

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Andelka B. Kovačević

**LIPIDNE NANOČESTICE
STABILIZOVANE NEJONSKIM
POLIHIDROKSILNIM
SURFAKTANTIMA: POSTUPAK
DOBIJANJA, KARAKTERIZACIJA,
STABILNOST I INKORPORIRANJE
LEKOVITE SUPSTANCE**

– DOKTORSKA DISERTACIJA –

Beograd, 2015. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY



Anđelka B. Kovačević

**LIPID NANOPARTICLES STABILIZED
WITH NONIONIC POLYHYDROXY
SURFACTANTS: PREPARATION,
CHARACTERIZATION, STABILITY AND
DRUG INCORPORATION**

– DOCTORAL DISSERTATION –

Belgrade, 2015

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutske tehnologije i kozmetologiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i *Department of Pharmaceutical Technology, Biopharmaceutics & NutriCosmetics, Institute of Pharmacy, Free University of Berlin, Nemačka.*

MENTOR:

Dr sc Snežana Savić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr sc Gordana Vuleta, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc Jela Milić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc Cornelia M. Keck, *full professor,*
Applied Pharmacy Division, University of
Applied Sciences Kaiserslautern, Germany

Dr sc Rainer H. Müller, *full professor,*
Institute of Pharmacy,
Free University of Berlin, Germany

Datum odbrane: _____

Želela bih da se zahvalim mentoru ovog rada

vanrednom profesoru Snežani Savić,

na slobodi koju sam imala u naučnoistraživačkom radu, konstantnim kritikama i savetima. Sticanje novih znanja nije uvek bilo lak zadatak, ali je zahvaljujući razumevanju, angažovanju mentora i visokim kriterijumima koje je postavila sopstvenim naučnim rezultatima, realizacija postavljenih ciljeva postajala svakim danom sve uspješnija. Stoga izražavam svoju zahvalnost za podršku tokom svih ovih godina.

Zahvaljujem se prof. dr Gordani Vuleta na pruženoj mogućnosti da budem deo tima sa kojim ona radi, na stručnim savetima, dobronamernim sugestijama i kritikama, kao i na konstantnom ličnom angažovanju tokom proteklih godina.

Zahvaljujem se prof. dr Jeli Milić koja me je uvela u svet lipidnih nanočestica, mudro i dobronamerno usmeravala, iskazala veliko razumevanje i pružala dragocene stručne savete i nesebičnu podršku svih ovih godina, uvek i u pravo vreme.

Najveći deo eksperimentalnog rada u okviru doktorske disertacije sproveden je tokom boravka na *Department of Pharmaceutical Technology, Biopharmaceutics & NutriCosmetics, Institute of Pharmacy, Free University of Berlin*, Nemačka pod supervizijom prof. dr Cornelia M. Keck i prof. dr Rainer H. Müller-a.

Prof. dr Cornelia M. Keck dugujem zahvalnost na bezrezervnom angažovanju i podršci, u svim segmentima izrade doktorske disertacije. Kao pravi znalac svoga posla naučila me je da svakom novom zadatku pristupam strpljivo i analitično. Posebno joj se zahvaljujem na pomoći u pripremi radova publikovanih u časopisima međunarodnog značaja, u kojima su objavljeni najznačajniji rezultati iz doktorske disertacije.

Velika čast i privilegija je bila raditi sa prof. dr Rainer H. Müller-om, kome dugujem neizmernu zahvalnost na pruženoj prilici da sa njim sarađujem i da od njega učim. Želim takođe da se zahvalim prof. Müller-u na pruženoj mogućnosti da deo svojih rezultata prezentujem na međunarodnim skupovima.

Veliko hvala upućujem svim profesorima i kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu na podršci, saradnji i razumevanju koju su pokazali tokom svih ovih godina.

Zahvalnost dugujem farmaceutskim tehničarima Corinni Schmidt i Inge Volz sa *Department of Pharmaceutical Technology, Biopharmaceutics & NutriCosmetics, Institute of Pharmacy, Free University of Berlin*, na pomoći i angažovanju tokom realizacije i izvođenja eksperimenata.

Zahvaljujem se Milici Benedik i Ružici Jevremović sa Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na razumevanju u pomoći u rešavanju administrativnih zadataka.

Zahvaljujem se dr sci Slavomira Doktorovova sa Instituta za medicinske i farmaceutske nauke, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Lisabonu za stalnu podršku, saradnju i kolegijalnost koju je iskazivala od kada se poznajemo.

Veliko hvala Gabrieli Karsubke na pomoći u rešavanju administrativnih problema tokom mog boravka u Nemačkoj.

Veliku zahvalnost dugujem mojim **Kovačevićima i Pucarevićima** na dobroj genetičkoj osnovi.

Svakako najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Borisavu i Dragici Kovačević, koji su bili stalna i iskrena podrška, ne samo tokom izrade doktorske disertacije, već tokom celog mog života. Posebno im se zahvaljujem što su me naučili pravim vrednostima u životu, verovali u mene i donosili prave odluke u pravo vreme.

Srdačno,

Anđelka B. Kovačević

**Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima:
postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance**

Sažetak: U radu je ispitivan uticaj fizičko-hemijskih osobina 12 nejonskih polihidroksilnih surfaktanata i udela tečnog lipida na veličinu lipidnih nanočestica i strukturu lipidnog matriksa. U prvoj fazi istraživanja, sprovedeno je merenje kontaktnog ugla polihidroksilnih surfaktanata na cetil palmitatu, koji se kasnije koristio kao lipidni matriks čvrstih lipidnih nanočestica. Nakon dobijanja preliminarnih informacija o sposobnosti kvašenja cetil palmitata polihidroksilnim surfaktantima, u nastavku studije pripremljene su vodene disperzije čvrstih lipidnih nanočestica i izvedena je njihova karakterizacija kroz kratkoročnu i dugoročnu studiju fizičke stabilnosti. Dobijeni rezultati ukazali su da su svi surfaktanti u niskoj koncentraciji ispoljili zadovoljavajuću efikasnost u obrazovanju i stabilizaciji čvrstih lipidnih nanočestica. Najveću efikasnost u stabilizaciji čestica imali su surfaktanti sa visokom HLB brojem, niskim kontaktnim uglom na cetil palmitatu i niskom molekulskom masom. Pored toga, uočen je i izvestan uticaj hemijske strukture polihidroksilnih surfaktanata na indeks kristalizacije i površinsko naelektrisanje (zeta potencijal) čvrstih lipidnih nanočestica. U nastavku istraživanja, ispitivao se uticaj tri polihidroksilna surfaktanta različite hemijske strukture na formiranje nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim udelom tečnog lipida u lipidnim matriksu. Najveću efikasnost u stabilizaciji nanostrukturiranih lipidnih nosača, nezavisno od udela tečnog lipida u matriksu, imao je surfaktant sa najkraćim alkil lancem. Sa druge strane, surfaktanti koji su posedovali duže alkil lance u svojoj strukturi pozitivno su uticali na indeks kristalizacije lipidnog matriksa nanočestica, a time i kapacitet lipidnog matriksa za inkorporiranje tečnog lipida. Uočeni uticaj hemijske strukture surfaktanata na strukturu lipidnog matriksa čestica, kao i potencijalne interakcije sa matriksom u budućnosti bi se mogle iskoristiti u razvoju nanostrukturiranih lipidnih nosača, koji bi posedovali željeni stepen kristaliniteta i kapacitet opterećenja za izabranu model lekovitu supstancu. Koristeći eksperimentalni i teorijski pristup u ispitivanju rastvorljivosti model lekovite supstance, izvršena je selekcija lipida koji su se koristili u razvoju lipidnih nanonosača sa takrolimusom, kao izabranom model lekovitom supstancom. Dodatkom monoglicerida u lipidni matriks čestica, koji se dominantno sastoji od voskova, povećana je rastvorljivost lekovite

supstance u matriksu čestice. Međutim, prisustvo monoglicerida sa druge strane dovelo je do destabilizacije nosača. Profili *in vitro* oslobađanja takrolimusa iz razvijenih nanostrukturiranih lipidnih nosača i poredbene formulacije nanoemulzija, bili su u skladu sa zapažanjima do kojih se došlo u okviru strukturne karakterizacije nosača. Kumulativna količina oslobođene lekovite supstance bila je najviša kod nanoemulzije, zbog tečnog karaktera kapi emulzija, a samim tim i slabijeg afiniteta supstance za nosač. U vodenim disperzijama nanostrukturiranih lipidnih nosača, afinitet takrolimusa za nosač je veći, zbog čvrste strukture lipidnog matriksa, tako da su difuzija supstance unutar nosača i oslobađanje u akceptorski medijum sporiji u odnosu na nanoemulziju.

Ključne reči: čvrste lipidne nanočestice; nano(strukturirani) lipidni nosači; polihidroksilni surfaktanti; takrolimus; homogenizacija pod visokim pritiskom; veličina čestica; zeta potencijal; indeks kristalizacije; *in vitro* ispitivanje oslobađanja lekovite supstance

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj: 57.085 : [615.011 : 615.375] (043.3)

615.451.3 (043.3)

Lipid nanoparticles stabilized with nonionic polyhydroxy surfactants: preparation, characterization, stability and drug incorporation

Abstract: In the study the influence of physicochemical properties of 12 nonionic polyhydroxy surfactants and liquid lipid (oil) content on the size of lipid nanoparticles and the structure of a lipid particle matrix was investigated. In the first part of the study, the contact angle measurements of the polyhydroxy surfactants on cetyl palmitate film (solid lipid used as a particle matrix) were performed. After preliminary information about the wettability of cetyl palmitate with polyhydroxy surfactants was obtained, aqueous solid lipid nanoparticle dispersions were produced and characterised in a short-term and long-term physical stability study. The results obtained indicated that all surfactants at low concentrations exhibited satisfactory efficiency in the formation and stabilisation of solid lipid nanoparticles. The highest efficiency in the stabilisation of the particles was obtained with the surfactant with a high HLB number, a low contact angle on the cetyl palmitate film and a low molecular weight. In addition, there was some influence of the chemical structure of polyhydroxy surfactants on the crystallinity index and the surface charge (zeta potential) of the solid lipid nanoparticles. In the next part of the study, the influence of three polyhydroxy surfactants with different chemical structures on the formation of the nanostructured lipid carriers with a varying liquid lipid content was studied. Independently of the liquid lipid content in the lipid matrix the surfactant with the shortest alkyl chain had the highest efficacy in the stabilisation of the nanostructured lipid carriers. On the other hand, long alkyl chain length surfactants lead to an increase in the crystallinity index and increased loading capacity of lipid nanoparticles for the liquid lipid can therefore be obtained with this approach. The observed influence of the chemical structure of the surfactant on the structure of the lipid particle matrix, as well as the prospective interactions of the surfactants with the lipid matrix of the particles, could be used in the future in the development of nanostructured lipid carriers with the desired crystallinity index and loading capacity for the selected model drug. The selection of the lipids used in the development of drug (tacrolimus) loaded lipid nanocarriers was performed with an experimental and theoretical approach. The addition of a monoglyceride in the lipid particle matrix predominantly composed of wax increased tacrolimus solubility in the particle matrix.

At the same time, the presence of monoglycerides destabilised the carrier. *In vitro* release of tacrolimus from the developed nanostructured lipid carriers and nanoemulsion (comparable formulation) were in agreement with the observations obtained during structural characterisation of the carrier systems. The cumulative amount of drug released was highest in the nanoemulsions, because of the liquid nature of the lipid droplets, i.e., weaker affinity of a substance with the carrier. In aqueous nanostructured lipid carrier dispersions, tacrolimus is incorporated into the solid lipid matrix, and hence its diffusion within the lipid matrix and release into the acceptor medium is prolonged in comparison with tacrolimus loaded nanoemulsion.

Keywords: solid lipid nanoparticles; nano(structured) lipid carriers; polyhydroxy surfactants; tacrolimus; high pressure homogenization; particle size; zeta potential; crystallinity index; *in vitro* drug release study

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical technology

UDK number: 57.085 : [615.011 : 615.375] (043.3)

615.451.3 (043.3)

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opšti deo	5
2.1. Lipidne nanočestice kao potencijalni nosači za lokalnu primenu lekovitih supstanci	5
2.1.1. Definicija, osobine i vrste lipidnih nanočestica	5
2.1.2. Postupci dobijanja lipidnih nanočestica: pregled postojećih tehnologija	9
2.1.2.1. Homogenizacija pod visokim pritiskom	11
2.1.2.2. Industrijski postupak dobijanja lipidnih nanočestica	16
2.1.3. Inkorporiranje aktivne supstance u lipidne nanočestice i oslobađanje aktivne supstance iz lipidnih nanočestica	18
2.1.3.1. Teorijski modeli kojima se opisuje inkorporiranje aktivne supstance u lipidne nanočestice	20
2.1.3.2. Teorijski modeli kojima se opisuje oslobađanje aktivne supstance iz lipidnih nanočestica	22
2.1.4. Potencijal lipidnih nanočestica za primenu na koži lekovitih supstanci i kozmetički aktivnih materija	25
2.2. Metode za karakterizaciju lipidnih nanočestica	28
2.2.1. Metode za određivanje veličine čestica i distribucije čestica po veličini	28
2.2.1.1. Foton korelaciona spektroskopija	28
2.2.1.2. Laserska difrakcija	31
2.2.2. Mikroskopske metode	34
2.2.2.1. Svetlosna i polarizaciona mikroskopija	34
2.2.2.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija	34
2.2.3. Metode za karakterizaciju strukture lipidnih nanočestica	35
2.2.3.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	35
2.2.3.2. Difrakcija X zraka pod širokim uglom	37
2.2.4. Metode za ispitivanje površinskih karakteristika lipidnih nanočestica	38
2.2.4.1. Zeta potencijal	38
2.2.5. Metode za <i>in vitro</i> ispitivanje oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih preparata za primenu na koži	41
2.3. Surfaktanti i njihova uloga u formulaciji lipidnih nanočestica	44
2.3.1. Osnovna razmatranja prilikom izbora surfaktanta/stabilizatora lipidnih nanočestica	44
2.3.2. Adsorpcija surfaktanta na međufazi čvrsto/tečno	47
2.3.3. Elektrostatička i sterna stabilizacija	49
2.3.4. Konvencionalni surfaktanti u formulaciji lipidnih nanočestica	52
2.3.5. Noviji surfaktanti u formulaciji lipidnih nanočestica	54
2.3.5.1. Šećerni estri	57
2.3.5.2. Poliglicerolski estri masnih kiselina	59
2.3.5.3. Alkil (poli)glukozidi	60
2.4. Takrolimus kao model lekovita supstanca	62
2.4.1. Fizičko-hemijske osobine, farmakološki profil, mehanizam delovanja i upotreba takrolimusa	62
2.4.2. Problemi sa takrolimusom/formulacijama sa takrolimusom za primenu na koži	67

3. Cilj istraživanja	70
4. Eksperimentalni deo	73
4.1. Materijal	73
4.1.1. Takrolimus	73
4.1.2. Surfactanti	73
4.1.3. Lipidi	77
4.1.3.1. Cetil palmitat (Cutina® CP)	77
4.1.3.2. Gliceril monostearat (Imwitor® 900P)	77
4.1.3.3. Gliceril dibehenat (Compritol® 888 ATO)	78
4.1.3.4. Trigliceridi, srednje dužine lanca (Miglyol® 812)	79
4.1.3.5. Ostali lipidi	80
4.2. Metode	81
4.2.1. Određivanje kontaktnog ugla (goniometrijska merenja)	81
4.2.2. Postupak dobijanja vodenih disperzija lipidnih nanočestica (homogenizacija pod visokim pritiskom)	82
4.2.3. Foton korelaciona spektroskopija	87
4.2.4. Laserska difrakcija	87
4.2.5. Zeta potencijal	88
4.2.6. Svetlosna i polarizaciona mikroskopija	89
4.2.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	89
4.2.8. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	89
4.2.9. Difrakcija X zraka pod širokim uglom (WAXD)	90
4.2.10. Određivanje rastvorljivosti takrolimusa	91
4.2.11. Visoko efikasna tečna hromatografija (HPLC)	93
4.2.12. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja lekovite supstance iz lipidnih nanočestica	93
5. Rezultati i diskusija	94
5.1. Rezultati i diskusija prve faze istraživanja	94
5.1.1. Merenje kontaktnog ugla (goniometrijska merenja)	94
5.1.2. Priprema vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima	97
5.1.3. Fizička stabilnost vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima	103
5.1.3.1. Kratkoročna studija fizičke stabilnosti na različitim temperaturama	103
5.1.3.2. Dugoročna studija fizičke stabilnosti na sobnoj temperaturi	109
5.1.4. Ispitivanje površinskog naelektrisanja čvrstih lipidnih nanočestica	115
5.1.5. Ispitivanje morfologije i površinskih karakteristika čvrstih lipidnih nanočestica	118
5.1.6. Karakterizacija lipida i surfaktanata u <i>bulk</i> stanju	119
5.1.7. Karakterizacija strukture čvrstih lipidnih nanočestica	122

5.2. Rezultati i diskusija druge faze istraživanja	129
5.2.1. Karakterizacija lipida i surfaktanata u <i>bulk</i> stanju	129
5.2.2. Priprema vodenih disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima	136
5.2.3. Analiza veličine čestica i fizička stabilnost vodenih disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima	138
5.2.4. Ispitivanje površinskog naelektrisanja nanostrukturiranih lipidnih nosača	153
5.2.5. Karakterizacija strukture nanostrukturiranih lipidnih nosača	156
5.3. Rezultati i diskusija treće faze istraživanja	163
5.3.1. Selekcija i karakterizacija lipida za pripremu lipidnih nanočestica sa takrolimusom	163
5.3.1.1. Određivanje rastvorljivosti takrolimusa u lipidima	163
5.3.1.2. Izračunavanje parametara rastvorljivosti takrolimusa u lipidima i analiza podataka	165
5.3.1.3. Karakterizacija lipida i smeše lipida sa model lekovitom supstancom	169
5.3.4. Formulacija lipidnih nanonosača sa takrolimusom	177
5.3.5. Karakterizacija lipidnih nanonosača sa takrolimusom	183
5.3.6. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja takrolimusa iz lipidnih nanonosača	188
6. Zaključak	192
7. Literatura	198
8. Prilozi	

1. Uvod

Lipidne nanočestice su koloidni nosači koji se sastoje od lipidnog matriksa koji je u čvrstom agregatnom stanju na sobnoj temperaturi i temperaturi tela. Prva generacija lipidnih nanočestica, tzv. čvrste lipidne nanočestice (engl. *Solid Lipid Nanoparticles*, *SLN*) razvijena je početkom 90-tih godina prošlog veka, istovremeno u dva nezavisna tima istraživača: tim istraživača okupljenih oko prof. Rainer H. Müller sa *Free University of Berlin* (Nemačka) i tim istraživača oko prof. Maria R. Gasco sa *University of Turin* (Italija). U početku, u oblasti čvrstih lipidnih nanočestica, bile su aktivne prof. Kirsten Westesen i Brita Siekmann sa *Technical University Braunschweig* (Nemačka). Danas, čvrstim lipidnim nanočesticama u Nemačkoj, intenzivno se bave istraživači u timu prof. C.C. Müller-Goyman i prof. H. Bunjes sa *Technical University Braunschweig* (Müller i sar., 2011).

U timu prof. Rainer H. Müller-a, čvrste lipidne nanočestice su se u početku dobijale postupkom homogenizacije pod visokim pritiskom, iz triglicerida i odgovarajućeg surfaktanta. Ovaj postupak omogućavao je dobijanje čestica čiji sastav je sličan sastavu koloidnih emulzija (Lucks i Müller, 1996). Gasco (1993) je opisala postupak dobijanja čvrstih lipidnih nanočestica, sastavljenih od masnih kiselina iz mikroemulzija. Oba sistema za isporuku lekovitih supstanci patentom su zaštićena 1993. godine. Treći nezavistan patent vezan za čvrste lipidne nanočestice, je iz 1994. godine, a nosioci patenta su prof. Kirsten Westesen i Brita Siekmann (Westesen i Siekmann, 1998). Nakon toga, bilo je više pokušaja da se formulišu čestice koje se dobijaju iz čvrstih lipida, ali većina pokušaja završila se razvojem sistema koji su stabilni svega nekoliko dana.

Formulacija koloidnih sistema tipa disperzija lipidnih nanočestica, se uprkos naporima različitih istraživača u ovoj oblasti, danas smatra izuzetno komplikovanim zadatkom, pre svega zbog raznovrsnosti i ograničenog poznavanja strukture ovih nosača. Među istraživačima u ovoj oblasti, dugi niz godina dominirao je stav da je aspekt fizičke stabilnosti od presudnog značaja. Rezultati eksperimentalnog rada u tom pravcu utemeljili su ovaj stav, ali su istovremeno naveli istraživače na razmišljanje vezano za aspekt bezbednosti. Priroda i koncentracija stabilizatora, u tom kontekstu, smatraju se

najvažnim činiocima. Prema literaturnim navodima za stabilizaciju lipidnih nanočestica najčešće se koriste polimerni i nejonski (polietoksilovani) surfaktanti. Polietoksilovani surfaktanti pokazuju dobru funkcionalnost u stabilizaciji lipidnih nanočestica (Hou i sar., 2003; Lim i sar., 2004). Međutim, u toku proizvodnje ovih surfaktanata može doći do obrazovanja toksične komponente, dioksana, koja je neprihvatljiva čak i u malim količinama zbog svoje karcinogenosti (Tadros, 2005). Pored toga, ovi surfaktanti podležu oksidaciji, čak i u uslovima skladištenja na sobnoj temperaturi (Bergh i sar., 1997; Karlberg i sar., 2003). Mehanizam oksidacije je formiranje hidroperoksida, kao primarnih oksidacionih proizvoda, potom formaldehida, alkilovanih aldehida i ostalih karbonilnih jedinjenja, koja dovode do iritacije kože (Bergh i sar., 1997; Bergh i sar., 1998a; Bergh i sar., 1998b; Karlberg i sar., 2003). Kao alternativa ovim surfaktantima, pažnju istraživača danas sve više privlače bezbedniji surfaktanti, sa nižim potencijalom za iritaciju kože, iz grupe nejonskih neetoksilovanih surfaktanata, koji se u literaturi označavaju terminom polihidroksilni surfaktanti. Surfaktanti iz navedene grupe dobijaju se kondenzacionom reakcijom jedinjenja polihidroksilne strukture (saharoza, glukoza, glicerol) sa masnim kiselinama/masnim alkoholima. U toku proizvodnje polihidroksilnih surfaktanata ne dolazi do etoksilacije, što se pozitivno odražava na njihovu kompatibilnost sa kožom, te se ovi surfaktanti u literaturi označavaju terminom „prijatelji kože” (engl. *“skin friendly”*) (Tadros, 2005). Pored povoljnih dermatoloških osobina, polihidroksilni surfaktanti privlače veliku pažnju i zbog specifičnih fizičko-hemijskih osobina. Fazne promene u sistemima koji sadrže ove surfaktante, manje su podložne uticaju temperature od sistema koji sadrže polietoksilovane surfaktante (Chai i sar., 2003). Usled toga, dehidratacija hidroksilne grupe, u molekulu polihidroksilnih surfaktanata, je daleko slabija od dehidratacije etarske grupe u molekulu polietoksilovanih surfaktanata (Schmid i Tesmann, 2001). Stoga se polihidroksilnim surfaktantima može dati prednost u formulaciji sistema za isporuku lekovitih supstanci, čija priprema se izvodi na povišenoj temperaturi, među kojima su i lipidne nanočestice. Ovakvo ponašanje polihidroksilnih surfaktanata objašnjava se prisustvom velikog broja hidroksilnih grupa u molekulu, koje obezbeđuju jake vodonične veze sa vodom. Polihidroksilni surfaktanti su, takođe, manje osetljivi na promene pH vrednosti i prisustvo elektrolita od polietoksilovanih surfaktanata (Söderman i Johanson, 1999). Stoga, ovi surfaktanti otvaraju mogućnosti razvoja

sistema za isporuku lekova, koji bi bili stabilniji od sistema na bazi polietoksilovanih surfaktanata. Polihidroksilni surfaktanti pokazuju veću tendenciju zadržavanja na međufazi ulje/voda, u odnosu na polietoksilovane surfaktante, kao i veću sposobnost za snižavanje međupovršinskog napona između ove dve faze (Holmberg i sar., 2002), što može biti potencijalni pristup ka smanjenju ukupne koncentracije surfaktanata, potrebne za stabilizaciju sistema tipa ulje/voda, uključujući i lipidne nanočestice. Međutim, i pored svih prethodno navedenih prednosti, efikasnost polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji lipidnih nanočestica nedovoljno je okarakterisana u dosadašnjim istraživanjima.

U standardnoj (klasičnoj) terapiji inflamatornih bolesti kože, kao što je atopijski dermatitis/ekcem, najčešće propisivani lekovi od strane dermatologa su kortikosteroidi. Dermatokortikosteroidi brzo dovode do smirivanja promena na koži, koja je zahvaćena atopijskim dermatitisom, ali s obzirom na hroničan tok bolesti, njihova dugotrajna primena može dovesti do niza lokalnih i sistemskih neželjenih efekata. Rizik za pojavu neželjenih efekata, naročito je izražen kod osetljivih osoba i dece. Takođe, određena grupa pacijenata ne reaguje dobro na konvencionalnu terapiju, te s tim u vezi, postoji potreba za efikasnijim lekovima koji bi se mogli koristiti u terapiji atopijskog dermatitisa u situacijama, kada primena konvencionalne terapije nije moguća ili ne daje očekivane rezultate (Bornhovd i sar., 2000). Inhibitori kalcineurina, koji predstavljaju nesteroidne imunosupresive, u tom kontekstu privlače sve veću pažnju. Ovi lekovi suprimiraju inflamaciju na sličan način kao kortikosteroidi i jednako su efikasni kao kortikosteroidi srednje jačine delovanja. Za razliku od kortikosteroida, nakon njihove primene nije uočena pojava atrofije kože (Alomar i sar., 2004). Jedno od objašnjenja, koje se može pronaći u literaturi je da inhibitori kalcineurina ne deluju na endotelne ćelije, keratinocyte i fibroblaste, tj. ne utiču na sintezu kolagena (Kikuchi i Tagami, 2002; Kyllönen i sar., 2004; Reitamo i sar., 1998). Takođe, u literaturi se navodi podatak, da ovi lekovi imaju selektivniji način delovanja od dermatokortikosteroida. Dok sa jedne strane dermatokortikosteroidi menjaju transkripciju gena u ćelijama tj. imaju raznovrsne celularne efekte (Almawi i Melemedijan, 2002), inhibitori kalcineurina, specifično deluju na ključne imunološke mehanizme, koji se nalaze u osnovi inflamatornih bolesti kože, odnosno primarno deluju na ćelije u lezijama kože (Nghiem i sar., 2002). Jedan od kandidata iz grupe inhibitora kalcineurina, koji je

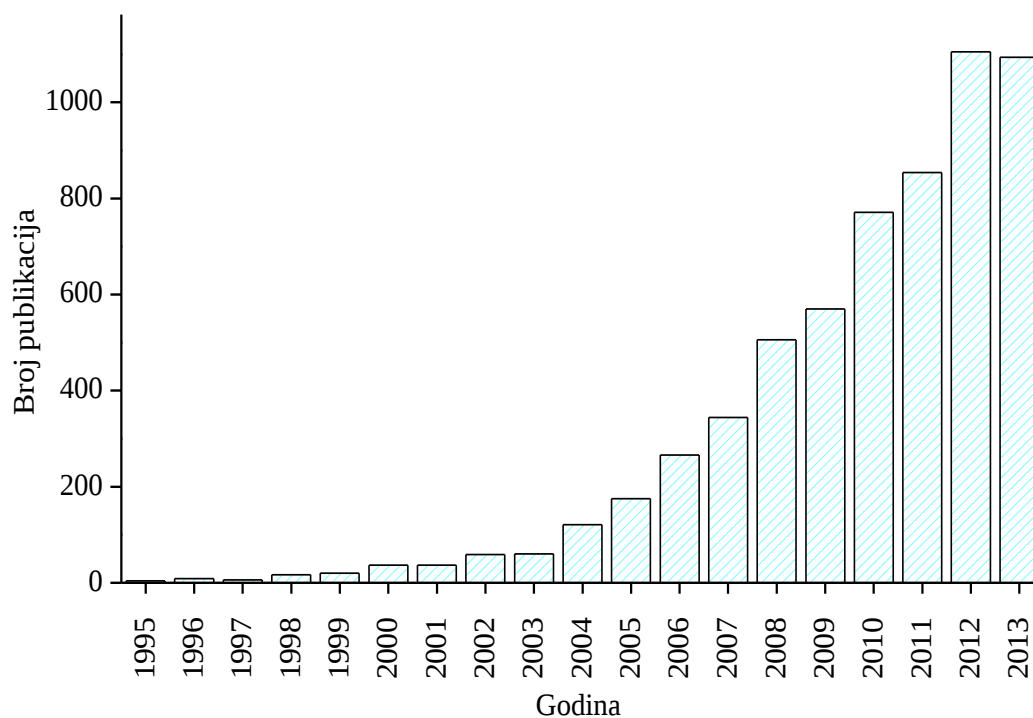
odobren od strane Evropske agencije za lekove (engl. *European Medicines Agency, EMA*) i Američke uprave za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) u lečenju atopijskog dermatitisa kod dece, starije od 2 godine i odraslih pacijenata je takrolimus. Takrolimus je na tržištu dostupan u obliku masti (Protopic[®], Astellas, Irska) u kojoj je lekovita supstanca inkorporirana u podlogu, koja se sastoji od tečnog parafina, čvrstog parafina, propilenkarbonata, belog mekog parafina i belog pčelinjeg voska. S obzirom da ova formulacija ne sadrži efikasan mehanizam za povećanje permeacije, niti jak ubrzivač penetracije, dermalna raspoloživost takrolimusa, još uvek je nedovoljna i veoma varijabilna. Sa druge strane, fizičko-hemijske osobine ovog makrolidnog laktone u pogledu molekulske mase (822,05 g/mol), lipofilnosti ($\log P$ $3,96 \pm 0,83$), hemijske strukture i rastvorljivosti u vodi (~ 2 $\mu\text{g/ml}$) otežavaju razvoj formulacija lekova za lokalnu primenu, unazad dugi niz godina. Jedan od novijih pristupa u popravljaju penetracije lipofilnih lekovitih supstanci u *stratum corneum* i dublje slojeve kože, jeste i razvoj koloidnih lipidnih nosača. U dosadašnjim *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima, uočeno je povećanje obima i penetracije takrolimusa iz koloidnih modifikovanih nanolipidnih nosača, a komparativne studije pokazale su da ovi nosači mogu biti efikasniji u poređenju sa Protopic[®] masti (Pople i Singh, 2010, 2011, 2012, 2013). Međutim, potencijal lipidnih nanočestica kao nosača za dermalnu isporuku takrolimusa, do danas nije istražen. Otuda proizilazi potreba, da se sagleda mogućnost inkorporiranja takrolimusa u lipidne nanočestice, i da se istovremeno ispita opravdanost i funkcionalnost primene nejonskih polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji lipidnih nanočestica sa takrolimusom, sa ciljem uvođenja novog koncepta u razvoju nosača lekovitih supstanci za primenu na koži, zahvaćenoj atopijskim dermatitisom.

2. Opšti deo

2.1. Lipidne nanočestice kao potencijalni nosači za lokalnu primenu lekovitih supstanci

2.1.1. Definicija, osobine i vrste lipidnih nanočestica

Lipidne nanočestice, kao potencijalni nosači lekovitih supstanci, predmet su intenzivnih i kontinuiranih istraživanja, kako na akademskom nivou tako i od strane farmaceutske industrije, unazad dugi niz godina. Veliki broj formulacija sa lipidnim nanočesticama našao je svoje mesto u kozmetičkim proizvodima. Broj aktuelnih studija i publikacija u kojima se razmatra mogućnost primene lipidnih nanočestica kao potencijalnih nosača lekovitih i kozmetički aktivnih supstanci u stalnom je porastu (slika 2.1.).



Slika 2.1. Kumulativni broj publikacija o lipidnim nanočesticama od 1995 - 2013. godine (u skladu sa pretraživanjima koja su izvedena na PubMed-u koristeći termin „lipidne nanočestice”)

Iako do danas ne postoji jedinstvena definicija, opšteprihvaćeno je da se terminom lipidne nanočestice označavaju vodene disperzije koloidnih čestica sa čvrstim lipidnim matriksom, koji je prekriven odgovarajućim stabilizatorom (Bunjес, 2011; Lucks i

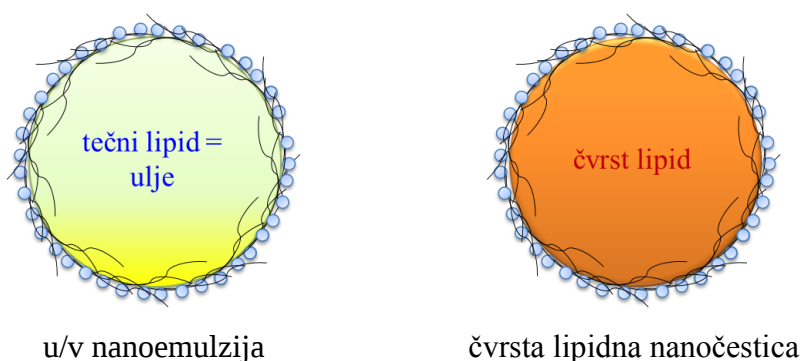
Müller, 1996; Müller i sar., 2011). Veličina lipidnih nanočestica je od 40 - 1000 nm, najčešće između 150 i 300 nm (Müller i sar., 2011; Pardeike i sar. 2009). Ekscipijensi koji se koriste u formulaciji lipidnih nanočestica su bezbedni za farmaceutsku primenu i oficinalni u Evropskoj i/ili Američkoj farmakopeji. Matriks lipidnih nanočestica je u čvrstom agregatnom stanju na sobnoj temperaturi i sastoji se od biodegradabilnih i/ili biokompatibilnih lipida. Terminom lipid u najširem smislu se označavaju (i) zasićeni trigliceridi (pr. gliceril tristearat), (ii) parcijalni gliceridi (pr. gliceril palmitostearat), (iii) masne kiseline (pr. stearinska kiselina), (iv) steroidi (pr. holesterol), (v) voskovi (pr. cetil palmitat), (vi) parafini (pr. čvrsti parafin) i (vii) masni alkoholi (pr. cetil alkohol) (Mäder i Mehnert, 2005; Parhi i Suresh, 2010). Svi prethodno pomenuti lipidi pokazuju visok stepen kompatibilnost sa kožom, tj. to su ekscipijensi koji se koriste dugi niz godina u razvoju kozmetičkih i farmaceutskih preparata za kožu. Rezultati prethodnih istraživanja ukazuju da se za stabilizaciju lipidnih nanočestica najčešće koriste jonski, nejonski i polimerni surfaktanti (pr. natrijum lauril sulfat, polisorbati, Poloxamer® 188). U dosadašnjim ispitivanjima, takođe je uočeno da je kombinacija surfaktanata superiornija u sprečavanju aglomeracije čestica u odnosu na pojedinačne surfaktante (Mäder i Mehnert, 2005).

Zbog prisustva čvrstog lipidnog matriksa, neki autori već dugi niz godina smatraju da lipidne nanočestice imaju određene prednosti u odnosu na koloidne nosače sa lipidnim matriksom koji je u tečnom ili u tečno-kristalnom stanju (Bunjes i Siekmann, 2006; Westesen i Siekmann, 1997). Između ostalog, kada je reč o prednostima čvrstog lipidnog matriksa, u literaturi se navodi da on može da obezbedi bolju fizičku i hemijsku stabilnost lekovitih supstanci (Bunjes, 2005). U dosadašnjim ispitivanjima uočeno je da lipidne nanočestice mogu da budu efikasnije u popravljanju hemijske stabilnosti nekih kozmetički aktivnih materija (retinoidi, askorbilpalmitat) u poređenju sa emulzijama (Jenning i Gohla, 2001) i u/v i v/u mikroemulzijama (Kristl i sar., 2003). Ukoliko je lekovita supstanca distribuirana unutar matriksa lipidne nanočestice, pokretljivost supstance je u znatnoj meri smanjena. Dakle, oslobađanje lekovite supstance iz čvrstih čestice se može kontrolisati, od veoma brzog do veoma sporog, izborom komponenata koje ulaze u sastav lipidnog matriksa (Bunjes i Siekmann, 2006). Upotreba čvrstog matriksa umesto tečnog, takođe se smatra interesantnim pristupom za

smanjenje mogućnosti otpuštanja model lekovite supstance, odnosno povećanje kapaciteta opterećenja lekovitom supstancom (Müller i sar., 2011).

Istraživačke aktivnosti u oblasti lipidnih nanočestica na samom početku uglavnom su bile usmerene na farmaceutske nedermalne puteve primene, tj. parenteralni (Blasi i sar., 2007; Joshi i Müller, 2009; Wissing i sar., 2004) i peroralni put primene (Muchow i sar. 2008; Müller i sar., 2006; Sarmiento i sar., 2007). Međutim, tokom poslednjih nekoliko godina, lipidne nanočestice se intenzivno proučavaju kao nosači lekovitih supstanci za primenu na koži (Doktorovova i sar., 2010; Müller i sar., 2002a; Müller i sar., 2007; Nikolić i sar., 2011; Pardeike i sar., 2009; Pardeike i sar., 2010; Pardeike i sar., 2011), zbog toga što koža pruža niz pogodnosti za primenu ovih nosača. Pozitivne osobine lipidnih nanočestica rezultirale su uvođenjem na tržište velikog broja kozmetičkih proizvoda. Uzimajući u obzir podatak da su se kozmetički proizvodi sa lipidnim nanočesticama na tržištu pojavili u kraćem vremenskom periodu od perioda koji je bio potreban za uvođenje na tržište kozmetičkih proizvoda sa liposomima, intenzivno se na akademskom nivou, ali i od strane industrije, razmatra mogućnost uvođenja lipidnih nanočestica na tržište lekovitih preparata.

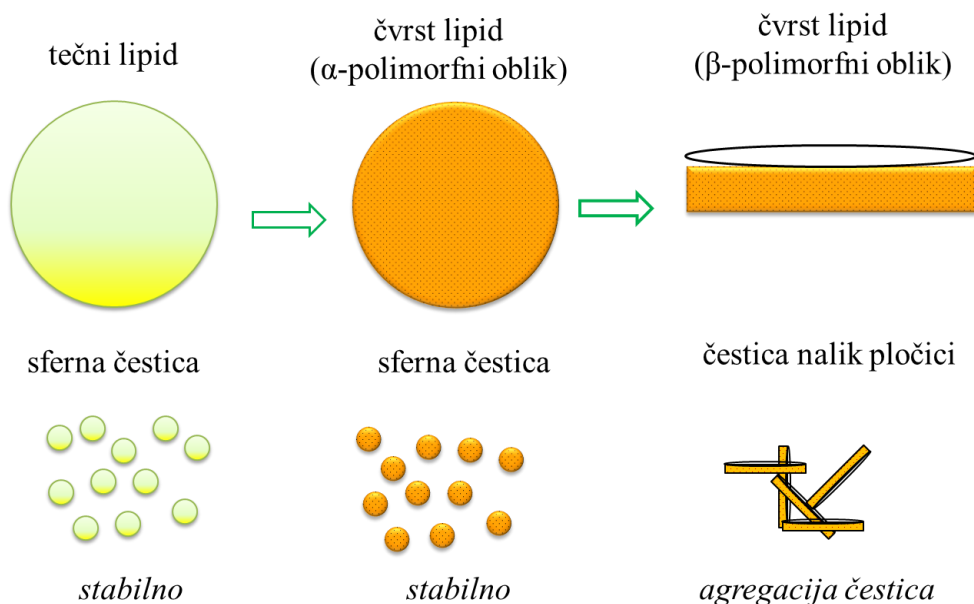
Lipidne nanočestice se mogu podeliti u dve grupe: čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači. Čvrste lipidne nanočestice se smatraju prvom generacijom lipidnih nanočestica. Dobijene su zamenom tečnog lipida (ulje) iz u/v nanoemulzija čvrstim lipidom/smešom čvrstih lipida (slika 2.2.) (Lucks i Müller, 1996).



