

# Nanoemulzije dobijene variranjem tipa emulgatora i udela masne faze: Uticaj formulacije i procesnih parametara na karakteristike i fizičku stabilnost

Sanela M. Đorđević<sup>1</sup>, Nebojša D. Cekić<sup>2</sup>, Tanja M. Isailović<sup>1</sup>, Jela R. Milić<sup>1</sup>, Gordana M. Vuleta<sup>1</sup>, Miodrag L. Lazić<sup>2</sup>, Snežana D. Savić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu, Leskovac, Srbija

## Izvod

Cilj ovog istraživanja bio je da se homogenizacijom pod visokim pritiskom izrade nanoemulzije stabilizovane alkil poliglukozidnim (APG) emulgatorom i da se njihove karakteristike i fizička stabilnost uporede sa nanoemulzijama stabilizovanim standardnom kombinacijom lecitina (L) i polisorbata 80 (P80). U istraživanju je praćen uticaj parametara formulacije, i to vrste i koncentracije emulgatora (smeša L/P80 vs. APG, u koncentraciji od 4, 6 i 8%) i koncentracije uljane faze (20, 30 i 40% trigliceridi srednje dužine lanca) na veličinu i raspodelu veličina kapi, zeta potencijal ( $\zeta$ ) i fizičku stabilnost nanoemulzija. Takođe je praćen uticaj procesnih parametara (postupak, pritisak i broj ciklusa homogenizacije) na veličinu kapi i indeks polidisperznosti (*PdI*), u cilju identifikovanja optimalnih uslova za izradu nanoemulzija. Dobijeni rezultati pokazuju da postoji uticaj sastava formulacije na karakteristike (L/P80 nanoemulzije: veličina kapi 147-156 nm,  $\zeta$  oko -20 mV; APG nanoemulzije: veličina kapi 165-228 nm,  $\zeta$  oko -50 mV) i fizičku stabilnost ispitivanih nanoemulzija, i da se diskontinualnim postupkom homogenizacije (9 ciklusa, 500 bar) mogu dobiti nanoemulzije optimalnih svojstava (veličina kapi, *PdI*).

**Ključne reči:** nanoemulzija, kaprilil/kapril glukozid, lecitin, polisorbat 80, homogenizacija pod visokim pritiskom, fizička stabilnost.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Nanoemulzije su nosači sa dugom i uspešnom istorijom primene u parenteralnoj ishrani, a od nedavno su počele da se intenzivno istražuju i kao nosači lekova za različite puteve primene, kao što su intravenska, oralna, rektalna, dermalna i primena u oko [1-5]. Prednosti nanoemulzija kao terapijskih sistema su kontrolisana veličina kapi, niska koncentracija emulgatora, visok solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekove [6,7] i mogućnost povećanja njihove biološke raspoloživosti [4]. Pored toga, nanoemulzije se obično sastoje od visoko biokompatibilnih i biodegradabilnih sastojaka, što ih čini pogodnim sistemima za osetljive puteve primene (intravenska, primena u oko), kao i za primenu u kozmetičke svrhe [6]. Primeri formulacija koje su odobrene za terapijsku primenu su intravenske nanoemulzije diazepama, propofola, liposolubilnih vitamina i amfotericina B [5,8].

U fizičkom smislu, nanoemulzije su emulzije sa veličinom kapi ispod 100 nm, analogno nanočesticama iste veličine [9,10]. Danas se, međutim, ovaj termin koristi

za sve metastabilne emulzije sa veličinom kapi ispod jednog mikrona, koje se generalno nazivaju submikronskim emulzijama [6]. U principu, nanoemulzije (poznate i kao miniemulzije, ultrafine emulzije, submikronske emulzije) uglavnom se opisuju kao ulje/voda (U/V) emulzije sa veličinom kapi ispod 1000 nm, najčešće u rasponu 100-500 nm [6,8,11], mada se navodi i opseg veličina 50-200 nm [12]. Zavisno od veličine kapi, nanoemulzije mogu biti translucetne ili transparentne (veličina ispod 100 nm) i neprovidne ili mlečne (veličina iznad 100 nm), a plavkasta nijansa ukazuje na pojavu Rejlijevog (Rayleigh) rasipanja svetlosti od malih kapi nanoemulzije [6,9].

Za razliku od mikroemulzija, nanoemulzije su termodinamički nestabilne – slobodna energija koloidne disperzije (uljane kapi u vodi) je veća od slobodne energije odvojenih faza (ulje i voda). Međutim, ako se obezbedi dovoljna energetska barijera između ove dve faze, nanoemulzije će biti kinetički stabilne [13]. Dobra dugoročna fizička stabilnost čini ove sisteme jedinstvenim [12], a proističe iz činjenice da su konvencionalni destabilizacioni fenomeni, poput kringinga (eng. *creaming*, raslojavanje) i koalescencije, uveliko sprečeni ili usporeni, usled Braunovog kretanja malih kapi, koje se suprotstavlja gravitaciji [11,12]. Glavni izvor nestabilnosti je Ostvaldovo sazrevanje koje predstavlja tendenciju malih kapi da se sjedine u veće, usled razlika u

NAUČNI RAD

UDK 66.063.61:544.7:615

Hem. Ind. 67 (5) 795-809 (2013)

doi: 10.2298/HEMIND120905005D

Preписка: S. Savić, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: [snexs@pharmacy.bg.ac.rs](mailto:snexs@pharmacy.bg.ac.rs)

Rad primljen: 5. septembar, 2012

Rad prihvaćen: 13. decembar, 2012

njihovoj rastvorljivosti [6,9]. Ovo sporo povećanje veličine kapi će konačno, tokom vremena, dovesti do separacije (odvajanja) faza nanoemulzije [14]. Pored toga, mogu da se jave i reverzibilni destabilizacioni fenomeni kao što su flokulacija, razdvajanje uslovljeno gravitacijom (kriming/sedimentacija) [15]. Odgovarajućim izborom vrste ulja, vrste emulgatora, njihovih koncentracija i uslova izrade, mogu da se dobiju nanoemulzije zadovoljavajuće kinetičke stabilnosti (meseci i godine) [13].

Nanoemulzije se izrađuju iz ulja, vode, emulgatora i, često, koemulgatora, i pošto su termodinamički nestabilni sistemi, uvek zahtevaju dovođenje neke spoljašnje energije sistemu. Metode za izradu nanoemulzija mogu se podeliti u dve grupe: visoko-energetske (koriste se mehanički uređaji- homogenizator pod visokim pritiskom, mikrofluidizer, ultrazvuk) i nisko-energetske (zasnivaju se na fizičko-hemijskim svojstvima sistema – fazno-inverzni i spontani emulgujući metod) [3,6,12].

Emulgatori imaju važnu ulogu u formiranju nanoemulzija: smanjenjem međupovršinskog napona smanjuje se Laplasov pritisak (razlika pritiska između unutrašnjosti i spoljašnjosti kapi), a otuda je i stres potreban za lomljenje kapi smanjen. Emulgatori takođe sprečavaju koalescenciju novonastalih kapi [12]. Generalno, za izradu nanoemulzija mogu da se koriste različiti površinski aktivni agensi: konvencionalne površinski aktivne materije (PAM), proteini i polisaharidi [13]. Lecitini su još uvek emulgatori izbora u smislu biokompatibilnosti. Nalaze se među najbezbednijim emulgatorima (GRAS status) i stoga se tradicionalno primenjuju u razvoju parenteralnih nanoemulzija. Lecitin stabilizuje nanoemulzije formiranjem višeslojnog omotača oko kapi, koji deluje kao efektivna strukturno-mehanička barijera. U cilju poboljšanja fizičke stabilnosti sistema dodaju se sterni stabilizatori, kao što su emulgujući agensi sa sternim voluminoznim grupama poput polisorbata. Dodatak pogodnog koemulgatora može da poboljša fleksibilnost međupovršinskog filma što se značajno reflektuje na stabilnost ovih emulzija [6].

Problemi vezani za upotrebu klasičnih PAM (lecitina) u nanoemulzijama potiču od toga što su fosfolipidi podložni oksidativnoj i hidrolitičkoj degradaciji, koja ima za posledicu nepovoljne promene u izgledu i mirisu nanoemulzija nakon određenog perioda čuvanja. Osim toga, smeše lecitina imaju visok potencijal za stvaranje agregata, što dovodi do formiranja vezikularnih i multilamelarnih struktura u toku izrade nanoemulzija. Uprkos decenijama istraživanja na ovom polju, još uvek nije u potpunosti razjašnjeno mogu li se ove strukture izbexi i da li njihovo prisustvo ima negativni efekat na dugoročnu stabilnost nanoemulzija [16]. Iako je uloga lecitina kao emulgatora davno utvrđena, kompleksno ponašanje fosfolipida u nanoemulzijama, još uvek nije u potpunosti predvidivo [6].

Tokom proteklih godina, brzo povećanje ekološke svesti o održivim PAM, pokrenulo je upotrebu prirodnih PAM koje se mogu dobiti iz obnovljivih izvora. U tom smislu, postoji sve veće interesovanje za alkil poliglukozide (APG), novu klasu nejonskih PAM koji se dobijaju iz obnovljivih sirovina kao što su glukoza i masni alkoholi. APG pokazuju izuzetnu biorazgradivost, odlična dermatološka svojstva i dobru površinsku aktivnost [17]. Dodatni razlozi za povećanu upotrebu ovih molekula, posebno u formulacijama za primenu na kožu, jesu minimalna osetljivost na promene pH i prisustvo elektrolita u poređenju sa etoksilovanim PAM [18].

Budući da upotreba APG kao potencijalnih stabilizatora nanoemulzija još uvek nije detaljno ispitana, jedan od ciljeva sprovedenog istraživanja bio je da se utvrdi da li sa emulgatorom ovog tipa mogu da se dobiju stabilne nanoemulzije sa malom veličinom kapi i uskom raspodelom veličina kapi (indeks polidisperznosti, eng. *polydispersity index, Pdl*). U tu svrhu izrađena je serija model nanoemulzija sa APG emulgatorom srednje dužine alkil lanca (kaprilil/kapril glukozid) metodom homogenizacije pod visokim pritiskom i izvršena njihova karakterizacija, a dobijeni rezultati upoređeni su sa rezultatima dobijenim za nanoemulzije stabilizovane standardnom kombinacijom lecitina i polisorbata 80.

