u različitim tipovima spremnika (plastika, staklo). Dobivene nanoemulzije se, s obzirom na mjerenja veličine, mogu smatrati stabilnima. No, nužno je imati u vidu i uočenu pojavu vrhnjenja kod uzoraka s najvišom koncentracijom surfaktanta.

Vrijednosti indeksa polidisperznosti ostale su ujednačene i kod mjerenja 10 dana od pripreme, s tim da nema značajnih razlika u rezultatima triju različitih spremnika (vidljivo u

tablici 8). Izmjereni rezultati, ukupno gledani, najpovoljniji su u usporedbi s nanoemulzijama pripravljenim s ostala tri emulgatora, kada se govori o heterogenosti veličine kapljica.

Tablica 8. Prikaz izmjerenih vrijednosti indeksa polidisperznosti (PDI) (srednja vrijednost ± standardna devijacija) pripravljenih nanoemulzija za različite udjele (%, m/m) surfaktanta Pluronica F68. Mjerenja su provedena odmah nakon priprave nanoemulzija (Dan 0) te 10 dana nakon mikrofluidizacije (Dan 10).

UZORAK	PDI			
	Dan 0	Dan 10 (Falcon)	Dan 10 (Isolab)	Dan 10 (staklo)
0,5%	0,124 ± 0,006	0,115 ± 0,020	0,088 ± 0,051	0,227 ± 0,041
1%	0,121 ± 0,033	0,073 ± 0,055	0,117 ± 0,054	0,129 ± 0,048
2,5%	0,050 ± 0,040	0,142 ± 0,031	0,140 ± 0,033	0,142 ± 0,013
5%	0,212 ± 0,045	0,201 ± 0,035	0,214 ± 0,020	0,191 ± 0,018
10%	0,350 ± 0,050	0,334 ± 0,068	0,352 ± 0,074	0,280 ± 0,008

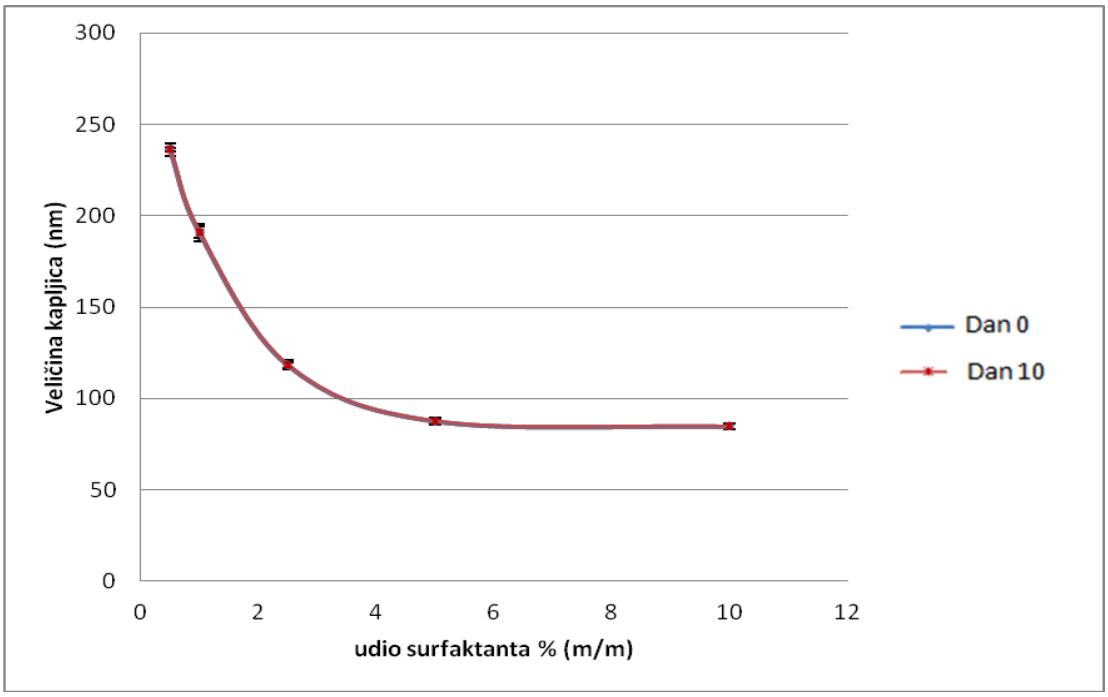
4.1.4. Nanoemulzije s Cremophorom EL

Cremophor EL neionski je surfaktant, produkt polioksietilacije 35 mola etilenoksida na 1 mol ricinusovog ulja. Često je korišten u farmaceutskoj industriji kao surfaktant ili solubilizator hidrofobnih tvari (Rowe i Quinn, 2009). Pri sobnoj je temperaturi (25ºC) žućkasta uljasta tekućina, karakterističnog mirisa. Topljiv je u vodi (HLB=12-14) te tvori U/V emulzije (Cannon i sur., 2008).