Slika 2.2. Shematski prikaz strukture u/v nanoemulzije i čvrste lipidne nanočestice

Čvrste lipidne nanočestice se sastoje od 0,1 - 30 % (m/m) lipida dispergovanog u vodenom medijumu koji sadrži 0,5 - 5 % (m/m) surfaktanta kao stabilizatora (Pardeike i sar., 2009). Potencijalni nedostaci čvrstih lipidnih nanočestica su nizak kapacitet

opterećenja lekovitom supstancom i isključivanje supstance iz lipidnog matriksa tokom čuvanja. Naime, čvrste lipidne nanočestice se sastoje samo od čvrstih lipida i direktno nakon pripreme barem deo čestica kristališe u visoko energetskej modifikaciji (α ili β') koja ima nesavršenu kristalnu rešetku (Müller i sar., 2007). Tokom čuvanja, ova modifikacija se transformiše u nisko energetskej, β modifikaciju, koja ima veomuređenu kristalnu rešetku sa malim brojem „nesavršenosti” (Mehnert i Mäder, 2012). Zbog visokog stepena uređenosti, vremenom dolazi do isključivanja lekovite supstance iz lipidnog matriksa (Pardeike i sar., 2009; Wissing i Müller, 2002). Dodatni nedostaci čvrstih lipidnih nanočestica su težnja ka agregaciji i formiranju gelova. Široko prihvaćena teorija je da se agregacija dešava zbog toga što lipidna faza prolazi polimorfnu transformaciju iz termodinamički nestabilne α -modifikacije u stabilnu β -modifikaciju. Transformacija sfernih čestica u α -modifikaciji u čestice nalik pločicama ili iglicama, (β -modifikacija) ima za rezultat smanjenje koncentracije surfaktanata, koji su potrebni za pokrivanje površine čestica. Novoformirane čestice koje sadrže površine koje nisu pokrivene surfaktantom dolaze u kontakt jedna sa drugom, što vodi njihovoj agregaciji (slika 2.3.) (McClements, 2012; Yang i sar., 2014).



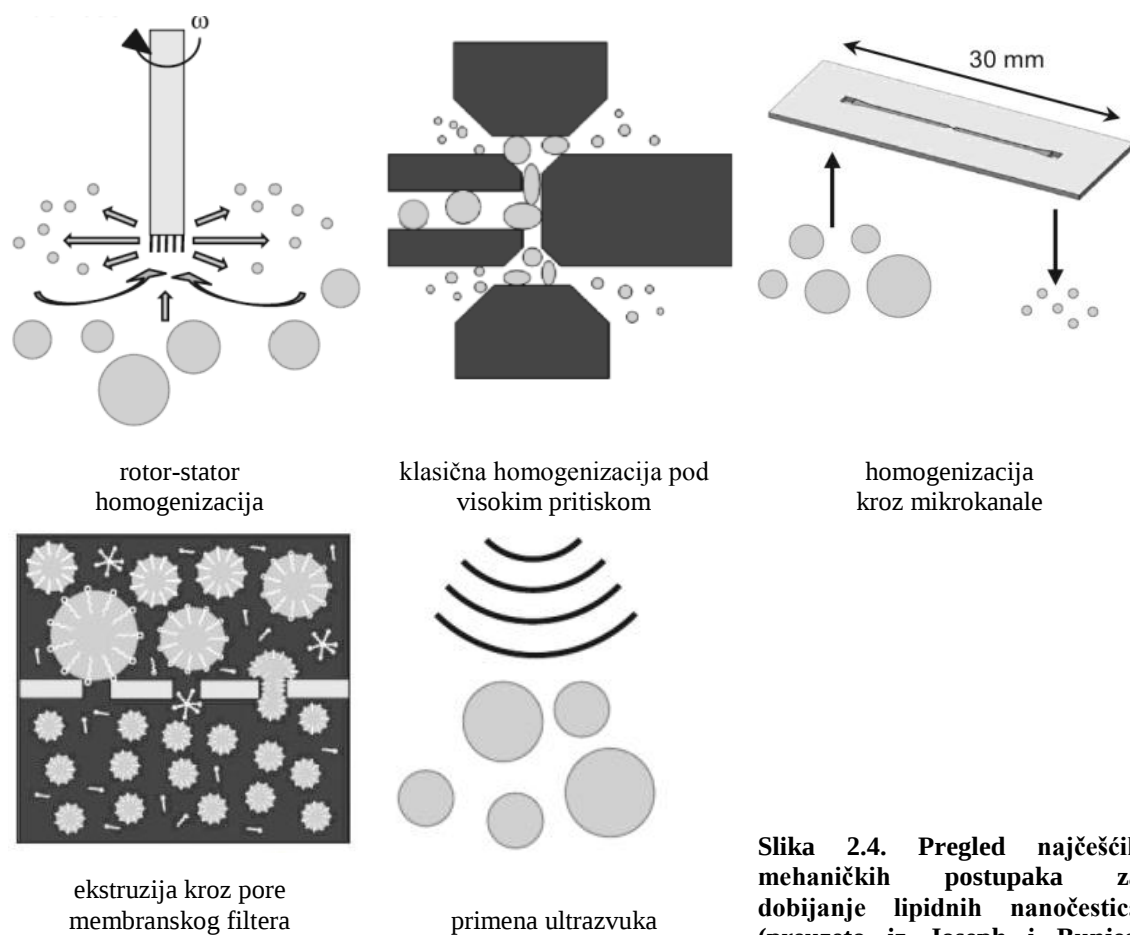
Slika 2.3. Lipidne čestice često prolaze morfološke promene i promene u stabilnosti nakon kristalizacije i polimorfnih transformacija (preuzeto i prilagođeno iz McClements, 2012)

Nedostaci koji su vezani za upotrebu čvrstih lipidnih nanočestica, pre svega nizak kapacitet opterećenja lekovitom supstancom i otpuštanje leka iz lipidnog matriksa čestica tokom čuvanja, doveli su do razvoja nove tehnologije lipidnih nanočestica (Müller i sar. 2002a; Radtke i sar., 2005). Prof Müller i sar. su predložili upotrebu smeše lipida, koji ne stvaraju uređenu kristalnu rešetku. Na temelju ovih postavki, razvijena je druga generacija lipidnih nanočestica, tzv. nanostrukturirani lipidni nosači (engl. *Nanostructured Lipid Carriers, NLC*). Da bi se dobio lipidni matriks koji će ostati u čvrstom agregatnom stanju na temperaturi tela, Müller i sar. su predložili mešanje čvrstog i tečnog lipida, koji ne stvaraju uređenu kristalnu rešetku (Pardeike i sar., 2009). Mešanjem čvrstog lipida sa tečnim lipidom u odnosu 70:30 do 99,9:0,1 stvara se tzv. „nanostrukturirani” lipidni matriks. Manje uređena kristalna rešetka lipida sa većim stepenom „nesavršenosti” ostavlja prostor u koji se može uklopiti aktivna supstanca (Müller i sar., 2002a, 2002b). Aktivna supstanca u ovom slučaju ostaje „zarobljena” unutar lipidnog matriksa, zbog toga što se povećava prostor unutar matriksa potreban za njeno inkorporiranje (Müller i sar., 2011). Na taj način se može povećati kapacitet opterećenja nosača aktivnom supstancom, tj. smanjiti verovatnoća isključivanja supstance iz lipidnog matriksa tokom dužeg vremenskog perioda (Mehnert i Mäder, 2012; Müller i sar. 2002a). Pored toga, nekolicina istraživačkih grupa iznela je pretpostavku da se upotrebom smeše čvrstih i tečnih lipida u velikoj meri može smanjiti agregacija čestica. Mehanizam stabilizacije čestica na ovaj način do danas nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da dodatak tečnog lipida usporava promene oblika čestica (iz sfernog u štapičast), te na taj način smanjuje i mogućnost njihove agregacije. Druga pretpostavka je da kapi tečnog lipida koje oblažu površinu čestica omogućavaju slobodno kretanje molekula surfaktanta u novostvorenoj međufazi čvrst lipid-vodena faza i tako stabilizuju čestice (Yang i sar., 2014).

2.1.2. Postupci dobijanja lipidnih nanočestica: pregled postojećih tehnologija

U literaturi se danas može naći veliki broj različitih postupaka za dobijanje lipidnih nanočestica. Izbor određenog postupka, zavisi od brojnih faktora, od kojih se najvažnijim smatraju: veličina čestica, fizičko-hemijske osobine i stabilnost lekovite supstance koju treba inkorporirati, fizička stabilnost sistema, kinetika oslobađanja

lekovite supstance, toksičnost povezana sa reziduama u gotovom proizvodu i raspoloživa oprema u laboratorijama i u industriji (Mäder i Mehnert, 2005; Souto i Müller, 2009). U principu, moguće je razlikovati dva osnovna pristupa/postupka u dobijanju lipidnih nanočestica: mehanički (engl. *top-down*) i hemijski (engl. *bottom-up*) pristup. *Top-down* postupak zasniva se na primeni spoljašnje energije na čestice većih dimenzija i dobijanje čestica nanometarskih dimenzija. Hemijski postupci zasnivaju se na hemijskim reakcijama i/ili samoudruživanju molekula u agregate nanometarskih veličina. Na slici 2.4. prikazani su neki od najčešćih mehaničkih postupaka, koji se danas koriste za dobijanje lipidnih nanočestica.



Slika 2.4. Pregled najčešćih mehaničkih postupaka za dobijanje lipidnih nanočestica (preuzeto iz Joseph i Bunjes, 2013)

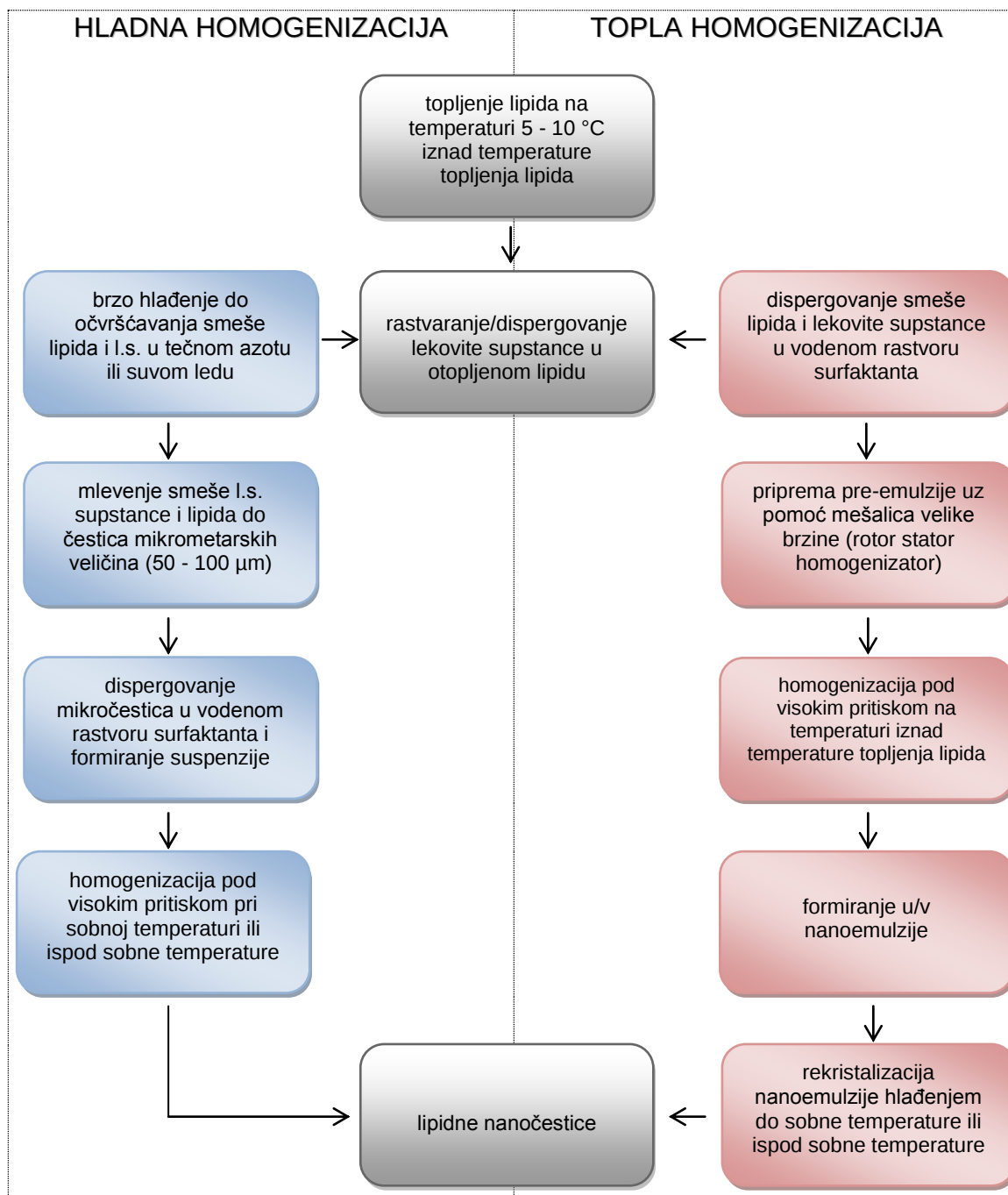
2.1.2.1. Homogenizacija pod visokim pritiskom

Homogenizacija pod visokim pritiskom se dugi niz godina smatra tehnikom izbora za dobijanje lipidnih nanočestica (Müller i Dingler, 1998). Ovim postupkom, uz adekvatan izbor formulacionih i procesnih parametara, moguće je dobiti čestice malog dijametra i uske distribucije po veličini (Lippacher i sar., 2001; Mehnert i Mäder, 2012; Muchow i sar., 2008). Postupak homogenizacije pod visokim pritiskom, takođe, omogućava prevođenja sa laboratorijskog na industrijski nivo, što je jedan od preduslova za uvođenje lipidnih nanočestica na tržište (Jenning i sar., 2002).

Za pripremu disperzija lipidnih nanočestica, homogenizacija pod visokim pritiskom se može izvesti na visokoj temperaturi (postupak tople homogenizacije pod visokim pritiskom), ili na sobnoj temperaturi, tj. ispod sobne temperature (postupak hladne homogenizacije pod visokim pritiskom) (slika 2.5.) (Pardeike i sar., 2009).

U postupku tople homogenizacije pod visokim pritiskom, lipid se topi na temperaturi koja je oko 5 - 10 °C iznad temperature topljenja lipida, nakon čega se aktivna supstanca rastvara ili disperguje u otopljenom lipidu. Smeša lipida i aktivne supstance se uz mešanje disperguje u vodenom rastvoru surfaktanta, koji je prethodno zagrejan na identičnu temperaturu, kao i lipid. Dobijena preemulzija, se potom homogenizuje na *piston-gap* homogenizatoru, pri pritisku od 200 - 500 bara, uz primenu 3 - 5 ciklusa homogenizacije (Parhi i Suresh, 2010; Souto i Müller, 2009). Od izuzetnog je značaja da se tokom čitavog procesa homogenizacije, temperatura održava najmanje 10 °C iznad temperature topljenja lipida, kako bi se sprečila rekristalizacija (McClements i sar., 2007). Po završenoj homogenizaciji pod visokim pritiskom, dobijena topla nanoemulzija se hladi do sobne temperature. Na sobnoj temperaturi, dolazi do rekristalizacije lipida i formiranja lipidnih nanočestica. Mala veličina i velika površina čestica, u fizičkom smislu, smatraju se energetski nestabilnim stanjem, koje ima za posledicu snižavanje temperature kristalizacije lipida u nanočesticama u odnosu na lipid u *bulk* stanju (Bunjes i sar., 1996; Hunter, 1987; Westesen i sar., 1997). Sa druge strane, neki lipidi koji ulaze u sastav lipidnog matriksa nanočestica (pr. gliceril trilaurat) teško kristalizuju na sobnoj temperaturi. Usled odsustva kristalizacionih centara unutar dispergovanih kapi (homogena nukleacija), pri upotrebi ovih lipida dolazi do stvaranja superohlađenih otopina, a ne čvrstih lipidnih nanočestica (Bunjes, 2011; Bunjes i Koch, 2005). Kada je reč o lipidima sa niskom temperaturom topljenja, može biti neophodno

da se nakon homogenizacije pod visokim pritiskom, nanoemulzija ohladi do temperature, koja je niža od sobne temperature, kako bi proces rekristalizacije otpočeo (Jenning i sar., 2000). Stoga se kontrolisana brzina hlađenja nakon homogenizacije smatra kritičnim parametrom za dobijanje čvrstih lipidnih nanočestica (Bunjes i sar., 1998; Bunjes i Westesen, 2001).



Slika 2.5. Shematski prikaz postupka dobijanja lipidnih nanočestica tehnikom tople i hladne homogenizacije pod visokim pritiskom (preuzeto i prilagođeno iz Pardeike i sar., 2009)

Postupak hladne homogenizacije pod visokim pritiskom, se izvodi na sobnoj temperaturi ili ispod sobne temperature i zbog toga se ponekad označava terminom mlevenje suspenzije. Ovaj postupak je razvijen da bi se: (a) smanjila mogućnost degradacije termolabilnih aktivnih supstanci; (b) smanjila mogućnost preraspodele hidrofilne aktivne supstance iz lipidne u vodenu fazu i (c) izbegao korak rekristalizacije nanoemulzije nakon homogenizacije, tokom koga može doći do obrazovanja superohlađenih otopina.

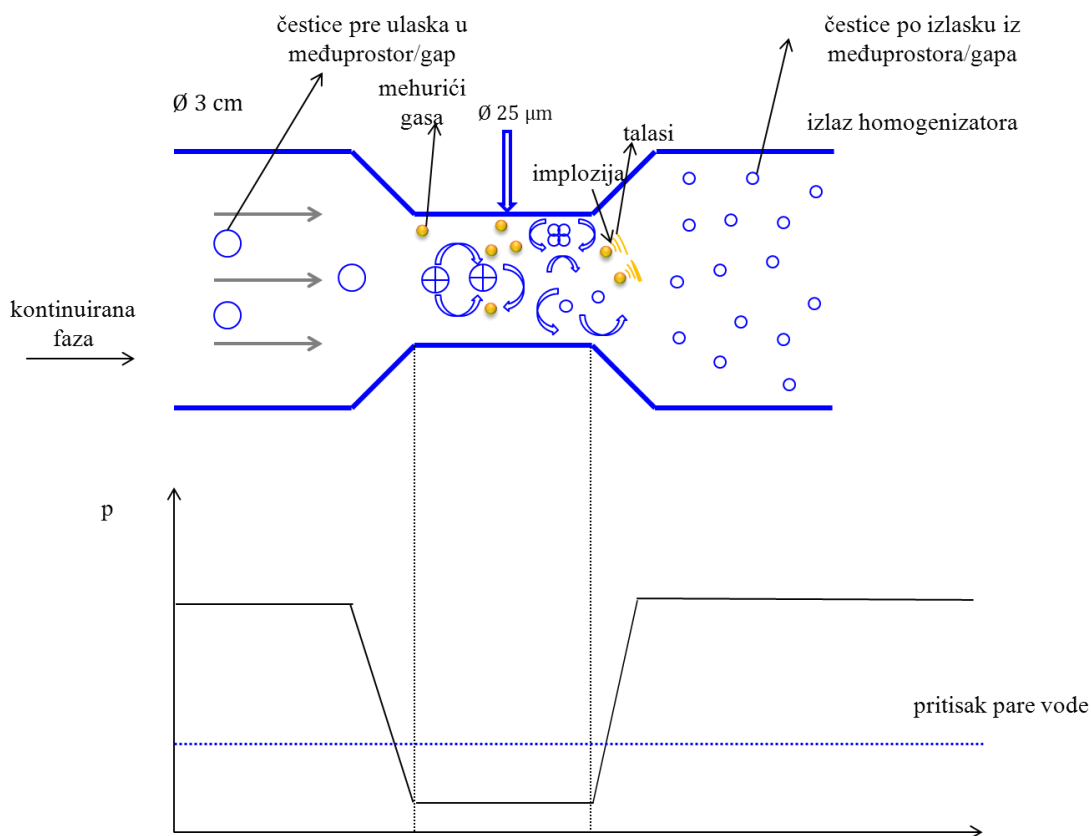
Prvi korak u pripremi disperzija lipidnih nanočestica postupkom hladne homogenizacije isti je kao i u postupku tople homogenizacije pod visokim pritiskom. Dakle, najpre se lipid zagreva na temperaturu koja je 5 - 10 °C iznad temperature topljenja lipida. Nakon toga, aktivna supstanca se rastvara ili disperguje u otopljenom lipidu. Smeša lekovite supstance i lipida, koja se dobije brzo se hladi pomoću tečnog azota ili suvog leda. Nakon hlađenja, dobijena smeša se melje u odgovarajućim mlinovima do čestica mikrometarskih veličina (50 - 100 μm). Dobijene mikročestice, zatim se disperguju u ohlađenom rastvoru stabilizatora, pri čemu se dobija tzv. pre-suspenzija. Dobijena pre-suspenzija se zatim podvrgava homogenizaciji pod visokim pritiskom, na sobnoj temperaturi ili ispod sobne temperature, pri čemu se mikročestice prevode u čestice nanometarskih veličina. U odnosu na postupak tople homogenizacije pod visokim pritiskom, pri postupku hladne homogenizacije pod visokim pritiskom, dobijaju se čestice većeg dijametra i većeg indeksa polidisperziteta. U toku postupka hladne homogenizacije pod visokim pritiskom, izlaganje lekovite supstance i lipida visokoj temperaturi je manje, ali se ne može u potpunosti izbeći, zbog toga što je u prvom koraku pripreme formulacije neophodno otopiti lipid (Parhi i Suresh, 2010).

Teorijski princip homogenizacije pod visokim pritiskom, shematski je prikazan na slici 2.6. Princip smanjenja veličine čestica, tokom homogenizacije objašnjava se Bernoullijevom jednačini, prema kojoj je zbir statičkog i dinamičkog pritiska u sistemu konstantan.

$$p_s + \frac{\rho v^2}{2} = \text{konstanta} \quad \text{jednačina 2.1.}$$

gde je p_s statički pritisak, ρ je gustina, v je brzina i $\frac{\rho v^2}{2}$ je dinamički pritisak.

Homogenizator pod visokim pritiskom, se sastoji od cilindra u koji se stavlja proizvod koji se homogenizuje, predkomore, međuprostora u kome se vrši homogenizacija, ventila i klipne pumpe koji obezbeđuju visok pritisak (slika 2.6.) (Jahnke, 1998; Keck, 2006; Müller i Böhm, 1998).



Slika 2.6. Princip rada homogenizatora Micron LAB 40 i promene pritiska u ventilu tokom homogenizacije (preuzeto i prilagođeno iz Müller i Böhm, 1998)

U toku homogenizacije pod visokim pritiskom, klip pod pritiskom deluje na disperziju i potiskuje je iz predkomore u međuprostor. Dijametar međuprostora, zavisi od pritiska u toku homogenizacije i obično se kreće u intervalu od 3 - 25 µm (Parhi i Suresh, 2010). Visok pritisak u toku homogenizacije ubrzava tečnost pri prolasku kroz međuprostor, usled čega dolazi do naglog porasta dinamičkog pritiska i pada statičkog pritiska. U jednom trenutku, statički pritisak se smanji ispod pritiska pare tečnosti, tako da tečnost počinje da ključa i obrazuju se mehurići gasa. Mehurići gasa u jednom trenutku implodiraju i stvaraju talase, u međuprostoru homogenizatora, što potpomaže, zajedno sa silama smicanja smanjenje veličine čestica. Proces implodizacije u literaturi se označava

terminom kavitacija (Holley, 1984). Na osnovu svega prethodno izloženog, može se zaključiti da sile kavitacije, koje nastaju usled naglog smanjenja statičkog pritiska tokom procesa homogenizacije i sile smicanja koje postoje u međuprostoru dovode do smanjenja veličine čestica (Parhi i Suresh, 2010).

Najzastupljeniji homogenizatori pod visokim pritiskom koji se koriste u laboratorijama su: Micron Lab 40 (LAB 40) (APV Deutschland GmbH, Nemačka), EmulsiFlex-C3, EmulsiFlex-C5 (Avestin, Kanada) i PANDA (GEA Niro Soavi, SAD (Müller i sar., 2011)). U preformulacionim studijama, sa lekovitim supstancama koje imaju visoku cenu, za pripremu malih količina uzoraka koristi se i uređaj EmulsiFlex-B3 (Avestin, Kanada). Minimalna zapremina uzorka koji se može pripremiti u ovom homogenizatoru je 0,5 ml (Liedtke i sar., 2000). Međutim, pritisak u toku homogenizacije se ne može kontrolisati tako precizno kod ovog homogenizatora, kao kod homogenizatora većeg kapaciteta (Müller i sar., 2011). Micron LAB 40 (APV Deutschland GmbH, Unna, Nemačka) (slika 2.7.a) je *piston-gap* homogenizator opremljen sa jednim klipom i jednim ventilom. U toku homogenizacije, vodena disperzija se potiskuje kroz klip homogenizatora čiji je dijametar $\sim 25 \mu\text{m}$ (pri pritisku od 500 bara). Proces je diskontinuiran, što znači da se homogenizovani proizvod skuplja u kontejner koji se potom prazni, a disperzija se vraća u centralni cilindar za naredni ciklus homogenizacije (Dingler i Gohla, 2002). Ovaj proces traje dugo, ali sve prednosti koje on ima, mogu da nadomeste ovaj mali nedostatak (Shegokar i sar., 2011). Minimalna zapremina uzorka, koja se može homogenizovati korišćenjem Micron LAB 40 je 20 ml pri pritisku od 100 - 1500 bar (Jenning i sar., 2002).

EmulsiFlex C-3 (Avestin, Mannheim, Nemačka) (slika 2.7.b) je takođe *piston-gap* homogenizator, opremljen sa jednim klipom i ventilom koji održava konstantan pritisak. Pritisak u toku homogenizacije može se podešavati od 50 - 30 000 psi, tj. približno 35 - 2000 bara. Minimalna zapremina uzoraka koja se može homogenizovati u ovom homogenizatoru je 10 ml. Priprema vodenih disperzija lipidnih nanočestica na EmulsiFlex-u C-3, može da se izvede diskontinuiranim ili kontinuiranim postupkom. Za razliku od diskontinuiranog postupka, kod kontinuiranog načina homogenizacije, proizvod se pod uticajem sile gravitacije vraća u kontejner. Očigledan nedostatak ovog postupka, je mešanje homogenizovanog sa nehomogenizovanim uzorkom, pa se stoga u literature navodi da je statistički potrebno neko vreme da proizvod koji se homogenizuje

kruži, kako bi se osiguralo da 99,9 % čestica prođe najmanje dva puta kroz homogenizator.



(a)



(b)

Slika 2.7. Lab-scale piston gap homogenizatori: (a) Micron LAB 40 ((APV Deutschland GmbH, Unna, Nemačka) i (b) EmulsiFlex C-3 (Avestin, Mannheim, Nemačka)

2.1.2.2. Industrijski postupak dobijanja lipidnih nanočestica

U industriji, za dobijanje lipidnih nanočestica koriste se homogenizatori srednjeg i većeg kapaciteta, kao što su Micron LAB 60 (APV Deutschland GmbH, Unna, Nemačka), APV Gaulin 5.5 (APV Deutschland GmbH, Unna, Nemačka) i Avestin C50 (Avestin Inc., Ottawa, Kanada). Na modifikovanom LAB 60 homogenizatoru (APV Deutschland GmbH, Unna, Nemačka) (slika 2.8.a) mogu se pripremiti disperzije lipidnih nanočestica u količini od 2 - 10 kg (2 - 10 l). LAB 60 je opremljen kontejnerom zapremine 10 l, u koji se stavlja proizvod koji se homogenizuje i kontejnerom iste zapremine u koji se sakuplja homogenizovani proizvod. Za razliku od LAB 40, kod LAB 60, disperzija prolazi kroz dva homogenizatorska ventila, prvi glavni ventil u kome se stvara pritisak od 500 bara i drugi ventil u kome je pritisak od 50 bara, što stvara povratni pritisak koji redisperguje kapi koje su koalescirale. Postupak pripreme lipidnih nanočestica svodi se na dodavanje rastopa lipida i lekovite supstance u posudu u kojoj se nalazi vodeni rastvor surfaktanta zagrejan na odgovarajuću temperaturu, pri čemu dolazi do obrazovanja grube pre-emulzije. Pre-emulzija prolazi kroz LAB 60 homogenizator i homogenizovani proizvod se sakuplja u sabirni sud. Sabirni sud

(kontejner) (i u diskontinuiranom postupku, kontejner u koji se stavlja uzorak koji se homogenizuje) i cevi koje povezuju ove sudove, zagrevaju se pomoću vodenog kupatila. Po završetku jednog ciklusa homogenizacije, homogenizovani proizvod se ponovo vraća u kontejner i postupak se ponavlja (Jenning i sar., 2002). Pripremu disperzija na homogenizatoru LAB 60, generalno je moguće izvesti kontinuiranim ili diskontinuiranim postupkom. Pri kontinuiranom postupku, proizvod koji se homogenizuje se vraća direktno pod uticajem sile gravitacije, preko sistema dvostrukih cevi u sabirni sud. Nasuprot tome, pri diskontinuiranom postupku homogenizovani proizvod se sakuplja u odvojeni kontejner. Po završetku prvog ciklusa homogenizacije, homogenizovani proizvod se vraća u kontejner za homogenizaciju i postupak se nastavlja dok se ne izvede potreban broj ciklusa homogenizacije.



(a)



(b)

Slika 2.8. Homogenizatori srednjeg i velikog kapaciteta: (a) Micron LAB 60 (APV Deutschland GmbH, Unna, Nemačka); (b) APV Gaulin 5.5 (APV Deutschland GmbH, Unna, Nemačka) (preuzeto iz Shegokar i sar., 2011)

Za pripremu disperzije lipidnih nanočestica u količini od 2 kg, prednost se daje kontinuiranom postupku homogenizacije u odnosu na diskontinuirani, zbog velike zapremine mrtvih uglova, koja iznosi 0,5 kg. Nasuprot tome, lipidne nanočestice u količini od 10 kg i više, mogu se dobiti samo diskontinuiranim postupkom (Jenning i sar., 2002). Za količine do 50 kg, potrebno je povezati dva homogenizatora u seriji. Prvi homogenizator, treba da obezbedi snabdevanje drugog homogenizatora disperzijom u dovoljnoj meri. U te svrhe, obično se koristi APV Gaulin 5.5 (APV Gaulin, D - Lübek, Nemačka) (slika 2.8.b) kao prvi homogenizator, a LAB 60 kao drugi homogenizator.

APV Gaulin 5.5 ima tri klipa i dva ventila u kojima se izvodi homogenizacija. Kapacitet ovog homogenizatora je 160 l/h (oko 160 kg/h) (Shegokar i sar., 2011). Kontejner u koji se stavlja uzorak, sadrži odgovarajuću mešalicu za pripremu pre-emulzije direktno u tom sudu i još jednu mešalicu kojom se meša disperzija tokom hlađenja i rekristalizacije nanoemulzije. Pošto su dva homogenizatora postavljena jedan iza drugog, homogenizacija u APV Gaulin 5.5 homogenizatoru se izvodi kontinuirano. Na taj način, se smanjuje vreme potrebno za pripremu disperzije, a time i izloženost uzorka visokoj temperaturi. Ovaj tip homogenizatora omogućava i dobijanje disperzije lipidnih nanočestica u struji gasa, npr. azota (Dingler i Gohla, 2002). Pored APV Gaulin 5.5, za pripremu velikih količina disperzija lipidnih nanočestica može se koristiti i homogenizator Avestin C50 (Avestin Inc, Ottava, Kanada). Ovaj homogenizator takođe radi na principu *piston-gap* tehnologije, ali se razlikuje od APV homogenizatora po dizajnu komore za homogenizaciju. Kapacitet homogenizatora Avestin C50 je od 15 - 50 l/h. Homogenizacija u ovom homogenizatoru se može izvoditi kontinuirano i diskontinuirano. Obzirom da Avestin C50 ima manji kapacitet u odnosu na APV Gaulin 5.5, uglavnom se koristi za manje serije ili za formulacije koje sadrže supstance jakog delovanja (Shegokar i sar., 2011).

2.1.3. Inkorporiranje aktivne supstance u lipidne nanočestice i oslobađanje aktivne supstance iz lipidnih nanočestica

Inkorporiranje aktivne supstance u lipidne nanočestice i oslobađanje iz čestica, su važni aspekti koje treba razmotriti pri razvoju formulacije, obzirom da oni u velikoj meri određuju efikasnost ovih sistema. Optimizacija inkorporiranja aktivne supstance u lipidne nanočestice obično se procenjuje preko parametara efikasnost inkapsulacije (engl. *encapsulation efficiency*, *EE*) i kapacitet opterećenja (engl. *loading capacity*, *LC*). *EE* se definiše kao odnos količine aktivne supstance inkorporirane u čestice /adsorbovane na česticu i ukupne količine supstance. *LC* se definiše kao odnos količine aktivne supstance inkorporirane u česticu/adsorbovane na površinu čestice i ukupne količine aktivne supstance. *EE* i *LC* se mogu izračunati preko jednačina 2.2. i 2.3:

$$EE = \frac{W_a - W_s}{W_a} \times 100 \quad \text{jednačina 2.2.}$$

$$LC = \frac{W_a - W_s}{W_a - W_s + W_L} \times 100 \quad \text{jednačina 2.3.}$$

gde W_a , predstavlja količinu supstance u formulaciji, W_s je količina supstance u supernatantu (nakon odvajanja lipidne faze od vodene faze), a W_L količina lipida u formulaciji (Souto i Müller, 2009).

EE može zapravo donekle indirektno da ukaže na efikasnost same metode, koja se koristi za inkorporiranje supstance u nosač. EE i LC zavise od fizičko-hemijskih osobina supstance (npr. lipofilnost, veličina molekula), sadržaja supstance, tipa i koncentracije upotrebljenog surfaktanta, vrste lipida koji ulazi u sastav matriksa nanočestica, distribucije aktivne supstance unutar lipidnog matriksa, kao i od samog postupka za pripremu formulacija lipidnih nanočestica (Judefeind i de Villiers, 2009; Tzachev i Svilenov, 2013).

Prilikom izbora odgovarajuće metode za inkorporiranje supstance u lipidne nanočestice, naročitu pažnju treba posvetiti karakterizaciji stepena kristalizacije lipida i prisustvu polimornih oblika, zbog toga što su ovi parametri u velikoj meri povezani sa načinom inkorporiranja supstance u nosač.

U cilju postizanja veće EE uobičajeno se aktivna supstanca rastvara ili disperguje u otopljenoj lipidnoj fazi pre pripreme disperzija lipidnih nanočestica (Lucks i Müller, 1996). Međutim, rastvorljivost lekovite supstance ne mora uvek biti u direktnoj korelaciji sa LC i EE. Rezultati velikog broja studija ukazuju da i pored dobre rastvorljivosti, aktivna supstanca nije uvek lokalizovana unutar lipidnog matriksa čestica, nego se može u znatnoj meri preraspodeliti u vodenu fazu, ili pak u sloj surfaktanta na površini čestica (Bunjes i sar., 1996; Chen i sar., 2001; Hsu i sar., 2003; Hu i sar., 2004; Jennings i Gohla, 2001; Lim i Kim, 2002; Müller i sar., 1995; Patravale i Ambarkhane, 2003; Santos Maia i sar., 2002; Schwarz i Mehnert, 1997; Sznitowska i sar., 2001; Venkateswarlu i Manjunath, 2004; Wang i sar., 2002; Westesen i sar., 1997; Yang i sar., 1999a; Yang i sar., 1999b; Yang i Zhu, 2002; zur Mühlen i sar., 1998). Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da EE i LC nisu uvek u direktnoj vezi sa rastvorljivošću supstance u lipidu, nego i sa rastvorljivošću u vodenoj fazi (Müller i sar. 2000a; zur Mühlen i Mehnert, 1998). Zbog toga, neki autori predlažu da se

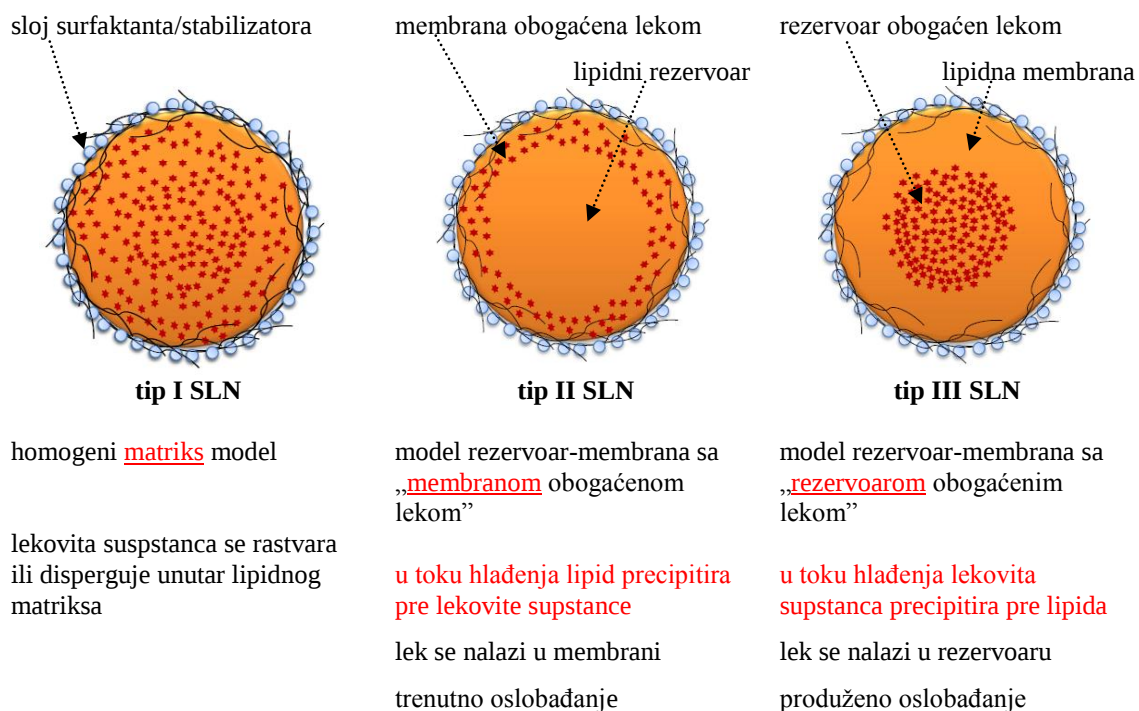
komparativno sa određivanjem rastvorljivosti aktivne supstance u lipidnom matriksu čestica određuje i particioni koeficijent (Li i sar., 2006; Shah i Agraval, 2013).