Dobro je poznato da parametri formulacije (tip i koncentracija emulgatora, udeo masne faze), kao i parametri procesa (temperatura, pritisak i broj ciklusa homogenizacije), utiču na fizičko-hemijska svojstva i stabilnost nanoemulzija [19]. S tim u vezi, u sprovedenom istraživanju dodatno je praćen uticaj vrste emulgatora (smeša lecitina i polisorbata 80 vs. kaprilil/kapril glukozid), kao i rastućih koncentracija uljane faze (20, 30 i 40 mas.%) i emulgatora (4, 6 i 8 mas.%) na veličinu kapi, površinsko naelektrisanje i fizičku stabilnost izrađenih nanoemulzija.

Drugi važan cilj istraživanja bio je da se utvrde optimalni procesni parametri za izradu nanoemulzija, variranjem postupka (kontinualan vs. diskontinualan), pritiska i broja ciklusa homogenizacije.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### Materijal

Za izradu nanoemulzija korišćeni su: trigliceridi srednje dužine lanca (MCT) odnosno kaprilno/kaprilski trigliceridi (Miglyol® 812, SB Trade, Srbija), lecitin iz jajeta (Lipoid® E80, Lipoid GmbH, Nemačka), polisorbitat 80 (Tween® 80, Croda Chemicals, Engleska), APG emulgator kaprilil/kapril glukozid (Plantacare® 810, Cognis, Nemačka) i sveže dobijena prečišćena voda naknadno propuštena kroz membranski bakteriološki filter (visokoprečišćena voda) (Milli-Q, Millipore GmbH, Nemačka).

## Metode

### Izrada nanoemulzija

U skladu sa standardnom procedurom opisanom u literaturi [3,20–22], izrađeno je šest različitih formulacija U/V nanoemulzija metodom homogenizacije pod visokim pritiskom. Komponente koje su ušle u sastav nanoemulzija, izabrane su na osnovu njihove stabilnosti i biokompatibilnosti. Sve nanoemulzije su izrađene sa MCT kao masnom fazom, visokoprečišćenom vodom kao vodenom fazom, dok su lecitin iz jajeta, polisorbata 80 i APG (kaprilil/kapril glukozid) upotrebljeni kao emulgatori. Prvi set formulacija izrađen je sa smešom lecitin/polisorbata 80 (1/1); analogno je izrađen i drugi set formulacija sa APG emulgatorom. Koncentracija MCT varirana je na 20, 30 i 40 mas.%, a koncentracija emulgatora na 4, 6 i 8 mas.%, pri čemu je maseni odnos masne faze i emulgatora držan konstantnim i bio je 5:1. Sastav formulacija i njihove oznake prikazani su u Tabeli 1.

Masna i vodena faza su pripremljene odvojeno. Masna faza se sastojala od MCT i u njoj je rastvoren lecitin zagrevanjem na 70 °C na magnetnoj mešalici (IKAmag, IKA Staufen, Nemačka). U vodenu fazu, koju je činila visokoprečišćena voda, dodat je polisorbata 80, odnosno APG emulgator kaprilil/kapril glukozid. Obe faze su zagrejane na 50 °C, na magnetnoj mešalici. Zatim je vodena faza dodata u masnu fazu i izrađena preemulzija mešanjem na rotor-stator homogenizatoru (Ultra-Turrax®, IKA Staufen, Nemačka) 3 min, brzinom od 8000 obrtaja/min, na 50 °C. Da bi se dobila finalna emulzija, ovako izrađena homogena preemulzija (veličina kapi oko 2 μm, *Pdl* oko 0,6) propuštena je kroz homogenizator pod visokim pritiskom (EmulsiFlex-C3, Avestin, Kanada), diskontinualnim postupkom, 9 puta, pri pritisku od 300 bar i temperaturi od 50 °C [21]. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, svaka nanoemulzija podeljena je u dva dela, koji su čuvani u dobro zatvorenim staklenim bočicama na 25 °C tokom 180 dana i na 40 °C tokom 30 dana, u cilju ispitivanja njihove fizičke stabilnosti.

U cilju procene da li i kako postupak homogenizacije i procesni parametri utiču na karakteristike nanoemulzija, dodatno su izrađena četiri uzorka F1L/P80 preemulzije koje su homogenizovane pod visokim pri-

tiskom u toku 10 ciklusa pod različitim uslovima. Variiran je postupak homogenizacije (kontinualan vs. diskontinualan) i pritisak (300 vs. 500 bar). Pre homogenizacije i nakon svakog drugog ciklusa homogenizacije uzimani su uzorci za analizu veličine i raspodele veličina kapi.

### Analiza veličine čestica

Prosečna veličina kapi (hidrodinamički prosečan prečnik, eng. *intesity-weighted mean diameter, z-average – z-ave*) i raspodela veličina kapi (*Pdl*) merene su na uređaju Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Velika Britanija) primenom tehnike dinamičkog rasipanja svetlosti (eng. *Dynamic Light Scattering, DLS*, tzv. foton korelaciona spektroskopija, eng. *Photon Correlation Spectroscopy, PCS*). Ovom tehnikom meri se stepen fluktuacije intenziteta rasute svetlosti usled Braunovog kretanja čestica/kapi u uzorku i prevodi u veličinu kapi pomoću Stokes–Einstein-ove jednačine [23]. *Pdl* je mera za raspodelu veličina kapi i ukazuje na kvalitet ili homogenost disperzije [24]. Kreće se od 0 (monodisperzna) do 0,5 (relativno široka raspodela). Na primer, za parenteralne nanoemulzije vrednosti *Pdl* do 0,25 smatraju se prihvatljivim [25].

Da bi se umanjio uticaj gustine i viskoziteta nanoemulzija na rezultate merenja, uzorci nanoemulzija su pre merenja 500 puta razblaženi visokoprečišćenom vodom. Merenje je izvedeno u polistirenskim kivetama za jednokratnu upotrebu na temperaturi od 25 °C pod uglom rasipanja svetlosti od 90°. Svaki uzorak je meren tri puta.

Pošto je opseg merenja Zetasizer Nano ZS90 uređaja 2 nm do 3 μm, za utvrđivanje mogućeg prisustva većih kapi, kao dodatna metoda karakterizacije primenjena je tehnika statičkog rasipanja svetlosti (eng. *Static Light Scattering, SLS*), poznata i kao laserska difrakcija (eng. *Laser Diffraction, LD*). Da bi se izbegli efekti višestrukog rasipanja svetlosti, nanoemulzije su razblažene visokoprečišćenom vodom i nakon 5 min stabilizacije uzoraka, merena je veličina kapi na uređaju Malvern Mastersizer (Malvern Instruments, Velika Britanija) na 25 °C, pri čemu je svaki uzorak meren tri puta. Uređaj je podržan softverom koji analizira zavisnost između ugla rasipanja svetlosti i veličine kapi (što je kap

Tabela 1 Sastav izrađenih nanoemulzija (mas.%); ostatak do 100 mas.% čini visokoprečišćena voda  
Table 1 Composition of prepared nanoemulsions (mass%)

Formulacija	Komponenta			
	Mygliol® 812	Lipoid® E80	Tween® 80	Plantacare® 810
F1L/P80	20	2	2	–
F2L/P80	30	3	3	–
F3L/P80	40	4	4	–
F1APG	20	–	–	4
F2APG	30	–	–	6
F3APG	40	–	–	8

veća, manji je ugao pod kojim se svetlost rasipa), i, primenom Mie teorijskog modela rasipanja svetlosti, daje zapreminsku raspodelu veličina kapi u nanoemulziji. Najčešći način izražavanja rezultata dobijenih LD metodom je prikazivanje LD prečnika kapi (eng. *volume-weighted mean diameters*)  $d_{10\%}$ ,  $d_{50\%}$  i  $d_{90\%}$ , koji se označavaju i kao  $d(v,0.1)$ ,  $d(v,0.5)$  i  $d(v,0.9)$ . Prečnik  $d(v,0.1)$  je veličina kapi na kojoj 10% zapremine uzorka čine kapi čija je veličina manja od „ $d(v,0.1)$ “ vrednosti. Prečnik  $d(v,0.5)$  (eng. *median volume particle size*) znači da 50% zapremine uzorka sadrži kapi manje od „ $d(v,0.5)$ “ vrednosti, a 50% uzorka čine kapi veće od ove vrednosti. Prečnik  $d(v,0.9)$  znači da 90% zapremine uzorka ima veličinu kapi manju od „ $d(v,0.9)$ “ vrednosti, i predstavlja osetljiv parametar za utvrđivanje prisustva većih kapi, kao i agregata kapi.

#### Svetlosna mikroskopija

U cilju detekcije eventualnog prisustva većih mikrometarskih kapi i pojave agregacije u izrađenim formulacijama u toku čuvanja, nerazblaženi uzorci nanoemulzija posmatrani su pod svetlosnim mikroskopom Motic digital microscope DMB3-223ASC, koji je podržan softverom Motic Images Plus v.2.0 (Motic GmbH, Nemačka), na uveličanju od 1000 puta.

#### Merenje zeta potencijala

Zeta potencijal, koji karakteriše naelektrisanje na površini emulgovanih kapi ulja, meren je na već spomenutom uređaju Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Velika Britanija). Pre merenja, uzorci nanoemulzija su razblaženi visokoprečišćenom vodom (10  $\mu$ L uzorka je razblaženo sa 4990  $\mu$ L visokoprečišćene vode). Merenje je vršeno na 25 °C u savijenoj (eng. *folded*) kapilarnoj ćeliji (DTS 1060) za jednokratnu upotrebu. Izmerena elektroforetska pokretljivost kapi u električnom polju prevedena je u zeta potencijal primenom Helmholtz-Smoluchowski jednačine:

$$\zeta [mV] = EM \frac{4\pi\eta}{\varepsilon} \quad (1)$$

gde je  $\zeta$  zeta potencijal,  $EM$  elektroforetska pokretljivost,  $\eta$  viskozitet disperzionog sredstva, a  $\varepsilon$  dielektrična konstanta disperzionog sredstva [26]. Dobijeni rezultati za zeta potencijal izraženi su kao srednja vrednost tri merenja.