Veličina kapljica nanoemulzija pripravljenih uz Cremophor EL kao surfaktant ostala je gotovo ista i kod ponovljenog mjerenja 10 dana nakon mikrofludizacije, kao što je vidljivo na slici 8. Izmjerene vrijednosti slične su onima dobivenima za nanoemulzije s Polisorbatom 60 i

nešto su manje u odnosu na veličine kod emulzija s Polisorbatom 80 i Pluronicom F68. S obzirom na rezultate oba ispitivanja, nanoemulzije s Cremophorom EL mogu se smatrati stabilnima na rast kapljica disperzne faze u vremenskom intervalu u kojem su ispitivane.

Indeks polidisperznosti također nije znatno različit kod oba mjerenja, izuzev rezultata ponovnog mjerenja za uzorak s udjelom surfaktanta od 0,5% , gdje je vidljivo poprilično smanjenje navedene vrijednosti. Polidisperznost je poprilično niska kod prve tri koncentracije surfaktanta, dok je ona kod uzorka s 10% emulgatora među najvišima u usporedbi s rezultatima ostalih nanoemulzija.



Slika 8. Ovisnost veličine kapljica nanoemulzije (srednja vrijednost ± standardna devijacija), izražene u nm, o udjelu (%, m/m) surfaktanta Cremophora EL, mjerene neposredno nakon priprave (Dan 0) te 10 dana nakon priprave nanoemulzije (Dan 10).

Tablica 9. Prikaz izmjerenih vrijednosti indeksa polidisperznosti (PDI) (srednja vrijednost ± standardna devijacija) pripravljenih nanoemulzija za različite udjele (%, m/m) surfaktanta Cremophora EL. Mjerenja su provedena odmah nakon priprave nanoemulzija (Dan 0) te 10 dana nakon mikrofluidizacije (Dan 10).

UZORAK	PDI	
	Dan 0	Dan 10
0,5%	0,148 ± 0,090	0,015 ± 0,000
1%	0,097 ± 0,036	0,054 ± 0,016
2,5%	0,181 ± 0,019	0,160 ± 0,018
5%	0,383 ± 0,011	0,352 ± 0,032
10%	0,536 ± 0,066	0,557 ± 0,011