U cilju određivanja EE i LC, neophodno je odrediti koncentraciju aktivne supstance u disperzionom medijumu. U retkim slučajevima, aktivna supstanca koja je isključena iz lipidnog matriksa se može detektovati svetlosnim mikroskopom ili čak organoleptički (Bunjes i sar., 1996; Jennings i Gohla, 2001; Westesen i sar., 1997; zur Mühlen i Mehnert 1998; zur Mühlen i sar., 1998). Određivanje koncentracija aktivne supstance koja nije vezana za lipidni matriks postaje složeno ukoliko (i) je koncentracija aktivne supstance veoma niska, (ii) sama aktivna supstanca formira koloidne strukture u disperzionom medijumu (pr. nanočestice, tečne kristale) i (iii) aktivna supstanca uopšte ne kristališe. Pored toga, neki autori ukazuju na činjenicu da dodatne koloidne strukture koje formira surfaktant u disperzionom medijumu, mogu uticati na preraspodelu supstance iz lipidne u vodenu fazu. Natrijum-laurilsulfat je poznati stabilizator lipidnih nanočestica. U vodenoj disperziji lipidnih nanočestica, ovaj surfaktant može biti prisutan u tri različita oblika: (i) vezan za površinu čestica, (ii) u obliku micela u disperzionom medijumu ili (iii) kao monomer u vodenoj fazi (Siekman i Westesen, 1998). Sve prethodno pomenute koloidne strukture mogu solubilizovati aktivnu supstancu, i na taj način mogu predstavljati alternativno mesto za njenu lokalizaciju (Mäder i Mehnert, 2005), što može da učini postupak određivanja koncentracije aktivne supstance, koja nije vezana za lipidni matriks, složenijim.

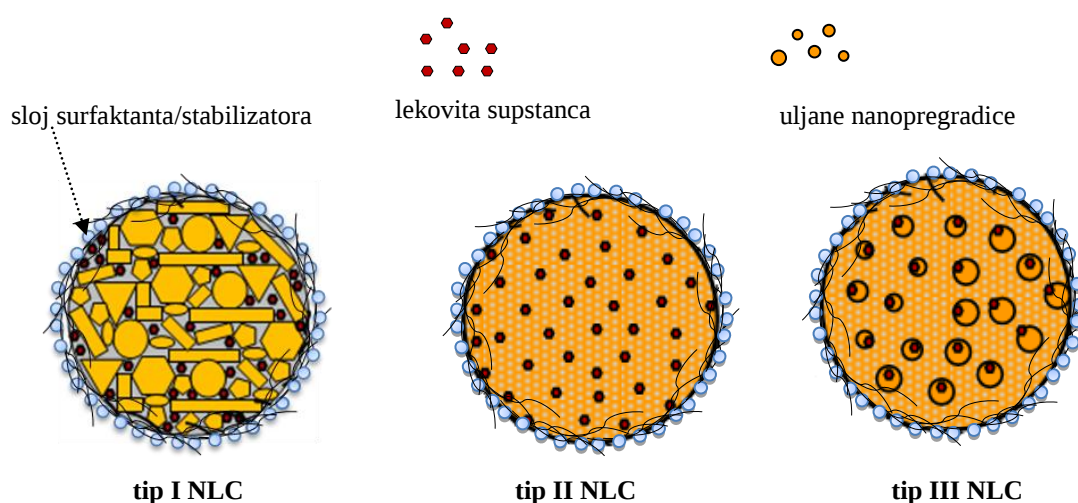
2.1.3.1. Teorijski modeli kojima se opisuje inkorporiranja aktivne supstance u lipidne nanočestice

U literaturi se mogu naći tri različita modela, kojima se opisuje inkorporiranje aktivne supstance u čvrste lipidne nanočestice: (i) model homogenog matriksa ili model čvrstog rastvora (tip I SLN); (ii) model rezervoar-membrana sa „membranom obogaćenom lekom” (tip II SLN) i (iii) model rezervoar-membrana sa „rezervoarom obogaćenim lekom” (tip III SLN) (slika 2.9.) (Mehnert i sar., 1997; Müller i sar., 2000a; Müller i sar., 2000b; Souto i Müller, 2009). Čvrsta suspenzija može biti četvrti model inkorporiranja aktivne supstance u čvrst lipidni matriks nanočestica, ako supstanca nije molekularno dispergovana u lipidu.

Inkorporiranje aktivne supstance u nanostrukturirane lipidne nosače u literaturi opisuje se sledećim modelima: (i) „imperfektan” kristalni model (tip I NLC); (ii) amorfni model (tip II NLC) i (iii) multipli model (tip III NLC) (slika 2.10.) (Müller i sar., 2002a; Souto i Müller, 2009).



Slika 2.9. Teorijski modeli inkorporiranja lekovite supstance u čvrste lipidne nanočestice (preuzeto i prilagođeno iz Souto i Müller, 2009)



Slika 2.10. Teorijski modeli inkorporiranja lekovite supstance u nanostrukturirane lipidne nosače (preuzeto i prilagođeno iz Souto i Müller, 2009)

Naravno, pored ovih modela inkorporiranja aktivne supstance, u praksi se veoma često sreću i njihove kombinacije. Različiti modeli kojima se opisuje struktura čvrstih lipidnih nanočestica ukazuju da je inkorporiranje supstance u lipidne nanočestice veoma kompleksan zadatak, ali istovremeno otvara mogućnost obrazovanja različitih modela kojima se adekvatno može podesiti profil oslobađanja aktivne supstance (Müller i sar., 2000a).

2.1.3.2. Teorijski modeli kojima se opisuje oslobađanje aktivne supstance iz lipidnih nanočestica

Oslobađanje aktivne supstance iz lipidnih nanočestica, je proces tokom koga se molekuli supstance oslobađaju iz čvrste faze i postaju dostupni za apsorpciju i farmakološko delovanje. *In vitro* oslobađanje supstance iz lipidnih nanočestica može pružiti informacije o strukturi nosača, interakcijama između aktivne supstance i nosača, a može se koristiti za predviđanje, ponašanja nosača u *in vivo* uslovima (Chorny i sar., 2002; Washington, 1990). Oslobađanje aktivne supstance iz lipidnih nanočestica može da obuhvati tri različita mehanizma: (i) difuzija sa površine čestice; (ii) difuzija iz matriksa i (iii) erozija sa površine čestice (slika 2.11.) (Souto i Müller, 2009).

U većini slučajeva, oslobađanje supstance predstavlja kombinaciju dva ili tri mehanizma oslobađanja. U slučaju oslobađanja sa površine čestice, adsorbovana supstanca se oslobađa odmah kada dođe u kontakt sa medijumom za oslobađanje. Ovaj mehanizam oslobađanja karakterističan je za tzv. model rezervoar-membrana (kojim se opisuje inkorporiranje aktivne supstance u čvrste lipidne nanočestice i opisuje se kao trenutno oslobađanje. Oslobađanja supstance u ovom slučaju može se usporiti unakrsnim vezivanjem hidrofilnih polimera ili polisaharida za površinu lipidnih nanočestica (Souto i Müller, 2009).

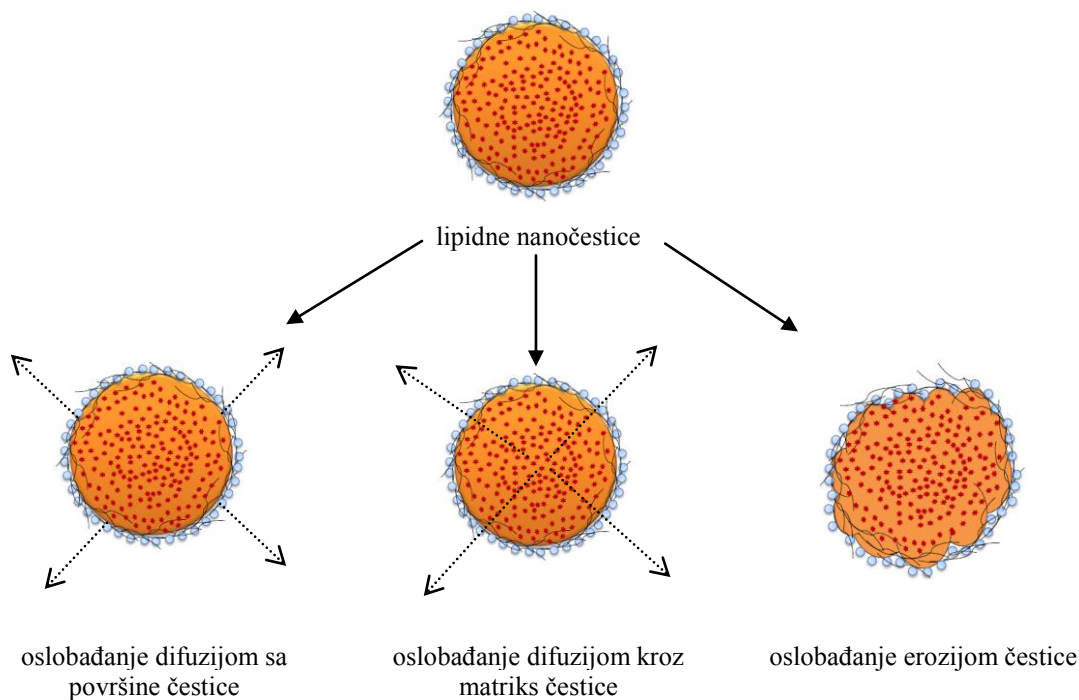
Kada se supstanca oslobađa difuzijom iz matriksa, profil oslobađanja odgovara kontrolisanom oslobađanju. Ovaj tip oslobađanja karakterističan je za tzv. matriks model čvrstih lipidnih nanočestica. Ovaj tip oslobađanja se može postići i sa nanostrukturiranim lipidnim nosačima, međutim, brzina oslobađanja je nešto veća u poređenju sa čvrstim lipidnim nanočesticama sličnog sastava (Souto i Müller, 2009). Najčešće korišćena jednačina kojom se opisuje oslobađanje difuzijom iz matriksa je

empirijska jednačina koja se može koristiti za dobijanje parametara difuzije (Peppas, 1983):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n$$

jednačina 2.4.

gde M_t/M_∞ predstavlja frakciju oslobođene supstance u vremenu t , k je konstantna kojom se opisuje interakcija između supstance i lipida, a n je empirijski parametar koji karakteriše mehanizam oslobađanja supstance. Na osnovu vrednosti difuzionog eksponenta n , može se zaključiti da li profil oslobađanja leka prati *Fick*-ov zakon difuzije ($n = 0,5$) ili ne ($0,5 < n < 1$).



Slika 2.11. Mehanizmi oslobađanja lekovite supstance iz lipidnih nanočestica (preuzeto i prilagođeno iz Souto i Müller, 2009)

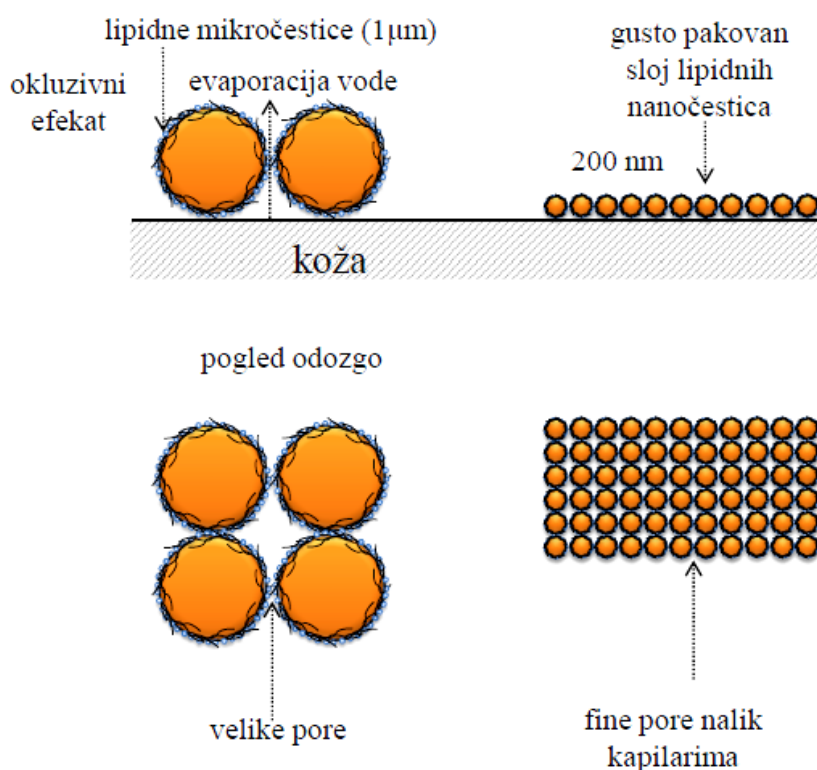
Najvažniji faktori koji mogu odrediti oslobađanje supstance iz lipidnih nanočestica su morfologija i veličina nosača (Souto i sar., 2004), vrsta surfaktanta i lipida (Heurtault i sar., 2003), način distribucije leka u lipidnom matriksu nanočestica, koncentracija supstance, rastvorljivost supstance u lipidnoj i vodenoj fazi pri različitim temperaturama. Brzina oslobađanja supstance iz manjih čestica je veća od brzine oslobađanja iz većih čestica, zbog manje dužine difuzionog puta koji treba da pređe

supstanca i veće površine kontakta između čestica i medijuma za oslobađanje. U prethodnim studijama je pokazano da ukoliko je koncentracija surfaktanta u vodenoj fazi niža, manja koncentracija supstance će se distribuirati u vodenu fazu. Pored toga, dodavanje surfaktanta u lipidni matriks čestica može da smanji koncentracija surfaktanta u vodenoj fazi i na taj način uspori oslobađanje (Wang i sar., 2005). U prethodnoj studiji pokazano je da razlika u EE aktivne supstance i brzini oslobađanja potiču od razlika u lipofilnosti matriksa. Oslobađanje aktivne supstance etopozida iz lipidnih nanočestica koje su sastavljene od gliceril tripalmitata bilo je sporije od oslobađanja iz lipidnih nanočestica koje se sastoje od gliceril monostearata, zbog toga što je gliceril tripalmitat lipofilniji od gliceril monostearata (Reddy i Murthy, 2005). Kod model rezervoar-membrane sa „lek obogaćenom membranom” u kome supstanca nije u potpunosti inkorporirana u lipidni matriks doći će do trenutnog oslobađanja. Kod model rezervoar-membrane sa „lek obogaćenim rezervoarom” oslobađanje lekovite supstance u početku može biti sporo, a nakon toga malo brže i konstantno (nepromenjeno) (zur Mühlen i Mehnert, 1998). Ukoliko je koncentracija supstance u disperziji lipidnih nanočestica blizu koncentracije zasićenja, brzina oslobađanja će biti veća. Ostali faktori koji mogu uticati na brzinu oslobađanja supstance iz lipidnih nanočestica su dizajn testa kojim se prati oslobađanje, pH vrednost i temperatura medijuma u kome se prati oslobađanje. Venkateswarlu i Manjunath (2004) su pokazali da postoji inverzan odnos između količine oslobođenog klorzapina iz lipidnih nanočestica i raspodele lekovite supstance između lipidnog matriksa sastavljenog od gliceril trimiristata, tripalmitata i tristearata i vodene faze. Do sličnog zaključka su došli Vivek i sar. (2007) kada su pratili oslobađanje olanzapina iz čvrstih lipidnih nanočestica.

2.1.4. Potencijal lipidnih nanočestica za primenu na koži lekovitih supstanci i kozmetički aktivnih materija

Zbog niza pozitivnih osobina, koje imaju nakon primene na koži, tokom proteklih deset godina intenzivno se ispituje mogućnost primene lipidnih nanočestica u proizvodima za lečenje, zaštitu i negu kože odnosno, farmaceutskim preparatima i kozmetičkim proizvodima (Müller i sar., 2007).

Adhezivnost je glavna osobina veoma finih čestica, to znači i nanočestica različitih vrsta. Slično liposomima, lipidne nanočestice formiraju adhezivne filmove na koži. Ranije se pretpostavljalo da lipidne nanočestice formiraju filmove gusto pakovanih sfera, dok rezultati kasnijih studija ukazuju da pod pritiskom, pri aplikaciji, sfere formiraju koherentan film (slika 2.12.) (Müller i Dingler, 1998; Wissing i sar., 2001; Wissing i Müller, 2002).



Slika 2.12. Zavisnost okluzivnog efekta od veličine čestica (preuzeto i prilagođeno iz Müller i Dingler, 1998)

U poređenju sa mikročesticama, nanočestice stvarajući koherentniji film na površini kože i posledično ostaju u dužem vremenskom periodu u kontaktu sa kožom u

poređenju sa česticama većih dimenzija. Mali prostor između čestica (kapilari) ograničava transepidermalni gubitak vode, tj. ima okluzivna svojstva, koja dovode do povećanja hidratacije kože (Souto i Müller, 2007a).

Aktuelan pristup u razvoju nosača lekovitih supstanci tipa lipidnih nanočestica, bazira se i na upotrebi pozitivno naelektrisanih supstanci (pr. cetilpiridiniumhlorid) koje obezbeđuju jače vezivanje čestica za negativno naelektrisanu sluzokožu (Müller i sar., 2009).

Mehanizam kojim se poboljšava perkutana penetracija lekovitih supstanci iz lipidnih nanočestica, još uvek je predmet velikog broja *in vitro* i *in vivo* studija. Smatra se da okluzivne osobine lipidnih nanočestica i posledično povećanje u hidrataciji kože u kombinaciji sa lipidnim karakterom obezbeđuju duži kontakt čestica sa kožom, što može da olakša razmenu supstanci iz čestica sa lipidima kože. Na taj način se u izvesnoj meri, može uticati na povećanje penetracije aktivnih supstanci u/kroz kožu (Lombardi Borgia i sar., 2005; Santos Maia i sar., 2002). Slično liposomima i polimernim nanočesticama, disperzije lipidnih nanočestica se mogu dodavati u polučvrste preparate za primenu na koži (hidrofilni kremovi, hidrofilni gelovi) koji već sadrže aktivnu supstancu u svom sastavu (Souto i Müller, 2007a; Souto i sar., 2004). Prednost ovog pristupa, je kombinovanje pozitivnih osobina lipidnih nanočestica sa dobro poznatim karakteristikama konvencionalnih formulacija za primenu na kožu u isti gotov farmaceutski preparat. Nakon inkorporiranja lipidnih nanočestica u polučvrste preparate za primenu na koži, aktivna supstanca ostaje inkorporirana unutar lipidnog matriksa nanočestica tokom perioda čuvanja preparata. Nakon primene na koži, usled povećanja temperature i gubitka vode iz preparata, supstanca se isključuje iz lipidnog matriksa čestica usled transformacije lipida iz uredene u neuređenu modifikaciju. Nakon isključivanja supstance iz lipidnog matriksa u okolni „medijum” (hidrofilni krem, hidrofilni gel) koji je već zasićen supstancom stvara se presičen sistem. Kao rezultat toga povećava se termodinamička aktivnost supstance, i difuzioni pritisak supstance na kožu, što može unaprediti penetraciju supstanci u/kroz kožu. Za razliku od drugih metoda za povećanje perkutane penetracije aktivne supstance, u ovom slučaju ne dolazi do interferencije sa ultrastrukturom *stratum corneum*-a (Müller i sar., 2002a). Ovakva razmatranja povećavaju značaj procene potencijala lipidnih nanočestica, kao nosača za popravljjanje penetracije aktivnih supstanci u/kroz kožu.

Schäfer-Korting i sar. (2007) su se u svojim istraživanjima intenzivno bavili isporukom glukokortikoida u/kroz kožu uz primenu tehnologije čvrstih lipidnih nanočestica. Autori su pokazali da je primenom lipidnih nanočestica moguće povećati penetraciju prednikarbata u kožu, ali takođe i ostvariti ciljne efekte u određenim slojevima kože (Lombardi Borgia i sar., 2005; Santos Maia i sar., 2000; Sivaramakrishnan i sar., 2004). Slično polimernim nanočesticama, lipidne nanočestice imaju čvrst lipidni matriks koji može da zaštititi nestabilne lekovite i kozmetički aktivne supstance od degradacije. Klasičan primer koji se često navodi u literaturi je retinol, za koga je pokazano da se njegova hemijska stabilnost popravljala nakon inkorporiranja u nanostrukturirane lipidne nosače u poređenju sa liposomima (Jenning i Gohla, 2001). Prema navodima Kristl i sar., (2003) hemijska stabilnost antioksidansa, askorbilpalmitata, u velikoj meri je popravljena nakon inkorporiranja u lipidne nanočestice u poređenju sa mikroemulzijama.

U zavisnosti od sastava lipidnog matriksa nanočestica, oslobađanje supstance iz čestica se može menjati, tj. može biti veoma brzo (kada je potrebno postići povećanu penetraciju leka kroz kožu) ili veoma sporo (kada je potrebno smanjiti sistemsku apsorpciju ili ukoliko lekovita supstanca u visokim koncentracijama u kojima se koristi dovodi do iritacije kože) (Souto i sar., 2007).

U novijim studijama se ističe da se matriks nanočestica može pripremiti sa lipidima čija struktura podseća na strukturu lipida kože, čime se smanjuje mogućnost da dođe do iritacije kože nakon primene lipidnih nanočestica na kožu (Müller i sar., 2011; Pardeike i sar., 2009). Pretpostavljeno je, da se razvojem formulacija lipidnih nanočestica u čiji sastav ulaze ceramidi, može pomoći u obnavljanju i ojačavanju zaštitnog lipidnog filma kože, i tako doprineti normalizaciji uslova na površini i u dubljim slojevima kože (Müller i sar., 2005).

2.2. Metode za karakterizaciju lipidnih nanočestica

2.2.1. Metode za određivanje veličine čestica i distribucije čestica po veličini

2.2.1.1. Foton korelaciona spektroskopija

Određivanje veličine lipidnih nanočestica može se izvoditi mikroskopskim tehnikama, kojima se dobijaju informacije o veličini i broju čestica u određenoj zapremini uzorka. Nedostatak ove metode je što je za dobijanje informacija o veličini čestica i preciznu statističku analizu potrebno imati najmanje 10.000 različitih mikrografija (ne čestica !) (ISO 14488:2000). Izostavljanje samo jedne čestice dijametra 10 μm , može imati isti efekat, kao izostavljanje hiljadu čestica dijametra 1 μm . Stoga se danas za dobijanje informacija o veličini čestica i distribuciji čestica po veličini koriste sofisticirane tehnike, kojima se preciznije može odrediti dijametar čestica i distribucije čestica po veličini. Ove tehnike uglavnom se baziraju na različitim interakcijama svetlosnog zraka sa česticama koloidnih dimenzija. Kao rezultat tih interakcija može doći do odbijanja, prelamanja, difrakcije svetlosnog zraka i slično.

Foton korelaciona spektroskopija (engl. *Photon Correlation Spectroscopy*, PCS) takođe poznata kao dinamičko rasipanje svetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering* syn. *Quasi-Elastic Light Scattering*) je tehnika kojom se određuje veličina čestica i distribucija čestica po veličini u koloidnim sistemima (Zetasizer Nano Series User Manual, 2007). Određivanje veličine čestica tehnikom PCS uglavnom se izvodi merenjem intenziteta rasute svetlosti pod uglom od 90° i 173°, zapravo ovom tehnikom se mere vremenski zavisne fluktuacije u intenzitetu rasute svetlosti u veoma kratkim uzastopnim vremenskim intervalima koji iznose nekoliko ns ili μs . Promena u intenzitetu fluktuacije rasute svetlosti u funkciji vremena, naziva se korelaciona funkcija. Korelator stalno dodaje i umnožava fluktuacije u izmerenom intenzitetu rasute svetlosti i generiše (auto)korelacionu funkciju za dati uzorak. Autokorelaciona funkcija se potom fituje u teorijsku korelacionu funkciju $g(\tau)$ preko jednačine:

$$g(\tau) = e^{-2D\tau K^2} \quad \text{jednačina 2.5.}$$

gde je D difuziona konstanta, K apsolutna vrednost vektora rasute funkcije i τ je *lag time* (Zetasizer Nano Series User Manual, 2007).

Na autokorelacionu funkciju se primenjuje algoritam, na osnovu čega se određuje veličina čestica i raspodela čestica po veličini. Veličina čestica koja se dobija ovom tehnikom poznata je kao hidrodinamička veličina (prečnik, dijametar), Z -ave, z -ave, Z -average size, Z -average mean, cumulant mean. Jednačina kojom se prevode vremenski zavisne fluktuacije u intenzitetu rasute svetlosti tj. translatorsni difuzioni koeficijent (D) u hidrodinamički dijametar čestica (D_H) je *Stokes-Einstein*-ova jednačina:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_H} \quad \text{jednačina 2.6.}$$

gde je k Boltzmann'-ova konstanta, T apsolutna temperatura pri kojoj se izvode merenja i η viskozitet medijuma u kome su čestice suspendovane (Zetasizer Nano Series User Manual, 2007).

Stokes-Einstein-ova jednačina povezuje stepen difuzije čestica sa veličinom čestica ukoliko su poznati viskozitet medijuma u kome su čestice suspendovane, Boltzmann'-ova konstanta i apsolutna temperatura pri kojoj se izvode merenja. Uobičajeno se koriste dve metode za analizu veličine čestica i distribucije čestica po veličini: kumulantna analiza i distribucionna analiza. Kumulantna analiza je definisana u međunarodnom standardu o dinamičkom rasipanju svetlosti (ISO 13321:1996). Sva merenja u doktorskoj disertaciji, izvedena su u skladu sa ovim standardom. Za određivanje veličine čestica kumulantnom analizom potrebno je znati indeks refrakcije disperzanta i viskozitet disperzionog medijuma.

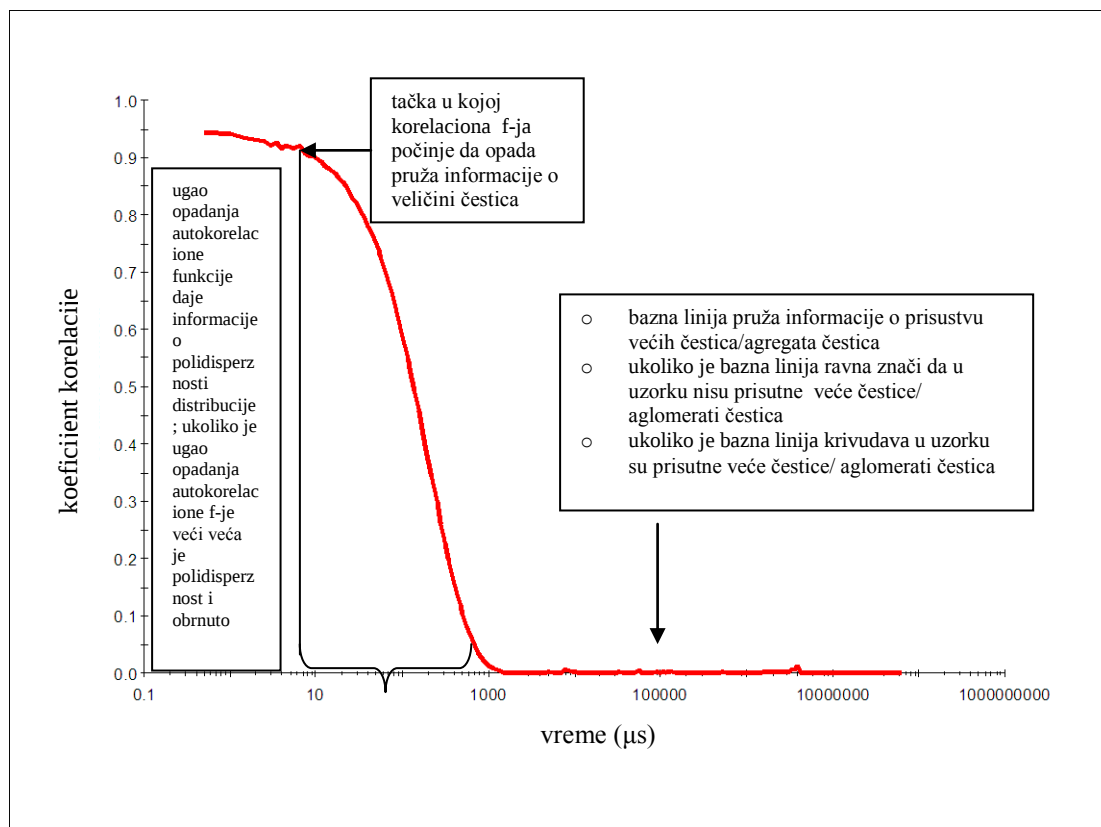
Prema definiciji, z -average je srednji dijametar čestica koji se izvodi iz kumulantne analize, na osnovu izmerenog intenziteta fluktuacije svetlosti, koja se dobija iz masene raspodele čestica. Polidisperzni indeks (PI) je prema definiciji bezdimenziona veličina, kojom se meri distribucija čestica po veličini iz kumulantne analize. PI zapravo opisuje matematičko odstupanje stvarne autokorelacione funkcije od teorijske (fitovane) korelacione funkcije $g(\tau)$. Odstupanje autokorelacione funkcije od fitovane korelacione funkcije se smanjuje sa sužavanjem raspodele čestica po veličini, tj. sa smanjenjem PI. PI može biti u intervalu od 0 - 0,5, dok vrednosti veće od 0,5 ukazuju da je distribucija čestica po veličini toliko polidisperzna da uzorak nije pogodan za merenje PCS (tabela

2.1). Kada je distribucija čestica po veličini idealno monodisperzna, obe funkcije (autokorelaciona i teorijska korelaciona) su jednake (teorijski $PI=0$) (Müller i Böhm, 1998).

Tabela 2.1. Tumačenje rezultata distribucije čestica po veličini dobijenih nakon merenja uzoraka na PCS (Müller i Böhm, 1998)

PI	Tumačenje rezultata
0	idealno monodisperzna distribucija čestica po veličini
0,001 - 0,05	monodisperzna distribucija čestica po veličini
0,10 - 0,20	relativno uska distribucija čestica po veličini
0,25 - 0,50	široka distribucija čestica po veličini
> 0,50	veoma široka distribucija čestica po veličini sa nepoznatim oblikom

U skladu sa ISO 13321:1996 standardom, rezultat koji se dobija PCS treba da bude nezavisan od koncentracije uzorka. S tim u vezi, veoma je važno da se za svaki uzorak odrediti koncentracioni opseg unutar koga se izvode merenja. Ukoliko je koncentracija uzorka suviše niska, rasipanje svetlosti od strane čestica može biti nedovoljno i merenje se ne može izvesti. Međutim, ovakva situacija se veoma retko sreće u praksi kada se merenja izvode na instrumentima iz serije Zetasizer Nano S/Nano ZS. Sa druge strane, ukoliko je koncentracija uzorka previsoka, rezultat ne može biti nezavisan od koncentracije uzorka. Stoga, tokom razvoja metode, određivanje optimalne koncentracije uzorka treba da uključi nekoliko uzastopnih merenja, uz komplementarnu primenu drugih sofisticiranih tehnika za određivanje veličine i raspodele čestica po veličini. Pored $z\text{-ave}$ i PI , kao najvažnijih parametara koji se dobijaju pri analizi uzoraka PCS, dodatne informacije se mogu dobiti i na osnovu izgleda korelograma (slika 2.13.) (MRK656-01, 2014).



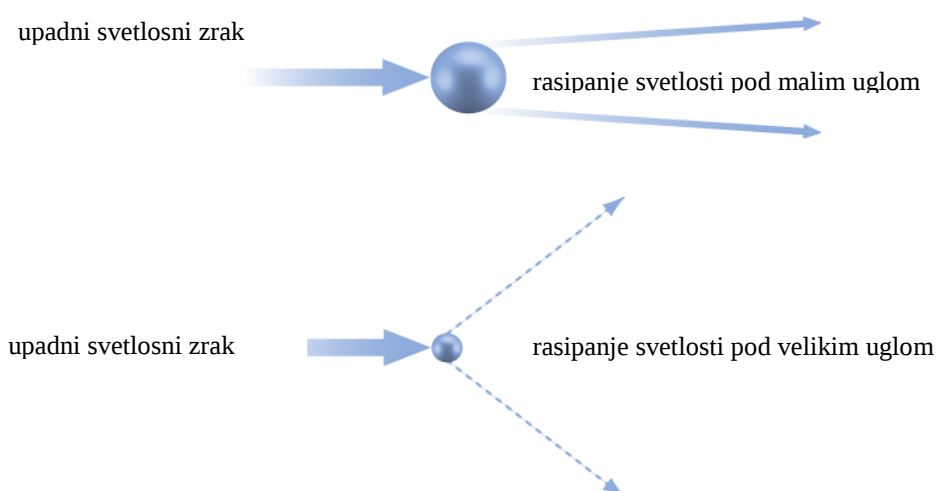
Slika 2.13. Izgled korelograma i tumačenje dobijenih rezultata (preuzeto i prilagođeno iz MRK656-01, 2014)

2.2.1.2. Laserska difrakcija

Zbog svoje jednostavnosti i preciznosti, laserska difrakcija (engl. *Laser Diffraction, LD*) se danas smatra nezaobilaznom tehnikom za određivanje veličine čestica i raspodele čestica po veličini, u sistemima koji sadrže čestice reda veličina od nekoliko stotina nm do nekoliko mm. Razlozi za široku primenu LD danas su brojni, i u okviru ove doktorske disertacije biće nabrojane samo najznačajnije karakteristike ove tehnike. Postupak merenja na savremenom laserskom difraktometru je brz, potpuno automatizovan, reproduktivan i može biti standardizovan za određeni sistem. Pošto ova tehnika može da pruži veoma brzo informacije o veličini čestica, ona nalazi široku primenu u fazi razvoja formulacije. U poređenju sa ostalim tehnikama za određivanje veličine čestica, LD omogućava analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom intervalu. Osim toga, kalibracija instrumenta se može lako izvesti pomoću standardnih referentnih materijala. Postupak izvođenja merenja na LD definisan je i verifikovan u standardu ISO 13320-1:1999, koji je objavljen krajem 1999. godine. ISO 13320-1:1999

standard je prvi formalni međunarodni standard koji daje osnovu za usklađivanje veličine čestica koja se određuje tehnikom rasipanja laserskog svetla pod malim uglom (engl. *low angle laser light scattering*). Ovaj dokument se smatra veoma važnim, zbog toga što je u praksi dostupno više različitih vodiča za merenje veličine čestica među kojima postoje fundamentalne razlike (Jones, 2003). Međutim, i pored svih prethodno navedenih prednosti koje ima, LD se ne može smatrati rutinskom tehnikom. U cilju dobijanja pouzdanih informacija o veličini čestica u ispitivanim sistemima, od ključnog je značaja da se shvati princip LD.

Tokom merenja veličine čestica LD tehnikom snop laserske svetlosti osvetljava čestice, koje su dispergovane u gasovitom u tečnom disperzionom medijumu (voda, alkohol i sl.). LD zapravo meri ugaone varijacije u intenzitetu rasute svetlosti pri prolasku snopa svetlosnog zraka kroz uzorak koji sadrži dispergovane čestice (Zimmermann, 1997). Čestice rasipaju svetlost pod različitim uglovima i kao rezultat toga obrazuju se difraktogrami „svetlosnih prstenova” različitog radijusa. Svetlost koju čestice rasipaju sabira se uz pomoć *Fourier*-vog sočiva, a podaci o intenzitetu rasute svetlosti se šalju do detektora i koriste za računanje veličine čestica. Šablon po kome se odvija difrakcija svetlosti, zavisi od odnosa radijusa čestica (D) i talasne dužine upadnog svetlosnog zraka (λ). Radijus čestica i uglovi difrakcije su obrnuto proporcionalni jedan drugom (Müller i Schuhmann, 1996). Dakle, velike čestice rasipaju svetlost pod malim uglovima većeg intenziteta, dok male čestice rasipaju svetlost pri većim uglovima nižeg intenziteta (slika 2.14.) (MRK1872-04).



Slika 2.14. Rasipanje svetlosti u prisustvu čestica većeg (gore) i manjeg dijametra (dole) (preuzeto i prilagođeno iz MRK1872-04)

U zavisnosti od odnosa D/λ mogu se razlikovati *Fraunhofer*-ovo, *Mie*-ovo i *Rayleigh*-ovo rasipanje svetlosti. Čestica čiji je dijametar mnogo veći od talasne dužine upadne svetlosti, pokazuju *Fraunhofer*-ovo rasipanje svetlosti. Čestice sa dijametrom mnogo manjim (tj. $10\times$ manjim) od talasne dužine upadne svetlosti pokazuju tzv. *Rayleigh*-ovo rasipanje. Sve čestice čija je veličina između ove dve vrednosti pokazuju *Mie*-ovo rasipanje svetlosti (Mie, 1908; Stratton, 2007; van de Hulst, 1981).

U praksi talasna dužina izvora svetlosti kojom se osvetljavaju čestice je u rasponu od 633 - 800 nm, odnosno 633 nm za Mastersizer 2000 (Malvern, UK). Prema tome, čestice čiji je dijametar veći od 3,8 μm se analiziraju uz primenu *Fraunhofer*-ove teorije, dok čestice čiji je dijametar manji od 3,8 μm se analiziraju primenom *Mie*-ove teorije (Keck i Müller, 2008). Pojednostavljen oblik *Mie*-ove teorije može se prikazati sledećom jednačinom:

$$I(\theta) = \underbrace{E \{k^2 D^4 [J_1]^2 \theta^1 + [K_1 \theta]^1 + [K_2 \theta]^3 + [K_2 \theta]^5}_{\text{Fraunhofer-ov član}} + \underbrace{k^4 D^6 (m-1)^2 \theta^6 / 8\pi}_{\text{Rayleigh-ov član}} \quad \text{jednačina 2.7.}$$

Fraunhofer-ov član

Rayleigh-ov član

gde je I intenzitet rasute svetlosti, E je fluks ulazne svetlosti po jedinici površine, k i K su konstante, D je prečnik čestica, J_1 je *Bessel*-ova funkcija prvog reda, θ je ugao rasipanja (koji se meri na detektoru), a m je optički parametar (Keck i Müller, 2008).

Optički parametar m se sastoji iz dva člana, realni član (n) i imaginarni član (ni). Oba indeksa prelamanja zavise od talasne dužine svetlosti i temperature i moraju se uzeti u razmatranje pri određivanju veličine submikronskih čestica. Podaci o optičkim osobinama sredine u kojoj su čestice dispergovane mogu se pronaći u literaturi. Pored toga, većina modernih optičkih instrumenata ima ugrađene baze podataka, sa optičkim osobinama disperznog sredstva. Ukoliko informacije o optičkim osobinama čestica nisu dostupne, moguće ih je odrediti eksperimentalnim putem ili proceniti koristeći tzv. iterativni pristup. Iterativni pristup se zasniva na stepenu poklapanja/podudaranja modelovanih podataka i stvarnih podataka dobijenih nakon merenja za dati uzorak (MRK1806-01, 2012).