#### Ispitivanje stabilnosti

U cilju ispitivanja fizičke stabilnosti izrađenih nanoemulzija sprovedene su ubrzana i dugotrajna studija stabilnosti. Sve nanoemulzije su nakon izrade podeljene u dve grupe. Prva grupa uzoraka čuvana je na 25 °C u toku 6 meseci (dugotrajna studija stabilnosti), a druga na 40 °C tokom mesec dana (ubrzana studija stabilnosti). Uzorci su čuvani u dobro zatvorenim staklenim bočicama sa aluminijumskom krimp kapičicom. Pored

praćenja fizičkog izgleda nanoemulzija, u fiksnim vremenskim intervalima mereni su veličina kapi,  $PdI$ , zeta potencijal, pH vrednost i provodljivost. Uzroci su analizirani na dan izrade i nakon 14 i 30 dana za procenu kratkoročne, odnosno 30 i 180 dana za procenu dugoročne stabilnosti sistema.

#### Merenje pH vrednosti

pH vrednost izrađenih nanoemulzija merena je jednostavnim uranjanjem elektrode pH metra (pH meter HI9321, Hanna Instruments, Portugalija) u uzorak, na temperaturi od 25 °C. Merenje je izvedeno tri puta za svaki uzorak i izračunata srednja vrednost.

#### Merenje provodljivosti

Električna provodljivost nanoemulzija merena je konduktometrijskom metodom (CDM230 MeterLab, Radiometer, Danska) direktnim uranjanjem elektrode u ispitivane uzorke, na 25 °C. Prikazane vrednosti za provodljivost predstavljaju srednju vrednost tri merenja.

#### Statistička analiza

Statistička analiza podataka izvršena je pomoću programa SPSS (verzija 18.0) primenom jednofaktorske ili dvofaktorske analize varijanse (ANOVA), kao i Student  $t$ -testa, gde je to bilo potrebno. Za poređenje srednjih vrednosti veličine kapi,  $PdI$ , zeta potencijala, provodljivosti i pH vrednosti nanoemulzija tokom ispitivanja njihove dugoročne i kratkoročne stabilnosti, korišćeni su jednofaktorska ANOVA (za tri grupe podataka) i  $t$ -test (za dve grupe podataka). Jednofaktorska ANOVA je korišćena i za ispitivanje uticaja broja ciklusa homogenizacije (nezavisno promenljiva) na veličinu kapi i  $PdI$  nanoemulzije (zavisno promenljive), dok je za ispitivanje uticaja dva faktora (pritisak i postupak homogenizacije) na jednu zavisno promenljivu (veličina kapi,  $PdI$ ) korišćena dvofaktorska ANOVA.  $P$  vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

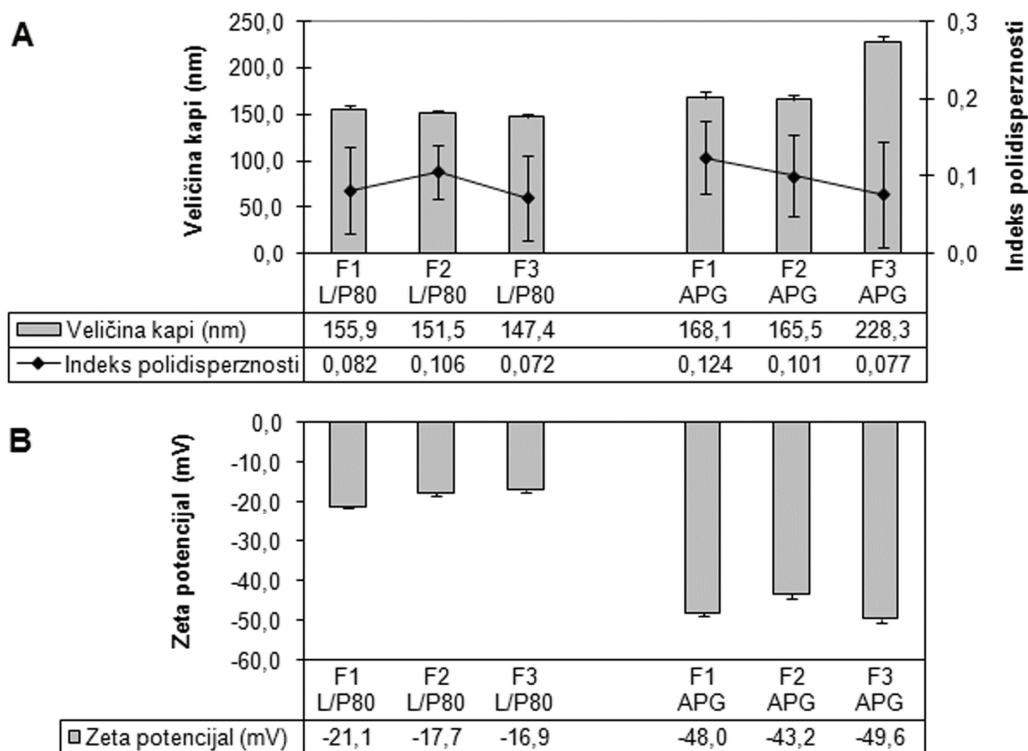
## REZULTATI I DISKUSIJA

### Uticaj sastava formulacije na karakteristike nanoemulzija

Sve izrađene nanoemulzije bile su tečne, mlečno bele (usled višestrukog rasipanja svetlosti) sa plavičastim odsjajem. Ovakva vizuelna pojava je inače karakteristična za nanoemulzije čija veličina kapi prelazi 100 nm [6].

Naime, analiza veličine kapi (slika 1A) pokazuje da su na dan izrade sve formulacije nanoemulzija imale prosečnu veličinu kapi, merenu PCS metodom, u opsegu od 147 do 228 nm, sa veoma uskom raspodelom veličine kapi ( $PdI$  u opsegu 0,072–0,124).

Vrednosti  $PdI$  manje od 0,1 ili 0,2 ukazuju na dobar kvalitet sistema i na relativno usku raspodelu veličina kapi, odnosno na unimodalnu raspodelu. Vrednosti  $PdI$



Slika 1. Prosečna veličina kapi (z-average  $\pm$  SD), raspodela veličine kapi (PDI  $\pm$  SD) i zeta potencijal ( $\pm$  SD) nanoemulzija koje sadrže rastuće koncentracije MCT (20, 30 i 40%) i emulgatora (4, 6 i 8%) na dan izrade.

Figure 1. Mean droplet size (z-average  $\pm$  SD), particle size distribution (PDI  $\pm$  SD) and zeta potential ( $\pm$  SD) of nanoemulsions containing increasing concentrations of MCT (20, 30 i 40%) and emulsifiers (4, 6 i 8%) on day of preparation.

blizu 1 (najviša vrednost) imaju sistemi lošeg kvaliteta čija veličina kapi više nije u nanometarskom opsegu [24].

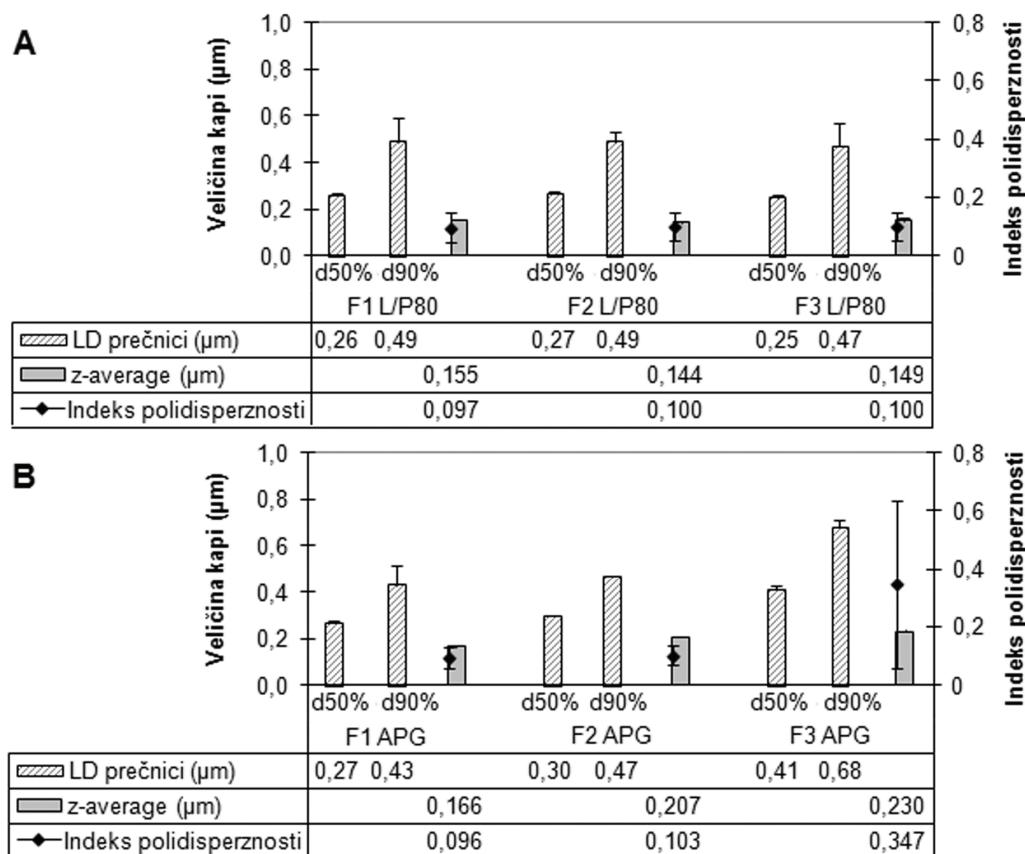
Dobijeni rezultati (slika 1A) jasno ukazuju da postoji uticaj sastava nanoemulzija na veličinu kapi. Kod nanoemulzija izrađenih sa smešom PAM lecitin/polisorbat 80 veličina kapi je bila manja (147–156 nm) u poređenju sa nanoemulzijama na bazi APG. Ovi nalazi mogu se objasniti različitom hidrofilnošću upotrebljenih emulgatora. Naime, Tan i Nakajima [27] su pokazali da emulgatori sa većom hidrofilnošću mogu efikasnije da obuhvate i stabilizuju kapi u U/V nanoemulzijama, što za posledicu ima formiranje manjih kapi. APG su u osnovi lipofilniji, imaju niže HLB vrednosti [28], pa bi veća hidrofilnost polisorbata 80, između ostalog, mogla biti odgovorna za manju veličinu kapi nanoemulzija izrađenih sa smešom lecitin/polisorbat 80.