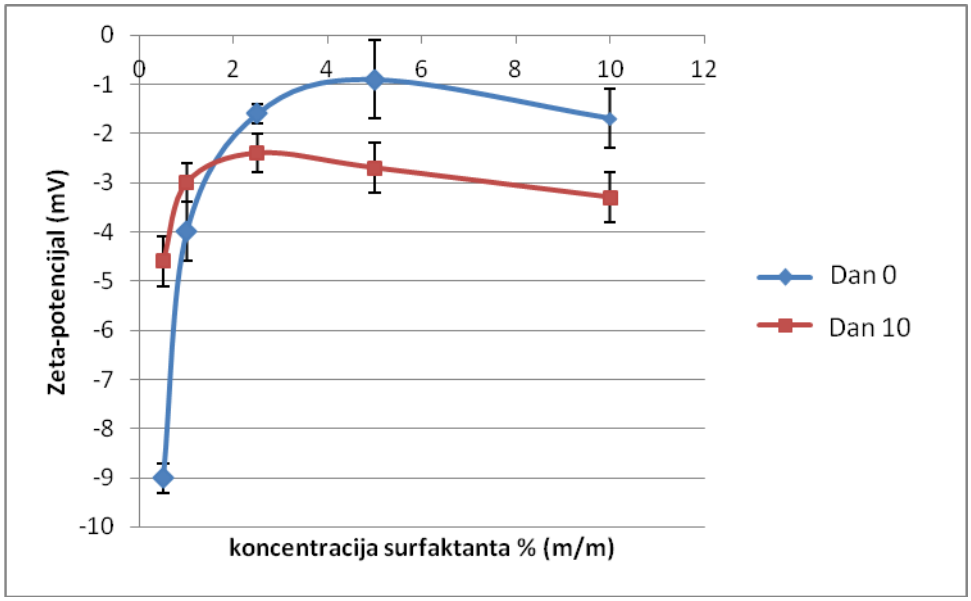
4.2. Ispitivanje zeta potencijala

Ispitivane nanoemulzije pripravljene su uz neionske surfaktante, stoga se očekuju niske vrijednosti zeta-potencijala. Stabilizacija nanoemulzija, u ovom slučaju, steričke je prirode. Posljedica je prisustva adsorbiranog sloja surfaktanta, njegove viskoznosti i elastičnosti, odnosno, kemijske strukture i konformacije molekula u sloju (Florence i sur., 1971).

4.2.1. Zeta-potencijal nanoemulzija s Polisorbatom 80

Izmjerene vrijednosti zeta-potencijala za nanoemulzije s Polisorbatom 80 ne prelaze -10 mV, kao što je vidljivo na slici 9. S obzirom da je riječ o neionskom emulgatoru,

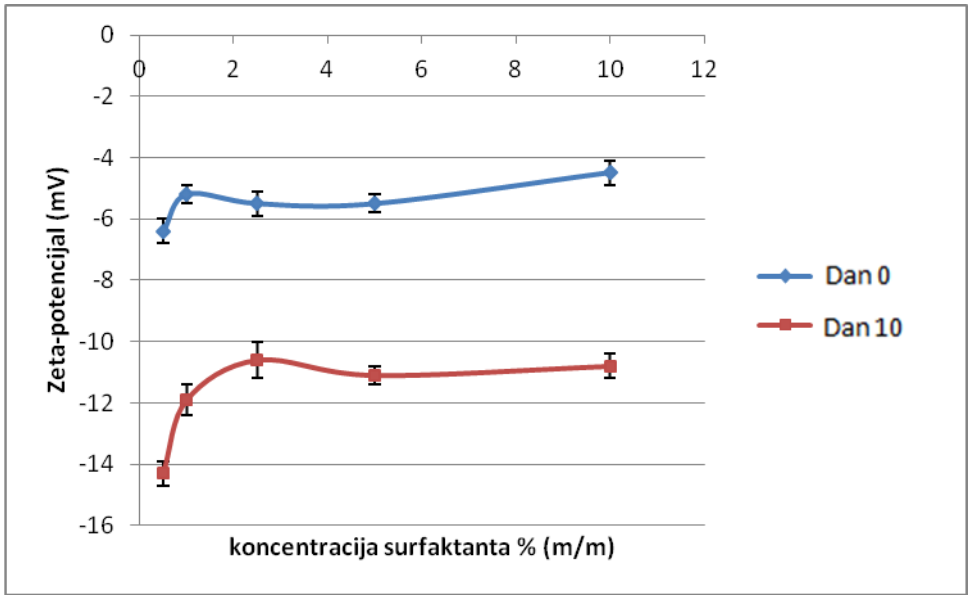
postojanje slabo negativnog naboja objašnjava se prisustvom slobodnih masnih kiselina, koje potječu iz uklopljenog sojinog ulja (Hwang i sur., 2009). Rezultati dobiveni mjerenjem 10 dana nakon mikrofluidizacije nešto se razlikuju od početnih, pogotovo kod najnižeg udjela surfaktanta.



Slika 9. Ovisnost zeta-potencijala nanoemulzije (srednja vrijednost ± standardna devijacija), izraženog u mV, o udjelu (%, m/m) surfaktanta Polisorbata 80, mjerenog neposredno nakon priprave (Dan 0) te 10 dana nakon priprave nanoemulzije (Dan 10).