U izveštajima koji se dobijaju nakon merenja na laserskom difraktometru između ostalog se nalaze informacije o volumenskom dijimetru čestica $d(v)_{0,10}$, $d(v)_{0,50}$, $d(v)_{0,90}$, $d(v)_{0,95}$ i $d(v)_{0,99}$. Volumenski dijometri čestica ukazuju da procenat čestica

u određenoj zapremini uzorka, koje imaju manji dijametar od date vrednosti, npr. volumenski dijametar $d(v)_{0,50}$ znači da 50 % zapremine uzorka sadrži čestice čija veličina je manja od $d(v)_{0,50}$ vrednosti, a 50 % zapremine uzorka čine čestice veće od ove vrednosti (Rawle, 2003).

2.2.2. Mikroskopske metode

2.2.2.1. Svetlosna i polarizaciona mikroskopija

Najvažnija prednost mikroskopskih metoda u odnosu na prethodno navedene tehnike za analizu veličine čestica je da se veličina čestica meri sama po sebi, a ne neka osobina koja zavisi od veličine čestica. Stoga se svetlosna mikroskopija koristi kao standardna komplementarna metoda drugim metodama za određivanje veličine čestica. Nedostatak ove metode, kao što je prethodno navedeno, je što je za dobijanje informacija o veličini čestica i preciznu statističku analizu potrebno imati najmanje 10.000 mikrografija (ISO 14488:2000; Jillavenkatesa i sar., 2001). Polarizaciona mikroskopija zajedno sa svetlosnom mikroskopijom se može koristiti za utvrđivanje prisustva/odsustva kristala aktivne supstance (Murphy, 2001).

2.2.2.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy, SEM*) je važna metoda za analizu čestice čiji dijametar je u intervalu od 0,1 - 1000 μm (donji limit SEM može biti i niži u zavisnosti od vrste instrumenta koji se koristi). SEM je korisnija za dobijanje informacija o obliku i površinskim karakteristikama lipidnih nanočestica, nego za merenja veličine čestica i raspodele čestica po veličini. Nedostatak ove tehnike, je dugo vreme potrebno za pripremu uzorka, visoka cena instrumenta i određeno iskustvo koje je potrebno posedovati u pripremi uzoraka (Jillavenkatesa i sar., 2001; Klang i sar., 2013).

2.2.3. Metode za karakterizaciju strukture lipidnih nanočestica

2.2.3.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry, DSC*) pripada grupi tehnika kojima se mere promene entalpije usled promena u fizičkim i hemijskim karakteristikama uzorka, a kao posledica različitih faznih prelaza u ispitivanim sistemima. Merenja se izvode u funkciji temperature ili vremena. Preciznije DSC meri razliku u protoku toplote između ispitivanog uzorka i inertnog referentnog materijala u funkciji temperature ili vremena. Razlike u prenosu toplote nastaju kada uzorak apsorbuje ili oslobađa toplotu usled termalnih promena, kao što su topljenje, kristalizacija, hemijske reakcije, polimorfni prelazi, isparavanja i slično. U toku merenja, temperature ispitivanog uzorka i referentnog standardnog materijala se povećavaju konstantnom brzinom (Bunjes i Unruh, 2007).

Pri konstantnom pritisku prenos toplote ekvivalentan je promeni entalpije, što se opisuje sledećom jednačinom:

$$\left(\frac{dq}{dt}\right) = \frac{dH}{dt} \quad \text{jednačina 2.8.}$$

Razlika u prenosu toplote između ispitivanog uzorka i referentnog standardnog materijala mogu se izračunati preko sledeće jednačine:

$$\Delta \frac{dH}{dt} = \left(\frac{dH}{dt}\right)_{\text{uzorka}} - \left(\frac{dH}{dt}\right)_{\text{referentnog standardnog materijala}} \quad \text{jednačina 2.9.}$$

Razlika u prenosu toplote može biti pozitivna ili negativna (Kumar i Randhawa, 2013). Fazne promene koje se odvijaju u disperzijama lipidnih nanočestica zahtevaju utrošak različite količine energije. Iz tog razloga, kod ove metodologije mora se voditi računa o osetljivosti mernog instrumenta, kao i o tome da limit detekcije bude dovoljno nizak. Takođe, treba imati na umu da brzina promene temperature tokom merenja utiče na rezoluciju pika i osetljivost instrumenta, jer ona određuje protok energije kroz uzorak. U zavisnosti od vrste instrumenta koji se koristi, brzina promene temperature može da varira od 0,001 - 10 °C/min (Bunjes i Unruh, 2007). Sporo povećanje temperature se koristi kada je potrebno dobiti dobru rezoluciju pika i kada je uzorku potrebno više

vremena da dostigne stanje ravnoteže. Veća brzina promene temperature, se koristi kod uzoraka kod kojih se razmena toplote odvija u relativno kratkom vremenskom intervalu. Veoma je važno da se za kalibraciju instrumenta i merenje koristi ista brzina promene temperature. Kalibracija temperaturne skale, kao i skale kojom se meri entalpija izvodi se referentnim materijalima visokog stepena čistoće (Höhne i sar., 2003) i sa dobro definisanim faznim prelazima (Gmelin i Sarge, 2000). Kalibracija instrumenta se obično izvodi indijumom ($T_t = 156\text{ °C}$), koji se smatra pogodnim i za kalibraciju temperature i za kalibraciju entalpije.

Generalno posmatrano u formulaciji lipidnih nanočestica, kada se transformiše *bulk* lipid u nanočestičnu formu, dolazi do depresije u temperaturi topljenja. Ovaj fenomen je opisan Gibbs-Thomson-ovom jednačinom, koja je sama po sebi izvedena iz Kelvin-ove jednačine (Hunter, 1987):

$$\ln\left(\frac{T}{T_0}\right) = \frac{2\gamma V_s}{r\Delta H} \quad \text{jednačina 2.10.}$$

gde T predstavlja temperature topljenja čestice i uvek je manja od temperature topljenja lipida u *bulk* stanju, T_0 , V_s je molarni volumen supstance, r je radijus čestice, ΔH je molarna entalpija topljenja i γ je međupovršinska energija na međufazi čvrsto/tečno.

Za karakterizaciju kristalnih formi supstanci, koristi se parameter ΔH koji se može dobiti kao površina ispod DSC krive. Na osnovu rezultata DSC studije, može se izračunati indeks rekristalizacije, koji predstavlja koristan parameter za poređenje kristaliniteta čestica. Indeks rekristalizacije (engl. *recrystallization index*, *RI*) definiše se kao procenat lipidnog matriksa koji rekristališe tokom čuvanja lipidnih nanočestica. Na osnovu literaturnih podataka, indeks rekristalizacije lipidnih nanočestica se može izračunati uz korišćenje sledeće jednačine (Freitas i Müller, 1999):

$$RI (\%) = \frac{\Delta H_{\text{vodene disperzije lipidnih nanočestica (SLN ili NLC)}}{\Delta H_{\text{bulk materijala}} \times \text{koncentracija lipidne faze}} \times 100 \quad \text{jednačina 2.11.}$$

gde ΔH vodene disperzije lipidnih nanočestica (SLN ili NLC), ΔH *bulk* materijala predstavljaju entalpije topljenja (J/g) vodene disperzije lipidnih nanočestica i lipida u *bulk* stanju, redom.

Koncentracija lipidne faze se izražava u procentima i predstavlja procenat čvrstog lipida u ukupnoj disperziji (tj. 10 % (m/m) disperzije čvrstih lipidnih nanočestica je 10/100

delova = 0,1, a 10 % disperzije nanostrukturiranih lipidnih nosača koja sadrži 8 % čvrstog lipida i 2 % ulja je 0,08). U slučaju da se računa RI temperiranog *bulk* materijala, koncentracija je jednaka 1.

2.2.3.2. Difrakcija X zraka pod širokim uglom

Difrakcija X zraka pod širokim uglom (engl. *Wide Angle X-ray Diffraction*, WAXD) je pored diferencijalne skenirajuće kalorimetrije široko korišćena tehnika za praćenje statusa lipida/lipidnog matriksa čestica. Ovom tehnikom je moguće dobiti informacije o rastojanjima kratkog i dugog dometa unutar kristalne rešetke lipida (Müller i sar., 2000b). Tokom ove tehnike, snop monohromatskog rendgenskog X zraka usmerava se ka kristalu, rasuti X zraci iz pravilno uređenih atoma interferiraju jedan sa drugim, i pri tome daju izražene difrakcione signale u određenom pravcu. Pravci u kojima dolazi do difrakcije snopa monohromatskih X zraka u direktnoj su vezi sa oblikom i dimenzijama jedinične ćelije kristalne rešetke. Intenzitet difrakcije X zraka zavisi od rasporeda atoma unutar jedinične ćelije kristalne rešetke. Talasna dužinu X-zraka λ , upadni ugao θ i međuatomska rastojanja d su povezani preko *Bragg*-ove jednačine:

$$d = \frac{\lambda}{\sin 2\theta} \quad \text{jednačina 2.12.}$$

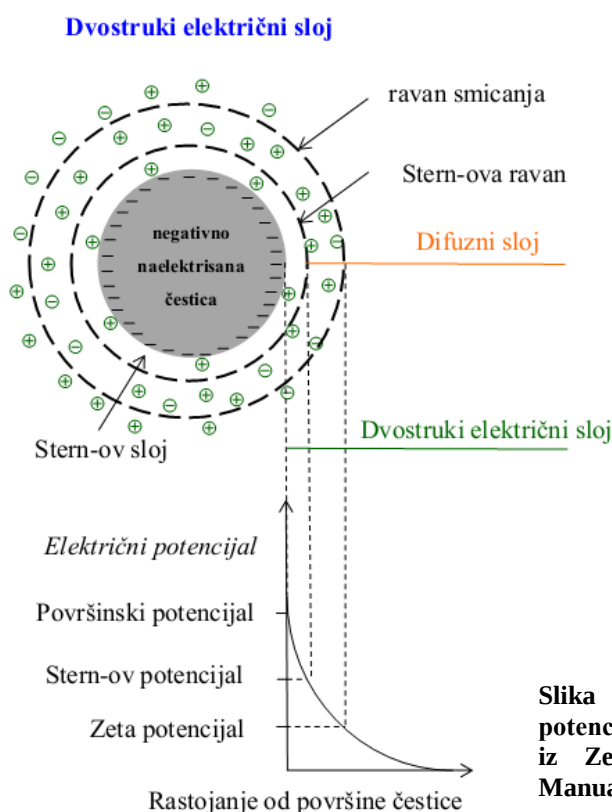
Difrakcijom X zraka pod širokim uglom moguće je napraviti razliku između amornih i kristalnih materijala. Kristalni materijali na difraktogramu pokazuju karakteristične pikove, specifične za svaki kristalni tip supstance, dok amorfni materijali ne pokazuju karakteristične pikove, već tzv. oreol tip difraktograma sa manje ili više pravilnim baznim linijama. Za razliku od DSC tehnike, difrakcijom X zraka pod širokim uglom se može detektovati polimorfni oblik materijala u disperziji na sobnoj temperaturi, tj. ne postoji opasnost da će doći do eventualnog uticaja temperature na promene polimorfnih oblika u materijalu/supstanci. Svaka supstanca rasipa snop zraka po određenom difrakcionom šablonu i na taj način daje otisak prsta za svaki kristal atoma ili molekula. Ako je potrebno izvršiti identifikaciju nepoznatog uzorka, onda će se njegovi difrakcioni šabloni uporediti sa difrakcionim šablonima poznate supstance ili njihovim d vrednostima, koje se računaju iz difraktograma (Bunjes i Unruh, 2007).

2.2.4. Metode za ispitivanje površinskih karakteristika lipidnih nanočestica

2.2.4.1. Zeta potencijal

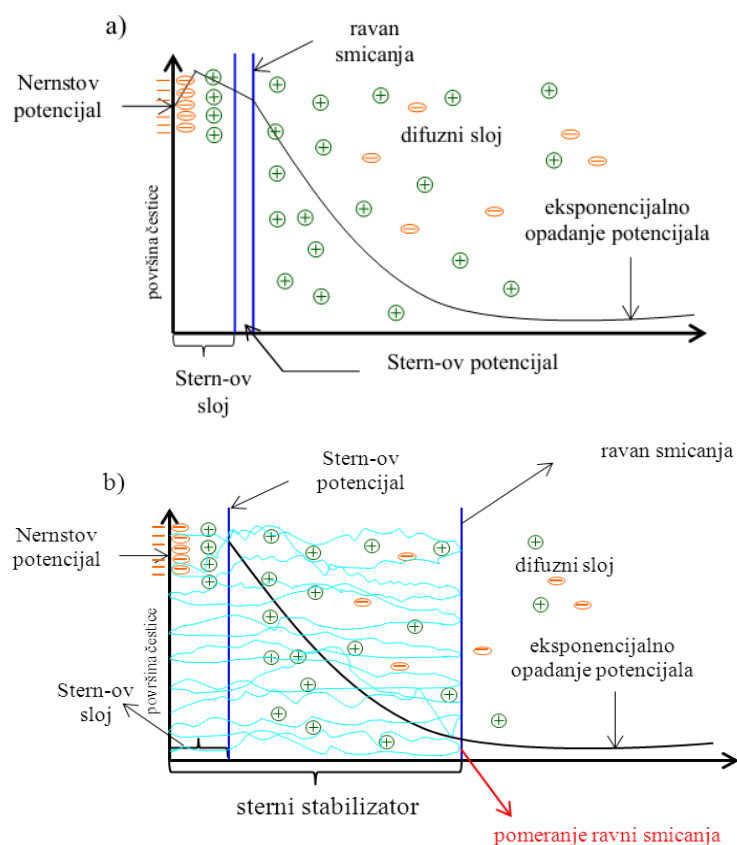
Koloidne čestice obično poseduju površinsko naelektrisanje koje potiče od jonizujućih grupa (tj. disocijacije hidroksilnih ili karboksilnih grupa na površini) ili adsorpcije jona iz disperzionog medijuma (tj. fizičke adsorpcije polielektrolita ili surfaktanata koji jonizuju). Površinsko naelektrisanje i domet električnog polja oko nanočestica imaju važnu ulogu u odbijanju čestica i njihovoj stabilnosti (Bunjes, 2005).

Čestice sa negativno naelektrisanom površinom i slojem pozitivno naelektrisanih jona koje su privučeni na površinu čestica zajedno formiraju *Stern-ov* sloj. Oko *Stern-ovog* sloja nalazi se difuzni sloj, koji sadrži pozitivne i negativne jone koji su slabije vezani za površinu čestica, tj. mobilniji od jona u *Stern-ovom* sloju (Đaković, 2006; Vuleta i sar., 2012). *Stern-ov* i difuzni sloj zajedno čine dvostruki električni sloj. Granica unutar dvostrukog električnog sloja, koja odvaja jone pričvršćene za površinu čestica od ostatka jona u difuznom sloju naziva se ravan smicanja (engl. *slipping plane*) (slika 2.15.) (Zetasizer Nano Series User Manual, 2007).



Slika 2.15. Shematski prikaz zeta potencijala (preuzeto i prilagođeno iz Zetasizer Nano Series User Manual, 2007)

Zeta potencijal se definiše kao potencijal meren u mV na ravni smicanja i ima vrednosti u intervalu od -100 do +100 mV. Zeta potencijal u velikoj meri utiče na interakciju između koloidnih čestica, pa je samim tim u vezi sa stabilnosti koloidnih sistema. Stoga se u literaturi navodi da se na osnovu izmerenih vrednosti zeta potencijala može predvideti stabilnost koloidnih sistema u dužem vremenskom periodu. U principu, čestice sa vrednostima zeta potencijala iznad +30 mV ili ispod -30 mV smatraju se stabilnim (Müller, 1996; Riddick, 1968). Međutim, ovo pravilo ne može biti strogo primenjivo za sisteme koji sadrže sterne stabilizatore, zbog toga što adsorpcija sternih stabilizatora na površini čestice vodi smanjenju zeta potencijala zbog pomeranja ravni smicanja (slika 2.16.) (Pardeike i Müller, 2010).



Slika 2.16. Shematski prikaz lokalizacije ravni smicanja u sistemima sa (a) elektrostatičkom i (b) sternom stabilizacijom (preuzeto i prilagođeno iz Pardeike i Müller, 2010)

Do promena u stabilnosti koloidnih sistema u kojima je dominantan mehanizam stabilizacije elektrostatička stabilizacija, može doći sa promenom pH vrednosti sistema,

jonske jačine ili sa dodatkom surfaktanata. Poznato je da jonski surfaktanti obezbeđuju električni potencijal na površini čestica, koji stvara visok zeta potencijal. Međutim, sa druge strane visoke koncentracije ovih surfaktanata smanjuju zeta potencijal zbog smanjenja debljine difuznog sloja. Stoga, neki autori predlažu, da je za optimalnu stabilizaciju čestica najbolje koristiti surfaktante ili kombinaciju surfaktanata koji obezbeđuju elektrostatičku i sternu stabilizaciju (Han i sar., 2008).

Opšte poznato je da uzorci koji se koriste za merenje zeta potencijala treba da budu bistri. Ukoliko je koncentracija uzorka previsoka, laserski zrak će biti atenuisan od čestice, te će se na taj način smanjiti intenzitet rasute svetlosti koja se detektuje na detektoru. Sa druge strane, ukoliko je potrebno razblažiti uzorak veoma je važno tačno odrediti razblaženje ispitivanog uzorka. Najvažniji parametar koji treba razmotriti tokom razblaživanja uzoraka je vrsta medijuma koji se koristi za razblaživanje. U literaturi se veoma često mogu naći samo vrednosti zeta potencijala za ispitivani uzorak, bez dodatnih informacija o vrsti i prirodi medijuma u kome su merenja izvedena. Ovakvi rezultati se ne mogu smatrati pouzdanim, zbog toga što zeta potencijal zavisi od sastava disperzionog medijuma isto koliko i od prirode same čestice. Cilj pripreme uzorka je stoga da se tokom procesa razblaživanja očuva postojeći sastav na površini čestica. Sastav disperzionog medijuma može se nekada odrediti samo na osnovu podataka koji postoje u literaturi, međutim, za mnoge koloidne disperzije, tačan sastav disperznog sredstva nije poznat. Ovaj uslovno rečeno problem, može se prevazići filtriranjem/centrifugiranjem disperznog sredstva iz originalnog uzorka, i potom koristiti kao medijum za razblaživanje ispitivanog uzorka. Na taj način se osigurava da površinske karakteristike čestice i sastav disperzionog medijuma ostaju nepromenjeni. Međutim, ovakav postupak pripreme medijuma nekada može dugo trajati i može biti teško ostvariv u laboratorijama prosečne opremljenosti. U takvim situacijama, treba koristiti neki drugi medijum za razblaživanje uzorka, koji će u što većoj meri odgovarati sastavu originalnog medijuma. Dakle, sastav medijuma u kome se meri zeta potencijal treba da odgovara originalnom medijumu u pogledu (i) pH vrednosti, (ii) ukupnog jonskog sastava i (iii) vrste i količine pomoćnih materija (surfaktanata, polimernih stabilizatora i sl.) (Zetasizer Nano Series User Manual, 2007).

Za merenje zeta potencijala mala količina uzorka se ubrizgava u ćeliju koja sadrži dve elektrode koje se koriste da stvore indukovano električno polje. Kada se primeni

električno polje na čestice, one počinju da se kreću ka anodi ili ka katodi u zavisnosti od toga da li je površina čestice naelektrisana pozitivno ili negativno. Brzina kretanja čestice tj. mobilnost čestica se konvertuje u zeta potencijal u mV, primenom *Helmholtz-Smoluchowski* jednačine uz prethodno unošenje podataka vezanih za viskozitet disperznog sredstva. Nakon merenja zeta potencijala dobijaju se dva izveštaja: (i) rezime zeta potencijala gde se nalaze rezultati i parametri iz odvojenih merenja i (ii) izveštaj o kvalitetu koji je rezultat ekspertskog mišljenja i daje informacije o tome da li podaci zadovoljavaju kriterijum kvaliteta ili ne (Zetasizer Nano Series User Manual, 2007).

2.2.5. Metode za *in vitro* ispitivanje oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih preparata za primenu na koži

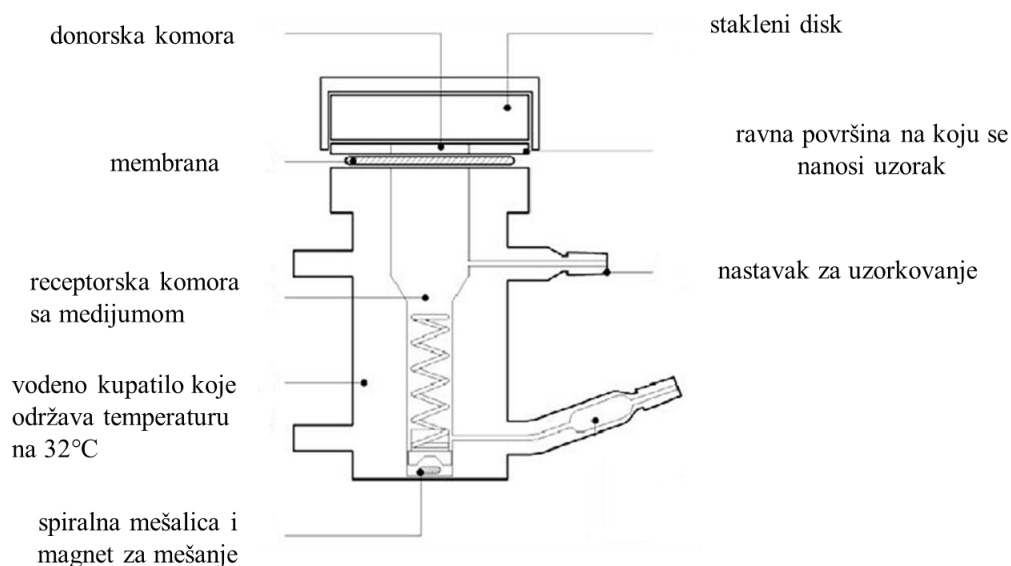
Testovi oslobađanja su jedna od nekoliko standardnih metoda koje se koriste za karakterizaciju polučvrstih farmaceutskih oblika (masti, kremovi i gelovi) i dobijanje važnih informacija pri razvoju formulacija ovih preparata. Detaljan opis aparature, postupaka i opreme za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz polučvrstih preparata za kožu retko se mogao naći u literaturi.

Prema preporukama FIP/AAPS za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz polučvrstih preparata za spoljašnju primenu preporučuje se *Franz*-ova difuziona ćelija (slika 2.17.). U radovima koji obrađuju problematiku kinetike oslobađanja aktivne supstance iz polučvrstih farmaceutskih oblika za kožu, eksperimenti su rađeni na *Franz*-ovoj ćeliji, a ređe upotrebom *Enhancer* ćelije, dok se prema nekim literaturnim podacima *in vitro* test brzine oslobađanja može izvoditi i na aparaturi sa protočnom ćelijom (USP aparatura 4), pri čemu je ćelija specijalno razvijena za dermofarmaceutske preparate. U 36. izdanju Američke farmakopeje (USP 36 - NF31) uvedeno je poglavlje <1724> (*Semisolid Drug Products-Performance Tests*) koje se odnosi na ispitivanje oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih preparata za primenu na koži primenom vertikalnih difuzionih ćelija (Hanson i Heaney, 2013; Siewert i sar., 2003).

Na slici 2.17., shematski je prikazana *Franz*-ova difuziona ćelija. Ćelija se sastoji iz donorskog (A) i akceptorskog dela (B), između kojih se stavlja membrana (C) i prsten O (D) koji se koristi za pozicioniranje membrane. Temperatura od 32 °C (za polučvrste

preparate za primenu na kožu) održava se proticanjem vode kroz spoljašnje vodeno kupatilo (E). Akceptorski deo, određene zapremine, puni se akceptorskim medijumom, koji treba da obezbedi „difuzione *sink* uslove” (Hanson i Heaney, 2013; Siewert i sar., 2003). Akceptorski medijum mora da bude kompatibilan sa formulacijom i sa membranom. Najvažniji faktor pri izboru akceptorskog medijuma je rastvorljivost lekovite supstance u medijumu. Akceptorski medijum se uobičajeno sastoji od prečišćene vode. U cilju povećanja rastvorljivosti lekovite supstance u akceptorski medijum se mogu dodati alkohol i/ili surfaktanti. pH vrednost medijuma je od velikog značaja i njegov izbor treba vršiti prema pH ispitivanog preparata, pH vrednosti od koje zavisi rastvorljivost aktivne supstance i pH membrane koja se koristi za praćenje ispitivanja brzine oslobađanja lekovite supstance (Flynn i sar. 1999).

Kinetika oslobađanja aktivne supstance iz test formulacija analizira se primenom različitih modela za praćenje oslobađanja (pr. *Higuchi* model, kinetika nultog reda, kinetika prvog reda) (tabela 2.2.). Na osnovu pomenutih modela može se proceniti tip kinetike oslobađanja, odnosno profil oslobađanja, izračunati vrednost difuzionog koeficijenta, i na taj način odrediti set kritičnih parametara od kojih najviše zavisi oslobađanje (Flynn i sar., 1999).



Slika 2.17. Shematski prikaz statične vertikalne difuzione ćelije (model A) prema USP 36 (poglavlje <1724>) (preuzeto i prilagođeno iz Hanson i Heaney, 2013)

Tabela 2.2. Matematički modeli koji se potencijalno mogu koristiti za karakterizaciju kinetike oslobađanja lekovite supstance iz polučvrstih preparata za primenu na koži (Souto i Müller, 2007b)

Model	Regresiona jednačina
Kinetika nultog reda	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
Kinetika prvog reda	$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 \cdot t/2,303$
Higuchi-jev model	$Q_t = Q_0 + K_H t^{1/2}$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t = K_{KP} \cdot t^n$
Hixson-Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC} \cdot t$

Q_t - količina oslobođenog leka u vremenu t . Q_0 - inicijalna količina leka. K - konstanta brzine oslobađanja matematičkog modela. n - eksponent oslobađanja.

Za *in vitro* procenu brzine oslobađanja lekovite supstance iz dermofarmaceutskih preparata, najviše se koristi parametar brzina oslobađanja ili u nešto manjem obimu fluks. Brzina oslobađanja se određuje na osnovu nagiba krive koja pokazuje zavisnost količine lekovite supstance koja se oslobodi po jedinici površine ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) u funkciji kvadratnog korena vremena, u toku koga je praćeno oslobađanje aktivne supstance. Fluks (kumulativna količina oslobođene aktivne supstance u jedinici vremena) se određuje kao nagib linearnog dela krive, koja daje zavisnost kumulativne količine oslobođenog leka po jedinici površine od vremena, u toku koga je praćeno oslobađanje. Za analizu uzoraka treba koristiti odgovarajući validiran specifičan i osetljiv analitički postupak. Sadržaj aktivne supstance može se određivati visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom (HPLC) ili drugom analitičkom metodom (Đorđević, 2001; Vuleta i sar., 2012; US FDA Guidance for Industry, 1997).

Oslobađanje aktivne supstance iz lipidnih nanočestica je kompleksan proces i zavisi od brojnih faktora kao što su npr. adsorpcije supstance na površinu čestica, difuzije kroz matriks čestice, degradacije matriksa, erozije čestica i kombinacije svih ovih procesa (Souto i Müller, 2009).

2.3. Surfaktanti i njihova uloga u formulaciji lipidnih nanočestica

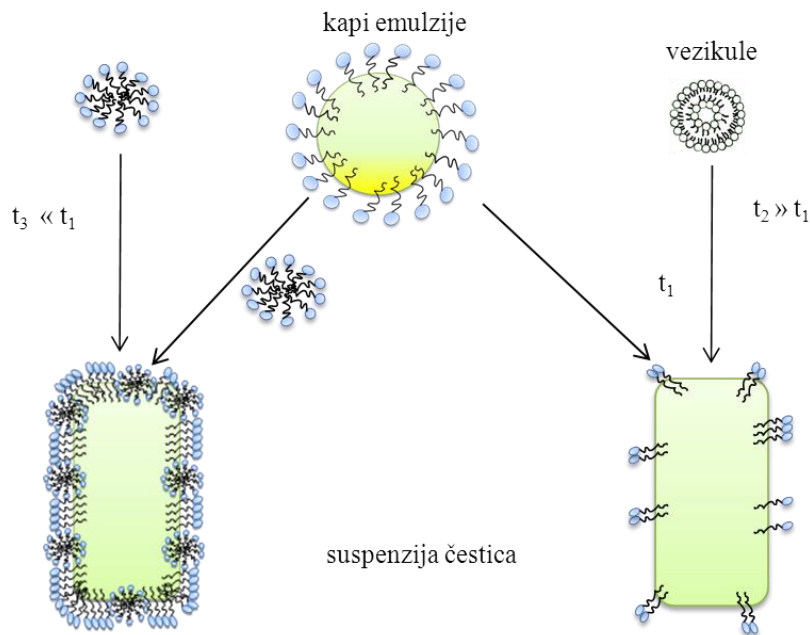
2.3.1. Osnovna razmatranja prilikom izbora surfaktanta/stabilizatora lipidnih nanočestica

Izbor stabilizatora lipidnih nanočestica veoma je komplikovan, i posle više od dve decenije rada brojnih istraživačkih grupa u ovoj oblasti, tako da danas još uvek ne postoji razvijen sistematski empirijski ili teorijski pristup. Mala veličina, odnosno velika specifična površina čestica, vode ka različitim vidovima nestabilnosti čestica. Osim toga, za stabilizaciju različitih lipida koriste se različiti stabilizatori, i nije realno očekivati da postoji jedan stabilizator koji će odgovarati svakom tipu lipidnog matriksa i svakom postupku izrade. Stoga se danas, izbor odgovarajućeg surfaktanta i njegove koncentracije uglavnom svodi na pripremu velikog broja formulacija i merenje veličine čestica uz primenu odgovarajućih tehnika. Ovakav pristup, u velikoj meri podseća na princip pokušaja i greške i sam po sebi iziskuje dosta vremena, novca i eksperimentalnog rada. Kao jedan od razloga ovakvom pristupu, neki autori navode da još uvek ne postoji dovoljan uvid u interakciju stabilizatora i čestica na nivou nanometarskih veličina. U literaturi se, takođe, navodi da se problem krije u nedovoljnom poznavanju i razumevanju odgovarajućih metoda koje se koriste u karakterizaciji dobijenih sistema. Da bi se objasnila uloga surfaktanata u obrazovanju lipidnih nanočestica, neophodno je razumeti proces formiranja lipidnih nanočestica na fundamentalnom nivou. Cilj ovog poglavlja jeste da se pokuša detaljnije objasniti uloga surfaktanata u pripremi lipidnih nanočestica, postupkom homogenizacije pod visokim pritiskom, s obzirom da će se ovaj postupak dobijanja lipidnih nanočestica koristiti u daljem radu.

Obrazovanje lipidnih nanočestica, postupkom homogenizacije pod visokim pritiskom obuhvata (i) dispergovanje lipida u vrućem vodenom rastvoru surfaktanta, (ii) smanjenje kapi većeg dijametra do kapi manjeg dijametra i obrazovanje pre-emulzije (iii) homogenizacija pre-emulzije i obrazovanje nanoemulzije i (iv) kristalizacija lipidne faze i formiranje lipidnih nanočestica (Joseph i Bunjes, 2013).

U toku formiranja emulzije, otopljeni čvrst lipid usitnjava se do čestica/kapi koje se disperguju u vodenom rastvoru surfaktanta. Pošto je međupovršinski napon između dve

tečnosti koje se ne mešaju, uvek veći od nula, dispergovanje unutrašnje tečne faze malog dijametra u spoljašnjoj fazi, praćeno je velikim povećanjem u slobodnoj međupovršinskoj energiji. Usled malog dijametra kapi unutrašnje faze i velike međupovršinske energije na granici faza, dobijena emulzija predstavlja termodinamički veoma nestabilan sistem. Uloga surfaktanta u ovom stupnju obrazovanja lipidnih nanočestica jeste da stabilizuje ovaj u osnovi nestabilan sistem u kratkom vremenskom periodu, što se između ostalog postiže adsorpcijom surfaktanta na međufazu i obrazovanjem međupovršinskog filma/barijere koji(a), sprečava agregaciju kapi. Obrazovani film surfaktanta (i) smanjuje međupovršinski napon između lipidne i vodene faze i posledično smanjuje termodinamičku nestabilnost sistema i (ii) smanjuje brzinu koalescencije dispergovanih lipidnih čestica/kapi, formirajući sternu i/ili elektrostatičku barijeru oko kapi. Smanjenjem međupovršinskog napona, smanjuje se količina mehaničkog rada koja je potrebna da se slomi unutrašnja faza u dispergovane čestice, dok se sternom i elektrostatičkom barijerom inhibira kontakt između čestica (Rosen i Kunjappu, 2012). Sledeći korak u formiranju lipidnih nanočestica, je homogenizacija pre-emulzije i formiranje nanoemulzije. Smanjenje veličine čestica tokom homogenizacije, povezano je sa daljim ogromnim povećanjem u površini. Funkcija surfaktanta u ovoj fazi, je da prekrije novostvorene površine čestica i spreči njihovu agregaciju. U ovoj fazi agregati mogu da se formiraju zbog nedovoljne pokrivenosti novostvorenih površina čestica stabilizatorom ili usled nedovoljnog stabilizirajućeg efekta (npr. suviše niskog zeta potencijala ili suviše tankog sloja stabilizatora ($\ll 10$ nm), koji obezbeđuje sternu stabilizaciju) (Müller i Jacobs, 2002). Superohlađena otopina, koja predstavlja prvi proizvod formiran nakon tople homogenizacije pod visokim pritiskom, predstavlja nanoemulziju, koju karakteriše sferičan oblik lipidnih kapi. Transformacija lipidne otopine u lipidne kristale, ima za rezultat povećanje površine čestica usled promena u obliku čestica. Usled toga, može se javiti lokalni nedostatak surfaktanta na površini čestice, što povećava nestabilnost sistema (slika 2.18.) (Mehnert i Mäder, 2012; Westesen i Siekmann, 1997).



Slika 2.18. Model kojim se opisuje nestabilnost koloidnih suspenzija koje se sastoje od gliceril tripalmitata (preuzeto i prilagođeno iz Westesen i Siekmann, 1997)

Da bi se izbegla agregacija čestica, primarna emulzija mora sadržati surfaktant u višku, koji je u stanju da pokrije novostvorene površine čestica. Pored toga, surfaktanti treba da imaju visok afinitet za površinu čestica i dovoljno veliku brzinu difuzije na novoobrazovane površine čestica. Prekrivanje novoobrazovanih površina ostvaruje se kroz difuziju surfaktanta, koja zahteva određeno vreme i varira između surfaktanata. Visoka brzina difuzije surfaktanata znači, da su oni u stanju da prekriju novostvorene površine u vremenu koje je dovoljno kratko, da se spreči agregacija čestica i geliranje sistema. U studiji koju su izvele Westesen i Siekmann (1997) opisano je da je brzina difuzije surfaktanta, između ostalog funkcija molekulske mase, hidratacije surfaktanta, viskoziteta disperzionog medijuma. U tom kontekstu autori navode da rastvoreni micela-formirajući surfaktanti i polimerni surfaktanti mogu da difunduju na površinu čestica u kraćem vremenskom periodu, nego surfaktanti koji formiraju vezikule.

Micele su vrlo dinamične koloidne strukture, i kao takve mogu služiti kao rezervoar mobilnih molekula koji su potrebni za trenutno prekrivanje nezaštićenih površina čestica, stvorenih tokom procesa rekristalizacije. Nasuprot micelama, stabilizatori koji obrazuju vezikule (pr. fosfolipidi) formiraju male, pretežno unilamelarne vezikule. Molekuli surfaktanata koji su vezani za vezikule imaju ograničenu pokretljivost, te

stoga nisu u stanju da trenutno prekriju novostvorene međufaze, obrazovane u toku rekristalizacije. Sa druge strane, u toku rekristalizacije ne postoji spoljašnji input energije koji bi mogao olakšati raspadanje vezikula koje obrazuju surfaktanti. Zbog niske pokretljivosti molekula koji su „zarobljeni” unutar vezikula na površini čestica se javlja nedostatak surfaktanta, i pored toga što u sistemu postoji višak surfaktanta, što sve skupa vodi ka nestabilnosti sistema (Westesen i Siekmann, 1997).

2.3.2. Adsorpcija surfaktanta na međufazi čvrsto/tečno

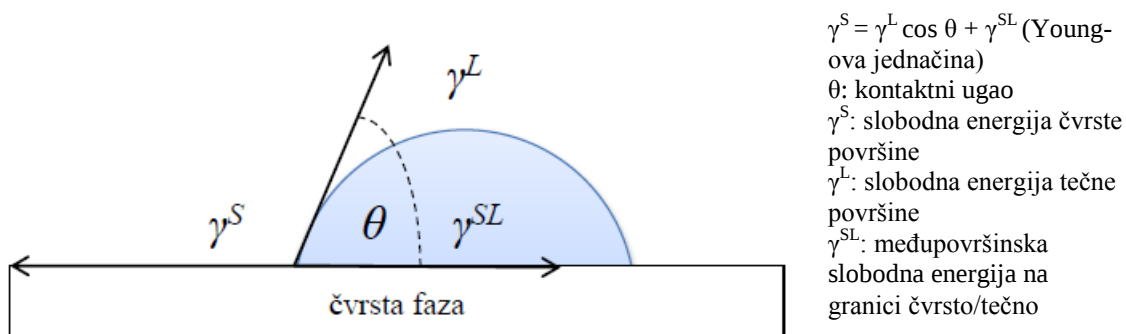
Kao što je već prethodno pomenuto hidrofilni surfaktanti koji obrazuju micle, imaju veoma dobru funkcionalnost u stabilizaciji lipidnih nanočestica (Westesen i Siekmann, 1997). Međutim, sa povećanjem rastvorljivosti surfaktanta u vodi, može da dođe do desorpcije surfaktanta sa površine čestica (Rosen i Kunjappu, 2012), do uzajamnog kontakta i agregacije čestica. Prema tome, poznavanje sposobnosti surfaktanta da zadrži kontakt sa lipidnom fazom nanočestica, isto toliko je važno koliko i poznavanje brzine difuzije surfaktanta. Pomenuti parametar, može pružiti veoma korisne informacije pri izboru stabilizatora, i na taj način skratiti dugoročne studije fizičke stabilnosti. Informacije o sposobnosti surfaktanta da zadrži kontakt sa lipidnim matriksom nanočestica, uobičajeno uključuje ispitivanje kvašenja, odnosno merenja kontaktnog ugla (slika 2.19.).

Na slici 2.19. prikazane su tri međufaze: čvrsto-tečna, čvrsto-gasovita i tečno-gasovita, odnosno postoje tri međupovršinska napona γ^{SL} , γ^S i γ^L . Linija kontakta ove tri faze, naziva se kontaktna linija. Kontaktni ugao se može odrediti, direktno merenjem ugla koji se formira između čvrste faze i tangente na kap ispitivane tečnosti (Yuan i Lee, 2013). Ravnotežna sila na kontaktnoj liniji, može se prikazati sledećom jednačinom (Miller i Neogi, 2008; Yuan i Lee, 2013):

$$\gamma^{SL} + \gamma^L \cos \theta - \gamma^S = 0 \quad \text{jednačina 2.13.}$$

gde γ^S predstavlja površinsku energiju čvrste faze, γ^{SL} je površinski napon na međufazi čvrsto/tečno, γ^L je površinska energija tečne faze i θ je kontaktni ugao.

Ova jednačina poznata je kao Young-ova jednačina ili Young-Dupre jednačina, i bliže objašnjava fenomen kvašenja. Jednačina se može primeniti samo ukoliko nema adsorpcije na međufazi i ukoliko je međupovršinski napon daleko od kontaktne tačke.