Poznato je da postoji uticaj koncentracije emulgatora i udela uljane faze na finalnu veličinu kapi nanoemulzija [12,19,21]. Ispitivanja su pokazala da je sa povećanjem udela uljane faze i koncentracije emulgatora došlo do smanjenja veličine kapi kod svih ispitivanih formulacija nanoemulzija, sem F3APG, gde je došlo do povećanja veličine kapi (slika 1A).

Povećanje koncentracije emulgatora ima za posledicu nastanak manjih kapi [5,7]. Nasuprot tome, povećanje količine dispergovane (uljane) faze dovodi do

povećanja kolizije kapi i otuda do koalescencije u toku samog procesa emulgovanja [12]. Veća veličina kapi je nepovoljnija u pogledu stabilnosti, ali je, s druge strane, potencijalni solubilizacioni kapacitet za lipofilne lekove veći [29]. Međutim, u sprovedenom istraživanju istovremeno su povećavani udeo masne faze i koncentracija emulgatora, tako da je njihov maseni odnos u svim formulacijama bio konstantan (5:1). Pokazano je da ako se maseni odnos emulgatora i dispergovane faze drži konstantnim, tj. ako se sa povećanjem udela masne faze povećava i koncentracija emulgatora, u sistemu dolazi do smanjenja međupovršinskog napona i nastanka manjih kapi [12]. Ovo zapažanje je, kao što je već navedeno, sa izuzetkom formulacije F3APG sastavljene od MCT, APG i vode u odnosu 40:8:52, potvrđeno u sprovedenom istraživanju. Dodatno, smatra se da bi odnos uljane faze i emulgatora od 5:3 doveo do najmanje veličine kapi [30].

Da bi se isključilo prisustvo većih kapi u ispitivanim nanoemulzijama, kao dodatne metode za procenu veličine kapi u sistemu, primenjene su LD i svetlosna mikroskopija. Slika 2 daje uporedni pregled veličine kapi merene PCS metodom i LD metodom 7 dana nakon izrade nanoemulzija. Kod nanoemulzija izrađenih sa smešom lecitin/polisorbat 80, 50% kapi bilo je manje od 270 nm, dok je veličina 90% kapi bila ispod 490 nm.



Slika 2. Prosečna veličina kapi merena foton korelacionom spektroskopijom (z-average), LD prečnici mereni laserskom difrakcijom (d50% i d90%) i indeks polidisperznosti (Pdl) različitih formulacija nanoemulzija 7 dana nakon izrade (srednja vrednost  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).  
Figure 2. Mean particle size measured by photon correlation spectroscopy (z-average), LD diameters measured by laser diffraction (d50% i d90%) and polydispersity index (Pdl) of various nanoemulsion formulations after 7 days of preparation (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

Kod nanoemulzija stabilizovanih kaprilil/kapril glukozidom,  $d(v,0.5)$  vrednosti su bile između 270 i 410 nm, dok su se vrednosti za  $d(v,0.9)$  kretale od 430 do 680 nm. U svim ispitivanim formulacijama najveće kapi bile su manje od 1  $\mu\text{m}$ . Kada se uporede veličine kapi dobijene PCS metodom i LD metodom, vidi se da su vrednosti LD prečnika veće. Razlog za to je što LD daje zapreminsku raspodelu veličine kapi, dok je kod PCS merenje zasnovano na intenzitetu svetlosti [25]. Svetlosna mikroskopija je dodatno potvrdila da nije bilo većih kapi, ili agregata kapi, ni u jednoj od izrađenih formulacija (slika 3).

Merenjem zeta potencijala uzoraka nanoemulzija stabilizovanih sa oba tipa emulgatora dobijeni su delom neočekivani rezultati.

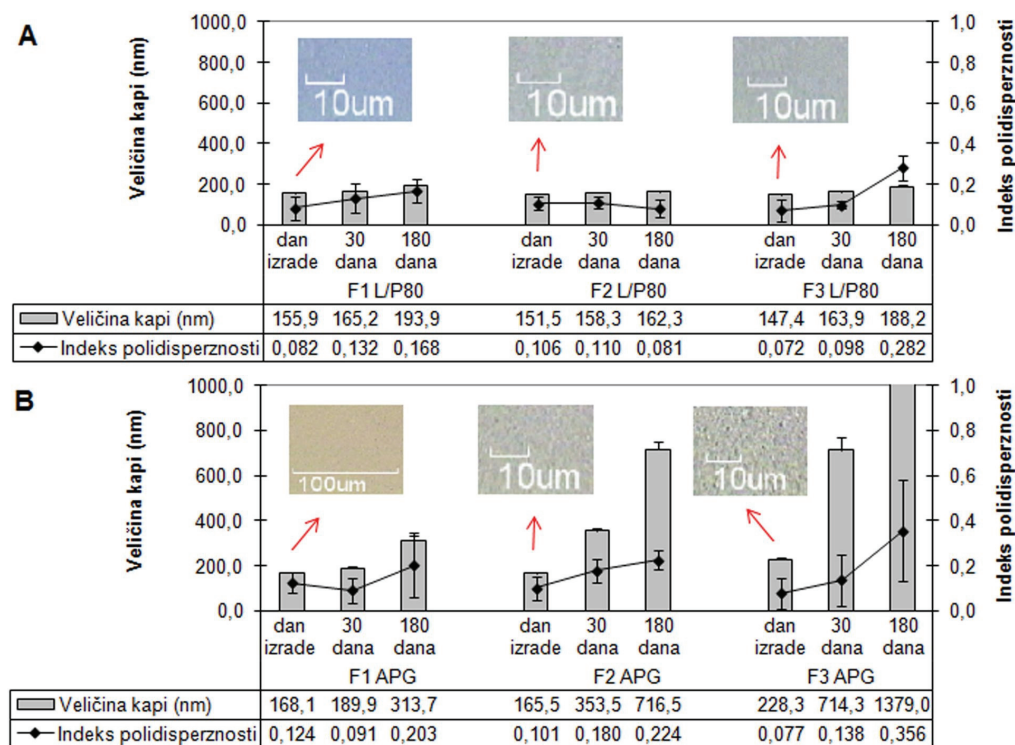
Poznato je da zeta potencijal približno karakteriše površinsko naelektrisanje kapi u emulzijama i jedan je od faktora koji određuje njihovu fizičku stabilnost. Ako sve čestice/kapi u disperziji imaju visok pozitivni ili visok negativni zeta potencijal, doći će do njihovog međusobnog odbijanja što sprečava koalescenciju i povećava stabilnost sistema [31,32]. Veličina zeta potencijala, dakle, ukazuje na potencijalnu stabilnost nanodisperznog koloidnog sistema.

Zeta potencijali ispitivanih formulacija nanoemulzija, mereni odmah nakon izrade, bili su u opsegu od  $-17$  do  $-50$  mV (slika 1B). Nanoemulzije izrađene sa smešom lecitin/polisorbat 80 imale su zeta potencijal oko  $-20$  mV, dok je zeta potencijal nanoemulzija izrađenih sa kaprilil/kapril glukozidom bio značajno veći ( $t$ -test,  $p < 0,05$ ) i iznosio je oko  $-50$  mV. Ove razlike u vrednostima zeta potencijala su očigledno posledica upotrebe različitog tipa emulgatora.

Kaprilil/kapril glukozid je nejonski sterni stabilizator, pa bi se na prvi pogled mogle očekivati niže vrednosti zeta potencijala. Međutim, ovaj polihidroksilni emulgator u svojoj strukturi ima hidrofobni deo, koji se smešta na površinu emulgovanih kapi ulja, i dug hidrofilni rep koji penetrira u vodenu fazu. Hidrofilni deo sadrži molekule glukoze koji mogu privući potencijalno negativno naelektrisane hidroksilne jone, čime bi se mogla objasniti dobijena visoka negativna vrednost zeta potencijala [26].

#### Fizička sabilnost nanoemulzija stabilizovanih različitim tipom emulgatora

Stabilnost nanoemulzija je složeno pitanje i zavisi od brojnih faktora kao što su sastav, veličina kapi, vis-



Slika 3. Prosečna veličina kapi ( $\pm$  SD) i indeks polidisperznosti ( $\pm$  SD) formulacija stabilizovanih smešom lecitin/polisorbat 80 (A) i kaprilil/kapril glukozidom (B) na dan izrade (sa fotomikrografijama) i nakon 30 i 180 dana čuvanja na 25 °C.

Figure 3. Mean droplet size ( $\pm$  SD) and polydispersity index ( $\pm$  SD) of formulations stabilized with lecithin and polysorbate 80 mixture (A) and caprylyl/capryl glucoside (B) on day of preparation (with photomicrographs) and after 30 and 180 days of storage at 25 °C.

kozitet nanoemulzija i uslovi sredine (temperatura čuvanja, sile smicanja) [6,19].

Fizička stabilnost izrađenih nanoemulzija ispitivana je podvrgavanjem uzoraka čuvanju na dve različite temperature: 25 °C u toku 6 meseci i 40 °C u toku mesec dana. U definisanim vremenskim intervalima praćeni su veličina kapi, *Pdl*, zeta potencijal, pH i provodljivost ispitivanih formulacija.

U toku dugotrajnog čuvanja na sobnoj temperaturi, nanoemulzije stabilizovane APG emulgatorom nisu promenile svoje organoleptičke osobine. Zadržale su mlečno-beli izgled, bez pojave znakova kringinga ili flokulacije u toku čuvanja. Nanoemulzije stabilizovane smešom lecitin/polisorbat 80 su pak imale blago žutu boju i uočene su dve faze: gornja, koncentrovana emulzija i gotovo čist, viskozni rastvor. Opisana pojava se pripisuje fenomenu kringinga u toku koga se faza manje gustine izdvaja na površini emulzije [33,34]. Međutim, nakon laganog protresanja (u skladu sa zahtevima Ph. Eur. 7.0) došlo je do redispergovanja i dobijene su homogene nanoemulzije.