4.2.2. Zeta-potencijal nanoemulzija s Polisorbatom 60

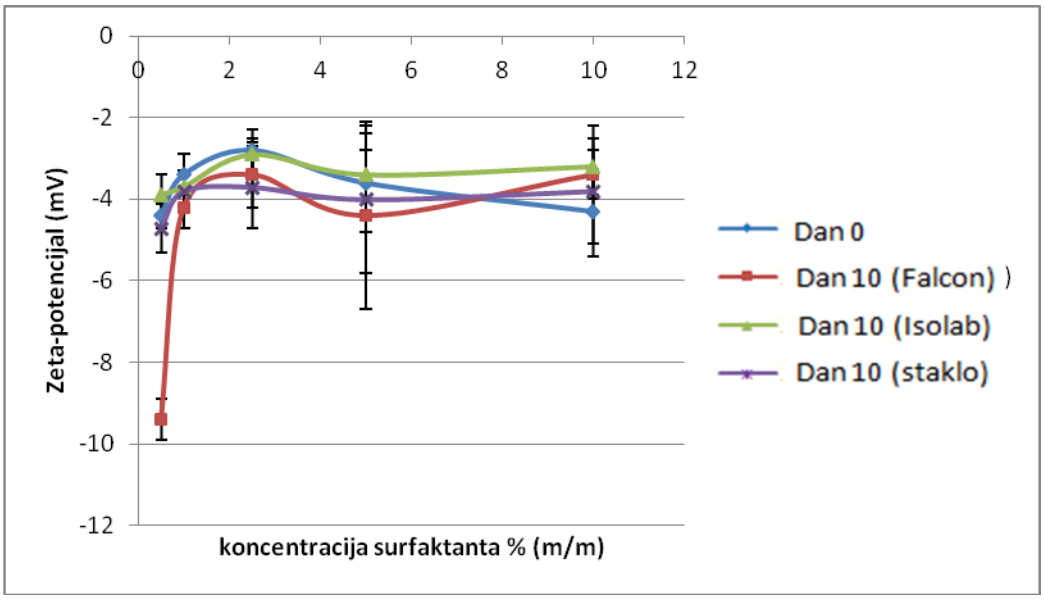
Kod mjerenja vrijednosti zeta-potencijala 10 dana nakon priprave nanoemulzija s Polisorbatom 60 uočen je velik porast u dobivenim rezultatima, u odnosu na ispitivanje provedeno odmah nakon mikrofluidizacije. Razlika je značajna te je navedena pojava uočena samo kod ovog surfaktanta (vidljivo u usporedbi sa slikama 9, 11 i 12). Moguće objašnjenje bila bi potencijalna prisutnost nabijenog onečišćenja u samom surfaktantu, koje se ispoljilo prilikom stajanja.



Slika 10. Ovisnost zeta-potencijala nanoemulzije (srednja vrijednost ± standardna devijacija), izraženog u mV, o udjelu (%, m/m) surfaktanta Polisorbata 60, mjerenog neposredno nakon priprave (Dan 0) te 10 dana nakon priprave nanoemulzije (Dan 10).

4.2.3. Zeta-potencijal nanoemulzija s Pluronicom F68

Pri usporedbi rezultata mjerenja zeta-potencijala odmah po pripremi nanoemulzija te 10 dana nakon mikrofluidizacije vidljiva je ujednačenost dobivenih vrijednosti, čak i kod različitih tipova spremnika (staklo, plastika). Odstupanje je uočljivo jedino kod ponovljenog mjerenja uzorka u Falcon plastičnom spremniku za najniži udio surfaktanta.