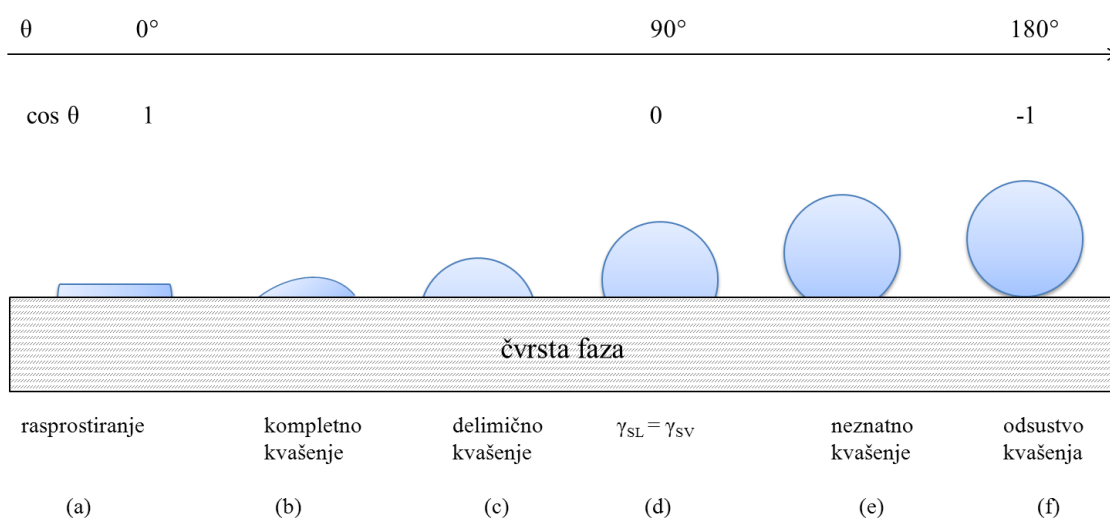
Slika 2.19. Kontaktni ugao - ugao između tangente na tački kontakta tečne i čvrste faze i horizontalne linije koja predstavlja čvrstu površinu (fazu) (preuzeto i prilagođeni iz Yuan i Lee, 2013)

Prema Young-ovoj jednačini, ako je međupovršinski napon između čvrste i tečne faze nizak, kontaktni ugao između ove dve faze biće nizak. Zavisno od afiniteta tečne faze za čvrstu fazu, površinskog napona tečne i čvrste faze, dobijaju se različiti kontaktni uglovi (slika 2.20). Kada je $\theta = 0^\circ$ (ili veoma blizu 0°) čvrsta faza se kompletno kvasi tečnom, tj. tečna faza se rasprostire na čvrstoj fazi i formira uniforman film. Kada je $0^\circ < \theta < 90^\circ$, radi se o delimičnom (nekompletnom) kvašenju. Kada je $180^\circ > \theta > 90^\circ$, govorimo o nepotpunom kvašenju čvrste faze tečnom. Ukoliko tečnost ne zaklapa ugao sa čvrstom površinom, tj. $\theta = 180^\circ$, u potpunosti je odsutno kvašenje čvrste faze tečnom. Ovakva situacija javlja se u slučaju, kada je čvrsta faza hidrofobna, a tečna faza hidrofilna. Šematski prikaz kompletnog, parcijalnog, slabog kvašenja ili odsustva kvašenja prikazan je na slici 2.20. za tečnost koja se rasprostire na čvrstoj ravnoj površini (Njobuenwu i sar., 2007). U literaturi se veoma često sposobnost kvašenja čvrste faze tečnom, povezuje sa (među)površinskom energijom. Kvašenje čvrste supstance visoke površinske energije (pr. magnezijum oksid ili živa) sa vodom opisuje se kao odlično, dok se kvašenje čvrste supstance niske površinske energije (npr. polietilen) sa vodom, opisuje kao veoma slabo (Tadros, 2005).

Na osnovu literaturnih podataka, moguće je razlikovati dve vrste kontaktnog ugla: statički i dinamički. Statički kontakti ugao, predstavlja ugao koji kap tečnosti određenog volumena zaklapa sa čvrstom fazom, dok se dinamički kontakti ugao,

odnosi na situaciju kada su tri faze (gasovita ili tečno/tečno/čvrsta) u pokretu (Yasuda, 2005). U ovom radu merio se statički kontaktni ugao. Statički kontaktni ugao, u velikoj meri je podložan varijacama pod uticajem različitih faktora, među kojima se u literaturi najčešće navode isparljivost tečne faze, vreme potrebno tečnoj fazi da se rasprostire po čvrstoj fazi (u slučaju da rasprostiranje nije spontano), protokol koji se primenjuje kada se tečna faza stavlja na čvrstu fazu i slično. S tim u vezi, mogu se javiti razlike u vrednostima kontaktnih uglova između različitih metoda koje se koriste za merenje kontaktnog ugla (Yuan i Lee, 2013).

kontaktni ugao:



Slika 2.20. Različiti oblici kapi na ravnoj površini. Kontaktni ugao između čvrste i tečne faze (a) rasprostiranje tečne faze na čvrstoj fazi; (b) kompletno kvašenje; (c) delimično kvašenje; (e) neznatno kvašenje; (f) odsustvo kvašenja (preuzeto i prilagođeno iz Njobuenwu i sar., 2007)

2.3.3. Elektrostatika i sterna stabilizacija

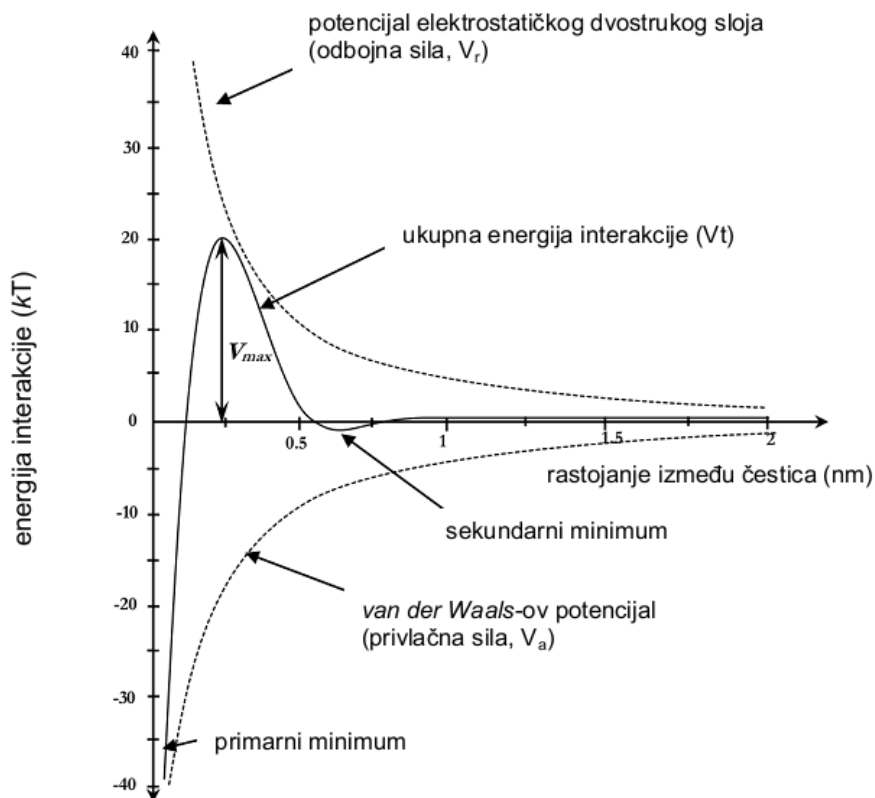
Elektrostatika i sterna stabilizacija su dva glavna mehanizma za stabilizaciju lipidnih nanočestica. Pored toga, u literaturi se još opisuje kombinacija ova dva mehanizma stabilizacije, poznata pod nazivom elektrosterna stabilizacija. Pomenuti mehanizmi stabilizacije u principu se oslanjaju na povećanje odbojnih sila između čestica (Bunjies, 2005) i baziraju se na dodatku jonskih i nejonskih stabilizatora u sistem (Agarwal i Bajpai, 2013).

Stabilnost koloidnih sistema, odnosno sile koje učestvuju u koagulaciji i flokulaciji čestica, opisuju se DLVO teorijom (prema naučnicima Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek (Liang i sar., 2007). Prema ovoj teoriji, moguće je razlikovati dve vrste sila

koje učestvuju u stabilizaciji koloidnih čestica. To su privlačne sile, koje su dugog dometa tzv. *van der Waals*-ove sile (V_a) sile, koje potiču od indukovanih dipol-dipol interakcija između čestica i odbojne elektrostatičke sile (V_r), koje potiču od interakcije identično naelektrisanih dvostrukih slojeva koji okružuju čestice. Ukupna potencijalna energija interakcije (V_t) predstavlja sumu privlačnih i odbojnih sila (jednačina 2.14) (Barnes i Gentle, 2011):

$$V_t = V_a + V_r \quad \text{jednačina 2.14.}$$

Ukoliko odbojne sile dominiraju nad privlačnim, ukupna energija sistema se povećava i sistem postaje stabilan. Ukoliko privlačne sile dominiraju nad odbojnim, ukupna energija u sistemu se smanjuje i sistem se destabilizuje. Na slici 2.21. prikazane su privlačne i odbojne sile u funkciji rastojanja od površine sfernih čestica (Müller, 1996).



Slika 2.21. Elektrostatičko odbijanje (V_r), *van der Waals*-ovo privlačenje (V_a) i rezultujuća ukupna energija (V_t) u funkciji rastojanja između čestica prema DLVO teoriji (preuzeto i prilagođeno iz Müller, 1996)

Kada se čestice nalaze na dovoljno velikom rastojanju, one ne stupaju u međusobnu interakciju. Kada se čestice približe jedna drugoj, razvijaju se odbojne sile između njih, i intenzitet ovih sila se povećava sa smanjenjem rastojanje između čestica, usled preklapanja elektrostatičkih dvostrukih slojeva koji potiču od čestice. DLVO teorijom se u principu objašnjavaju sile interakcija dugog dometa u koloidnim sistemima, dok se ovom teorijom ne mogu objasniti sile interakcija kratkog dometa. Pri veoma malim rastojanjima između čestica (nekoliko nanometara), oblik i hemijska struktura čestica u većoj meri određuju interakciju među česticama (Kamiya, 2007). U principu, sile koje se ne objašnjavaju DLVO teorijom, kao što su sile solvatacije ili hidratacije, hidrofobne sile, sterne interakcije među česticama, mogu biti mnogo jače od pomenutih sila, koje se objašnjavaju DLVO teorijom, kada su čestice veoma blizu jedna drugoj (Dagastine i Stevens, 2005; Kamiya, 2007; Liang i sar., 2007).

Pri velikom ili srednjem rastojanju između identično naelektrisanih čestica, vladaju sile elektrostatičkog odbijanja, zbog toga što se intenzitet *van der Waals*-ovih sila privlačenja smanjuje sa povećanjem rastojanja između čestica. Kada se čestice približe jedna drugoj, počinju da dominiraju odbojne sile. Intenzitet odbojnih sila se povećava sa smanjenjem rastojanja između čestica, usled preklapanja elektrostatičkih dvostrukih slojeva. Kada se čestice približe jedna drugoj, na rastojanju koje se označava kao H_m , kriva energije interakcije pokazuje maksimum (V_m). Ukoliko je ovaj maksimum dovoljno veliki, neće doći do aglomeracije čestica, odnosno sistem će biti stabilan u dužem vremenskom periodu. Međutim, ukoliko čestice savladaju ovaj maksimum, u sistemu će početi da vladaju *van der Waals*-ove sile privlačenja tako da čestice stupaju u interakciju jedna sa drugom i obrazuju se agregati. Prema tome, za maksimalnu stabilnost koloidnih sistema elektrostatičke sile odbijanja treba da budu što je moguće veće, tj. naelektrisanje na površini čestica treba da bude što je moguće veće (Müller, 1996).

Elektrostatičke odbojne sile razvijaju se samo u vodenim, a ne i u nevodenim sistemima, zbog niske dielektrične konstante medijuma (Rogueda, 2005; Tadros, 2005). Pored elektrostatičkih odbojnih sila u vodenim sistemima i sterne mehanizmi stabilizacije obezbeđuju fizičku stabilnost u sistemu usled obrazovanja strukturno-mehaničke barijere molekula oko čestica. Ova barijera sprečava da čestice dođu u kontakt jedna sa drugom. Stabilizatori koji grade sternu barijeru uobičajeno su iz grupe

prirodnih ili sintetskih polimera i označavaju se terminom polimerni surfaktanti. Kada se oni koriste za postizanje sterne stabilizacije nanočestica, različiti uslovi moraju biti ispunjeni da bi se pripremle stabilne disperzije. Između ostalog, u literaturi se navodi da disperzioni medijum mora biti dobar „rastvarač” za adsorbovane polimerne lance da bi u dovoljnoj meri obezbedio njihovo rasprostiranje u *bulk* rastvor. Prekrivanje površine čestica mora da bude kompletno i molekuli stabilizatora moraju biti dovoljno čvrsto prikačeni za površinu čestica, ali ne previše jako kako ne bi došlo do njihovog kolapsa zbog prevelike debljine sterne barijere (Attwood i Florence, 2012).

2.3.4. Konvencionalni surfaktanti u formulaciji lipidnih nanočestica

Lipidne nanočestice su sastavljene od biodegradabilnih i fizioloških lipida, te se stoga mogu smatrati bezbednim nosačima lekovitih/kozmetički aktivnih supstanci za primenu na koži. Međutim, brojne studije su pokazale da zadovoljavajući bezbednosni profil lipidnih nanočestica, nameće potrebu za korišćenjem surfaktanata/stabilizatora koji su bezbedni za kožu. U tom kontekstu važan cilj ka kome se stremiti jeste i da se uz upotrebu što nižih koncentracija surfaktanata formulišu disperzije lipidnih nanočestica koje ispunjavaju farmaceutsko-tehnološke i biofarmaceutske zahteve kako bi se moguća iritacija kože, do koje bi mogli da dovedu upotrebljeni surfaktanti svela na minimum. Danas se uobičajeno za stabilizaciju lipidnih nanočestica koriste površinski aktivne materije (PAM) jonskog (pr. natrijum holat), nejonskog (pr. polisorbati) i amfoternog tipa (pr. fosfolipidi) kao i različite vrste polimera (pr. poloksameri, polivinilalkohol) (Siekman, 1994; Siekman i Westesen, 1994a; 1994b). Pregled najčešće korišćenih nejonskih surfaktanata i polimernih stabilizatora koji se koriste u formulacijama lipidnih nanočestica za primenu na koži prikazan je u tabeli 2.3 (Souto i Müller, 2007a).

Tabela 2.3. Primeri najčešće korišćenih stabilizatora/surfaktanata u formulaciji lipidnih nanočestica za kožu (preuzeto iz Souto i Müller, 2007a)

Nejonski surfaktanti	Polimerni stabilizatori
Polisorbat 20, Polisorbat 40, Polisorbat 60, Polisorbat 80	Poloxamer [®] 188, Poloxamer [®] 182, Poloxamer [®] 184, Poloxamer [®] 235, Poloxamer [®] 335, Poloxamer [®] 407
Sorbitanski estri masnih kiselina	
Polietoksilovani etri masnih alkohola	
Poligliceril-3 metil glukoza distearat	Tyloxapol [®]

Zbog veličine molekula polimerni stabilizatori ne penetriraju u *stratum corneum*, te je stoga rizik od pojave iritacije kože nakon njihove primene sveden na minimum, pa se mogu smatrati pogodnom zamenom za tradicionalne nejonske PAM. Pored toga, ovi surfaktanti poseduju razgranate lance kojima mogu čvrsto da se zakače na međufazu čvrsto/tečno i stabilizirajuće lance koji obezbeđuju efektivnu sternu stabilizaciju (Tadros, 2005). Međutim, sa druge strane pokazano je da upotreba polimera kao stabilizatora lipidnih nanočestica, ponekad zahteva relativno visoke koncentracije za efikasnu stabilizaciju. Siekmann i Westesen (1994a) su pokazali da 2 % (m/m) nejonskog polimera Tyloxapol® (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol polimer sa formaldehidom i oksiranom) nije dovoljno da se stabilizuje 10 % (m/m) disperzije lipidnih nanočestica u čiji sastav ulazi gliceril tripalmitat kao lipidni matriks. Sa druge strane, neki autori navode da su neki polimeri osetljivi na prisustvo elektrolita (Freitas i Müller, 1999). Visoke koncentracije elektrolita vode dehidraciji adsorpcionog sloja poloksamera i smanjenju debljine tog sloja, a time i smanjenju njihovog efekta stabilizacije (Tadros i Vincent, 1980).

Nejonski surfaktanti su nenaelektrisani, imaju nizak potencijal za iritaciju kože, te se stoga njima daje prednost u preparatima za kožu. Osim toga, oni predstavljaju najraznovrsniju grupu PAM-a u pogledu hemijske strukture, osobina i mogućnosti primene (Tadros, 2005). Prema vrsti hidrofilne glave nejonski surfaktanti mogu se podeliti na polietoksilovane, sa hidrofilnim glavama sastavljenim od polietilenoksida i polihidroksilne surfaktante koji imaju polihidroksilne glavene grupe. Tradicionalno korišćeni nejonski surfaktanti u stabilizaciji lipidnih nanočestica uglavnom se dobijaju postupkom etoksilacije masnih kiselina/masnih alkohola. Hemijski polietoksilovani surfaktanti su polietri. Na sobnoj temperaturi su stabilni, a na nižim temperaturama postaju polučvrsti (Bergh i sar., 1999; Evetts i sar., 1995). Međutim, pokazano je da tokom čuvanja na sobnoj temperaturi, lako dolazi do oksidacije polietoksilovanih surfaktanata atmosferskim kiseonikom (autooksidacija) (Bergh i sar., 1997; Bodin i sar., 2002; Donbrow, 1987; Karlberg i sar., 2003). Mehanizam ove oksidacije je formiranje hiperoksida kao primarnih oksidacionih proizvoda, potom formaldehida, alkilovanih aldehida i drugih karbonilnih jedinjenja (Bergh i sar., 1998a; Bergh i sar., 1998b; Bergh i sar., 1999; Decker i Marchal, 1973). Testovi na zamorcima su pokazali da većina ispitivanih oksidacionih proizvoda dovodi do iritacije kože (Bergh i sar., 1998a; Bergh

i sar., 1998b; Bergh i sar., 1999; Bodin i sar., 2001; Bodin i sar., 2003) i među potencijalnim alergenima koji se formiraju tokom autooksidacije, formaldehid i acetaldehid se smatraju izvorom neočekivanih reakcija (Matura i sar., 2004). Formaldehid je dobro poznati kontaktni alergen i unutar Evropske unije, kozmetički proizvodi koji sadrže više od 0,05 % (m/m) formaldehida, moraju biti adekvatno obeleženi zbor rizika od iritacije kože (De Groot i sar., 2009). Praktična posledica ovih rezultata, jeste da polietoksilovani surfaktanti nakon čuvanja na sobnoj temperaturi mogu imati potpuno drugačiji hemijski sastav od originalnog proizvoda, i zbog toga u nekim situacijama, ne mogu obezbediti zadovoljavajući stepen kompatibilnosti sa kožom. Dodatni problem u toku proizvodnje polietoksilovanih surfaktanata može da bude formiranje toksične komponente, dioksana, koja nije prihvatljiva čak ni u maloj količini, zbog svoje karcinogenosti (Tadros, 2005). Uz to, nizak stepen biodegradabilnosti nejonskih polietoksilovanih surfaktanata predstavlja sve veći problem. Ova činjenica usmerava savremena istraživanja u ovoj oblasti ka korišćenju surfaktanata, koji se dobijaju iz prirodnih i obnovljivih izvora i koji ne sadrže molekul etilenoksida u svojoj strukturi (Johnson, 2001; Lanigan, 1999; Lanigan i Yamarik, 2001; Tadros, 2005). Uz to, sa povećanjem svesti ljudi o značaju zaštite životne sredine, farmaceutska i kozmetička industrija sve više prepoznaju potrebu za upotrebom sastojaka, koji se dobijaju iz obnovljivih izvora (označenih terminom prijatelji kože i čovekove okoline), kao i za procenom potencijala ovih surfaktanata u stabilizaciji konvencionalnih, ali i novijih (nanosistema) za isporuku lekovitih supstanci. Paralelno sa tim u svesti istraživača, sve više raste interesovanje za polihidroksilne surfaktante, zato što se polihidroksilna grupa može dobiti iz prirodnih i obnovljivih izvora.

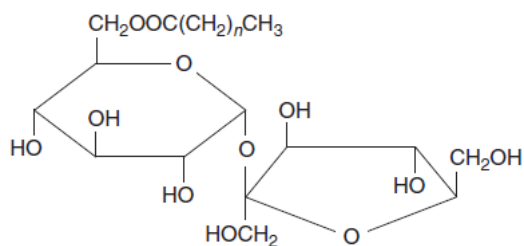
2.3.5. Noviji surfaktanti u formulaciji lipidnih nanočestica

Kao alternativa klasičnim nejonskim surfaktantima, danas pažnju istraživača sve više privlače surfaktanti, koji u svojoj strukturi sadrže polihidroksilnu glavenu grupu, i u literaturi se označavaju terminom polihidroksilni surfaktanti. Polihidroksilni surfaktanti se dobijaju zamenom etilenoksidne grupe hidroksilnim grupama. Vezivanjem hidrofilnih i hidrofobnih delova u molekulu polihidroksilnih surfaktanata, može se uticati na različite načine na HLB vrednost ovih molekula i njihove stabilizirajuće osobine. Uobičajeni hidrofilni delovi u strukturi polihidroksilnih surfaktanata su

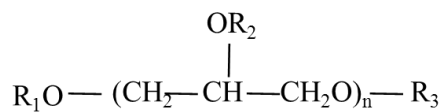
glicerol, ugljeni hidrati (saharoza, glukoza) i njihovi alkoholi (sorbitol) i glikoli. Najvažnije grupe polihidroksilnih surfaktanata su šećerni (saharozni) estri, glicerol (i poliglicerolski) estri, alkil (poli)glukozidi, glikolni estri, i sorbitanski estri (slika 2.22.) (Tadros, 2005; von Rybinski i Hill, 1998).

Polihidroksilni surfaktanti imaju izraženije ambifilne osobine od etoksilovanih surfaktanata. Hidrofilnije osobine su rezultat većeg broja hidroksilnih grupa u njihovoj strukturi, što obezbeđuje jaku vodoničnu vezu sa vodom, smanjuje mogućnost dehidratacije hidrofilnih grupa u molekulu ovih surfaktanata pri povišenoj temperaturi i ima za rezultat veću kritičnu temperaturu flokulacije u odnosu na polietoksilovane surfaktante (slika 2.23.). Hidrofobni deo u molekulu polihidroksilnih surfaktanata (alkil lanac koji potiče od masne kiseline/masnog alkohola) ima više izražena hidrofobna svojstva od lanaca propilen oksida u molekulu polietoksilovanih surfaktanata i zahvaljujući svojoj hemijskoj strukturi pokazuje visok afinitet za površinu hidrofobnih čestica, kakve su lipidne nanočestice. Dodatni razlog za povećano interesovanje za ove surfaktante, može biti i njihova manja osetljivost na prisustvo elektrolita i promene pH vrednosti u odnosu na surfaktane koji sadrže polietilenoksid (Söderman i Johansson, 1999; Tadros, 2005).

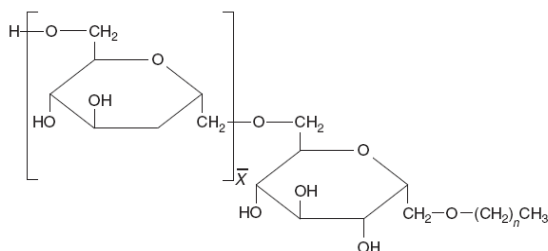
Dakle, nejonski polihidroksilni surfaktanti poseduju unapređene tehnološke, dermatološke i ekološke osobine, zbog čega se sve više ističe značaj njihove primene u preparatima za kožu (Helgason i sar., 2009; Stubenrauch, 2001; von Rybinski i Hill, 1998). Uzimajući u obzir sve prethodno navedene aspekte, veći deo ove doktorske disertacije biće posvećen ispitivanju funkcionalnosti polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji lipidnih nanočestica.



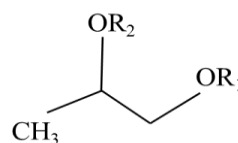
(a)



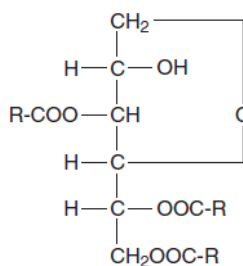
(b)



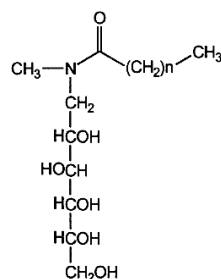
(c)



(d)

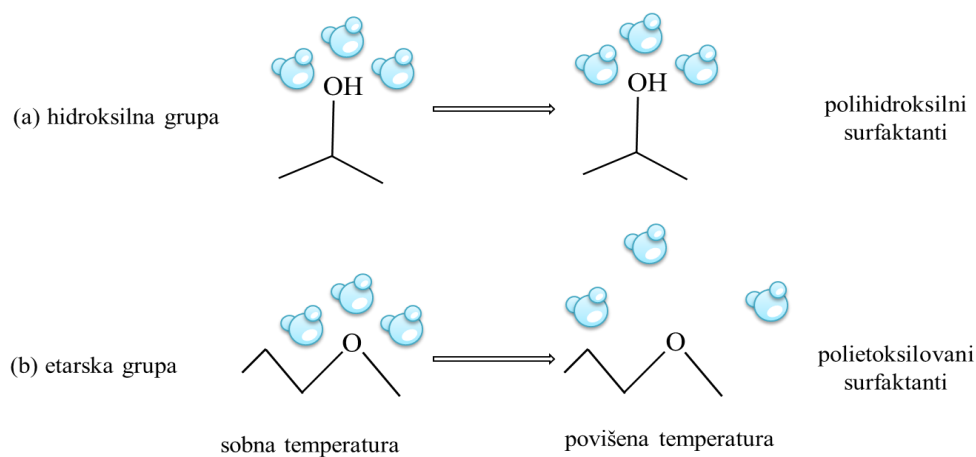


(e)



(f)

Slika 2.22. Opšte strukturne formule predstavnika polihidroksilnih surfaktanata: (a) šećerni (saharozni) estri, (b) poliglicerolski estri, (c) alkil (poli)glukozidi, (d) glikolni estri, (e) sorbitanski estri, (f) alkil glukamidi (preuzeto i prilagođeno iz von Rybinski i Hill, 1998)



Slika 2.23. Afinitet polihidroksilnih i polietoksilovanih surfaktanata za molekul vode na sobnoj i povišenoj temperaturi

2.3.5.1. Šećerni estri

Šećerni estri su nejonski surfaktanti sastavljeni uglavnom od saharoze kao hidrofilne grupe i masne kiseline kao lipofilne grupe (slika 2.22.a) i često se u literaturi označavaju terminom estri saharoze. Molekul saharoze sadrži osam hidroksilnih grupa, odnosno najviše osam molekula masnih kiselina može biti vezano za jedan molekul saharoze. Variranjem broja masnih kiselina koje reaguju sa jednim molekulom saharoze, dobijaju se estri saharoze (mono-, di-, poliestri) sa različitim osobinama. Uobičajeno se esterifikacija saharoze vrši zasićenim masnim kiselinama (laurinska (C_{12}), miristinska (C_{14}), palmitinska (C_{16}), stearinska (C_{18}), beheninska (C_{22})) ili nezasićenim masnim kiselinama (oleinska (C_{18})). Komercijalne PAM-e iz grupe šećernih estara su složene mešavine koje se razlikuju po stepenu esterifikacije saharoze i dužini alkil lanca masnih kiselina. Estri saharoze sa visokim sadržajem monoestara su hidrofilniji, dok estri sa višim stepenom esterifikacije su lipofilniji. Variranjem prirode i broja masnih kiselina, koje učestvuju u esterifikaciji saharoze, dobijaju se tenzidi sa širokim spektrom HLB vrednosti. U zavisnosti od sastava i stepena esterifikacije, estri saharoze mogu da budu u čvrstom ili tečnom agregatnom stanju. Rastvorljivost šećernih estara se smanjuje sa povećanjem stepena esterifikacije i sa povećanjem dužine alkil lanca u molekulu masnih kiselina. Šećerni monoestri naročito oni sa kraćim alkil lancima u molekulu pokazuju dobru rastvorljivost u vodi, dok su di- i poliestri delimično rastvorni ili potpuno nerastvorni u vodi. Stepem esterifikacije šećernih estara takođe određuje njihovu površinsku aktivnost i temperaturu topljenja. Temperatura topljenja većine šećernih estara koji se koriste u farmaceutskim i kozmetičkim formulacijama, kreće se u intervalu od 45 - 65 °C. Za razliku od šećernih estara sa visokim HLB brojem, šećerni estri sa nižim HLB brojem, nemaju karakteristične temperature topljenja (Heng i sar., 2003; Szűts i Szabó-Révész., 2012).

Veliki broj šećernih estara (npr. saharoza stearat, saharoza palmitat, saharoza oleat, saharoza kokoat, saharoza miristat) su dozvoljeni po Kozmetičkoj direktivi, pa se stoga mogu koristiti u kozmetičkim proizvodima na teritoriji Evropske unije. Od ranih 60-ih godina šećerni estri se koriste kao aditivi u prehrambenoj industriji (pr. E473). Svakako najveću primenu danas ovi surfaktanti nalaze u farmaceutskoj industriji, u formulacijama različitih konvencionalnih i naprednih sistema za isporuku lekova (Szűts i Szabó-Révész., 2012).

Saharoza stearat i saharoza palmitat su oficinalni u Evropskoj i Američkoj farmakopeji, zbog čega se danas favorizuje njihova upotreba u formulaciji lekovitih preparata. Najnoviji rezultati ukazuju na činjenicu da u oblasti farmaceutske tehnologije, šećerni estri nalaze veliku primenu u formulaciji različitih nanosistema. Zimmermann i Müller (2001) su ispitivali stabilnost vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih šećernim estrima u rastvorima različite pH vrednosti u prisustvu elektrolita. Wissing i Müller (2003) su razvili formulacije čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih saharoza stearatom za primenu na koži i ispitivali efekte ove formulacije *in vivo*. Lippacher i sar. (2000, 2001, 2002, 2004) su takođe ispitivali efikasnost saharoza stearata u stabilizaciji vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica. Značajan napredak u okviru pomenutih ispitivanja napravljen je sa razvojem disperzija čvrstih lipidnih nanočestica, koje sadrže visoku koncentraciju lipida, čija konzistencija se može menjati od tečne do polučvrste sa povećanjem koncentracije lipida. U studiji koju su izveli Arica i sar. (2006) razvijene su formulacije čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih šećernim estrima metodom iniciranja rastvarača i uz primenu ultrazvuka. Piao i sar. (2008) su formulisali uljane nanosuspenzije za transdermalnu isporuku diklofenak-natrijuma, uz korišćenje saharoza erucata. Takegami i sar. (2008) su koristili šećerne estre u cilju povećanja fizičke stabilnosti nanoemulzija. Saharoza erukat je našao primenu i u razvoju uljanih nanosuspenzija za transkutanu isporuku proteina (Tahara i sar., 2008). Klang i sar. (2011) su razvili formulaciju nanoemulzija stabilizovanu saharoza stearatom, kao jedinim surfaktantom i potvrdili fizičku stabilnost ove nanoemulzije u dugoročnoj studiji stabilnosti. Dobijeni rezultati su se poredili sa rezultatima dobijenim za nanoemulzije stabilizovane standardnim emulgatorom, lecitinom. Dijametar kapi u nanoemulzijama stabilizovanim saharoza stearatom bio je manja od dijametra kapi u nanoemulzijama stabilizovanim lecitinom, a takođe pomenute formulacije su pokazale bolju fizičku stabilnost u toku ispitivanog perioda čuvanja. Dobijeni rezultati ukazali su na bolju funkcionalnost saharoza stearata, u stabilizaciji nanoemulzija u poređenju sa lecitinom.

2.3.5.2. Poliglicerolski estri masnih kiselina

Poliglicerolski estri masnih kiselina su nejonski surfaktanti koji se dobijaju esterifikacijom jedne ili više OH grupa (poli) glicerola masnim kiselinama (zasićenim ili mononezasićenim) (slika 2.22.b) (Dobson i sar., 1993). Poliglicerolski estri masnih kiselina su poznati još od početka dvadesetog veka, međutim, u poslednjih nekoliko godina intenzivnije se radi na razvoju proizvoda visokog stepena čistoće, što je uslovalo povećano interesovanje farmaceutske i kozmetičke industriji za ove PAM-e. Kao trifunkcionalni molekul, glicerol se može kondenzovati, dajući pri tome kondenzacione proizvode pod nazivom poligliceroli ili poliglicerolski estri. Najjednostavniji primer poliglicerolskih estara masnih kiselina su diglicerolski estri. Ako su primarne hidroksilne grupe uključene u reakciju esterifikacije nastaju linearni molekuli, a ako su uključene sekundarne hidroksilne grupe, formiraju se nelinearni (razgranati) molekuli. Na taj način se formiraju molekuli diglicerola, a ako se polimerizacija nastavi dalje dobijaju se tri-, tetra- i poliglicerolski estri. Uobičajeno, 30 - 50 % od ukupne količine hidroksilnih grupa u molekulu glicerola je esterifikovano masnim kiselinama. Najčešće masne kiseline koje ulaze u sastav poliglicerolskih estara su laurinska, stearinske, oleinska kiselina ili masne kiseline koje se nalaze u biljnim uljima (laneno ulje, ricinusovo ulje). Bez obzira koja masna kiselina ulazi u sastav poliglicerolskih estara, dobijaju se smeše koje se međusobno razlikuju po stepenu polimerizacije, vrsti i položaju esterifikovanih masnih kiselina (elektronska baza podataka i).

Poliglicerolski estri su danas važne nejonske PAM-e koje nalaze široku primenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Zahvaljujući svom amfifilnom karakteru koriste se kao stabilizatori suspenzija, emulgatori i sredstva za povećanje viskoziteta. U kozmetičkoj industriji poliglicerolski estri masnih kiselina se koriste u gelovima za kosu, emulzijama i losionima za čišćenje kože, kremovima za decu, hidrantnim kremovima, kozmetičkim proizvodima za zaštitu kože od sunca. Dugi niz godina, poliglicerolski estri masnih kiselina su se koristili u prehrambenoj industriji, zbog čega su označeni kao PAM bezbedne za oralnu primenu (elektronska baza podataka i).

2.3.5.3. Alkil (poli)glukozidi

Alkil (poli)glukozidi (slika 2.22.c) su nejonske PAM-e, koje se dobijaju iz obnovljivih izvora, kao što su glukoza i masni alkoholi iz skroba i palminog ulja (Tsushima, 1995). Prvi alkil glukozidni surfaktant sintetisao je i identifikovao Emil Fischer pre više od 100 godina. Međutim, postupci industrijskog dobijanja koji bi bili ekonomični i efikasni, te na taj način komercijalno prihvatljivi razvijeni su tek pre oko 30-ak godina. U tom kontekstu se za alkil (poli)glukozide u literaturi često koristi termin nova klasa surfaktanata. Danas ovi surfaktanti predstavljaju važnu grupu biokompatibilnih surfaktanata, čija glavna karaktersitika jeste dužina alkil lanca i prosečan broj monosahardnih jedinica vezanih za alkil lanac (stepen oligomerizacije) (von Rybinski i Hill, 1998).

Alkil (poli)glukozidi se dobijaju iz obnovljivih sirovina, te stoga poseduju veoma dobar ekotoksikološki profil. Rezultati ispitivanja nedvosmisleno ukazuju na podatak, da su ovi molekuli lako biorazgradivi, kao i da je vreme potrebno za potpunu biodegradaciju relativno kratko. C12-14 alkil poliglukozidni surfaktant je testiran tri puta, i dobijeni rezultati su potvrdili veoma visok stepen krajnje biodegradacije u periodu od 28 dana (Steber i sar., 1997).

Zahvaljujući ekonomičnoj proizvodnji i povoljnim ekološkim i tehničkim osobinama, alkil poliglukozidi danas nalaze sve širu primenu u formulaciji različitih sistemima za isporuku lekova (Manconi i sar., 2006, Messinger i sar., 2007). Na osnovu rezultata toksikoloških testova, alkil (poli)glukozidi su deklarirani kao bezbedni i za ljudsku upotrebu (testovi akutne toksičnosti i hemolitički testovi) (Aulmann i Sterzel, 1997). Na osnovu testova akutne oralne i dermalne toksičnosti, kao i na osnovu ispitivanja kompatibilnosti sa kožom alkil poliglukozidi se ne smatraju toksičnim ili štetnim. Sa druge strane, čisti surfaktanti se klasifikuje kao iritansi kože i oka. U *in vitro* testovima, alkil glukozidi nisu pokazali nikakav potencijal za mutacije gena i hromozoma. Odsustvo sistemske toksičnosti takođe je registrovano u studijama subhronične oralne toksičnosti kod mužjaka i ženki Vistar pacovi, koji su dobijali dnevnu dozu od 1000 mg/kg telesne mase/dan surfaktanta (Messinger i sar., 2007) .

Dermatološki, alkil (poli)glukozidi predstavlja novu grupu vrlo blagih PAM-a, koje su izuzetno pogodne za upotrebu sami kao surfaktanti ili kao kosurfaktani u formulaciji proizvoda koji se smatraju blagim za kožu. Rezultati prethodnih studija pokazali su da

alkil (poli)glukozidi ispoljavaju modifikovane adsorpcione osobine na površini kože, niži stepen penetracije u niže slojeve epidermisa i dermisa, što posledično rezultuje nižim iritacionim potencijalom. U poređenju sa standardnim tenzidima (npr. natrijum lauril sulfat) vodeni rastvor alkil (poli)glukozida u obliku C12-14 komercijalnog proizvoda ispoljio je niži potencijal za iritaciju kože, kako u pogledu parametra eritema kože kao pokazatelja iritacije kože tako i u pogledu naknadne deskvamacije kože kao parametra koji se povezuje sa hidratacijom *stratum corneum*-a. Optimalna kompatibilnost alkil (poli)glukozidnih surfaktanata sa kožom, može se postići pažljivim odabirom surfaktanata u pogledu dužine alkil lanca i stepena polimerizacije (Hill i sar., 1997).