Nakon mesec dana čuvanja na povišenoj temperaturi, lecitin/polisorbat 80 nanoemulzije su bile slabo žute i neprijatnog mirisa, a na površini formulacije sa 40% masne faze bila je prisutna tanka skrma od uljanih kapi. APG nanoemulzije su pokazale nestabilnost,

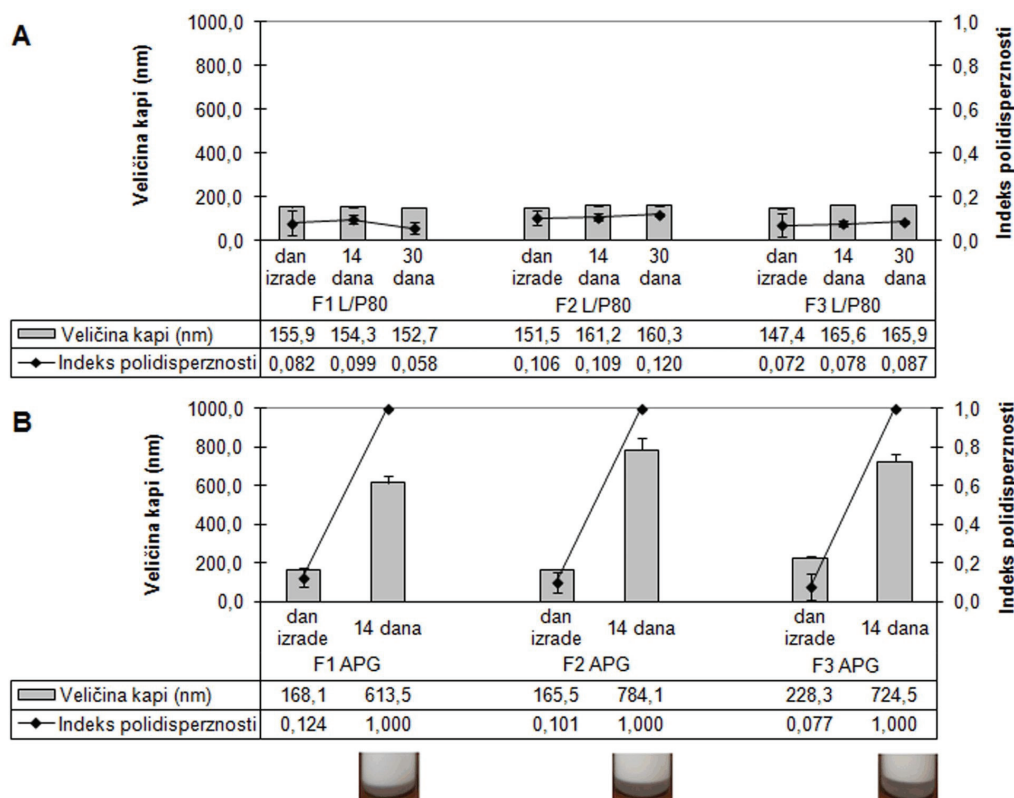
odnosno došlo je do ireverzibilnog razdvajanja faza (gornji, mlečno beli i donji, bistri sloj).

Veličina kapi je upotrebljena kao jedan od reprezentativnih indikatora stabilnosti za sve formulacije nanoemulzija čuvanih na 25 (slika 3), odnosno 40 °C (slika 4).

Slika 3 pokazuje promene u veličini kapi i *Pdl* ispitivanih uzoraka nanoemulzija u toku čuvanja od 180 dana na 25 °C. Kod nanoemulzija stabilizovanih kombinacijom lecitina i polisorbata 80 zabeleženo je povećanje veličine kapi, koje je kod formulacija sa 20 i 40% MCT iznosilo oko 40 nm, a kod formulacije sa 30% MCT oko 10 nm. *Pdl*, koji daje informaciju o odstupanju od prosečne veličine kapi, bio je manji od 0,2 što odlikava relativno homogene kapi. Jedino je kod F3L/P80 *Pdl* bio veći (oko 0,3). Kod ove nanoemulzije je povećanje i veličine kapi i *Pdl* tokom vremena bilo statistički značajno (ANOVA, Tukey test,  $p < 0,05$ ).

Posle istog perioda čuvanja, formulacije sa kaprilil/kapril glukozidom pokazale su značajno povećanje prosečne veličine kapi (ANOVA, Tukey test,  $p < 0,05$ ). Najmanje i najsporije povećanje veličine kapi (od 168 na 314 nm) i *Pdl* manji od 0,2 imala je formulacija sa 20% MCT i ona se može smatrati fizički stabilnom. Kod APG formulacije sa 30 i 40% MCT, veličina kapi je bila daleko veća (716 nm i preko 1  $\mu$ m) sa *Pdl* preko 0,2 odnosno 0,4, respektivno. Dobijeni rezultati upućuju na





Slika 4. Veličina kapi ( $\pm$  SD) i indeks polidisperznosti ( $\pm$  SD) formulacija stabilizovanih smešom lecitin/polisorbat 80 (A) i kaprilil/kapril glukozidom (B) na dan izrade i nakon 14 i 30 dana čuvanja na 40 °C.

Figure 4. Mean droplet size ( $\pm$  SD) and polydispersity index ( $\pm$  SD) of formulations stabilized with lecithin and polysorbate 80 mixture (A) and caprylyl/capryl glucoside (B) on day of preparation and after 14 and 30 days of storage at 40 °C.

širu raspodelu veličina kapi koja je indikator manje otpornosti nanoemulzije na Ostvaldovo sazrevanje u poređenju sa sistemima koji imaju uže raspodele, odnosno niži *Pdl*.

Brzo povećanje veličine kapi ukazuje na lošu stabilnost sistema [35]. U principu, manje kapi imaju manju tendenciju ka kringingu, a veću ka agregaciji, jer su brojnije u datom odnosu faza i podložnije uticaju Braunovog kretanja, pri čemu i jedno i drugo vodi ka koliziji kapi i nestabilnosti sistema [15].

Prisustvo agregata kapi u uzorcima nanoemulzija posle 180 dana dodatno je potvrđeno svetlosnom mikroskopijom (mikrografije nisu prikazane).

Slika 4 pokazuje veličinu kapi i *Pdl* ispitivanih formulacija nanoemulzija u toku čuvanja na 40 °C. Na osnovu veličine i raspodele veličina kapi može se zaključiti da su nanoemulzije stabilizovane standardnom kombinacijom emulgatora (lecitin/polisorbat 80) bile fizički stabilne u toku mesec dana čuvanja na povišenoj temperaturi. Najstabilnija je bila formulacija sa najmanjim sadržajem uljane faze (F1L/P80), kod koje se vrednosti za veličinu kapi i *Pdl* gotovo nisu promenile (ANOVA, post hoc Tukey test,  $p > 0,05$ ). Sa povećanjem udela uljane faze (formulacije F2L/P80 i F3L/P80) došlo je do porasta veličine kapi za 10–20 nm, što se pokazalo sta-

tistički značajnim (ANOVA, Tukey test,  $p < 0,05$ ). Povećanje veličine kapi bilo je izraženije kod formulacije sa 40% uljane faze (F3L/P80). Sve formulacije su, međutim, zadržale usku raspodelu veličine kapi, odnosno *Pdl* je bio oko 0,1, što može da ukaže na veću otpornost sistema na Ostvaldovo sazrevanje.

Za razliku od nanoemulzija sa lecitinom i polisorbatom 80, sve formulacije nanoemulzija stabilizovane APG emulgatorom bile su nestabilne na 40 °C, što se pokazalo već nakon dve nedelje. Došlo je do značajnog povećanja veličine kapi (*Paired-Samples t-test*,  $p < 0,05$ ), i svi uzorci su bili jako polidisperzni (*Pdl* jednak 1) usled prisustva većih agregata kapi. Razlog za ovu nestabilnost može biti neadekvatan udeo emulgatora u datim formulacijama [36].

U prilog prethodnim nalazima idu i rezultati merenja zeta potencijala ispitivanih nanoemulzija. Slika 5 daje uporedni prikaz promena vrednosti zeta potencijala kod nanoemulzija nakon mesec dana čuvanja na sobnoj i temperaturi od 40 °C.

Kao što je već objašnjeno, veliko površinsko naelektrisanje kapi smatra se jednim od ključnih faktora u održavanju stabilnosti nanoemulzija. Apsolutne vrednosti zeta potencijala veće od 30 mV uglavnom ukazuju na dobru fizičku stabilnost, dok vrednosti iznad 60 mV





nost odlična, što zapravo nije slučaj. Ovo pokazuje da zeta potencijal ne treba posmatrati kao garanciju za stabilnost, jer drugi relevantni faktori nisu obuhvaćeni ovim parametrom [40]. S druge strane, treba imati u vidu da je zeta potencijal inherentna karakteristika sistema, i da se njegove značajnije promene najčešće ne odigravaju kod fizički stabilnih sistema. Nestabilnost APG nanoemulzija pod stresnim uslovima (40 °C) može se objasniti time da se na višim temperaturama pojavljuju dodatni faktori koji imaju destabilizujući efekat [26].

U prilog prethodnim nalazima mogu ići i rezultati praćenja pH vrednosti i električne provodljivosti ispitivanih nanoemulzija. Praćenje pH važno je za procenu stabilnosti nanoemulzija zato što promene pH ukazuju na pojavu hemijskih reakcija koje mogu kompromitovati kvalitet finalnog proizvoda [35].

Slika 6 pokazuje promene pH vrednosti ispitivanih nanoemulzija u toku čuvanja na 25 °C. Kod svih formulacija došlo je do značajnog opadanja pH vrednosti u funkciji vremena čuvanja (ANOVA, Tukey test,  $p < 0,05$ ), koje je manje izraženo kod nanoemulzija stabilizovanih lecitinom i polisorbatom 80 u odnosu na one stabilizovane kaprilil/kapril glukozidom. Takođe se može primetiti da je do najvećeg pada pH došlo u toku prvih mesec dana čuvanja, dok je kasnije pH sporije opadao.