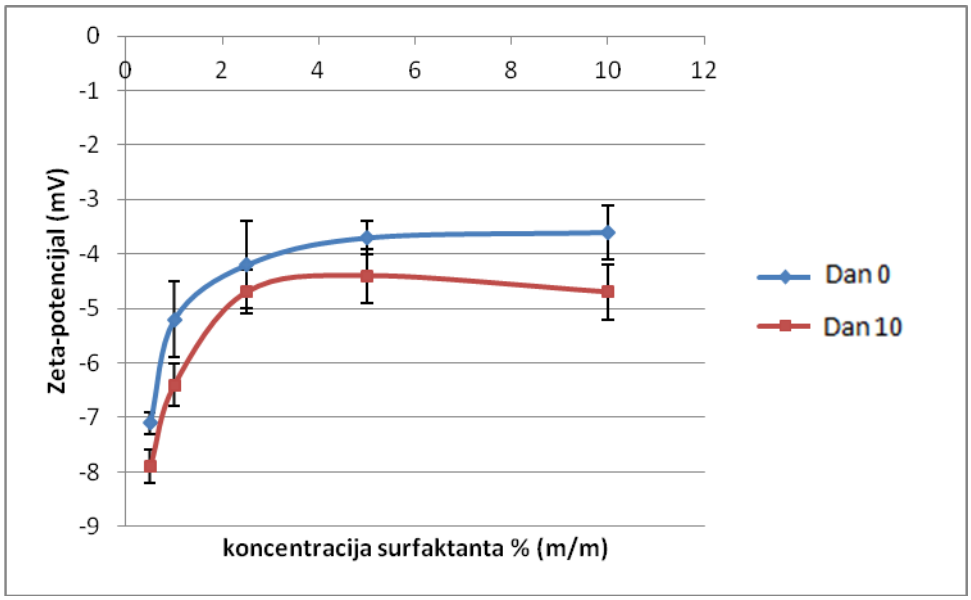


Slika 11. Ovisnost zeta-potencijala nanoemulzije (srednja vrijednost ± standardna devijacija), izraženog u mV, o udjelu (%, m/m) surfaktanta Pluronica F68, mjerenog neposredno nakon priprave (Dan 0) te 10 dana nakon priprave nanoemulzije (Dan 10).

4.2.4. Zeta-potencijal nanoemulzija s Cremophorom EL

Rezultati mjerenja zeta-potencijala nanoemulzija s Cremopforom EL kao surfaktantom pokazuju popriličnu ujednačenost kod usporedbe vrijednosti dobivenih mjerenjem odmah nakon mikrofluidizacije te onih određenih 10 dana nakon priprave. Većina dobivenih vrijednosti se kreće u intervalu od -4 do -3mV, kao i kod glavnine rezultata dobivenih za ostale surfaktante.

S obzirom da je riječ o neionskim emulgatorima, sama elektrostatska stabilizacija u vidu repulzije istovrsnih naboja ima malo značaja pored steričke, stoga dobivene niske vrijednosti zeta-potencijala ne znače, nužno, nestabilnost ispitivanih emulzija. Ponovnim osvrtom na rezultate ispitivanja veličina dobivenih kapljica disperzne faze (vidljivo na slikama 5, 6, 7 i 8) može se zaključiti da su pripravljene nanoemulzije stabilne na procese flokulacije/koalescencije i Ostwaldovog zrenja u vremenu u kojem su ispitivane.



Slika 12. Ovisnost zeta-potencijala nanoemulzije (srednja vrijednost ± standardna devijacija), izraženog u mV, o udjelu (%, m/m) surfaktanta Cremophora EL, mjerenog neposredno nakon priprave (Dan 0) te 10 dana nakon priprave nanoemulzije (Dan 10).

5. ZAKLJUČAK

- Mikrofluidizacijom su uspješno pripravljene nanoemulzije koristeći sojino ulje te 4 različita neionska surfaktanta (Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68, Cremophor EL). Pripravljenim nanoemulzijama određeni su veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal. Također, ispitana je stabilnost ponovnim mjerenjem navedenih parametara 10 dana nakon postupka mikrofluidizacije.

- Pokazano je da udio surfaktanta u sustavu znatno utječe na mjerene parametre.

- Veličine kapljica nanoemulzija opada porastom udjela surfaktanta u uzorku. Dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 63,2 ± 0,8 do 253,7 ± 6,3 nm. Rezultati veličine ne razlikuju se značajno u ovisnosti o tipu korištenog surfaktanta.

- Kod mjerenja indeksa polidisperznosti uočen je sličan trend rasta dobivenih vrijednosti kod svih mjerenih emulzija, u smjeru povišenja koncentracije surfaktanta u sustavu. Uzorci s udjelom emulgatora iznad 2,5% (m/m), u prosjeku, pokazuju nepovoljne PDI vrijednosti te se mogu smatrati manje otpornima na destabilizaciju putem Ostwaldovog zrenja te, kasnije, flokulacije/koalescencije.

- S obzirom na sličnost rezultata ispitivanja veličine i indeksa polidisperznosti provedenih odmah nakon pripreme te 10 dana nakon mikrofluidizacije kod svih emulgatora, dobivene nanoemulzije se mogu nazvati stabilnima na procese rasta kapljica disperzne faze u vremenu u kojem su ispitivane.

- Vrijednosti zeta-potencijala ispitivanih nanoemulzija blago su negativne i kreću se od -0,9 ± 0,8 do -14,3 ± 0,4 mV. Veće odstupanje uočeno je kod uzoraka s Polisorbatom 60 kod usporedbe mjerenja provedenih odmah nakon pripreme te 10 dana nakon mikrofluidizacije.

- S obzirom da su nanoemulzije formirane uz neionske emulgatore, stabilizacija je pretežito steričke prirode, s manjim značajem elektrostatske repulzije kao mehanizma

sprječavanja flokulacije/koalescencije, stoga, promatrajući rezultate ispitivanja veličine, dobivene nanoemulzije se mogu smatrati stabilnima.