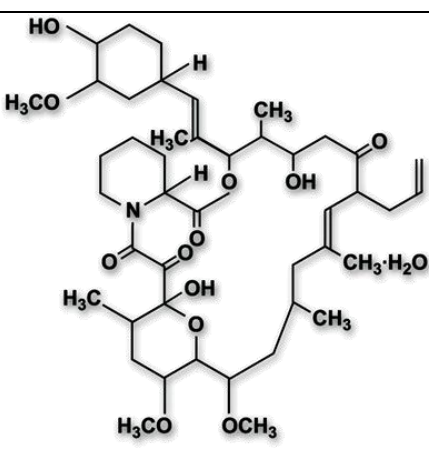
Pored povoljnih dermatoloških osobina, utvrđeno je da alkil (poli)glukozidi poseduju izuzetno interesantne fizičko-hemijske osobine, koje se u nekim slučajevima, jasno razlikuju od osobina drugih nejonskih PAM-a. Kritična micelarna koncentracija (KMK) čistih alkil monoglukozida i tehničkih alkil poliglukozida se može uporediti sa KMK nejonskih polietoksilovanih surfaktanata. Dužina alkil lanca ima daleko veći uticaj na KMK od broja glukozidnih grupa u molekulu. Iako se KMK alkil (poli)glukozida može upoređivati sa KMK drugih nejonskih polietoksilovanih surfaktanata, uočava se trend njenog smanjenja sa povećanjem dužine alkil lanca. Alkil (poli)glukozidi predstavljaju mešavinu homologa, anomera i izomera. Kratkolančani i srednjelančani alkil (poli)glukozidi se rastvaraju u vodi i pokazuju dobar potencijal za snižavanje međupovršinskog napona i kontaktnog ugla. Ovi surfaktanti su stabilni u rastvorima širokog opsega pH vrednosti kao i u prisustvu elektrolita. Pored toga, u literaturi se navodi da alkil poliglukozidi pokazuju sinergizam sa drugim PAM-a. Kao rezultat povoljnih fizičko-hemijskih i dermatoloških osobina poslednjih godina alkil (poli)glukozidi sve više potiskuju nejonske PAM-e koje se dobijaju iz petrohemijskih izvora, te se stoga čak prema mišljenju nekih autora smatraju novom klasom surfaktanata (von Rybinski i Hill, 1998).

2.4. Takrolimus kao model lekovita supstanca

2.4.1. Fizičko-hemijske osobine, farmakološki profil, mehanizam delovanja i upotreba takrolimusa

Takrolimus je 23-člani makrolidni lakton i jedan je od prvih makrolidnih imunosupresiva koji su otkriveni, nakon otkrića rapamicina 1975. godine. Ime takrolimus potiče od mesta njegovog otkrivanja (Tsukuba), hemijske strukture (makrolid) i farmakološkog dejstva (imunosupresiv). Hemijsku strukturu takrolimusa prvi put su opisali Tanaka i sar. (1987). IUPAC naziv, molekulska formula i molekulska masa takrolimusa prikazani su u tabeli 2.4 (Hane i sar., 1992).

Tabela 2.4. IUPAC naziv, molekulska formula, molekulska masa, hemijska struktura i temperatura topljenja takrolimusa (preuzeto i prilagođeno iz Hane i sar., 1992)

IUPAC naziv:	(—) – (1 <i>R</i> , 9 <i>S</i> , 12 <i>S</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>S</i> , 17 <i>R</i> , 18 <i>E</i> , 21 <i>S</i> , 23 <i>S</i> , 24 <i>R</i> , 25 <i>S</i> , 27 <i>R</i>)-17-allyl-1,14-dihydroxy-12-[(<i>E</i>)-2-[(1 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)-4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1-methylvinyl]-23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetramethyl-11,28-dioxo-4-azatricyclo[22.3.1.0] octacos-18-ene-2,3,10,16-tetrone hydrate
Molekulska formula	C ₄₄ H ₆₉ NO ₁₂ · H ₂ O
Molekulska masa	822,05
Hemijska struktura	
Temperatura topljenja	127 - 129 °C

Takrolimus je beo kristalni prašak. Sadrži jedan molekul vode vezan kao kristalna voda, i pri atmosferskim uslovima ne vezuje i ne oslobađa vodu. Praktično je nerastvoran u

vodi i n-heksanu, lako se rastvara u etanolu i etilacetatu, a vrlo lako u metanolu, acetonu i hloroformu (tabela 2.5.).

Tabela 2.5. Rastvorljivost takrolimusa u različitim rastvaračima (Hane i sar., 1992)

Rastvarač	Rastvorljivost (mg/ml) at 25°C
Hloroform	594
Metanol	588
Aceton	542
Etanol	370
Etil-acetat	301
Etil-etar	54.7
n-heksan	0.071
Voda	0,012

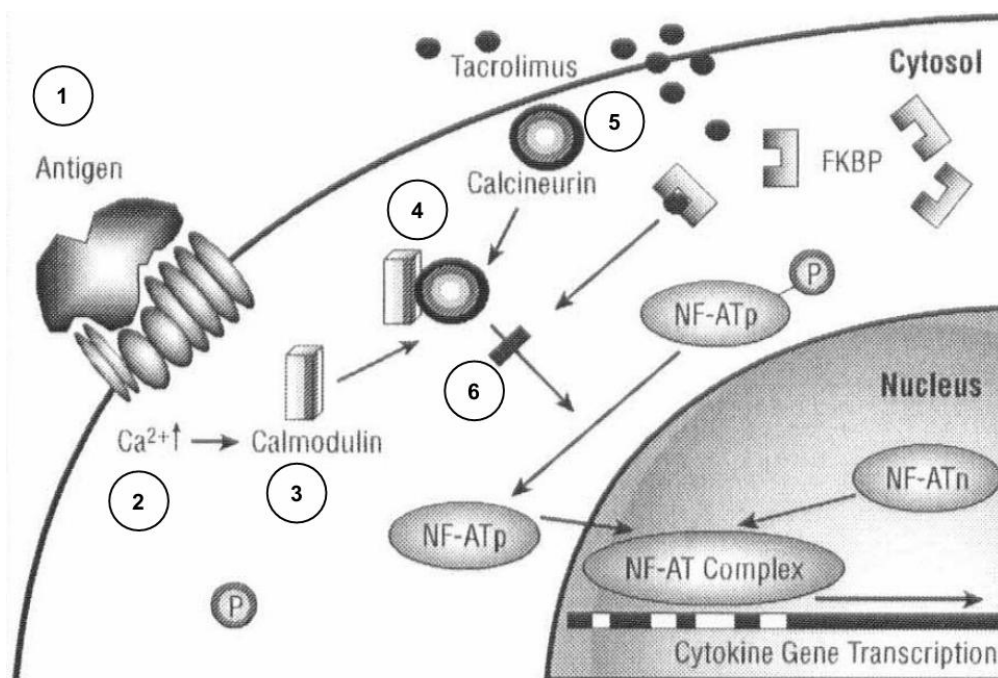
Rastvorljivost takrolimusa u vodi je konstantna pri pH vrednosti od 1 - 9. Nema literaturnih podataka o polimorfizmu takrolimusa. U čvrstom stanju, takrolimus postoji kao jedan konformer, u cis-obliku. Particioni koeficijent u n-oktanol/voda sistemu veći je od 1000 (tabela 2.6.) (Hane i sar., 1992). Particioni koeficijent i odgovarajuća logP vrednost koja iznosi $3,96 \pm 0,83$ takođe su u skladu sa niskom rastvorljivošću takrolimusa u vodi. pH vrednost ima veoma mali uticaj na distribuciju takrolimusa između lipofilne i hidrofilne faze, tj. log P se ne menja sa povećanjem pH vrednosti od 1 - 8. Pri pH vrednosti 9, log P iznosi 3,91, dok pri pH vrednosti 10 log P iznosi 3,64, što ponovo ukazuje na slabu distribuciju takrolimusa u hidrofilnu fazu (SciFinder Scholar, 2007).

Tabela 2.6. n-oktanol/voda particioni koeficijent takrolimusa (Hane et al., 1992)

Koncentracija		
n-Oktanol faza (1)	Vodena faza (2)	P-vrednost [(1)/(2)]
34.19 mg/ml	0.8 µg/ml	1000<
33.83 mg/ml	0.8 µg/ml	1000<

Ciljno mesto delovanja takrolimusa su T-limfociti (slika 2.24.) (Ruzicka i sar., 1999; Stepkowski, 2000). Kada ova lekovita supstanca uđe u ćeliju, stvara se kompleks sa

ćelijski specifičnim imunofilinom, FK506 vezujućim proteinom (FKBP-12), što dovodi do inhibicije kalcineurin fosfataze. Molekul takrolimusa ima vezujući domen kojim može da se akumulira na FKBP-12 i efektorski domen kojim se dobijeni kompleks veže visokim afinitetom za kalcineurin fosfatazu i dovodi do njene inhibicije (Fruman i sar., 1992; Lane i sar., 1993; Liu i sar., 1991; Liu i sar., 1992; Morris, 1994). Inhibicija kalcinerin fosfataze, onemogućava defosforilaciju NF-AT, naknadno inhibira ulazak NF-AT u nukleus i suprimira transkripciju gena. Kao rezultat toga, smanjuje se i oslobađanje drugih citokina, faktora proliferacije i aktivacije T-limfocita, što smanjuje odgovor T ćelija na antigene (Gupta i sar., 2002; Thomson i sar., 1995; Wohlrab, 2006).



Slika 2.24. Mehanizam delovanja takrolimusa (FK 506): (1) vezivanje za antigen, (2) povećanje ćelijskog Ca^{2+} , (3) vezivanje Ca^{2+} za kalmodulin, (4) aktivacija kalcineurina, (5) vezivanje takrolimusa za FK-vezujući protein (FKBP), (6) sprečavanje defosforilacije NF -AT_p. NF - AT_p ne može da uđe u nukleus, ometa se formiranje NF-AT kompleksa i inhibira se transkripcija (preuzeto i prilagođeno iz Ruzicka i sar., 1999)

Pored ovog mehanizma, takrolimus takođe može imati širok spektar imunomodulatornih efekata, u lečenju različitih bolesti kože, preko vezivanja za površinu steroidnih receptora na ćeliji i inhibicije adhezije mast ćelija, inhibicije oslobađanja medijatora iz mast ćelija i bazofila, smanjenja intracelularnog adhezionog

molekula-1 i nishodne regulacije ekspresije IL-8 receptora i FcεRI na Langerhansovim ćelijama (Columbo i sar., 1995; Fleischer, 1999; Wollenberg i Bieber, 1997).

Takrolimus je odobren od strane FDA 1994. u transplantaciji jetre, a nakon toga njegova upotreba proširena je i na transplantaciju bubrega, srca, tankog creva, pankreasa, pluća, dušnika, kože, rožnjače, kostne srži i ekstremiteta. Pored primene u transplantaciji, takrolimus se koristi i u dermatologiji. Za primenu na koži, takrolimus je komercijalno dostupan u obliku lipofilne masti (Protopic® 0,03 % i 0,1 % mast; Astellas Pharm Inc., ranije Fujisava Pharmaceutical Co., Ltd., Japan) koja je specijalno razvijena za lečenje atopijskog dermatitisa. Takrolimus mast je odobrena najpre u Japanu 1999. godine, a nakon toga 2000. godine u SAD i 2002. godine u nekim zemljama Evropske unije. U sastav Protopic® masti ulazi podloga, koja se sastoji od belog vazelina, belog pčelinjeg voska, tečnog parafina i čvrstog parafina. Propilen karbonat u kome je rastvoren takrolimus u ovoj formulaciji dispergovan je u podlozi. Protopic® mast se propisuje pacijentima kod kojih konvencionalna terapija nema efekta ili je pak uočena intolerancija na istu (DAZ, 2002).

Uobičajeno se Protopic® mast nanosi na promene na koži koje su zahvaćene atopijskim dermatitisom, dva puta dnevno, dok se ne uoče znaci poboljšanja, nakon čega se koristi u kontinuitetu dva puta nedeljno u nižim koncentracijama. Odnedavno se ispituje mogućnost primene Protopic® masti u lečenju vitiliga kod dece, kao i mogućnost primene ove formulacije na osetljivim delovima tela (lice, vrat) (Silverberg i sar., 2004). Iako još uvek nije odobren za lokalnu terapiju *psoriasis vulgaris*, takrolimus se može klasifikovati kao efikasan antiinflamatorni lek za psorijazu, zbog toga što su studije na lezijama i inverznim lezijama (Freeman i sar., 2003; Kroft i sar., 2005; Lebwohl i sar., 2005; Steele i sar., 2005) kao i korišćenje modifikovanih nosača i okluzije pokazale obećavajuće rezultate (Erdogan i sar., 2002; Pople i Singh, 2010; Remitz i sar., 1999).

Efikasnost takrolimusa u lokalnoj terapiji atopijskog dermatitisa, već je dokazana u placebo-kontrolisanoj, dvostruko slepoj, multicentričnoj studiji u Evropi i SAD (Alaiti i sar., 1998; Boguniewicz i sar. 1998). Takrolimus je takođe pokazao veću efikasnost i brži početak delovanja od inhibitora kalcineurina, pimekrolimusa (Paller i sar., 2005).

Protopic® je potvrđen da je efikasan u lečenju umerenih do teških oblika atopijskog dermatitisa, kod odraslih i kod dece starije od 2 godine. Rezultatih nekih studija ukazuju

da je sistemska apsorpcija takrolimusa nakon primene na koži minimalna (Choi i Cho, 2009; Ruzicka i sar., 1999; Yoshida i sar., 2004).

Mehanizam delovanja takrolimusa u lečenje atopijskog dermatitisa, nije u potpunosti poznat i razjašnjen. Takrolimus deluje prvenstveno na T ćelije, sprečava njihovu aktivaciju i oslobađanje pro-inflamatornih citokina. Pored ovog mehanizma delovanja pokazano je da takrolimus specifično utiče i na druge imune ćelije uključene u patogenezu atopijskog dermatitisa, blokira stvaranje i oslobađanje citokina u mast ćelijama, eozinofilima i bazofilima, inhibira aktivaciju T-ćelija za antigen-prezentujuće dendritične ćelije, i smanjuje broj inflamatornih dendritskih epidermalnih ćelija u lezijama atopijskog dermatitisa (Beck, 2005; Kohyama i sar., 1999; Sawada i sar., 1987; Sengoku i sar., 2000; Wollenberg i Bieber, 2001).

Studije o uticaju 0,1 % (m/m) takrolimus masti pokazale su da takrolimus dovodi do smanjenja kolonizacije *S. aureus* nakon primene. Takrolimus nema antistafilokoknu aktivnost, ali smanjuje kolonizaciju kože *S. aureus-om*, usled poboljšanja uslova na površini kože (Pournaras i sar., 2001; Remitz i sar., 2001). Pošto takrolimus nema inhibitorni efekat na smanjenje kolonizacije *S. aureus*, neki autori predlažu da se efekat leka kategoriše kao imunomodulatorni, a ne kao imunosupresivni (Gupta i sar., 2002).

Pored gore pomenutog mehanizma delovanja, takrolimus utiče i na druge procese koji su uključeni u patogenezu inflamatornih bolesti kože. Dakle, takrolimus je efikasan u lečenju onih bolesti kože kod kojih T ćelije nemaju uvek centralnu ulogu u patogenezi. Postoje izveštaji koji ukazuju na ulogu takrolimusa u lečenju gangrenozne piodermije (lat. *pyoderma gangrenosum*) (Jolles i sar., 1999; Richter-Hintz i sar., 2000; Schuppe i sar., 2000), lihen planusa (lat. *lichen planus*) (Lener i sar., 2001; Vente i sar., 1999), vitiliga (lat. *vitiligo*), alopecije areate (lat. *alopecia areata*), teških oblika refraktornog uveitisa (iritisa) (lat. *uveitis*) (Evans, 2005), rozacee (lat. *rosacea*) koja nastaje posle primene kortikosteroida (Goldman, 2001), hroničnih ulcerativnih promena na nogama kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (Schuppe i sar., 2000).

2.4.2. Problemi sa takrolimusom/formulacijama sa takrolimusom za primenu na koži

Problemi sa takrolimusom/takrolimus masti (Protopic[®]) mogu se podeliti u dve grupe: (a) problemi vezani sa bezbednost lokalno primenjenog takrolimusa i (b) problemi vezani za neadekvatnu isporuka leka na ciljno mesto delovanja usled slabe i veoma promenljive apsorpcije takrolimusa.

Najčešći neželjeni efekti, koji se javljaju nakon primene takrolimus masti, su prolazne reakcije preosetljivosti na mestu primene, kao što je pruritus. Stepenn pomenutih reakcija preosetljivosti vezan je za težinu bolesti, i učestalost pojave ovih reakcija smanjuje se vremenom sa ublažavanjem simptoma atopijskog dermatitisa. Reakcije preosetljivosti su obično blagog do umerenog intenziteta, traju 15 - 20 min nakon primene leka, javljaju se tokom prvih nekoliko dana lečenja i uglavnom iščezavaju sa vremenom. Peckanje, koje se obično opisuje kao osećaj toplote i prolaznog bola, prijavljeno je kao neželjeni efekat, kod 18 - 59 % pacijenata koji su bili uključeni u kliničke studije. Pruritus i eritem, kao neželjeni efekat prijavljeni su kod više od 10 % pacijenata u kliničkim studijama, ali su bili blagog do umerenog intenziteta i prolazni (EMA, 2006a). U kliničkim studijama, učestalost pojave neželjenih reakcija na koži bila je povezana sa težinom bolesti. Kod pacijenata sa težim oblicima atopijskog dermatitisa ili kod onih kod kojih je više od 75 % telesne površine bilo zahvaćeno atopijskim dermatitisom, u većoj meri su zabeležene neželjene reakcije na koži (Koo i sar., 2005; Reitamo i sar., 2004; Soter i sar., 2001). Pored toga, retrospektivna analiza dve dugotrajne studije pokazala je da su neželjene reakcije bile dva puta ređe kod pacijenata sa blagim oblicima atopijskog dermatitis nego kod pacijenata sa teškim simptomima bolesti (Spergel i sar., 2003). Sa druge strane, značajno je pomenuti da su neželjene reakcije na koži retko dovodile do prekida terapije sa takrolimus masti.

Bezbednost takrolimus masti u dužem vremenskom periodu se procenjivala u tri studije koje su trajale 6-12 meseci (Kang i sar., 2001; Reitamo i sar., 2005; Reitamo i sar., 2000). Bezbednosni profil takrolimus masti tokom godinu dana lečenja, bio je sličan bezbednosnom profilu u kratkotrajnoj studiji, a većina neželjenih efekata javljala se na početku terapije i bila je povezana sa statusom bolesti (Kang i sar., 2001; Reitamo i sar., 2000). Sa izuzetkom simptoma nalik influenci, koji se smatraju sezonskim i ne dovode se u direktnu vezu sa primenom takrolimus masti, nije uočena prevalenca pojave

infekcija tokom vremena. Dalja potvrda dugoročne bezbednosti takrolimus masti, posle intermitentne primene formulacije kod odraslih i kod dece ispitivana je u tri velike studije koje su trajale 4 godine (Remitz i sar., 2007). Rezultati ovih istraživanja, pokazali su da osim ranije prijavljenih neželjenih efekata nije bilo novih neželjenih efekata, nakon dugotrajne primene takrolimus masti.

I pored pokazane efikasnosti u lečenju kožnih bolesti, EMA je 2006. godine preispitala bezbednost primene takrolimusa u lečenju atopijskog dermatitisa nakon prijavljenih slučajeva limfoma i kancera kože kod dece i odraslih koji su koristili Protopic[®] mast (EMA, 2006b). Prema mišljenju različitih eksperata iz ove oblasti inhibitori kalcineurina, uključujući i takrolimus nemaju direktan kancerogeni efekat, nego dovode do sistemske imunosupresije, što omogućava progresiju kancerogenih bolesti. Studije u kojima je praćen stepen sistemske apsorpcija takrolimusa pokazale su da je nakon primene takrolimus masti, apsorpcija leka bila minimalna kod većine pacijenata i da nije bilo dokaza o pojavi kumulativne imunosupresije (Harper i sar., 2005; Rubins i sar., 2005). Visoki nivoi takrolimusa u krvi uočeni su samo kod pacijenata kod kojih je bio narušen integritet kožne barijere tako da je mast sa takrolimusom bila kontraindikovana kod tih pacijenata (Allen i sar., 2001).

Još jedan nedostatak preparata sa takrolimusom je niska i veoma varijabilna apsorpcija molekula lekovite supstance iz Protopic[®] masti (Boguniewicz i sar., 1998; Kang i sar., 2001; Paller i sar., 2005; Ruzicka i sar., 1997). Niska i varijabilna apsorpcija lekovite supstance, povezuje se sa nepovoljnim fizičko-hemijskim osobinama takrolimusa u pogledu veličine molekula, hemijske strukture i lipofilnosti. Sa druge strane, Protopic[®] mast predstavlja relativno jednostavnu formulaciju, koja ne sadrži efikasan mehanizam za povećanje penetracije, niti jak ubrzivač penetracije.

Novi pristup u poboljšanju penetracije lipofilnih lekovitih supstanci u *stratum corneum* i dublje slojeve kože, je primena koloidnih nosača lekovitih supstanci. Inkapsulacija takrolimusa u efikasan koloidni nosač, sa čvrstim matriksom može biti pristup za smanjenje lokalne iritacije kože, s obzirom na činjenicu da lekovita supstanca neće biti u direktnom kontaktu sa kožom nakon primene. Pored toga, razvijeni nosač treba da ima potencijal da savlada *stratum corneum* i omogućiti da lekovita supstance stigne u dermis u dovoljnim terapijskim koncentracijama.

Mogućnost upotrebe lipidnih nanočestica (SLN, NLC) kao potencijalnih nosača za dermofarmaceutsku upotrebu takrolimusa, gotovo da nije istražena. U naučnim bazama podataka dostupne su studije, koje su izveli Pople i Singh (2010, 2011, 2012 i 2013). U ovim studijama ispitivana je mogućnost formulacije čvrstih lipidnih nanočestica i tzv. koloidnih modifikovanih nanolipidnih nosača koji su nakon toga inkorporirani u hidrofilni gel, kao nosač za lokalnu primenu takrolimusa. Sastojci čvrstih lipidnih nanočestica bili su pored takrolimusa, gliceril trimiristat (čvrst lipid), Tween[®] 80 i Arlacel[®] 80 (surfaktanti) i prečišćena voda, dok su koloidni modifikovani nanolipidni nosači, pored prethodno navedenih komponenata još sadržali propilenglikol-monokaprilat kao solubilizator. Koncentracija lipida u ovim formulacijama bila je relativno niska i iznosila je 5 % (m/m) (kod čvrstih lipidnih nanočestica) i 2 % (m/m), kod koloidnih modifikovanih nanolipidnih nosača. Rezultati istraživanja su pokazali da je *in vitro* permeacija takrolimusa iz hidrofilnog gela koji sadrži čvrste lipidne nanočestice bila 16 - 21 puta veća u poređenju sa Protopic[®] masti koja se koristila kao referentni proizvod, dok je *in vitro* penetracija lekovite supstance iz hidrofilnog gela koji sadrži koloidne modifikovane nanolipidne nosače, bila 5,6 - 6,1 puta veća u odnosu na referentni lek. Veći stepen penetracije takrolimusa iz ovih formulacija, autori su pripisali većoj brzini oslobađanja leka.

U ovoj doktorskoj disertaciji će biti predstavljen razvoj lipidnih nanočestica sa sadržajem lipida od 20 % (m/m) kao novih nosača za takrolimus, uz korišćenje nejonskih polihidroksilnih surfaktanata kao novijih stabilizatora lipidnih nanočestica, koji poseduju nizak nivo iritacije kože.

3. Cilj istraživanja

Cilj doktorske disertacije bio je da se ispita mogućnosti primene nejonskih polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji „praznih” formulacija lipidnih nanočestica i lipidnih nanočestica sa model lekovitom supstancom (takrolimus).

Preciznije, prvi cilj doktorske disertacije bio je da se (i) optimizuju procesni parametri za dobijanje disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima, (ii) ispita funkcionalnost pomenutih surfaktanata u formulaciji i stabilizaciji disperzija čvrstih lipidnih nanočestica i (iii) izvrši karakterizacija razvijenih formulacija. Važan cilj, takođe, bio je da se sistematski ispita uticaj hemijske strukture surfaktanata na fizičko-hemijske osobine čestica, tj. sposobnost kvašenja površine čestica surfaktantom, veličinu, stepen kristaliniteta i naelektrisanje čestica. Za izradu čvrstih lipidnih nanočestica, koristila se metoda tople homogenizacije pod visokim pritiskom. Po završenoj homogenizaciji pod visokim pritiskom, nosači su podvrgnuti fizičko-hemijskoj karakterizaciji. Karakterizacija je obuhvatila procenu fizičke stabilnosti nosača i karakterizaciju kristalne strukture lipidnog matriksa. U cilju ispitivanja fizičke stabilnosti čvrstih lipidnih nanočestica, relevantna ispitivanja ponovljena su nakon 30 dana čuvanja uzoraka na temperaturama $5 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $40 \pm 2^\circ\text{C}$ (kratkotrajna studija fizičke stabilnosti) i nakon 3 i 6 meseci čuvanja uzoraka na temperaturi $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (dugotrajna studija fizičke stabilnosti) metodama dinamičkog i statičkog rasipanja svetlosti i svetlosne mikroskopije. Morfologija čvrstih lipidnih nanočestica, ispitivala se skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Kao što je prethodno navedeno, ispitivani surfaktanti sadrže glicerol (poliglicerolski estri masnih kiselina) ili ugljene hidrate kao hidrofilni deo (šećerni estri i alkil poliglukozidi), a masne kiseline ili masne alkohole, kao lipofilni deo. Osobine ovih molekula određene su karakteristikama surfaktanata (stepen polimerizacije poliglicerolskog ostatka, stepen esterifikacije i vrsta masnih kiselina koje reaguju sa poliglicerolima i saharozom (poliglicerolski estri masnih kiselina, šećerni estri) i dužina alkil lanca (alkil poliglukozidi)). Stoga se sposobnost surfaktanata da stabilizuju čvrste lipidne nanočestice, ispitivala u funkciji strukture surfaktanata.

S obzirom da formulacija čvrstih lipidnih nanočestica podrazumeva fizičku stabilnost u pogledu veličine čestica, ali i u pogledu kristalne strukture lipidnog matriksa čestica, nametnula se potreba za karakterizacijom stepena kristaliniteta lipidnog matriksa nanočestica, koja je izvedena tehnikom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije. Poznato je da se karakteristike nehomogenizovanog lipida, tj. lipida u *bulk* stanju, razlikuju od karakteristika lipida u nanočesticama. Stoga je karakterizacija lipida u čvrstim lipidnim nanočesticama bila praćena karakterizacijom lipida i surfaktanata u *bulk* stanju (nehomogenizovani lipid i surfaktanti).

Na osnovu rezultata prve faze istraživanja, izvršena je selekcija surfaktanata koji su se koristili u sledećoj fazi. Druga faza istraživanja obuhvatila je formiranje čvrstog matriksa nanočestica sa rastućim udelom tečnog lipida (ulja) u čvrstom lipidu, formulaciju nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima sa pomenutim lipidnim matriksima, optimizaciju procesnih parametara za dobijanje nosača i karakterizaciju dobijenih nosača. U cilju utvrđivanja uticaja udela tečnog lipida (ulja) na strukturu čvrstog lipida izvedena je karakterizacija pripremljenih lipidnih matriksa DSC tehnikom. Analogno prvoj fazi istraživanja, karakterizaciju nehomogenizovanog lipidnog matriksa pratila je i karakterizacija surfaktanata u *bulk* stanju. U nastavku ove faze ispitivala se sposobnost polihidroksilnih surfaktanata da omoguće formiranje nanostrukturiranih lipidnih nosača, malog dijametra i uske raspodele čestica po veličini. U te svrhe, koristila su se tri surfaktanta sa bazično različitom hemijskom strukturom, iz grupe poliglicerolskih estara masnih kiselina, šećernih estara i alkil poliglukozida. U cilju utvrđivanja uticaja udela tečnog lipida (ulja) na karakteristike čestica, u ovoj fazi istraživanja pripremljene su formulacije nanostrukturiranih lipidnih nosača sa udelom tečnog lipida (ulja) u rasponu od 20 - 60 % (m/m). Karakterizacija razvijenih nosača izvedena je tehnikama dinamičkog i statičkog rasipanja svetla, svetlosnom mikroskopijom, merenjem zeta potencijala nosača i primenom tehnike diferencijalne skenirajuće kalorimetrije. Nanostrukturirani lipidni nosači se razlikuju od čvrstih lipidnih nanočestica po strukturi lipidnog matriksa, tj. prisustvu tečnog lipida. Stoga se u okviru ove faze disertacije, pratio uticaj udela tečnog lipida, kao i uticaj strukture surfaktanata iz grupe poliglicerolskih estara masnih kiselina, alkil poliglukozida i estara saharoze na veličinu čestica, naelektrisanje i kristalnu strukturu nosača. Na osnovu rezultata koji su dobijeni u prve dve faze, u trećoj

fazi istraživanja razvijene su formulacije lipidnih nanočestica sa takrolimusom, kojima se postiže trenutno i kontrolisano oslobađanje izabrane model lekovite supstance. Važan korak u tom pravcu predstavljao je izbor odgovarajućeg lipidnog matriksa, koji obezbeđuje visok stepen inkapsulacije lekovite supstance. Kao i u prethodnim fazama istraživanja, bilo je neophodno izvesti dodatne studije kojima bi se poredila struktura lipida u *bulk* stanju sa lipidom u lipidnim nanočesticama. U narednoj fazi istraživanja izvedena je *in vitro* studija oslobađanja takrolimusa iz lipidnih nanočestica na *Franz*-ovim difuzionim ćelijama preporučenim od strane FDA. Kao poredbeni formulacija u ispitivanjima brzine oslobađanja lekovite supstance iz lipidnih nanočestica koristila se nanoemulzija. Razvoj i optimizacija formulacije nanoemulzije sa sadržajem lipida i model lekovite supstance koji je identičan sadržaju lipida i lekovite supstance u lipidnim nanočesticama, odvijao se paralelno sa razvojem formulacije lipidnih nanočestica. Poznato je da metoda ispitivanja brzine oslobađanja lekovite supstance primenom *Franz*-ovih difuzionih ćelija je razvijena za polučvrste preparate za primenu na koži, a u literaturi, ima veoma malo podataka ovoj vrsti ispitivanja iz nanočestica. Stoga je ova faza istraživanja bila posvećena standardizaciji metode za ispitivanje brzine oslobađanja takrolimusa iz lipidnih nanočestica.

4. Eksperimentalni deo

4.1. Materijal

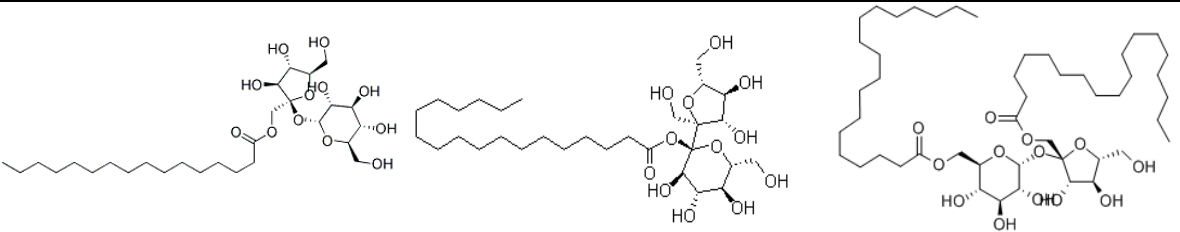
4.1.1. Takrolimus

Kao model lekovita supstanca upotrebljen je takrolimus proizvođača Sandoz, Austrija.

4.1.2. Surfaktanti

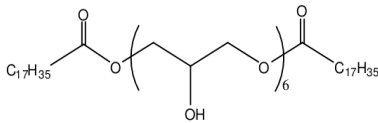
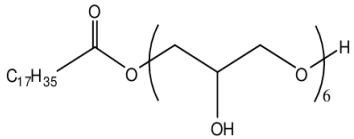
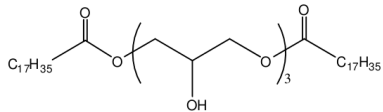
U skladu sa ciljevima istraživanja, za stabilizaciju disperzija lipidnih nanočestica koristili su se nejonski polihidroksilni surfaktanti, koji su bezbedni za primenu na koži. Karakteristike i proizvođači surfaktanata koji su se koristili u ovom istraživanju prikazani su u tabelama 4.1. - 4.3.

Tabela 4.1. Pregled karakteristika estara saharoze korišćenih za izradu lipidnih nanočestica

¹ INCI ime (srp.)	saharoza palmitat	saharoza stearat	saharoza distearat	saharoza polilaurat	saharoza polistearat
Komercijalni naziv	Sisterna [®] PS750-C	Surfhope [®] C-1815	Surfhope [®] C-1805	Surfhope [®] C-1201	Sisterna [®] SP01-C
Proizvođač	Sisterna (Roosendaal, Holandija)	Mitsubishi Kagakoo Foods Corporation (Tokio, Japan)	Mitsubishi Kagakoo Foods Corporation (Tokio, Japan)	Mitsubishi Kagakoo Foods Corporation (Tokio, Japan)	Sisterna (Roosendaal, Holandija)
Osobine na 25 °C	beličasti prašak	beličasti prašak	beličasti prašak	veoma viskozna tečnost	beličasti prašak
Temperatura topljenja	44 - 46 °C	49 - 52 °C	57 - 65 °C	-	60 - 68 °C
Rastvorljivost u vodi	nakon rastvaranja u vodi, na temperaturi od 25 °C dobija se translucentan rastvor; na temperaturi od 60 - 80 °C rastvor postaje bistar	nakon rastvaranja u vodi, na temperaturi od 25 °C dobija se translucentan rastvor; na temperaturi od 60 - 80 °C rastvor postaje bistar	nerastvoran	nerastvoran	nerastvoran
Hemijska formula	C ₂₈ H ₅₂ O ₁₂	C ₃₀ H ₅₆ O ₁₂	C ₄₈ H ₉₀ O ₁₃	-	-
Molekulska masa (g/mol)	~ 580	~ 610	~ 875	-	-
HLB broj	16	15	5	1	~ 1
Strukturna formula					
Ostale osobine	Sisterna [®] PS 750-C sadrži 75 % monoestara saharoze	Surfhope [®] C-1815 sadrži 70 % monoestara saharoze	Surfhope [®] C-1805 sadrži 30 % monoestara i 70 % di-, tri- i poliestara saharoze	Surfhope [®] C-1201 sadrži 1 % monoestara i 99 % di-, tri- i poliestara	Sisterna [®] SP01-C sadrži manje od 30 % monoestara saharoze

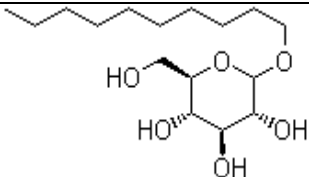
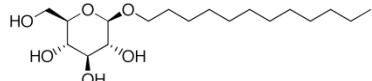
¹INCI - Međunarodna nomenklatura kozmetičkih sastojaka (engl. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) - srpski naziv

Tabela 4.2. Pregled karakteristika poliglicerolskih estara masnih kiselina korišćenih za izradu lipidnih nanočestica

INCI ime (srp.)	poligliceril-6 distearat	poligliceril-6 izostearat	poligliceril-3 diizostearat
Komercijalni naziv	Plurol Distearique [®]	Plurol Isostearique [®]	Plurol Diisostearique [®]
Proizvođač	Gatefossee (Nanterre Cedex, Francuska)		
Osobine	voskasta masa	viskozna tečnost, karakterističnog mirisa	viskozna tečnost
Temperatura topljenja	48 - 53 °C	-	-
Rastvorljivost u vodi	disperguje se u vodi, na povišenoj temperaturi	nerastvoran, ali se može dispergovati u vodi	nerastvoran
Hemijska formula	C ₅₄ H ₁₀₆ O ₁₅	C ₃₆ H ₇₂ O ₁₄	C ₄₅ H ₈₈ O ₉
Molekulska masa (g/mol)	994	728	772
HLB broj	9	10	4,5
Strukturna formula			
Ostale osobine	monoizomer, linearne strukture	monoizomer, račvaste strukture	diizomer, račvaste strukture

¹INCI - srpski naziv

Tabela 4.3. Pregled karakteristika alkil poliglukozi koriscenih za izradu lipidnih nanocestica

INCI ime (srp.) ¹ / Hemijski opis ²	kaprilo/kaprilni glukozid ¹	vodeni rastvor alkil poliglukozi na bazi prirodnog masnog alkohola (C8-C14) ²	vodena disperzija alkil poliglukozi na bazi prirodnog masnog alkohola (C10-C16), bez konzervansa ²	lauril glukozid
Komercijalni naziv	Plantacare [®] 810	Glucopon [®] 425 N/HH	Glucopon [®] 600 CS UP	Plantacare [®] 1200
Proizvođač	Cognis (Düsseldorf, Nemačka)			
Osobine	žućkasta tečnost niskog viskoziteta	žućkasta, bistra tečnost	žućkasta tečnost niskog viskoziteta, koja kristalizuje na temperaturi ispod 30 °C	viskozna, neprozirna tečnost
Rastvorljivost u vodi	potpuno se meša	potpuno se meša	delimično se meša	disperguje se u vodi
Hemijska formula	C ₁₆ H ₃₂ O ₆	-	-	C ₁₈ H ₃₆ O ₆
Molekulska masa (g/mol)	~320	-	-	~ 420
HLB broj	15-16	12-13	11-12	16-17
Strukturna formula		-	-	
Dužina alkil lanca	8-10 C atoma	8-14 C atoma	10-16 C atoma	12-16 C atoma
Ostale osobine	Plantacare [®] 810 sadrži maksimalno 62 - 65 % surfaktanta i 35 - 38 % vode.	Glucopon [®] 425 N/HH sadrži 48 - 52 % surfaktanta i 48 - 52 % vode	Glucopon [®] 600 CS UP sadrži 50 - 53 % surfaktanta i 47 - 50 % vode.	Plantacare [®] 1200 UP sadrži 50 - 53 % surfaktanta i 47 - 50 % vode. Plantacare [®] 1200 UP sadrži maks. 0 - 3 % C8, 0 - 4 % C10, 67 - 75 % C12, 23 - 30 % C14 i 0 - 2 % C16 masnih alkohola iz kokosovog i palminog ulja

4.1.3. Lipidi

Čvrsti lipidi koji su se koristili za pripremu disperzija lipidnih nanočestica, sastoje se od smeše nekoliko hemijskih jedinjenja čija temperatura topljenja je iznad 40 °C. Izbor tečnog lipida za pripremu placebo formulacija lipidnih nanočestica, izvršen je na osnovu sposobnosti mešanja tečnog lipida sa čvrstim lipidima na povišenoj temperaturi. Selekcija tečnog lipida za formulacije lipidnih nanočestica sa takrolimusom, izvedena je nakon ispitivanja rastvorljivosti takrolimusa u tečnom lipidu. Pravilnim izborom i adekvatnom kombinacijom čvrstog i tečnog lipida obezbeđuje se formiranje neuređenog lipidnog matriksa, koji ostavlja dovoljno prostora za inkorporiranje molekula lekovite supstance.