U toku čuvanja na 40 °C, nanoemulzije su takođe pokazale promene pH vrednosti (slika 7). Došlo je do

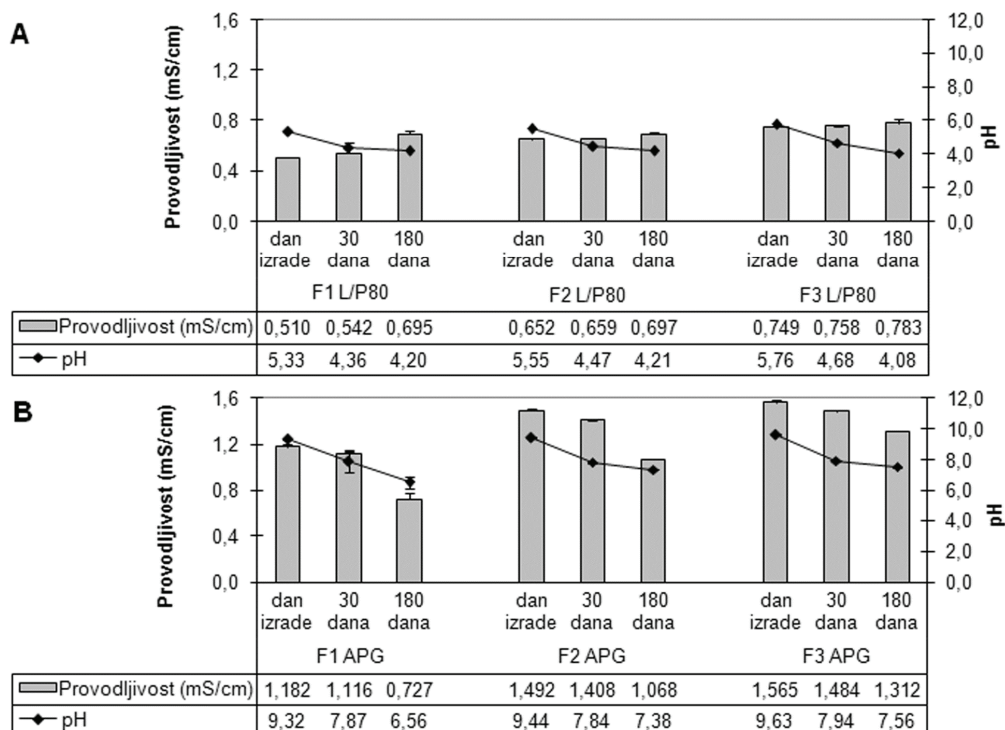
statistički značajnog pada pH nanoemulzija stabilizovanih i kombinacijom lecitin/polisorbat 80 (ANOVA, Tukey test,  $p < 0,05$ ) i kaprilil/kapril glukozidom (Paired-Samples *t*-test,  $p < 0,05$ ).

Opadanje pH vrednosti nanoemulzija dovodi se u vezu sa hidrolizom triglicerida iz uljane faze i fosfolipida iz lecitina, što dovodi do formiranja slobodnih masnih kiselina, lizofosfolipida i glicerofosfolipida [6,34]. Formiranje slobodnih masnih kiselina je odgovorno za kontradiktorno povećanje negativnih vrednosti zeta potencijala koje je napred opisano [6].

Baker i saradnici su pokazali da oslobađanje malih količina slobodnih masnih kiselina u toku čuvanja nanoemulzija, usled hidrolize fosfolipida i ulja, dovodi do povećanja negativnih vrednosti zeta potencijala, čime se povećava stabilnost ovih formulacija. Međutim, povećanje zeta potencijala može se smatrati samo delimično korisnim jer je formiranje slobodnih masnih kiselina udruženo sa smanjenjem pH vrednosti. Ovo promovira dalju degradaciju kroz hidrolizu triglicerida i fosfolipida i destabilizuje nanoemulzije [1].

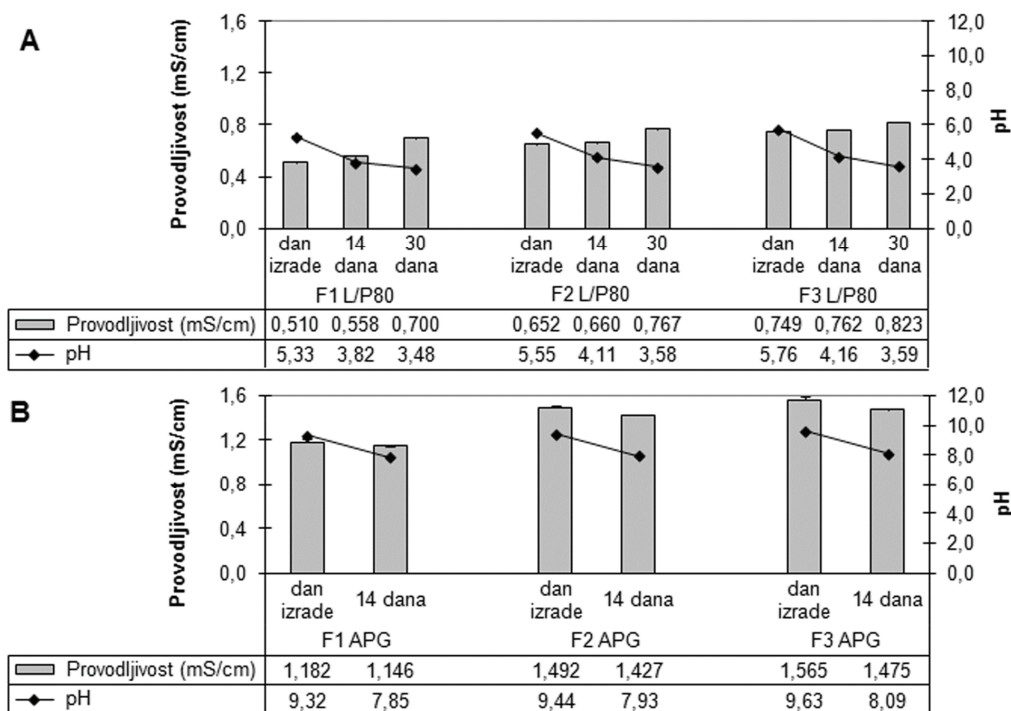
Iako se smanjenje pH vrednosti nanoemulzija u toku studija dugotrajne stabilnosti odvija sporo, preporučuje se podešavanje pH neposredno nakon izrade, kao i primena antioksidanasa [6].

Rezultati dobijeni merenjem električne provodljivosti pokazuju da je kod svih ispitivanih formulacija



Slika 6. pH vrednost ( $\pm$  SD) i električna provodljivost ( $\pm$  SD) nanoemulzija stabilizovanih smešom lecitin/polisorbat 80 (A) i kaprilil/kapril glukozidom (B) na dan izrade i nakon 30 i 180 dana čuvanja na 25 °C.

Figure 6. pH value ( $\pm$  SD) and electrical conductivity ( $\pm$  SD) of nanoemulsions stabilized with lecithin and polysorbate 80 mixture (A) and caprylyl/capryl glucoside (B) on day of preparation and after 30 and 180 days of storage at 25 °C.



Slika 7. pH vrednost ( $\pm$  SD) i električna provodljivost ( $\pm$  SD) nanoemulzija stabilizovanih smešom lecitin/polisorbat 80 (A) i kaprilil/kapril glukozidom (B) na dan izrade i nakon 14 i 30 dana čuvanja na 40 °C.

Figure 7. pH value ( $\pm$  SD) and electrical conductivity ( $\pm$  SD) of nanoemulsions stabilized with lecithin and polysorbate 80 mixture (A) and caprylyl/capryl glucoside (B) on day of preparation and after 14 and 30 days of storage at 40 °C.

nanoemulzija, u svim uslovima čuvanja, došlo do značajnih promena ovog parametra (slike 6 i 7).

Tokom 6 meseci čuvanja na 25 °C, nanoemulzije stabilizovane kombinacijom lecitin/polisorbat 80 pokazale su porast u električnoj provodljivosti, dok se kod nanoemulzija stabilizovanih kaprilil/kapril glukozidom električna provodljivost smanjila (ANOVA, Tukey test,  $p < 0,05$ ) (slika 6). Tokom čuvanja na 40 °C, takođe je kod nanoemulzija sa lecitinom i polisorbatom 80 došlo do povećanja (ANOVA, Tukey test,  $p < 0,05$ ), a kod APG nanoemulzija do smanjenja električne provodljivosti (Paired-Samples *t*-test,  $p < 0,05$ , slika 7).

Promene u električnoj provodljivosti mogu ukazati na nestabilnost i mogu da utiču na veličinu kapi nanoemulzija [35]. Generalno, kada je emulzija stabilna, ne zapažaju se promene u provodljivosti. Povećanje provodljivosti se može smatrati znakom destabilizacije nanoemulzije koja će se ispoljiti pre ili kasnije. Međutim, teško je samo na osnovu provodljivosti proceniti stabilnost nanoemulzije [41].