.

- Uzimajući u obzir sva obavljena mjerenja, najbolju ujednačenost rezultata pokazuju nanoemulzije pripravljene s Cremophorom EL.

6. LITERATURA

Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and Microemulsions: Clarification of the Critical Differences. *Pharm Res*, 2010, 28, 978-985.

Cannon JB, Shi Y, Gupta P. Emulsions, Microemulsions, and Lipid-Based Drug Delivery Systems for Drug Solubilization and Delivery – Part I: Parenteral Applications. U: Water-Insoluble Drug Formulation, Second Edition. Liu R, urednik, Boca Raton, CRC Press, 2008, str. 198.

Florence AT, Rogers JA. Emulsion stabilization by non-ionic surfactants: experiment and theory. *J Pharm Pharmac*, 1971, 23, 233-251.

Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, Liu J, Gan Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov Today*, 2013, 18, 290-297.

García-Celma MJ, Homs M, Morales D, Solans C. Nano-emulsions for Pharmaceutical Applications. U: Nanocolloids. Sanchez-Dominguez M, Rodriguez-Abreu C, urednici, Portugal, Elsevier Inc, 2016, str. 374-375., 377., 365-373.

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, 2834-2836.

Gupta A, Narsimhan V, Hatton TA, Doyle PS. Kinetics of the Change in Droplet Size during Nanoemulsion Formation. *Langmuir*, 2016, 32, 11551-11555.

Gutiérrez JM, González C, Maestro A, Solé I, Pey CM, Nolla J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2008, 13, 245-251.

Hamouda T, Hayes MM, Cao Z, Tonda R, Johnson K, Wright DC, Brisker J, Baker JR. A Novel Surfactant Nanoemulsion with Broad-Spectrum Sporicidal Activity against Bacillus Species. *J Infect Dis*, 1999, 180, 1938-1943.

Hepworth P. Non-iomic surfactants. U: Chemistry and Technology of Surfactants. Farn RJ, urednik, Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 2006, str. 141.

Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems-A Review. *Trop J Pharm Res*, 2013, 12, 255-264.

Hwang TL, Fang CL, Chen CH, Fang JY. Permeation Enhancer-Containing Water-in-Oil Nanoemulsions as Carriers for Intravesical Cisplatin Delivery. *Pharm Res*, 2009, 26, 2314-2323.

The HLB System. ICI Americas Inc., Delaware, 1976, str. 3.

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

Komaiko J, McClements DJ. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Method: A Review of Available Methods. *Comp Rev Food Sci Food Safety*, 2016, 15, 331-352.

Li X, Anton N, Vandamme T. Nano-Emulsions: Overview and Applications. U: Nanopharmaceutics: The Potential Application of Nanomaterials. Liang XJ, urednik, Singapour, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2013, str. 22.

Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, IUPAC Commission on Colloid and Surface Chemistry, USA, 1972, str. 37.

Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *J Phys Condens Matter*, 2006, 18, 635-666.

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

Miyamoto K, Shimada T, Sawamoto K, Sai Y, Yonemura Y. Disposition Kinetics of Taxanes in Peritoneal Dissemination. *Gastroenterol Res Pract*, 2012, 1-15.

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

Pluronic F68, struktura, http://www.sigmaaldrich.com, pristupljeno 11.4.2017.

Pluronic F68, svojstva, http://www.sigmaaldrich.com, pristupljeno 11.4.2017.

Polisorbat 60, struktura, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), pristupljeno 15.4.2017.

Polisorbat 60, svojstva, http://www.sigmaaldrich.com, pristupljeno 11.4.2017.

Polisorbat 80, struktura, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov , pristupljeno 11.4.2017.

Prikaz U/V i V/U tipa emulzija, http://wwwcourses.sens.buffalo.edu, pristupljeno 3.4.2017.

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of pharmaceutical Excipients. London, Pharmaceutical Press, 2009, str. 429.

Sadurni N, Solans C, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 26, 438-445.

Silva HD, Cerqueira MA, Vicente AA. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Food Bioprocess Technol*, 2011, 5, 854-867.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2005, 10, 102-110.

Solans C, Sole I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2012, 17, 246-254.

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

Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58, 357-368.

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

Wulff-Pérez M, Torcello-Gómez A, Gálvez-Ruíz MJ, Martín-Rodríguez. Stability of nanoemulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. *Food Hydrocoll*, 3009, 23, 1096-1102.