4.1.3.1. Cetil palmitat (Cutina® CP)

Cetil palmitat, sintetički spermacet, oficinalan je u Ph. Eur. kao Cetylis palmitas. Cetil palmitat je bela masna masa, ljuspice ili granule. Sastoji se pretežno od heksadecil hekadekanoata, estra cetil alkohola i palmitinske kiseline. Pored palmitinske kiseline (C16), kao kisele komponente u sastav cetil palmitate mogu ulaziti laurinska (C12), miristinska (C14) i stearinska (C18) kiselina. Cetil alkohol može delimično biti zamenjen miristil alkoholom ili stearil alkoholom. Zavisno od sastava estarske smeše, temperatura topljenja cetil palmitata može da se menja. Prema propisu Ph. Eur. temperatura topljenja cetil palmitata 15 i cetil palmitata 65 je oko 45 °C, dok je temperatura topljenja cetil palmitat 95 oko 52 °C. Cetil palmitat 15, cetil palmitat 65 i cetil palmitat 95 sadrže 10 - 20 %, 60 - 70 %, odnosno minimum 90 % heksadecil hekadekanoata, redom. Čist cetil palmitat kristalizuje u dve modifikacije, koji se tope na temperaturama od 52,4 - 52,9 °C tj. od 53,2 - 53,8 °C. Cetil palmitat se rastvara u ključalom anhidrovanom etanolu i metilen hloridu, slabo se rastvara u tečnom parafinu, a praktično se ne rastvara u vodi i u anhidrovanom etanolu. Za pripremu lipidnih nanočestica, u ovoj studiji je kao cetil palmitat korišćena Cutina® CP proizvođača Cognis, (Düsseldorf, Nemačka). Udeo heksadecil hekadekanoata u Cutina® CP je 32 %.

4.1.3.2. Gliceril monostearat (Imwitor® 900P)

Imwitor® 900P (Sasol GmbH, Witten, Nemačka) je veoma heterogena smeša mono-, di- i triglicerida, koja odgovara monografiji gliceril monostearat 40-55 u Ph. Eur.

Temperatura topljenja Imvitor[®] 900P je u intervalu od 54 - 64 °C. 90 % masnih kiselina koje ulaze u sastav Imwitor[®]-a 900P čine palmitinska i stearinska kiselina. Monogliceridi čine oko 40 - 55 % lipidne smeše, HLB vrednost Imwitor[®] 900P je ~ 3. Zbog svoje površinske aktivnosti, Imwitor[®] 900P se koristi u farmaceutskim preparatima kao surfaktant i kosurfaktant, a takođe se može koristiti i kao regulator konzistencije. Najveća prednost Imwitor[®] 900P u formulaciji disperzija lipidnih nanočestica je visok kapacitet inkapsulacije lekovite supstance, dok se u nekim studijama (Runge, 1998; Zimmermann i Müller, 2001) kao glavni nedostatak Imwitor[®] 900P navode niska dugoročna stabilnost vodenih disperzija lipidnih nanočestica, koje se sastoje od Imwitor[®] 900P. Rezultati prethodnih studija ukazuju da Imwitor[®] 900P pretežno kristališe u β modifikaciji, ali je takođe potvrđeno i prisustvo β i β i modifikacije (pikovi na 0,46; 0,42; 0,39 i 0,38 nm, interplanarno rastojanje $d_{001} = 5,56$ nm) (Runge, 1998). Najveći deo lipida koji se koristi u ovom istraživanju kristališe u β i modifikaciji. WAXD refleksije su veoma široke i ukazuju na veoma heterogenu kristalnu strukturu lipida (polimorfizam lipida prikazan je u poglavlju 5). Imwitor[®] 900P je lipid koja ima GRAS status i pogodan je za oralnu upotrebu.

4.1.3.3. Gliceril dibehenat (Compritol[®] 888 ATO)

Compritol[®] 888 ATO je komercijalni naziv za proizvod firme Gattefossé GmbH (Weil am Rhein, Nemačka) koji se sastoji od glicerolskih estara beheninske kiseline (C_{22}). Compritol[®] 888 ATO se zapravo sastoji od gliceril tribehenata (28 - 32 %), gliceril dibehenata (52 - 54 %) i gliceril monobehenata (12 - 18 %). Glavna masna kiselina koja ulazi u sastav Compritol[®]-a 888 ATO je beheninska kiselina (> 85 %), ali su tđd. prisutne i druge masne kiseline (C_{16} - C_{20}). U ovom radu Compritol[®] 888 ATO se koristio kao čvrst lipid u pripremi lipidnih nanočestica sa takrolimusom. Pored toga, Compritol[®] 888 se koristi kao vezivno sredstvo u direktnoj kompresiji pri izradi tableta, kao lubrikans pri izradi tableta i kapsula, i kao lipidni matriks u formulacijama sa produženim oslobađanjem. Temperatura topljenja Compritol[®]-a 888 ATO je oko 70 °C. Zbog prisustva parcijalnih acilglicerola, ovaj lipid ima ambifilne osobine. HLB vrednost Compritol[®]-a 888 ATO je oko 2. Peroksidni broj Compritol[®]-a 888 ATO je ispod 6 meq O_2 /kg, što ukazuje na njegovu visoku hemijsku stabilnost. Compritol[®] 888 ATO se rastvara u hloroformu, metilen hloridu, i ksilenu kada se zagreje, a nerastvoran je u

etanolu, etiletru, mineralnim uljima i vodi. Koristi se u u/v i v/u emulzijama kao sredstvo za povećanje viskoziteta spoljašnje faze emulzija tj. povećanje stabilnosti. Čuva se na temperaturi ispod 35 °C, u originalnom pakovanju zaštićen od svetlosti, toplote i vlage.

4.1.3.4. Trigliceridi srednje dužine lanca (Miglyol® 812)

Po hemijskom sastavu Miglyol® 812 predstavlja smešu triglicerida iz zasićenih masnih kiselina (C8-C10) (*Triglycerida saturata media*) (Ph. Eur). Miglyol® 812 (Caelo GmbH, Hilden, Nemačka) koji se koristio u ovom radu je sintetski tečni lipid koji sadrži minimum 95 % zasićenih masnih kiselina, kaprilna (oktanoinska) i kaprinska (dekanoinska) kiselina. To je bezbojna ili slabo žuta uljasta tečnost, bez mirisa, praktično nerastvorna u vodi, meša se sa alkoholom, metilen hloridom, tečnim parafinom i masnim uljima. Temperatura očvršćavanja Miglyol® 812 zavisi od modifikacije lipida i kreće se u intervalu od -22 do -50 °C. Miglyol® 812 ima nizak viskozitet, i nije osetljiv na oksidaciju (Saupe, 2004). Koristi se kao rastvarač za lipofilne supstance, dobro se podnosi na koži (deluje emolijentno) i služi kao pomoćna materija za masti, kreme, supozitorije, uljane rastvore i uljane suspenzije (Vuleta i sar., 2012).

4.1.3.5. Ostali lipidi

U Tabeli 4.4. dat je pregled ostalih lipida koji su se koristili u eksperimentalnom delu doktorske disertacije.

Tabela 4.4. Pregled lipida (komercijalni naziv, hemijski naziv, proizvođač, osobine na 25 °C i temperatura topljenja) koji su korišćeni u studiji rastvorljivosti

Komercijalni naziv	Hemijski naziv	Proizvođač	Osobine na 25 °C	Temperatura topljenja [°C]
Apifil	PEG-8 beli pčelinji vosak	Gattefossé, Francuska	čvrsta supstanca beličaste boje karakterističnog mirisa	-
Bees wax white	beli pčelinji vosak	Roth, SAD	bela ili žućkasto bela čvrsta masa slabog mirisa	63-64
Carnauba wax 2442L	karnauba vosak	Kahl GmbH, Nemačka	bela voskasta sjajna masa izuzetno tvrda	82-86
Compritol HD5ATO	behenoil polioksil 8-gliceridi	Gattefossé, Francuska	beličasti prašak slabo karakterističnog mirisa	60-67
Dynacet® 211	acetilovani gliceridi	Sasol GmbH, Nemačka	bela voskasta čvrsta masa	~ 41-47
Dynasan® 110	gliceril trikaprilat	Sasol GmbH, Nemačka	beličasta pahuljasta kristalna masa ili beo prašak	31-32
Dynasan® 114	gliceril trimiristat	Sasol GmbH, Nemačka	beo prašak slabo karakterističnog mirisa	55-58
Dynasan® 116	gliceril tripalmitat	Sasol GmbH, Nemačka	beo pahuljast prašak slabo karakterističnog mirisa	61-65
Dynasan® 118	gliceril tristearat	Sasol GmbH, Nemačka	beo prašak slabo karakterističnog mirisa	70-73
Imwitor® 308	gliceril monokaprilat	Sasol GmbH, Nemačka	bela čvrsta kristalna masa slabo karakterističnog mirisa	30-34
Imwitor® 312	gliceril monolaurat	Sasol GmbH, Nemačka	bela čvrsta masa slabo karakterističnog mirisa	~ 60
Precirol® ATO	gliceril distearat	Gattefossé, Francuska	beličasti prašak slabo karakterističnog mirisa	50-60
	gliceril tristearat			
	gliceril dipalmitat			
	gliceril tripalmitat			
Softisan® 142	hidrogenovani kokogliceridi	Sasol GmbH, Nemačka	bela masa u obliku pastila	~ 42
Softisan® 154	hidrogenovano palmينو ulje	Sasol GmbH, Nemačka	bela pahuljasta masa	53-58
Eutanol® G	oktil dodekanol	Cognis, Nemačka	bistra svetložuta uljasta tečnost bez mirisa	-
Hemp seed oil	ulje semena Cannabis Sativa	Gustav Hees GmbH, Nemačka	uljasta tečnost, svetlo zelene do tamno zelene boje karakterističnog mirisa	-

Vodena faza disperzije lipidnih nanočestica i nanoemulzija bila je destilovana voda, koja se dobijala na uređaju MilliQ plus (Millipore system, Schwalbach, Nemačka).

4.2. Metode

4.2.1. Određivanje kontaktnog ugla (goniometrijska merenja)

Young-ova jednačina zahteva ravnu i homogenu površinu, te se stoga za određivanje kontaktnog ugla rastvora surfaktanta na čvrstom lipidu lipid se topio na mikroskopskoj pločici, nakon čega je ostavljen određeno vreme da dođe do njegove rekristalizacije lipida. Za surfaktante koji nisu hidrosolubilni, bilo je neophodno pripremiti binarni sistem lipida i surfaktanta u masenom odnosu 1:10, koji je odgovarao masenom odnosu lipida i surfaktanta u formulaciji. Dobijeni binarni sistem se potom topio na mikroskopskoj pločici, nakon čega bi došlo do rekristalizacije dobijene binarne smeše. Kontaktni ugao se merio neposredno nakon nanošenja 15 μ l destilovane vode na binarni sistem surfaktant-lipid i 60 s nakon toga kako bi se uočile eventualne promene. Kod hidrosolubilnih surfaktanata, kontaktni ugao se merio neposredno nakon nanošenja 15 μ l rastvora surfaktanta u destilovanoj vodi na površinu lipida i nakon 60 s. Merenje kontaktnog ugla izvedeno je na uređaju Contact Angle Meter G1 (Krüss, Nemačka) (slika 4.1). Uređaj se sastoji od izvora svetlosti (halogena lampa), preciznog šprica kojim se dozira zapremina tečnosti (voda odnosno vodeni rastvor surfaktanta) koja se nanosi na čvrstu površinu pomoću odgovarajuće igle i pokretnog postolja u obliku table.



Slika 4.1. Uređaj za merenje kontaktnog ugla (Contact Angle Meter G1 (Krüss, Nemačka))

Uređaj ima mogućnost merenja kontaktnog ugla u intervalu od 1 - 180°, sa preciznošću od $\pm 0,1^\circ$. Merenja su izvedena tri puta za svaki ispitivani uzorak. Merenje kontaktnog

ugla na uređaju Contact Angle Meter G1 izvedeno je nakon aplikacije kapi tečne faze na otopljenu čvrstu fazu, koja se nalazila na pokretnom postolju.

Kap tečnosti je osvetljavana sa jedne strane izvorom svetlosti (halogena lampa), dok je kamera sa suprotne strane beležila oblik kapi tečnosti. Prilikom određivanja kontaktnog ugla, može se posmatrati cela kap tečnosti na čvrstoj površini, deo kapi tečnosti ili samo oblast kontakta tečne i čvrste faze. Nezavisno od metode koja se koristi, kontaktni ugao (θ) se definiše kao ugao koji zaklapa tangenta na spoljašnjoj liniji kapi tečnosti sa linijom čvrste površine (tzv. bazna linija).

4.2.2. Postupak dobijanja lipidnih nanočestica (homogenizacija pod visokim pritiskom)

Za pripremu vodenih disperzija lipidnih nanočestica u ovom radu korišćen je *piston-gap* homogenizator APV Micron LAB40, APV Deutschland GmbH, Unna, Nemačka. Kapacitet homogenizatora je od 20 - 40 ml u diskontinuiranom režimu rada, pri pritisku koji se kreće u intervalu od 100 - 1500 bara. Homogenizator je opremljen vodenim kupatilom kojim se precizno kontroliše temperatura tokom homogenizacije. Za pripremu disperzija lipidnih nanočestica (SLN i NLC) lipidna faza (tj. čvrst lipid ili smeša čvrstog i tečnog lipida (ulja) i vodeni rastvor surfaktanta (u slučaju hidrofilnih surfaktanata) grejani su odvojeno na temperaturi koja je 5 - 10 °C iznad temperature topljenja lipida. U slučaju lipofilnih surfaktanata, surfaktanti su se dodavali u lipidnu fazu. Potom se lipidna faza dodavala u vodenu fazu i mešala uz pomoć rotor-stator homogenizatora Ultra-Turrax[®] T25 (Jahnke & Kunkel, Staufen, Nemačka), pri brzinama od 8000 rpm/min, u trajanju od 30 s. Dobijena pre-emulzija je homogenizovana na temperaturi koja je 5 - 10 °C iznad temperature topljenja lipida pri pritisku od 500 bara, tokom 3 - 5 ciklusa. Nakon homogenizacije, dobijena vruća u/v nanoemulzije se prenosila u silanizirane transparentne staklene bočice, koje su se odmah zatvarale i ostavljale da se ohlade na sobnu temperaturu, kako bi došlo do kristalizacije lipida. Najznačajniji procesni parametri koji su uticali na prosečnu veličinu čestica i raspodelu čestica po veličini, bili su pritisak u toku homogenizacije i broj ciklusa. Generalno sa povećanjem pritiska i broja ciklusa u toku homogenizacije, dobijale su se čestice manjeg dijametra i uže raspodele po veličini. Adekvatnim izborom ovih

procesnih parametara moguće je dobiti čestice malog dijametra i uske distribucije po veličini.

U tabeli 4.5. prikazan je detaljan sastav ispitivanih formulacija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima, razvijenih u prvoj fazi.

Tabela 4.5. Sastav vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima

Formulacija	Surfaktant, 1,0 % (m/m)	Lipidna faza, 10,0 % (m/m)	Vodena faza, 89,0 % (m/m)
SLN S1	saharoza palmitat		
SLN S2	saharoza stearat		
SLN S3	saharoza distearat		
SLN S4	saharoza polilaurat		
SLN S5	saharoza polistearat	cetil palmitat	voda, prečišćena
SLN P1	poligliceril-6 distearat		
SLN P2	poligliceril-6 izostearat		
SLN P3	poligliceril-3 diizostearat		
SLN A1	C8-10 alkil poliglukozid		
SLN A2	C8-14 alkil poliglukozid		
SLN A3	C10-16 alkil poliglukozid		
SLN A4	C12-16 alkil poliglukozid		

U tabeli 4.6. prikazan je detaljan sastav formulacija nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima, razvijenih u drugoj fazi.

Tabela 4.6. Sastav vodenih disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača (% m/m) stabilizovanih poligliceril-6 distearatom, saharoza stearatom i C8-10 alkil poliglukozidom. Matriks čestica se sastojao od smeše čvrstog lipida i tečnog lipida (cetil palmitat i trigliceridi srednje dužine lanca) (20 - 60 % (m/m))

Formulacija	cetil palmitat (%, m/m)	trigliceridi srednje dužine lanca (%, m/m)	poligliceril-6 distearat (%, m/m)	C8-10 alkil poliglukozid (%, m/m)	saharoza stearat (%, m/m)	voda, prečišćena (%, m/m)
NLC P1 (20)	8,0	2,0	1,0	-	-	89,0
NLC P1 (30)	7,0	3,0	1,0	-	-	89,0
NLC P1 (40)	6,0	4,0	1,0	-	-	89,0
NLC P1 (50)	5,0	5,0	1,0	-	-	89,0
NLC P1 (60)	4,0	6,0	1,0	-	-	89,0
NLC A1 (20)	8,0	2,0	-	1,0	-	89,0
NLC A1 (30)	7,0	3,0	-	1,0	-	89,0
NLC A1 (40)	6,0	4,0	-	1,0	-	89,0
NLC A1 (50)	5,0	5,0	-	1,0	-	89,0
NLC A1 (60)	4,0	6,0	-	1,0	-	89,0
NLC S2 (20)	8,0	2,0	-	-	1,0	89,0
NLC S2 (30)	7,0	3,0	-	-	1,0	89,0
NLC S2 (40)	6,0	4,0	-	-	1,0	89,0
NLC S2 (50)	5,0	5,0	-	-	1,0	89,0
NLC S2 (60)	4,0	6,0	-	-	1,0	89,0

Za pripremu lipidnih nanočestica sa takrolimusom (tabela 4.7.), binarna smeša čvrstih lipida (cetil palmitat i gliceril monostearat) kod čvrstih lipidnih nanočestica, odnosno binarna smeša gliceril dibehenata i trigliceridi srednje dužine lanca, tj. ternarna smeša (cetil palmitat/gliceril monostearat/trigliceridi srednje dužine lanca) kod nanostrukturiranih lipidnih nosača izmerena je u staklenoj laboratorijskoj čaši i zagrejana na temperaturi od 60 °C, da bi se lipidi otopili. Nakon toga, u otopljenu smešu lipida dodat je takrolimus, i smeša se kontinuirano mešala i zagrevala u cilju potpunog rastvaranja leka u lipidu. U odvojenom sudu (hemijska čaša), rastvorena je PAM-a (C8-10 alkil poliglukozid) u visoko prečišćenoj vodi i zagrejana na istu temperaturu. Topao vodeni rastvor surfaktanta (vodena faza) pomešan je sa otopljenom smešom lekovite supstance i lipida i homogeno dispergovan uz pomoć Ultra - Turrax® T25 (Janke & Kunkel, Staufen, Nemačka) pri brzini od 8000 rpm, uz održavanje temperature na 60 °C. U ovom koraku nakon homogenizacije na rotor-stator homogenizatoru dobijena je gruba u/v nanoemulzija, koja je potom podvrgnuta postupku homogenizacije pod visokim pritiskom (Micron LAB 40, APV Deutschland GmbH, Nemačka) pri temperature od 65 °C i uz primenu pet ciklusa homogenizacije. Nakon dobijanja grube u/v nanoemulzije, ona je ohlađena na sobnu temperaturu. Nakon toga, tečne nanokapi su tokom hlađenja kristalizovale i formirale disperziju lipidnih nanočestica na sobnoj temperaturi. Nanoemulzije su se pripremale na isti način kao i disperzije lipidnih nanočestica, samo što je čvrst lipid, tj. smeša čvrstog i tečnog lipida zamenjena tečnim lipidom (ulje).

Tabela 4.7. Sastav lipidnih nanonosača (lipidne nanočestice (SLN, NLC) i nanoemulzija) sa takrolimusom

Komponente	takrolimus (%, m/m)	cetil palmitat (%, m/m)	gliceril monostearat (%, m/m)	gliceril dibehenat (%, m/m)	trigliceridi srednje dužine lanca (%, m/m)	C8-C10 alkil poliglukozid (%, m/m)	voda, prečišćena (%, m/m)
TCL-NLC A	0,1	3,4	1,0	-	0,5	1,0	94,0
TCL-NLC B	0,1	7,9	1,0	-	1,0	3,0	87,0
TCL-SLN	0,1	15,9	4,0	-	-	5,0	75,0
TCL-NLC 1	0,1	16,9	1,0	-	2,0	5,0	75,0
TCL-NLC 2	0,1	15,9	-	-	4,0	5,0	75,0
TCL-NLC 3	0,1	-	-	15,9	4,0	5,0	75,0
TCL-NE	0,1	-	-	-	19,9	5,0	75,0

4.2.3. Foton korelaciona spektroskopija

Foton korelaciona spektroskopija (PCS) je izvedena na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija) povezanim sa softverskim paketom Zetasizer Software verzija 5.10 (Malvern Instruments, Velika Britanija). Merni opseg instrumenta je od 0,6 nm - 6 μ m. Merenja su sprovedena uz upotrebu odgovarajućeg standardnog operativnog postupka (engl. *Standard Operating Procedure*, SOP), na temperaturi od 25 °C. Za analizu ispitivanih uzoraka korišćena je plastična polistirenska kiveta, za jednokratnu upotrebu. Svetlost rasuta nakon prolaska kroz kivetu sa uzorkom detektuje se pod uglom od 173°. Pre analize uzorci su razblaženi destilovanom vodom do postizanja odgovarajućeg intenziteta rasipanja svetlosti. Analiza podataka dobijenih tokom merenja izvedenih kod ispitivanih disperzija lipidnih nanočestica izvršena je preko opcije *General Purpose*. PCS je primenjena za određivanje veličine čestica (engl. *intensity-weighted mean diameter, Z-average, Z-ave, z-ave*) i polidisperznog indeksa (PI). Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost deset uzastopnih merenja za svaki uzorak, a prikazani su kao $z\text{-ave} \pm SD$ i $PI \pm SD$.

Rezultati ovih merenja upotrebljeni su za utvrđivanje uticaja formulacionih i procesnih parametara na veličinu lipidnih nanočestica u toku razvoja formulacije, i za procenu funkcionalnosti polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji disperzija lipidnih nanočestica bez lekovite supstance i sa model lekovitom supstancom (takrolimus).

4.2.4. Laserska difrakcija

Za merenje veličine lipidnih nanočestica i utvrđivanje prisustva/odsustva većih čestica i u analiziranim uzorcima, pored PCS, dodatno je primenjena tehnika statičkog rasipanja svetlosti, poznata kao laserska difrakcija (LD). Merenja su izvedena na uređaju Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Velika Britanija) koji koristi dva *Fourier*-ova sočiva i tri detektora (detektor pod niskim, srednjim i visokim uglom). Merni raspon instrumenta je od 0,02 μ m - 2000 μ m. Rad uređaja je integrisan sa softverskim paketom Mastersizer 2000 verzija 5.4 (Malvern Instruments, Velika Britanija). Ovaj softverski paket omogućava kreiranje odgovarajućeg standardnog operativnog postupka (SOP) za merenje veličine, koji sadrži podatke o vrsti uzorka koji se meri i vrsti disperzanta. Kao medijum u kome su dispergovane lipidne nanočestice koristila se destilovana voda. Vrednosti realnog i imaginarnog indeksa refrakcije lipidnih nanočestica (1,456 i 0,01,

redom) i vrednost indeksa refrakcije destilovane vode (1,33), koje su prethodno određene unošene su u SOP neposredno pre merenja. Merenja su sprovedena pet puta za svaki ispitivani uzorak na temperaturi od 25 °C. Volumenski dijametri čestica ($d(v)_{0,10}$, $d(v)_{0,50}$, $d(v)_{0,90}$, $d(v)_{0,95}$ i $d(v)_{0,99}$) dobijeni su korišćenjem *Mie*-ove teorije. Volumenski dijametar čestica predstavlja procenat (udeo) čestica u datoj zapremini koji ima manju veličinu od date vrednosti. Npr. $d(v)_{0,99} = 1 \mu\text{m}$ znači da 99 % čestica u datoj zapremini uzorka ima dijametar manji od 1 μm (Rawle, 2003).

Rezultati ovih merenja zajedno sa rezultatom PCS upotrebljeni su za utvrđivanje uticaja formulacionih i procesnih parametara na veličinu lipidnih nanočestica u toku razvoja formulacije i za procenu funkcionalnosti polihidroksilnih surfaktanata u stabilizaciji disperzija lipidnih nanočestica bez lekovite supstance i sa model lekovitom supstancom.

4.2.5. Zeta potencijal

Zeta potencijal je određen primenom tehnike elektroforetske pokretljivosti, kojom se meri kretanje čestica u primenjenom električnom polju. Merenja su izvedena na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija) koji je povezan sa softverskim paketom Zetasizer (Verzija softvera 5.10, Malvern Instruments, Velika Britanija). U toku merenja uređaj je isključen iz PCS moda i prebačen u Laser Doppler Anemometry (LDA) mode. Jačina primenjenog polja u toku merenja iznosila je 20 V/cm.

S obzirom da je zeta potencijal funkcija naelektrisanja čestice i elektrolita prisutnih u disperzionom medijumu, za sve ispitivane uzorke merenja su izvedena u destilovanoj vodi i dodatno u originalnom disperzionom medijumu, za uzorke koji sadrže hidrosolubilne surfaktante. Da bi se izbegle fluktuacije u zeta potencijalu, usled varijacija u električnoj provodljivosti destilovane vode, koja može da bude u intervalu od 1 - 10 $\mu\text{S/cm}$, električna provodljivost destilovane vode kojom su razblaženi ispitivani uzorci pre merenja podešena je na 50 $\mu\text{S/cm}$ uz korišćenje 0,9 % rastvora natrijum-hlorida. pH vrednost ispitivanih uzoraka u toku merenja bila je u intervalu od 5,5 - 6. Originalni disperzioni medijum dobijao se rastvaranjem surfaktanta u destilovanoj vodi, u koncentraciji jednakoj koncentraciji u formulaciji. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri uzastopna merenja za svaki uzorak, a prikazani su kao zeta potencijal (ζ) $\pm$ SD. Rezultati ovih ispitivanja su upotrebljeni za

određivanje površinskog naelektrisanja čestica i dobijanje informacija o fizičkoj stabilnosti ispitivanih uzoraka.

4.2.6. Svetlosna i polarizaciona mikroskopija

Svetlosna i polarizaciona mikroskopija su dodatne metode koje su se koristile u karakterizaciji. Analiza ispitivanih uzoraka izvodila se na uređaju Leitz (Wetzlar, Nemačka) uz primenu χ pločice, po potrebi. Uređaj je integrisan sa softverskim programom Image Focus software verzija 1.3.1.4. (Euromex microscopes, Arnheim, Holandija) povezanim sa CMEX-1 digitalnom kamerom (Euromex microscopes, Arnheim, Holandija). U cilju povećanja verovatnoće nalaženja većih čestica ili agregata čestica, nerazblažena disperzija lipidnih nanočestica se nanosila na mikroskopsku pločicu. Preko mikroskopske pločice se postavljalo pokrovno staklo, nakon čega je svaki uzorak pregledan tri puta. Pregled ispitivanih uzoraka na mikroskopu izvodio se pri uveličanjima 160x, 400x, 630x i 1000x. Cilj mikroskopske analize nije bio da se odredi veličina nanočestica, zato što su one ispod granice detekcije mikroskopa, nego da se utvrdi prisustva/odsustva agregata nanočestica ili kristala neinkapsuliranog leka.

4.2.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajuća elektronska mikroskopija je metoda koja je primenjena za analizu veličine, površinskih karakteristika, morfologije lipidnih nanočestica sa i bez takrolimusa i za procenu potencijalnog prisustva ili odsustva agregata čestica u disperziji. Pre analize uzorci vodenih disperzija lipidnih nanočestica su nerazblaženi nanošeni na odgovarajuće držače, koji su sa obe strane imali lepljive trake, osušeni su, a potom su u atmosferi argona obloženi slojem zlata debljine 6,5 nm pomoću uređaja SCD 040, Balt-Tec GmbH, Witten, Nemačka. Nakon toga, uzorci su posmatrani uz pomoć skenirajućeg elektronskog mikroskopa S-4000, Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Krefeld, Nemačka, pri uveličanju od 20,000X.

4.2.8. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Za termalnu analizu uzoraka, koristio se kompenzovani diferencijalni skenirajući kalorimetar DCS (Mettler DSC 821e, Mettler Toledo, Gießen, Nemačka). U ovom istraživanju merenja su izvedena pri rasponu temperature od 20 - 150 °C. Instrument je

pre merenja kalibrisan indijumom. Količina disperzija lipidnih nanočestica (SLN i NLC) koja je bila potrebna za DSC merenja zavisila je od koncentracije lipidne faze u disperziji. Odgovarajuća količina vodene disperzije lipidnih nanočestica, koja je sadržala 1 - 2 mg čvrstog lipida precizno je merena u aluminijumskim posudama zapremine 40 μ l. Za DSC analizu lipida i surfaktanta u *bulk* stanju, binarnih, ternarnih i kvaternernog sistema, 1 - 2 mg uzorka precizno je mereno u aluminijumskim posudama. Svi uzorci bez lekovite supstance su se zagrevali pri temperaturi od 20 - 90 °C, i brzinu promene temperature od 10 K/min. DSC analiza čiste lekovite supstance, ternarnih i kvaternernog sistema, izvodila se na temperaturi od 20 - 200 °C, pri brzini promene temperature od 10 K/min. Brzina protoka azota u svim ispitivanjima iznosila je 80 ml/min. Prazna aluminijumska posuda se koristila kao referentni uzorak. *Onset* temperatura, temperatura topljenja (koja odgovara maksimumu na krivi topljenja), i ukupna entalpija topljenja su se računali pomoću STAR^e Software (Mettler Toledo, Švajcarska). Indeks rekristalizacije (RI) tj. procenat rekristalizovanog čvrstog lipida u odnosu na inicijalnu koncentraciju čvrstog lipida se računao pomoću jednačine 2.11. Rezultati DSC merenja, upotrebljeni su za analizu lipida i surfaktanata u *bulk* stanju, za utvrđivanje potencijalnih interakcija polihidroksilnih surfaktanata i pojedinačnih komponenata lipidnog matriksa u *bulk* stanju, ispitivanje rastvorljivosti model lekovite supstance u tečnim i čvrstim lipidima, utvrđivanje prisustva/odsustva kristalne strukture lipidnog matriksa lipidnih nanočestica posredno preko određivanje indeksa kristalizacije kao i za utvrđivanje prisustva polimorfni oblika lipida u ispitivanim uzorcima. Za utvrđivanje prisustva različitih polimorfni oblika, rezultati DSC su se poredili sa rezultatima difrakcije X zraka pod širokim uglom.

4.2.9. Difrakcija X zraka pod širokim uglom (WAXD)

WAXD merenja u ovom radu su izvedena na uređaju Philips PW 1830 X-ray generator (Philips, Amedo, Holandija) sa bakarnom anodom (Cu-K α radiation, $\lambda=0,15418$ nm) i detektorom (Goniometer PW18120). Opseg difrakcionog ugla (2θ) bio je od 4 - 40°. Podaci o difrakciji X zraka su detektovani pomoću osetljivog detektora koristeći anodu voltaže 40 kV, struju jačine 25 mA i brzinu skeniranja od 0,5 °/min.

Difraktometar X zraka koji se koristio u ovom istraživanju, može da analizira čestice u suspenziji, samo ukoliko je viskozitet disperzionog medijuma dovoljno veliki. S tim u

vezi, za analizu tečnih uzoraka, kao što su disperzije lipidnih nanočestica (SLN, NLC) bilo je potrebno dodati sredstvo za povećanje viskoziteta. Pre merenja disperzije lipidnih nanočestica su se prevodile u pastu uz dodatak locust bean gume, tj. 1 ml disperzije se mešao sa ~ 1 mg gume kao sredstvom za povećanje viskoziteta.

Rezultati WAXD merenja zajedno sa rezultatima DSC analize upotrebljeni su za ispitivanje rastvorljivosti model lekovite supstance u čvrstom lipidu i smeši tečnog i čvrstog lipida, utvrđivanje prisustva/odsustva kristalne strukture lipidnog matriksa, i za utvrđivanje prisustva polimorfnih oblika lipida u ispitivanim uzorcima.

4.2.10. Određivanje rastvorljivosti takrolimusa

Za određivanje rastvorljivosti model lekovite supstance u čvrstom lipidu, u ovom radu, 1 % (m/m) takrolimusa je dodato u različite lipide koji se mogu koristiti kao matriks lipidnih nanočestica. Lipidi koji su se koristili u studiji rastvorljivosti bili su voskovi i acilgliceroli koji su se razlikovali u sadržaju monoglicerida i dužini alkil lanca masnih kiselina (deo 4.1.3.). Dobijena smeša se mešala 1 h pri brzini od 125 rpm na temperaturi koja je najmanje 10 °C iznad temperature topljenja lipida (Model 4230 Innova refrigerated incubator shaker (New Brunswick Scientific). Nakon 15, 30, 45 i 60 minuta, uzorci su pregledani organoleptički, svetlosnim i polarizacionim mikroskopom da bi se utvrdilo prisustvo/odsustvo kristala lekovite supstance.

Uz eksperimentalni pristup, za određivanje rastvorljivost takrolimusa koristio se i teorijski pristup, koji se zasniva na računanju rastvorljivosti uz korišćenje jednačina. Hildebrand i Skot (1964) su najpre definisali parametar rastvorljivosti (δ) supstance kao kvadratni koren gustine kohezivne energije, koja direktno odražava stepena kohezivnih sila koje drže molekule zajedno. Hansen i Beerbower (1971) proširili su koncept parametra rastvorljivosti podelom paramtra δ na tri parcijalna parametra rastvorljivosti (δ_d , δ_p , δ_h). Ovim parametrima se opisuju specifične međuatomski ili intermolekularne sile između rastvarača i rastvorene supstance, primenom jednačine 4.1.:

$$\delta_{total}^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad \text{jednačina 4.1.}$$

gde su δ_d , δ_p i δ_h su parcijalni parametri rastvorljivosti povezani sa disperzionom silom, polarnim interakcijama i vodoničnom vezom, redom. Vrednosti δ_d , δ_p i δ_h se ne mogu

odrediti direktno. Ipak, na osnovu poznavanja hemijske strukture supstanci, parcijalni parametri rastvorljivosti mogu se predvideti metodom doprinosa funkcionalnih grupa supstance koju je predložio van Krevelen i Te Nijenhuis (2009):

$$\delta_d = \frac{\sum F_d}{\sum V} \quad \text{jednačina 4.2.}$$

$$\delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_p^2}}{\sum V} \quad \text{jednačina 4.3.}$$

$$\delta_h = \frac{\sqrt{\sum E_h}}{\sqrt{\sum V}} \quad \text{jednačina 4.4.}$$

gde su F_d , F_p , E_h redom, doprinosi funkcionalnih grupa disperzionim silama, polarnima silama, energiji vodonične veze, a V je molarna zapremina.

Ukupna i parcijalna rastvorljivost takrolimusa kao i polarnost šesnaest čvrstih lipida, tri tečna lipida, i takrolimusa izračunati su korišćenjem jednačina 4.1 - 4.4., sa vrednostima F_d , F_p , E_h , i V funkcionalnih grupa koje su preuzete iz literature (van Krevelen i Te Nijenhuis, 2009).

Entalpija mešanja između lipida i kompleksa izračunata je uz primenu jednačine 4.5.

$$\Delta H_M = \Phi_1 \Phi_2 [(\delta_{d1} - \delta_{d2})^2 + (\delta_{p1} - \delta_{p2})^2 + (\delta_{h1} - \delta_{h2})^2] \quad \text{jednačina 4.5.}$$

gde su Φ_1 i Φ_2 zapreminske frakcije komponente 1 i komponente 2, redom.

Polarnost supstance (X_p) računala se korišćenjem jednačine 4.6., uzimajući u obzir doprinos vodoničnih veza i drugih polarnih interakcija (Rowe, 1988):

$$X_p = 1 - \frac{\delta_d^2}{\delta_{total}^2} \quad \text{jednačina 4.6.}$$

4.2.11. Visoko efikasna tečna hromatografija (HPLC)

Visoko efikasna tečna hromatografija se izvodila na uređaju HPLC sistem Kroma System 2000 (Kontron Instruments, Berlin, Nemačka) u izokratskom modu. HPLC sistem koji se koristio u ovom radu sastojao se od automatskog dela za uzorkovanje (model 560), pumpe (model 525) i detektora (model 540). Sistem je povezan sa KromaSystem 2000 v.1.70 i procesnim sistemom kontrolisanim HPLC modulima. Temperatura u toku analize je kontrolisana pomoću vodenog kupatila Haake W90 (Haake, Karlsruhe, Nemačka).

4.2.12. *In vitro* ispitivanje oslobađanja lekovite supstance iz lipidnih nanonosaa

Za *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja lekovite supstance iz lipidnih nanočestica i nanoemulzije (poredbeni formulacija) korišćena je statična *Franzova* difuzionna ćelija (Crown Scientific, Somerville, SAD) preporučena od strane FDA sa dijametrom membrane od 0,9 cm i površinom od 0,64 cm², na temperaturi od 32 ± 0,5 °C, kako bi se imitirala temperatura na površini kože. Za postizanje temperature od 32 °C kroz sistem *Franzovih* difuzionih ćelija, ćelije su aklimatizovane 60 min pre početka eksperimenta. 300 µl uzorka preneto je u donorsku fazu *Franz-ove* difuzione ćelije, preciznije na membrane od celuloza acetata (Sartorius, Göttingen, Nemačka) sa veličinom pora od 0,1 µm, koje su prethodno preko noći potopljene u akceptorski medijum. Zapremina akceptorske faze je iznosila 6 - 6,5 ml, a kao akceptorski medijum koristila se smeša prečišćene vode, propilenglikola i koncentrovanog etanola u masenom odnosu 25:35:40. Brzina mešanja akceptorske faze magnetom bila je 600 obrt/min. Iz *Franzove* difuzione ćelije periodično (1, 2, 4, 6, 8 i 24 h) uzorkovano je 300 µl akceptorskog medijuma i izvršena nadoknada čistim medijumom, iste temperature. Koncentracija lekovite supstance u prikupljenim uzorcima određivana je prethodno razvijenom HPLC metodom na talasnoj dužini maksimuma apsorpcije ($\lambda_{\text{takrolimus}} = 210 \text{ nm}$). Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost šest određivanja za svaki uzorak. Karakterizacija profila oslobađanja i određivanje ukupne količine oslobođene supstance iz lipidnih nanonosaa izvršena je primenom različitih matematičkih/ kinetičkih modela.

5. Rezultati i diskusija

5.1. Rezultati i diskusija prve faze istraživanja

5.1.1. Merenje kontaktnog ugla (goniometrijska merenja)

U dosadašnjim istraživanjima u oblasti nanočestica sa inkorporiranom lekovitom supstancom, ističe se podatak da stabilnost sistema u velikoj meri zavisi od hemijske strukture surfaktanata tj. osobina hidrofilne glave i hidrofobnog ostatka/grupe koja stupa u interakciju sa površinom nanočestica. Prema mišljenju nekih autora (Cerdeira i sar., 2010; Jacobs i Müller, 2002; Müller i Jacobs, 2002) važna osobina koja doprinosi stabilnosti lek-nanočestica jeste i elektrostatička i sterna stabilizacija, koja u najvećoj meri upravo zavisi od osobina surfaktanata. Sličan princip važi i kod lipidnih nanočestica. Pored toga, za stabilizaciju lipidnih i lek-nanočestica, veoma je važno da surfaktanti obezbeđuju dovoljan stepen kvašenja čvrste faze tečnom. S tim u vezi, afinitet surfaktanta za površinu čestica igra značajnu ulogu. Ukoliko površina lipidnih nanočestica nije u dovoljnoj meri prekrivena surfaktantom, povećava se verovatnoća uzajamnog kontakta između „nezaštićenih” površina, što vodi agregaciji čestica i sveukupnoj nestabilnosti sistema (Siekman, 1994). Dakle, surfaktanti koji imaju veći afinitet za novostvorene površine će u većoj meri sprečiti agregaciju čestica. Indirektan način za određivanje afiniteta surfaktanta za površinu čvrste faze je merenje kontaktnog ugla. Prema Young-ovoj jednačini, ukoliko surfaktanti u dovoljnoj meri smanjuju međupovršinski napon između čvrste i tečne faze, oni povećavaju sposobnost kvašenja čvrste faze tečnom, odnosno snižavaju kontaktni ugao između te dve faze. Prema tome, sa sniženjem kontaktnog ugla povećava se sposobnost kvašenja čvrste faze tečnom, što sve zajedno doprinosi stabilnosti sistema. Prema literaturnim podacima, ukoliko je kontaktni ugao niži od 90° , čvrsta faza se dobro kvasi tečnom. Ukoliko je kontaktni ugao veći od 90° , kvašenja čvrste faze tečnom je slabije (Tadros, 2005; Vuleta i sar., 2012). Kontaktni ugao 0° označava potpuno kvašenje čvrste faze tečnom, dok odsustvo kvašenja između ove dve faze je ukoliko kontaktni ugao iznosi 180° (Tadros, 2005).