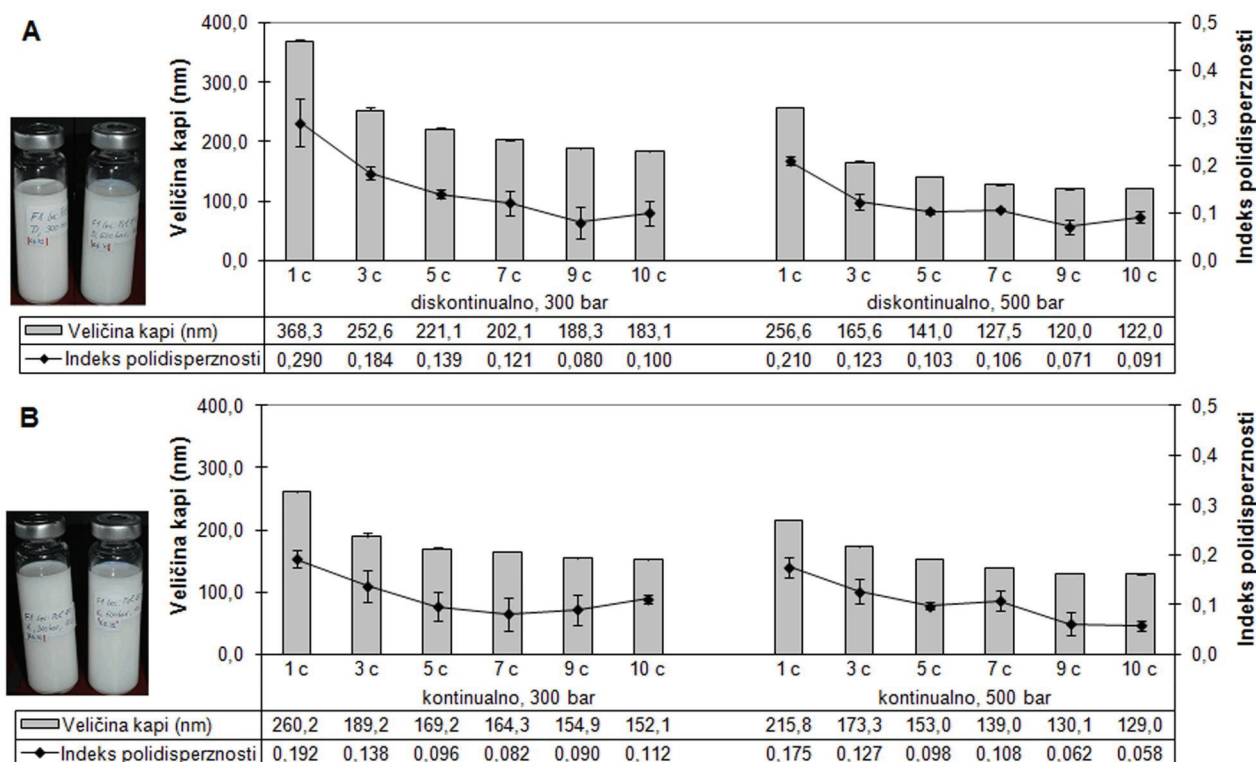
Merenje provodljivosti takođe omogućava da se utvrdi da li je kontinualna faza nanoemulzije vodena ili masna, kao i da se prati pojava inverzije faza [42]. Rezultati za provodljivost dobijeni u ovom istraživanju pokazuju da su u toku praćenja sve nanoemulzije imale vodenu fazu kao kontinualnu, odnosno nisu pokazale inverziju faza.

#### Uticaj procesnih parametara na karakteristike nanoemulzija

U ovom delu ispitivan je uticaj parametara procesa homogenizacije na veličinu i raspodelu veličina kapi nanoemulzija, u cilju pronalazanja optimalnih uslova izrade nanoemulzija. Na osnovu rezultata eksperimenata sprovedenih u prvom delu istraživanja, za radnu formulaciju odabrana je nanoemulzija sa najmanjom koncentracijom emulgatora, koja je imala malu veličinu kapi i bila stabilna u svim uslovima čuvanja. Ova formulacija, sastavljena od 20% MCT i po 2% lecitina i polisorbata 80, homogenizovana je na 50 °C variranjem broja ciklusa (do 10), pritiska (300 i 500 bar) i postupka homogenizacije (kontinualan i diskontinualan). Slika 8 prikazuje efekat pomenutih procesnih parametara na veličinu kapi i *Pdl* model nanoemulzije.

Veličina kapi nanoemulzije obično može da se smanji povećanjem unosa energije usled dužeg vremena homogenizacije (tj. povećanja broja prolazaka kroz homogenizator) ili većeg pritiska [43].

Kao što se i očekivalo, povećanje broja ciklusa homogenizacije dovelo je do značajnog smanjenja veličine kapi (ANOVA, Tukey test,  $p < 0,05$ ), pri čemu se prosečna veličina kapi nakon devetog i desetog ciklusa homogenizacije nije značajno razlikovala. Takođe, sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije, dobijena je i značajno uža raspodela veličine kapi (ANOVA, Tukey test,  $p < 0,05$ ), mada razlike u vrednostima *Pdl* nakon



Slika 8. Uticaj variranja procesnih parametara na veličinu i raspodelu veličina kapi izrađenih uzoraka nanoemulzije.  
Figure 8. Influence of variation of the production parameters on particle size and particle size distribution of prepared nanoemulsion samples.

petog ciklusa nisu bile statistički značajne. Osim toga, može se primetiti da sa desetim prolaskom kroz homogenizator nije došlo do poboljšanja u vrednosti  $PdI$  (slika 8). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je za dobijanje optimalne veličine kapi sa uskom raspodelom dovoljno 9 ciklusa homogenizacije pod povišenim pritiskom.

Pritisak homogenizacije značajno utiče na svojstva emulzija, jer sile smicanja i turbulencije, koje zavise od pritiska, a nastaju u toku homogenizacije, mogu da utiču na veličinu kapi i raspodelu veličine [19]. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazuju da su veličina kapi i  $PdI$  bili manji pri višem pritisku (slika 8).

Statistički je pokazano (dvofaktorska analiza varijanse) da na veličinu kapi uzorka nanoemulzije nakon devetog ciklusa homogenizacije značajno utiče pritisak, ali i da postoji značajan uticaj postupka homogenizacije, kao i značajne interakcije ovih promenljivih. Pošto su oba faktora (pritisak i postupak homogenizacije) imala po dva nivoa (300/500 bar i kontinualan/diskontinualan, raspektivno) ne radi se post hoc test, ali je sproveden post hoc test za interakcije ova dva faktora. Razmatranjem efekta postupka izrade u zavisnosti od pritiska (kontinualno, 300 bar vs. kontinualno, 500 bar; diskontinualno, 300 bar vs. diskontinualno, 500 bar) dobijeno je da je veličina kapi u oba slučaja, pri kontinualnom i diskontinualnom postupku, značajno manja

( $p < 0,05$ ) na višem pritisku (500 bar). Kada je, pak, posmatran efekat pritiska u zavisnosti od postupka izrade (300 bar, kontinualno vs. 300 bar, diskontinualno; 500 bar, kontinualno vs. 500 bar, diskontinualno) zaključeno je da se na nižem pritisku (300 bar) dobija značajno manja ( $p < 0,05$ ) veličina kapi kada se homogenizacija odvija kontinualno; dok se na višem pritisku (500 bar) značajno manja ( $p < 0,05$ ) veličina kapi dobija kada je postupak homogenizacije diskontinualan. Ovo zapažanje, međutim, nije lako objasniti.

Poznato je da tokom procesa emulgovanja, koji se odvija u homogenizatoru pod visokim pritiskom, dolazi do deformacije i lomljenja (usitnjavanja) kapi, adsorpcije emulgatora na novoformiranu međupovršinu, kolizije i, verovatno, rekoalescencije novonastalih kapi. Ravnoteža između lomljenja i rekoalescencije kapi određuje finalnu veličinu kapi nanoemulzije, a ova ravnoteža, između ostalog, zavisi i od pritiska homogenizacije. Naime, sa povećanjem pritiska homogenizacije povećava se brzina i stepen rekoalescencije, čime se objašnjava zašto povećanje pritiska ne dovodi uvek do smanjenja veličina kapi [44,45].

Moguće je da je pri kontinualnom procesu homogenizacije koji se odvija na višem pritisku (500 bar) pojava rekoalescencije kapi izraženija nego kod diskontinualnog procesa, pri čemu nije sasvim jasno šta je

tačno do ovoga dovelo, što svakako otvara puteve za dalja istraživanja.

Kada je kao zavisno promenljiva posmatran *Pdl* dobijen nakon devetog ciklusa homogenizacije, dvofaktorskom analizom varijanse nije utvrđen značajan uticaj ni pritiska, ni postupka homogenizacije, kao ni značajnost interakcija ovih parametara ( $p > 0,05$ ).

Dobijeni rezultati jasno upućuju da se diskontinualnom homogenizacijom pod pritiskom od 500 bar može dobiti nanoemulzija optimalnih karakteristika (veličina kapi, *Pdl*).

Dalji korak u istraživanju bio bi procena uticaja procesnih parametara na fizičku stabilnost nanoemulzija i razmatranje uticaja dodatnih stabilizatora, kao i različitih model lekovitih supstanci na karakteristike i stabilnost nanoemulzija.

## ZAKLJUČAK

Homogenizacijom pod visokim pritiskom uspešno su izrađene nanoemulzije sastavljene od visokoprečišćene vode i rastućih koncentracija MCT i emulgatora- kaprilil/kapril glukozida ili kombinacije lecitina i polisorbata 80. Vrsta emulgatora je uticala na veličinu kapi, ali je ona kod svih izrađenih nanoemulzija bila između 145 i 230 nm, sa *Pdl* ispod 0,2.

Tokom čuvanja na 25 i 40 °C, kod svih nanoemulzija došlo je do porasta veličine i raspodele veličina kapi, povećanja negativne vrednosti zeta potencijala i opadanja pH vrednosti, dok se električna provodljivost povećala kod nanoemulzija sa lecitinom i polisorbatom 80, a smanjila kod APG nanoemulzija. Tokom 6 meseci čuvanja na 25 °C, veličina kapi nanoemulzija stabilizovanih smešom lecitin/polisorbat 80 povećala se za 10–40 nm, dok je kod APG nanoemulzija povećanje veličine kapi, zavisno od udela masne faze, bilo 140–1000 nm. Na osnovu analize veličine i raspodele veličina kapi, može se reći da su nanoemulzije izrađene sa 20% MCT i 4% emulgatora (smeša lecitin/polisorbat 80 (1/1) odnosno APG) bile stabilne pod ovim uslovima čuvanja. Ekstremni porast veličine kapi od oko 1000 nm, zabeležen kod APG nanoemulzije sa 40% MCT, može biti posledica neadekvatnog udela APG emulgatora u formulaciji ili njegove nemogućnosti da sam, bez prisustva koemulgatora, stabilizuje nanoemulzije sa ovako visokim udelom ulja. U toku mesec dana čuvanja na 40 °C, nanoemulzije stabilizovane smešom lecitin/polisorbat 80 bile su fizički stabilne, dok su sve nanoemulzije stabilizovane APG emulgatorom bile nestabilne.