ZETASIZER 1000HS/3000HS: Size measurements. UK, Malvern Instruments Ltd., 2001, str. 4.3.

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

ZETASIZER Hardware-Zetasizer 1000/2000/3000, Malvern Instruments Ltd., UK, 2001, str. 2.2.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

Nanoemulzije, zbog svojih specifičnih svojstava, dobivaju sve veći značaj u odnosu na klasične emulzijske sustave. Mala veličina kapljica disperzne faze, kinetička stabilnost i prilagodljiv izgled (mliječno bijele do transparentne) otvaraju im mnoga područja primjene, pogotovo u farmaceutskoj industriji u vidu poboljšanih nosača lijekova.

U ovom radu ispitivane su nanoemulzije U/V tipa sa sojinim uljem kao disperznom fazom. U pripravi su korištena četiri različita surfaktanta u rastućim koncentracijama: Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68, Cremophor EL. Nanoemulzije su pripremljene visokoenergetskom metodom, mikrofluidizacijom. Određivane su im veličina kapljica, indeks polidisperznosti i vrijednost zeta-potencijala. Svaki od parametara određivan je dva puta. Prvo mjerenje obavljeno je odmah nakon obrade uzoraka mikrofluidizatorom, dok je drugo provedeno 10 dana nakon mikrofluidizacije, u svrhu ispitivanja stabilnosti pripravljenih nanoemulzija. Dobiveni rezultati ispitivanja veličine pokazuju pad vrijednosti pri povećanju masenog udjela surfaktanta u sustavu, s tim da indeks polidisperznosti pritom raste. Sve nanoemulzije s udjelom surfaktanta iznad 2,5% (m/m) pokazuju nepovoljne vrijednosti PDI što ih čini manje otpornima na procese destabilizacije (Ostwaldovo zrenje, flokulacija). Ispitivanje zeta-potencijala pokazuje prisustvo blago negativnog naboja na površini kapljica kod svih ispitivanih nanoemulzija, što je posljedica prisustva slobodnih masnih kiselina iz sojinog ulja. Mjerenja obavljena 10 dana nakon priprave pokazuju ujednačenost s rezultatima dobivenima odmah nakon mikrofluidizacije Izuzetak su rezultati ispitivanja zeta-potencijala uzoraka s Polisorbatom 60, gdje je vidljivo primjetno povećanje vrijednosti kod svih masenih udjela surfaktanta. Ukupno gledano, najpovojnije rezultate ispitivanja dale su nanoemulzije s Cremophorom EL kao surfaktantom.

Ključne riječi: nanoemulzija, mikrofluidizacija, sojino ulje, Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68, Cremophor EL

Nanoemulsions have recently attracted increasing attention, compared to conventional emulsions, due to their specific properties. Small droplet size, high kinetic stability, and tunable optical transparency (milky-white to transparent) are making them suitable for wide range of applications, especially in pharmaceutical industry, with the possible use as improved drug carriers.

The focus of this diploma thesis was formation of O/W type nanoemulsions, with soybean oil as a dispersed phase. Four different surfactants were used (in ascending concentrations): Polisorbate 80, Polisorbate 60, Pluronic F68, Cremophor EL. The nanoemulsions were formed using microfluidisation as a high energy method of preparation. The main measured parameters were droplet size, polydispersity index and zeta-potential. Each of them was determinated two times. The first measurement followed the preparation by microfluidisation. The second one took place 10 days after the preparation process. The purpose of the second quantification was to determine the effect of time on nanoemulsion stability. The results of the droplet size measurement show the decrease of the droplet size in correlation with the increase of surfactant concentration in the formulation. The value of PDI, on the other hand, rises. All of the samples with the surfactant concentration of 2,5% (m/m) or above, showed the unsuitable PDI values, which indicates their instability towards the Ostwald rippening and flocculation process. Measurement of zeta-potential shows the low negative surface charge of the droplets, which can be a result of free fatty acids that come from the soybean oil. The values measured 10 days after the microfluidisation do not differ greatly from the measurements made directly after the preparation, except for the zeta-potential values of samples with Polisorbat 60, where the significant increase can be seen.

Taking all results into account, it can be concluded that the nanoemulsions with Cremophor EL are the most suitable for further use.