Procenom uticaja procesnih parametara na veličinu kapi i *Pdl* nanoemulzije, mogu se odabrati optimalni procesni parametri: 9 ciklusa homogenizacije, pritisak od 500 bar i diskontinualan postupak homogenizacije.

## Zahvalnica

Ovaj rad urađen je u okviru projekta tehnološkog razvoja TR34031 koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

## LITERATURA

- [1] M.T. Baker, M. Naguib, Propofol: the challenges of formulation, *Anesthesiology* **103** (2005) 860–876.
- [2] S. Tamilvanan, S. Benita, The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58** (2004) 357–368.
- [3] E. Yilmaz, H.H. Borchert, Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60** (2005) 91–98.
- [4] M. Sznitowska, M. Gajewska, S. Janicki, A. Radwanska, G. Lukowski, Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52** (2001) 159–163.
- [5] M. Sznitowska, S. Janicki, E. Dabrowska, K. Zurowska-Pryczkowska, Submicron emulsions as drug carriers; Studies on destabilization potential of various drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.* **12** (2001) 175–179.
- [6] V. Klang, C. Valenta, Lecithin-based nanoemulsions, *J. Drug Del. Sci. Tech.* **21** (2011) 55–76.
- [7] H. Zhou, Y. Yue, G. Liu, Y. Li, J. Zhang, Q. Gong, Z. Yan, M. Duan, Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system, *Nanoscale Res. Lett.* **5** (2010) 224–230.
- [8] X. Li, L. Du, C. Wang, Y. Liu, X. Mei, Y. Jin, Highly efficient and lowly toxic docetaxel nanoemulsions for intravenous injection to animals, *Pharmazie* **66** (2011) 479–483.
- [9] T.G. Mason, J.N. Wilking, K. Meleson, C.B. Chang, S.M. Graves, Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties, *J. Phys. Condens. Matter* **18** (2006) R635–R666.
- [10] J.V.L. Henry, P.J. Fryer, W.J. Frith, I.T. Norton, Emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron emulsions stabilised with Tweens (20 and 80), Brij 96v and sucrose monoesters, *J. Colloid Interface Sci.* **338** (2009) 201–206.
- [11] V. Klang, N.B. Matsko, C. Valenta, F. Hofer, Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment, *Micron* **43** (2012) 85–103.
- [12] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, Formation and stability of nano-emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* **108–109** (2004) 303–318.
- [13] D.J. McClements, Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities, *Soft Matter* **8** (2012) 1719–1729.
- [14] K. Welin-Berger, B. Bergenstahl, Inhibition of Ostwald ripening in local anesthetic emulsions by using hydrophobic excipients in the disperse phase, *Int. J. Pharm.* **200** (2000) 249–260.



- [15] D.J. McClements, Food emulsions: Principles, practices and techniques, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2005.
- [16] V. Klang, N. Matsko, K. Raupach, N. El-Hagin, C. Valenta, Development of sucrose stearate-based nanoemulsions and optimisation through  $\gamma$ -cyclodextrin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **79** (2011) 58–67.
- [17] W. von Rybinski, B. Guckenbiehl, H. Tesmann, Influence of co-surfactants on microemulsions with alkyl polyglycosides, *Colloids Surfaces, A* **142** (1998) 333–342.
- [18] O. Söderman, I. Johansson, Polyhydroxyl-based surfactants and their physico-chemical properties and applications, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **4** (1999) 391–401.
- [19] Y. Yuan, Y. Gao, J. Zhao, L. Mao, Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions, *Food Res. Int.* **41** (2008) 61–68.
- [20] S. Hoeller, A. Sperger, C. Valenta, Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation, *Int. J. Pharm.* **370** (2009) 181–186.
- [21] Y. Baspinar, C.M. Keck, H.H. Borchner, Development of a positively charged prednicarbate nanoemulsion, *Int. J. Pharm.* **383** (2010) 201–208.
- [22] V. Klang, N. Matsko, A.M. Zimmermann, E. Vojnikovic, C. Valenta, Enhancement of stability and skin permeation by sucrose stearate and cyclodextrins in progesterone nanoemulsions, *Int. J. Pharm.* **393** (2010) 152–160.
- [23] C. Rupp, H. Steckel, B.W. Müller, Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactants with different molecule structures, *Int. J. Pharm.* **387** (2010) 120–128.
- [24] N. Anton, P. Gayet, J.P. Benoit, P. Saulnier, Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion, *Int. J. Pharm.* **344** (2007) 44–52.
- [25] R.H. Müller, S. Schmidt, I. Buttle, A. Akkar, J. Schmitt, S. Brömer, SolEmuls® – novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs, *Int. J. Pharm.* **269** (2004) 293–302.
- [26] A. Kovacevic, S. Savic, G. Vuleta, R.H. Müller, C.M. Kreck, Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure, *Int. J. Pharm.* **406** (2011) 163–172.
- [27] C.P. Tan, M. Nakajima,  $\beta$ -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation, *Food Chem.* **92** (2005) 661–671.
- [28] H. Tesmann, J. Kahre, H. Hensen, B.A. Salka, in: K. Hill, W. von Rybinski, G. Stoll (Eds.), *Alkyl Polyglycosides: Technology, Properties and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2008, pp. 71–98.
- [29] M. Jumaa, B.W. Müller, The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions, *Int. J. Pharm.* **163** (1998) 81–89.
- [30] S. Jahnke, in: R.H. Müller, B.H.L. Böhm (Eds.), *Dispersion Techniques for Laboratory and Industrial Scale Processing*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2001, pp. 7–30.
- [31] R.H. Müller, Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis, Band 37, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996.
- [32] S.A. Wissing, R.H. Müller, Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration, *J. Control. Release* **81** (2002) 225–233.
- [33] M. Trotta, F. Pattarino, T. Ignoni, Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **53** (2002) 203–208.
- [34] K. Zurowska-Pryczkowska, M. Sznitowska, S. Janicki, Studies on the effect of pilocarpine incorporation into a submicron emulsion on the stability of the drug and the vehicle, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **47** (1999) 255–260.
- [35] D.S. Bernardi, T.A. Pereira, N.R. Maciel, J. Bortoloto, G.S. Viera, G.C. Oliveira, P.A. Rocha-Filho, Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments, *J. Nanobiotechnology* **9** (2011) 44.
- [36] S. Feng, G. Huang, Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers, *J. Control. Release* **71** (2001) 53–69.
- [37] T.M. Riddick, *Control of Colloid Stability through Zeta Potential*, Zeta-Meter Inc. via Livingston Publishing Company, Wynnewood, 1968.
- [38] P.R. Mishra, L. Al Shaal, R.H. Müller, C.M. Keck, Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery, *Int. J. Pharm.* **371** (2009) 182–189.
- [39] K. Mitri, R. Shegokar, S. Gohla, C. Anselmi, R.H. Müller, Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance, *Int. J. Pharm.* **414** (2011) 267–275.
- [40] A. Akkar, R.H. Müller, Formulation of intravenous carbamazepine emulsions by SolEmuls technology, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **55** (2003) 305–312.
- [41] H. Masmoudi, YL. Dréau, P. Piccerelle, J. Kister, The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR, *Int. J. Pharm.* **289** (2005) 117–131.
- [42] M.J. Lawrence, G.D. Rees, Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **45** (2000) 89–121.
- [43] W. van Nieuwenhuyzen, B.F. Szuhaj, Effects of lecithins and proteins on the stability of emulsions, *Fett/Lipid* **100** (1998) 282–291.
- [44] J. Floury, J. Bellettre, J. Legrand, A. Desrumaux, Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A. Study of the Flow Pattern, *Chem. Eng. Sci.* **59** (2004) 843–853.
- [45] J. Floury, J. Legrand, A. Desrumaux, Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and recalescence phenomena, *Chem. Eng. Sci.* **59** (2004) 1285–1294.



## SUMMARY

### NANOEMULSIONS PRODUCED BY VARYING THE TYPE OF EMULSIFIER AND OIL CONTENT: EFFECT OF FORMULATION AND PROCESS PARAMETERS ON THE CHARACTERISTICS AND PHYSICAL STABILITY

Sanela M. Đorđević<sup>1</sup>, Nebojša D. Cekić<sup>2</sup>, Tanja M. Isailović<sup>1</sup>, Jela R. Milić<sup>1</sup>, Gordana M. Vuleta<sup>1</sup>, Miodrag L. Lazić<sup>2</sup>, Snežana D. Savić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

<sup>2</sup>*Faculty of Technology, University of Niš, Leskovac, Serbia*

(Scientific paper)

The aim of the present study was to prepare oil-in-water nanoemulsions stabilized with a novel natural alkyl polyglucoside surfactant and to compare them with corresponding lecithin/polysorbate 80-based nanoemulsions in terms of physicochemical properties and physical stability. Nanoemulsions were prepared by high pressure homogenization, using 20, 30 and 40 mass% medium chain triglyceride as oil phase, and 4, 6 and 8 mass% lecithin/polysorbate 80 mixture (1/1) or caprylyl/capryl glucoside as emulsifiers. The effects of emulsifier type, emulsifier concentration and oil content were investigated with respect to changes in particle size, particle size distribution, surface charge and physical stability. The influence of production parameters (number of homogenization cycles, type of homogenization process, homogenization pressure) on particle size was also investigated. Analysis was performed by photon correlation spectroscopy, laser diffraction, zeta potential, pH and electrical conductivity measurements. All the produced formulations revealed a small droplet size ranging from 147 to 228 nm and a very narrow size distribution (polydispersity index range 0.072–0.124). Zeta potentials were found to be about –20 and –50 mV for nanoemulsions stabilized with lecithin/polysorbate 80 and caprylyl/capryl glucoside, respectively. The results obtained from the stability studies (6 months at 25 °C and 1 month at 40 °C) indicated that nanoemulsion stability was influenced by their composition. The results also suggested the most appropriate production parameters: 9 homogenization cycles, homogenization pressure of 500 bar and discontinuous process of homogenization.

*Keywords:* Nanoemulsion • Caprylyl/capryl glucoside • Lecithin • Polysorbate 80 • High pressure homogenization • Physical stability