Keywords: Nanoemulsion, microfluidisation, soybean oil, Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68, Cremophor El

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Razvoj nanoemulzija sojinog ulja stabiliziranih neionskim surfaktantima

Glorija Parmać

SAŽETAK

Nanoemulzije, zbog svojih specifičnih svojstava, dobivaju sve veći značaj u odnosu na klasične emulzijske sustave. Mala veličina kapljica disperzne faze, kinetička stabilnost i prilagodljiv izgled (mliječno bijele do transparentne) otvaraju im mnoga područja primjene, pogotovo u farmaceutskoj industriji u vidu poboljšanih nosača lijekova.

U ovom radu ispitivane su nanoemulzije U/V tipa sa sojinim uljem kao disperznom fazom. U pripravi su korištena četiri različita surfaktanta u rastućim koncentracijama: Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68, Cremophor EL. Nanoemulzije su pripremljene visokoenergetskom metodom, mikrofluidizacijom. Određivane su im veličina kapljica, indeks polidisperznosti i vrijednost zeta-potencijala. Svaki od parametara određivan je dva puta. Prvo mjerenje obavljeno je odmah nakon obrade uzoraka mikrofluidizatorom, dok je drugo provedeno 10 dana nakon mikrofluidizacije, u svrhu ispitivanja stabilnosti pripravljenih nanoemulzija. Dobiveni rezultati ispitivanja veličine pokazuju pad vrijednosti pri povećanju masenog udjela surfaktanta u sustavu, s tim da indeks polidisperznosti pritom raste. Sve nanoemulzije s udjelom surfaktanta iznad 2,5% (m/m) pokazuju nepovoljne vrijednosti PDI što ih čini manje otpornima na procese destabilizacije (Ostwaldovo zrenje, flokulacija). Ispitivanje zeta-potencijala pokazuje prisustvo blago negativnog naboja na površini kapljica kod svih ispitivanih nanoemulzija, što je posljedica prisustva slobodnih masnih kiselina iz sojinog ulja. Mjerenja obavljena 10 dana nakon priprave pokazuju ujednačenost s rezultatima dobivenima odmah nakon mikrofluidizacije Izuzetak su rezultati ispitivanja zeta-potencijala uzoraka s Polisorbatom 60, gdje je vidljivo primjetno povećanje vrijednosti kod svih masenih udjela surfaktanta. Ukupno gledano, najpovojnije rezultate ispitivanja dale su nanoemulzije s Cremophorom EL kao surfaktantom.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 12 grafičkih prikaza, 14 tablica i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanoemulzija, mikrofluidizacija, sojino ulje, Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68, Cremophor EL

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 Pharmaceutical Technology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Development of soybean oil nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants

Glorija Parmać

SUMMARY

Nanoemulsions have recently attracted increasing attention, compared to conventional emulsions, due to their specific properties. Small droplet size, high kinetic stability, and tunable optical transparency (milky-white to transparent) are making them suitable for wide range of applications, especially in pharmaceutical industry, with the possible use as improved drug carriers.

The focus of this diploma thesis was formation of O/W type nanoemulsions, with soybean oil as a dispersed phase. Four different surfactants were used (in ascending concentrations): Polisorbate 80, Polisorbate 60, Pluronic F68, Cremophor EL. The nanoemulsions were formed using microfluidisation as a high energy method of preparation. The main measured parameters were droplet size, polydispersity index and zeta-potential. Each of them was determinated two times. The first measurement followed the preparation by microfluidisation. The second one took place 10 days after the preparation process. The purpose of the second quantification was to determine the effect of time on nanoemulsion stability. The results of the droplet size measurement show the decrease of the droplet size in correlation with the increase of surfactant concentration in the formulation. The value of PDI, on the other hand, rises. All of the samples with the surfactant concentration of 2,5% (m/m) or above, showed the unsuitable PDI values, which indicates their instability towards the Ostwald rippening and flocculation process. Measurement of zeta-potential shows the low negative surface charge of the droplets, which can be a result of free fatty acids that come from the soybean oil. The values measured 10 days after the microfluidisation do not differ greatly from the measurements made directly after the preparation, except for the zeta-potential values of samples with Polisorbat 60, where the significant increase can be seen. Taking all results into account, it can be concluded that the nanoemulsions with Cremophor EL are the most suitable for further use.

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

Thesis includes: 37 pages, 12 figures, 14 tables and 40 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoemulsion, microfluidisation, soybean oil, Polisorbat 80, Polisorbat 60, Pluronic F68, Cremophor EL

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
Dubravka Vitali Čepo, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2017.