U ovom radu kontaktni ugao je meren da bi se procenio afinitet surfaktanta za cetil palmitat (matriks čvrstih lipidnih nanočestica). U radu su se koristili nejonski

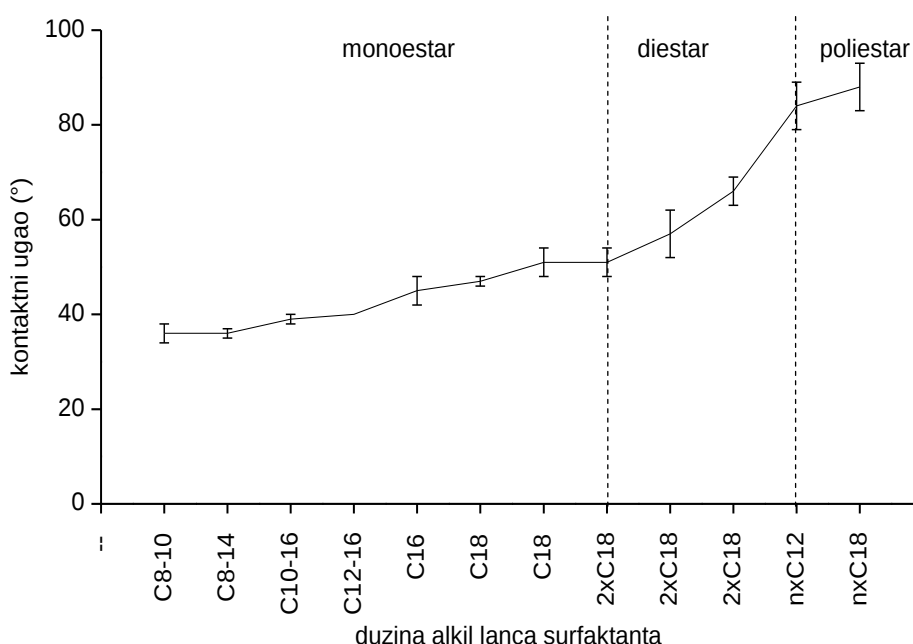
surfaktanti, koji ne sadrže molekul etilen oksida u svojoj strukturi, i kao takvi se smatraju pogodnim za primenu na kožu. Rezultati merenja kontaktnog ugla prikazani su u tabeli 5.1.1. U odnosu na prečišćenu vodu kvašenje cetil palmitata povećalo se u prisustvu gotovo svih ispitivanih surfaktanata (sa izuzetkom saharoza polilaurata i saharoza polistearata). Kvašenje čvrstog lipida najviše se popravilo u prisustvu rastvora alkil poliglukozida, preciznije u poređenju sa prečišćenom vodom kontaktni ugao se smanjio za 39 - 43°. Nešto manje smanjenje u vrednostima kontaktnog ugla (28 - 34°) zabeleženo je u prisustvu monoestara saharoze (saharoza palmitat i saharoza stearat) i poliglicerolskih monoestara (poligliceril-6 izostearat).

Tabela 5.1.1. Vrednosti kontaktnog ugla za prečišćenu vodu i polihidroksilne surfaktante (n=3, sr. vrednost $\pm$ SD)

Uzorak	Kontaktni ugao (°)
prečišćena voda	79 $\pm$ 2
saharoza palmitat	45 $\pm$ 3
saharoza stearat	51 $\pm$ 3
saharoza distearat	57 $\pm$ 5
saharoza polilaurat	84 $\pm$ 5
saharoza polistearat	88 $\pm$ 5
poligliceril-6 distearat	66 $\pm$ 3
poligliceril-6 izostearat	47 $\pm$ 1
poligliceril-3 diizostearat	51 $\pm$ 3
C8-10 alkil poliglukozid	36 $\pm$ 2
C8-14 alkil poliglukozid	36 $\pm$ 1
C10-16 alkil poliglukozid	39 $\pm$ 1
C12-16 alkil poliglukozid	40 $\pm$ 0

Najmanje smanjenje u vrednostima kontaktnog ugla zabeleženo je u prisustvu diestara saharoze (saharoza distearat) i poliglicerolskih diestara (poligliceril-6 distearat i poligliceril-3 diizostearat). Poliestri saharoze (saharoza polilaurat i saharoza polistearat) nisu uticali na smanjenje kontaktnog ugla, naprotiv u prisustvu ovih surfaktanata dobijene su više vrednosti kontaktnog ugla u odnosu na prečišćenu vodu. Ovakvo ponašanje se može objasniti vrlo niskim HLB brojem ($\sim$ 1) ovih surfaktanata (tabela 4.1), koji su izrazito hidrofobni i ne mogu dovesti do smanjenja kontaktnog ugla, čije su vrednosti zato više u odnosu na prečišćenu vodu.

Moguće objašnjenje za dobar afinitet alkil poliglukozida, monoestara saharoze i poliglicerolskog monoestra za cetil palmitat može biti formiranje hemijske veze između hidroksilnih grupa surfaktanta i karbonilne grupe lipida. Poliestri saharoze ne sadrže hidroksilne grupe u molekulu, te je stoga interakcija između surfaktanta i cetil palmitata verovatno slabija. Na osnovu rezultata merenja kontaktnog ugla uočava se da postoji rastući trend u vrednosti kontaktnog ugla sa povećanjem dužine alkil lanca i stepena esterifikacije polihidroksilnih surfaktanata (slika 5.1.1.), što je očekivani i sa aspekta uticaja njihove hemijske strukture na ponašanje na kontaktnim površinama.



Slika 5.1.1. Kontaktni ugao polihidroksilnih surfaktanata na cetil palmitatu (Cutina® CP) u funkciji dužine alkil lanca i stepena esterifikacije surfaktanata

Nakon dobijanja preliminarnih informacija o mogućnosti kvašenja čvrstog lipida različitim surfaktantima, pripremljene su vodene disperzije čvrstih lipidnih nanočestica i izvedena je njihova karakterizacija. Paralelno sa karakterizacijom strukture čvrstih lipidnih nanočestica izvedena je i strukturna karakterizacija lipida i surfaktanata u *bulk* stanju, u cilju dobijanja dodatnih informacija o

5.1.2. Priprema vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima

Na osnovu podataka koji su bili dostupni u literaturi (Göppert i Müller, 2003; 2005), u kojima su za stabilizaciju čvrstih lipidnih nanočestica sa 10 % (m/m) cetil palmitata (Cutina® CP) kao čvrstog lipida upotrebljeni nejonski etoksilovani surfaktant polisorbit 80 ili polimerni stabilizator poloksamer 188, uočeno je da su koncentracije surfaktanata od 1,2 % (m/m) bile dovoljne za dobijanje čvrstih lipidnih nanočestica prosečnog dijametra oko 230 nm i uske distribucije čestica po veličini ($PI < 0,15$). Budući da je cilj istraživanja bila formulacija lipidnih nanočestica prosečnog dijametra ispod 200 nm sa što nižom koncentracijom stabilizatora, potencijal polihidroksilnih surfaktanata iz grupe šećernih estara, poliglicerolskih estara masnih kiselina i alkil poliglukozida da stabilizuju vodene disperzije čvrstih lipidnih nanočestica ispitivan je kroz seriju formulacija sa koncentracijom surfaktanta 1 % (m/m) tj. fiksnim odnosom surfaktant/lipid od 1/10.

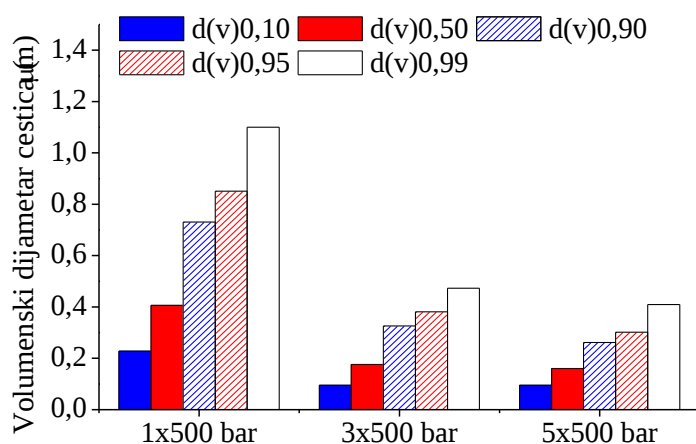
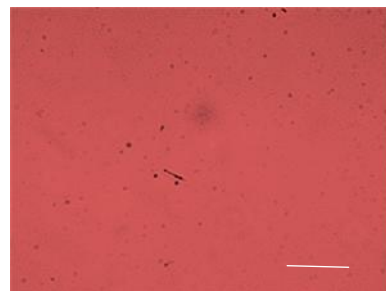
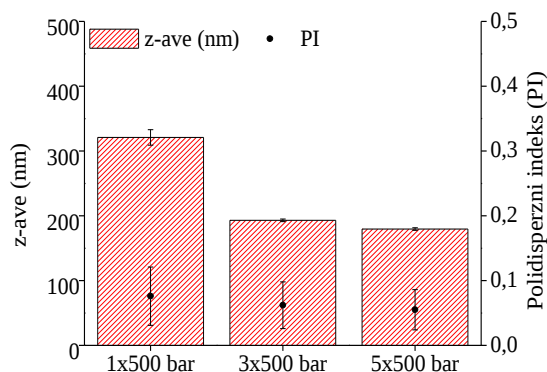
Među različitim metodama za pripremu vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica koje su dostupne u literaturi (zur Mühlen i sar., 1998) metoda tople homogenizacije pod visokim pritiskom se izdvojila kao najefikasnija za dobijanje čestica malog dijametra i uske distribucije čestica po veličini (Lippacher i sar., 2001; Mehnert i Mäder, 2012; Muchov i sar., 2008). Veličina lipidnih nanočestica koje se dobijaju postupkom homogenizacije pod visokim pritiskom zavisi od formulacionih parametara (vrsta lipida i surfaktanta/smeše surfaktanata i koncentracija upotrebljenog surfaktanta, osobine inkorporirane aktivne supstance) i procesnih parametara (vreme homogenizacije, temperatura, pritisak u toku homogenizacije, broj ciklusa). Pažljivim izborom formulacionih i procesnih parametara moguće je u velikoj meri uticati na kvalitet finalne formulacije, tj. doprineti većoj stabilnosti sistema i smanjenju agregacije čestica (Mehnert i Mäder, 2012). S tim u vezi, sve formulacije u ovom istraživanju pripremljene su ovom metodom. U cilju ispitivanja uticaja hemijske strukture surfaktanata i broja ciklusa homogenizacije na veličinu čestica i distribuciju čestica po veličini, odnos između surfaktanta i lipida održavan je konstantnim. Profili smanjenja veličine kapi sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije koji je dobijen u ispitivanim sistemima detaljno su analizirani sa ciljem da se odrede optimalni procesni parametri za dobijanje čestica malog dijametra i uske distribucije po veličini. Budući da su profili

smanjenja veličine čestica, tj. indeksa polidisperziteta sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije kod svih uzoraka u ovom istraživanju odgovarali tipičnim profilima koji se mogu naći u literaturi, na slikama 5.1.2. - 5.1.4. su prikazani samo rezultati dobijeni za tri uzorka stabilizovana surfaktantima iz različitih hemijskih grupa (šećerni estri, poliglicerolski estri masnih kiselina i alkil poliglukozidi). U svim ispitivanim uzorcima uočeno je da je došlo do smanjenja veličine čestica i sužavanja distribucije čestica po veličini, sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije. Takođe, uočeno je da su nakon samo jednog ciklusa homogenizacije dobijene čestice nanometarskih veličina, preciznije PCS dijametar čestica bio je u intervalu od 185 - 320 nm. Čestice najmanjeg dijametra dobijene su u uzorcima stabilizovanim alkil poliglukozidima. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima merenja kontaktnog ugla, odnosno veća sposobnost kvašenja cetil palmitata surfaktantom imala je za posledicu obrazovanje čestica manjeg dijametra. Osim toga, svi alkil poliglukozidi se dobro rastvaraju u vodi (na temperaturi homogenizacije) i imaju nižu molekulsku masu od ostalih surfaktanata. Stoga se moglo pretpostaviti da će ovi surfaktanti brže difundovati na novostvorene površine čestica. Dakle, nakon prvog ciklusa homogenizacije najbolju funkcionalnost u stabilizaciji lipidnih nanočestica ispoljili su surfaktanti koji su imali najviše HLB vrednosti, najniže vrednosti kontaktnog ugla na lipidnom filmu i najnižu molekulsku masu.

Sa daljim povećanjem broja ciklusa homogenizacije profil smanjenja veličine čestica imao je sličan trend u prisustvu svih ispitivanih surfaktanata. Između prvog i trećeg ciklusa homogenizacije uočene su najveće promene, tj. skokovit pad u prosečnom dijametru čestica ($\bar{z}$ -ave), dok se veoma male promene u ovim vrednostima uočavaju između trećeg i petog ciklusa homogenizacije. Klasična interpretacija gotovo nepromenjenih vrednosti prosečnog dijametra čestica nakon trećeg ciklusa homogenizacije povezuje se sa dostizanjem tzv. platoa u dijametru čestica koje čine *bulk* populaciju nakon unosa određene količine energije u sistem. Naime, između prvog i trećeg ciklusa energija koja se uvodi u sistem troši se ravnomerno na smanjenje veličine svih čestica u formulaciji. Nakon trećeg ciklusa homogenizacije, uneta energija u sistemu troši se na smanjenje dijametra čestica u *bulk* populaciji, a samo delimično na čestice većeg dijametra.

I pored toga što je prosečan dijametar čestica ostao gotovo nepromenjen između trećeg i petog ciklusa homogenizacije, postupak homogenizacije je nastavljen dalje kako bi se

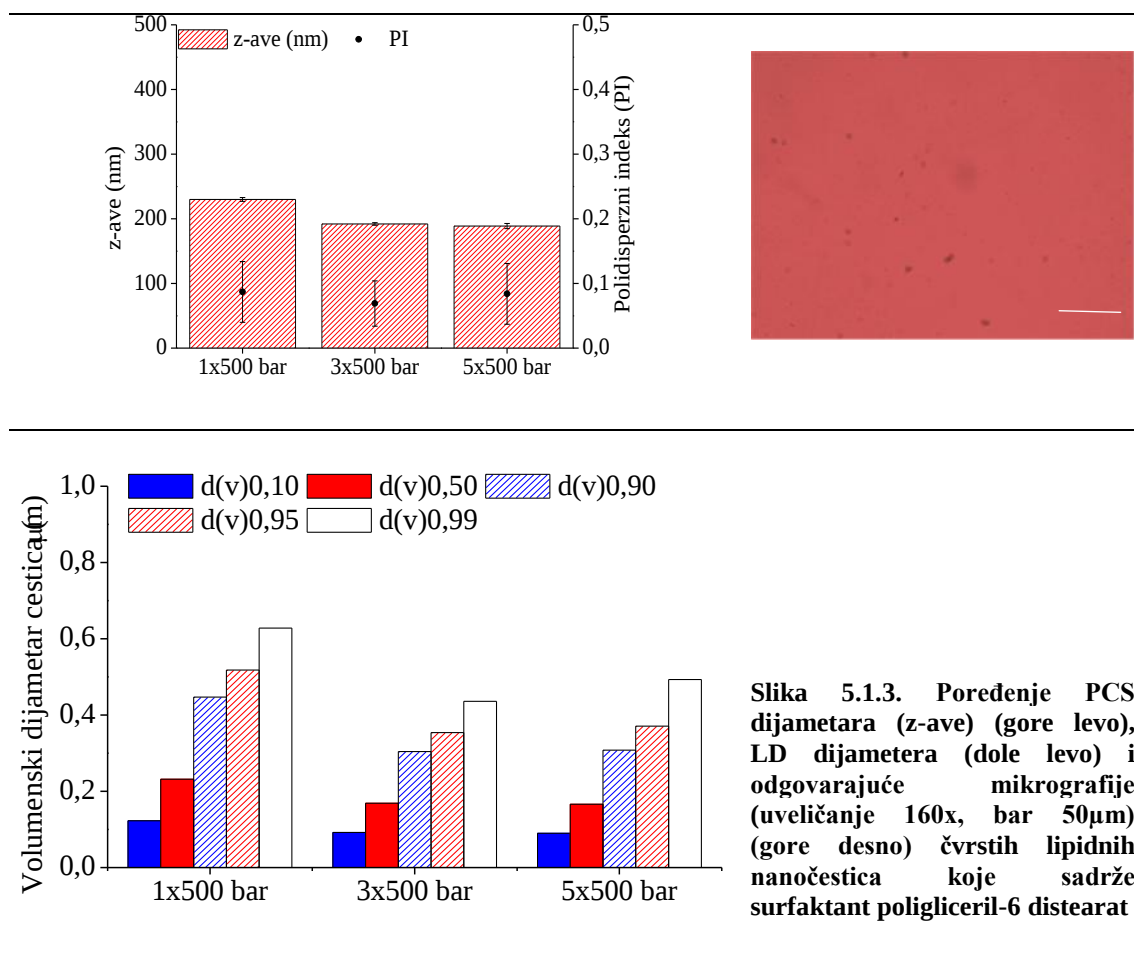
pratila promene u homogenosti disperzije, odnosno u smanjenju PI. Rezultati PCS studije potvrdili su veoma male promene u vrednostima PI između trećeg i petog ciklusa homogenizacije.



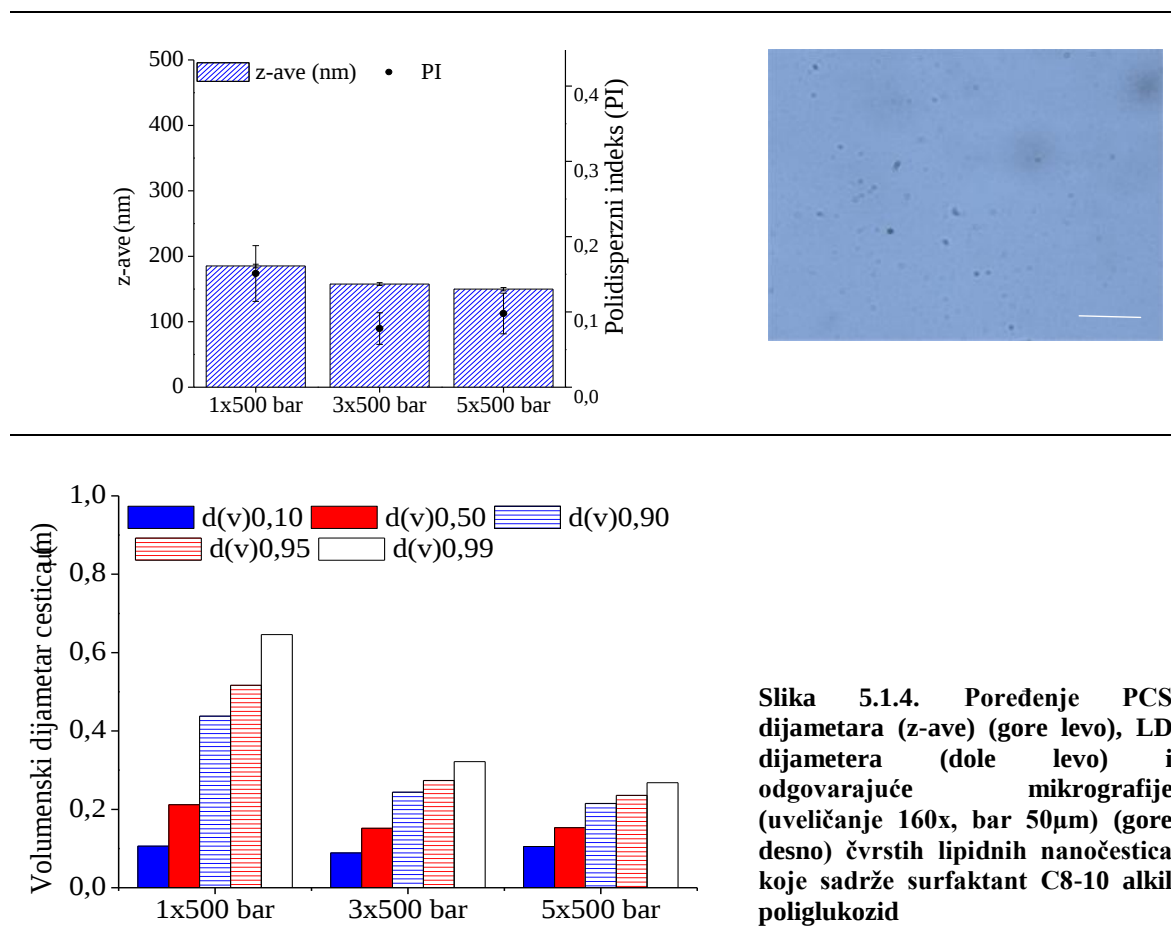
Slika 5.1.2. Poređenje PCS dijametara (z-ave) (gore levo), LD dijametara (dole levo) i odgovarajuće mikrografije (uveličanje 160x, bar 50μm) (gore desno) čvrstih lipidnih nanočestica koje sadrže surfaktant saharoza stearat

Međutim, neki autori iznose tvrdnju da se samo na osnovu PCS dijametara i PI ne mogu uvek izvesti ispravni zaključci o veličini čestica i raspodeli čestica po veličini, zbog toga što PCS ne „vidi” čestice čiji dijametar je iznad 3 μm (Keck, 2010; Souto, 2005). Uzimajući u obzir ove literaturne navode u nastavku istraživanja za detaljniju analizu ispitivanih formulacija korišćena je tehnika laserske difrakcije koja može pružiti preciznije podatke o prisustvu čestica mikrometarskih veličina. Rezultati koji su dobijeni tokom merenja ispitivanih formulacija metodom laserske difrakcije prikazani su na slikama 5.1.2. - 5.1.4. Sva merenja kod ispitivanih formulacija lipidnih nanočestica sprovedena su u skladu sa definisanim standardnim operativnim postupkom

(SOP). Poređenjem dobijenih rezultata sa parametrima PCS analize dolazi se do zaključka da je trend smanjena volumenskih dijametara veoma sličan trendu smanjenja prosečnog dijametra čestica i PI. Slično PCS dijametrima i PI, volumenski dijametrima ($d(v)_{0,10}$ - $d(v)_{0,99}$) se smanjuju sa uvođenjem energije u sistem dok se ne dostigne plato.



Linearno smanjenje dijametara $d(v)_{0,10}$ - $d(v)_{0,99}$ uočava se između prvog i trećeg ciklusa u svim ispitivanim formulacijama, dok sa daljim povećanjem broja ciklusa profil smanjenja volumenskih dijametara postaje eksponencijalan. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je maksimalna disperzibilnost *bulk* populacije (odnosno minimalna vrednost dijametara $d(v)_{0,50}$) dostignuta nakon tri ciklusa homogenizacije. Dalji unos energije u sistem (tj. povećanje broja ciklusa homogenizacije) samo neznatno je uticao na smanjenje volumenskog dijametara *bulk* populacije. Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatom PCS-studije (slike 5.1.2. - 5.1.4 (gore levo)).



Slika 5.1.4. Poređenje PCS dijametara (z-ave) (gore levo), LD dijametara (dole levo) i odgovarajuće mikrografije (uveličanje 160x, bar 50μm) (gore desno) čvrstih lipidnih nanočestica koje sadrže surfaktant C8-10 alkil poliglukozid

Nasuprot volumenskom dijametri *bulk* populacije, koji ostaje praktično nepromenjen između trećeg i petog ciklusa homogenizacije, u istom ciklusnom intervalu uočava se trend blagog smanjenja volumenskih dijametara $d(v)_{0,90}$ - $d(v)_{0,99}$. Na osnovu prethodnih rezultata pretpostavljeno je da se homogenizacija ispitivanih disperzija odvijala u dva koraka. U prvom koraku, koji traje kraće i završava se sa trećim ciklusom homogenizacije većina čestica (tzv. *bulk* populacija) dostiže svoju maksimalnu disperzibilnost. U drugom koraku, koji traje nešto duže i završava se petim ciklusom homogenizacije, uočeno je dalje smanjenje dijametara „većih” čestica odnosno sužavanje raspodele čestica po veličini. Promene u dijametri čestica koje čine *bulk* populaciju bile su neznatne ili ih uopšte nije bilo. Uzimajući u obzir da je ovakav trend smanjenja volumenskih dijametara dobijen kod svih formulacija u ovom istraživanju pretpostavilo se da se pri formulaciji čvrstih lipidnih nanočestica sa polihidroksilnim surfaktantima u cilju dobijanja dovoljno homogene formulacije, odnosno uklanjanja čestica većeg

dijametra, preporučuje izvođenje dodatnih ciklusa homogenizacije, nakon što čestice koje čine *bulk* populaciju dostignu svoju minimalnu vrednost.

Dodatno, uočeno je da je u formulaciji koja sadrži poligliceril-6 distearat, kao surfaktant, došlo do blagog povećanja volumenskih dijametara $d(v)_{0,90}$, $d(v)_{0,95}$ i $d(v)_{0,99}$ nakon trećeg ciklusa. Ovaj fenomen se objašnjava prekomernim unosom energije u sistem, koja za posledicu može imati povećanja dijametra čestica (Jahnke, 1998). Slični rezultati dobijeni su u studiji koju su izveli Huynh i sar. (2008). Fenomen povećanja dijametra čestica sa povećanjem unosa energije u sistem neki autori su pripisali povećanju Braunovog kretanja kapi i nedovoljnoj funkcionalnosti emulgatora u stabilizaciji kapi emulzije (Jafari i sar., 2006; Jafari i sar., 2008). Kapi emulzije koje nastaju u toku homogenizacije su termodinamički nestabilne, što doprinosi većoj koliziji i koalescenciji tj. obrazovanju kapi većeg dijametra (Desrumaux i Marcand, 2002). Takođe, tokom homogenizacije usled smanjenja dijametra kapi dolazi do velikog povećanja njihove površine. Ukoliko novonastale površine kapi postanu prevelike, u jednom trenutku emulgatori nisu više u mogućnosti da ih sve prekriju, tako da one stupaju u kontakt jedna sa drugom. Kao rezultat toga dolazi do obrazovanja kapi većeg dijametra. Ovakva pojava u literaturi označava se terminom „prag” deplecije (engl. *“threshold of depletion”*) (Huynh i sar., 2008) i povezuje se sa pojavom koalescencije (Schulz i Daniels, 2000). Sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije takođe dolazi do povećanja temperature u homogenizatoru. Prema mišljenju nekih autora određeni emulgatori kada se zagreju iznad kritične temperature gube sposobnost stabilizacije kapi emulzije, što vodi obrazovanja kapi većeg dijametra (Floury i sar., 2000).

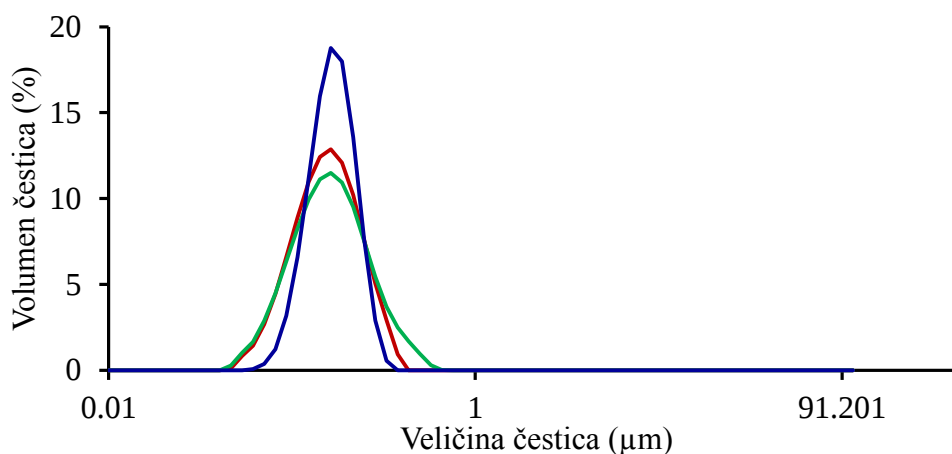
Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da polihidroksilni surfaktanti u niskoj koncentraciji (1 % (m/m)) pokazuju dobru funkcionalnost u pripremi disperzija lipidnih nanočestica malog dijametra i uske raspodele čestica po veličini. Optimalni uslovi za pripremu disperziju u ovom radu bili su 3 - 5 ciklusa homogenizacije (u zavisnosti od surfaktanta), pri pritisku od 500 bar i temperaturi od 75 °C.

5.1.3. Fizička stabilnost vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima

5.1.3.1. Kratkoročna studija fizičke stabilnosti na različitim temperaturama

Određivanje veličine čestica i distribucije čestica po veličini smatra se standardnim pristupom u dobijanju preliminarnih informacija o karakteristikama čvrstih lipidnih nanočestica. Opšteprihvaćeni pristup je da čestice treba da poseduju dijametar ispod 1 μm i usku distribuciju po veličini ($\text{PI} < 0,2$). Osim toga analiza veličine čestica u funkciji vremena može pružiti detaljnije zaključke o fizičkoj stabilnosti sistema, ali i o strukturnim promenama unutar lipidnog matriksa čestica. Sistemi se mogu smatrati fizički stabilnim ukoliko nema promena u veličini čestica i raspodeli čestica po veličini tokom ispitivnog perioda ili su te promene unutar definisanih granica.

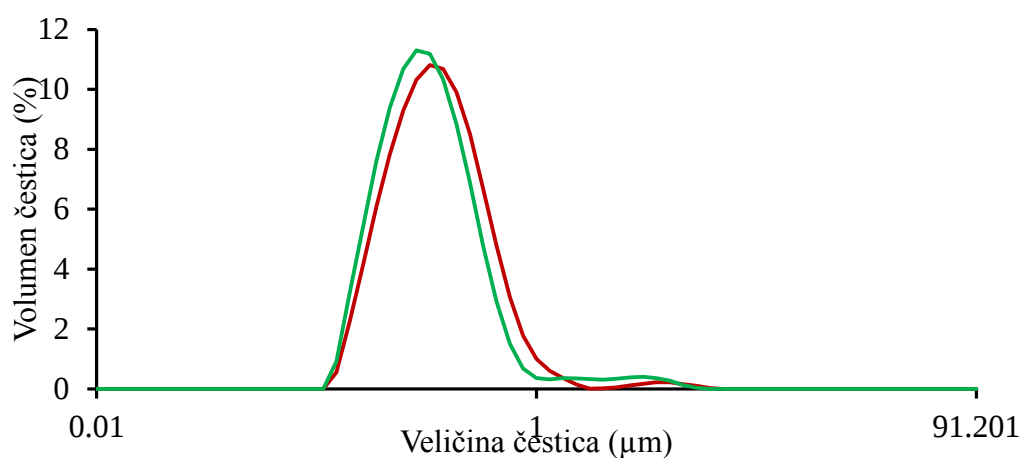
Izveštaji o rezultatima PCS i LD merenja ispitivanih uzoraka neposredno nakon izrade ukazali su na činjenicu da su disperzije čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovane alkil poliglukozidima, poliglicerolskim estrima masnih kiselina i mono- i diestrima saharoze bile makroskopski homogene, niskog viskoziteta sa prosečnim dijametrom čestica ispod 200 nm. Distribucija čestica po veličini bila je monomodalna, a dijametar najvećih čestica nije prelazio 600 nm (slika 5.1.5.).



Slika 5.1.5. Raspodela veličine čestica* prema volumenu nakon izrade kod čvrstih lipidnih nanočestica koje sadrže surfaktante saharoze stearat (—), poligliceril-6 distearat (—) i C8-10 alkil poliglukozid (—)

*particle size (μm)

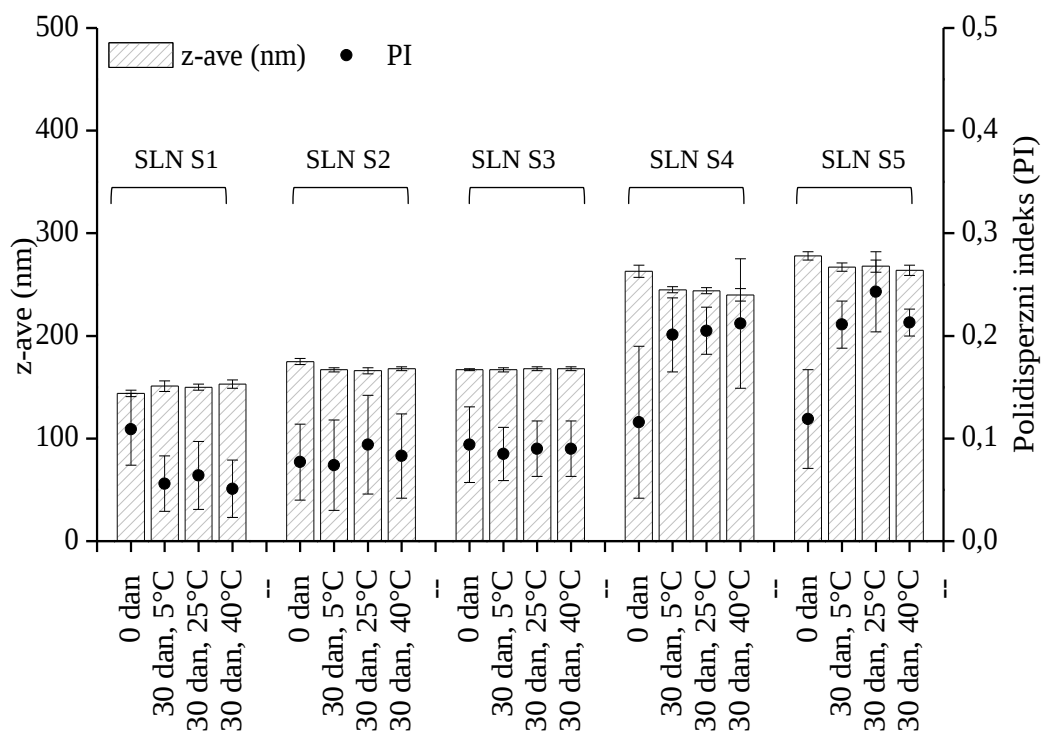
Čestice najmanjeg dijametra (144 nm i 153 nm) dobijene su u formulacijama stabilizovanim saharoza palmitatom i C8-10 alkil poliglukozidom. Saharoza palmitat i C8-10 alkil poliglukozid su surfaktanti koji imaju najveću HLB vrednost, najmanji kontaktni ugao na lipidnom (cetil palmitat) filmu i najmanju molekulsku masu. Kao što je objašnjeno u teorijskom delu doktorske disertacije, očekuje se da surfaktanti male molekulске mase koji su rastvorni u vodi mogu da difunduju na novoobrazovane površine čestica i stabilizuju ih u toku i nakon homogenizacije u kraćem vremenskom periodu od vremena potrebnog za agregaciju čestica. Osim toga, sa rastvorima saharoza palmitata i C8-10 alkil poliglukozida dobijene su najniže vrednosti kontaktnog ugla na lipidnom filmu. Ovakav rezultat ukazuje na dobar afinitet ovih surfaktanata za lipidni matriks čestica. Dijametri čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovani poliestrima saharoze (saharoza polilaurat i saharoza polistearat) bili su veći i iznosili su 244 nm i 255 nm, redom. U ovim formulacijama uočeno je prisustvo čestica mikrometarskih veličina (slika 5.1.6.). Međutim, stepen agregacije bio je mali ($\leq 1\%$), tj. samo dijametar $d(v)_{0,99}$ bio je iznad 1 μm , dok je dijametar $d(v)_{0,95}$ bio ispod 1 μm .



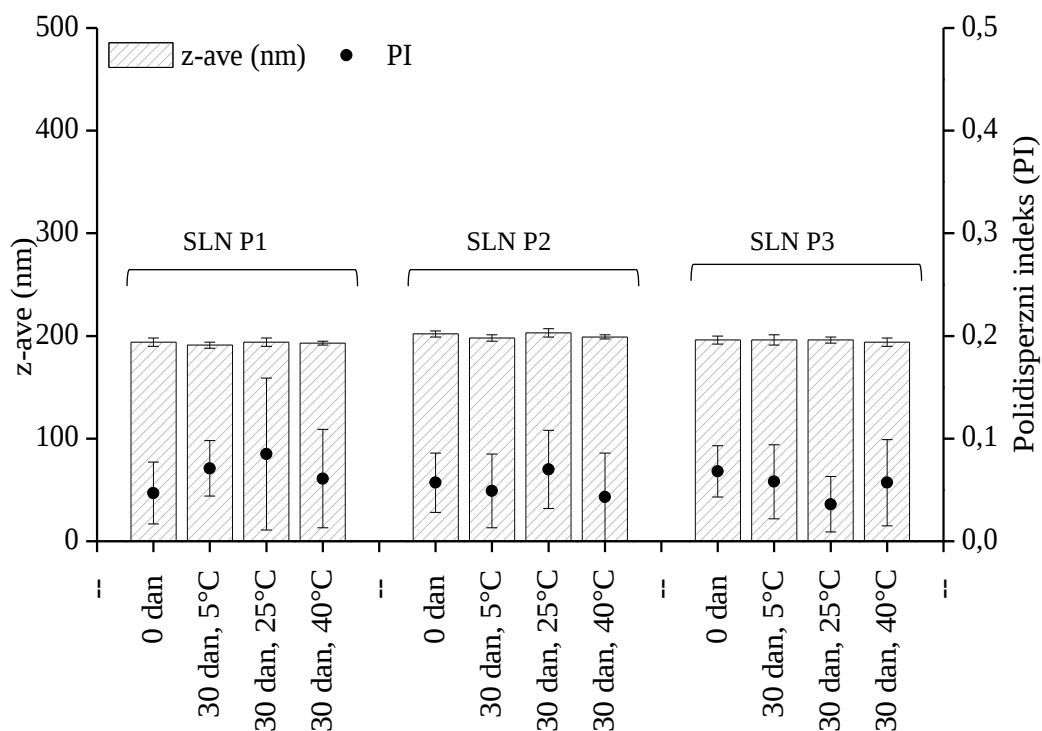
Slika 5.1.6. Raspodela veličine čestica prema volumenu nakon izrade kod čvrstih lipidnih nanočestica koje sadrže surfaktante saharoza polilaurat (—) i saharoza polistearat (—)

Procena fizičke stabilnosti ispitivanih formulacija u ovom istraživanju obuhvatila je određivanje veličine čestica i distribucije čestica po veličini primenom PCS tehnike i određivanje volumenskih dijametara čestica primenom LD tehnike nakon čuvanja uzoraka na temperaturama $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ u toku jednog meseca. Sva merenja su izvedena u skladu sa definisanim standardnim operativnim postupkom

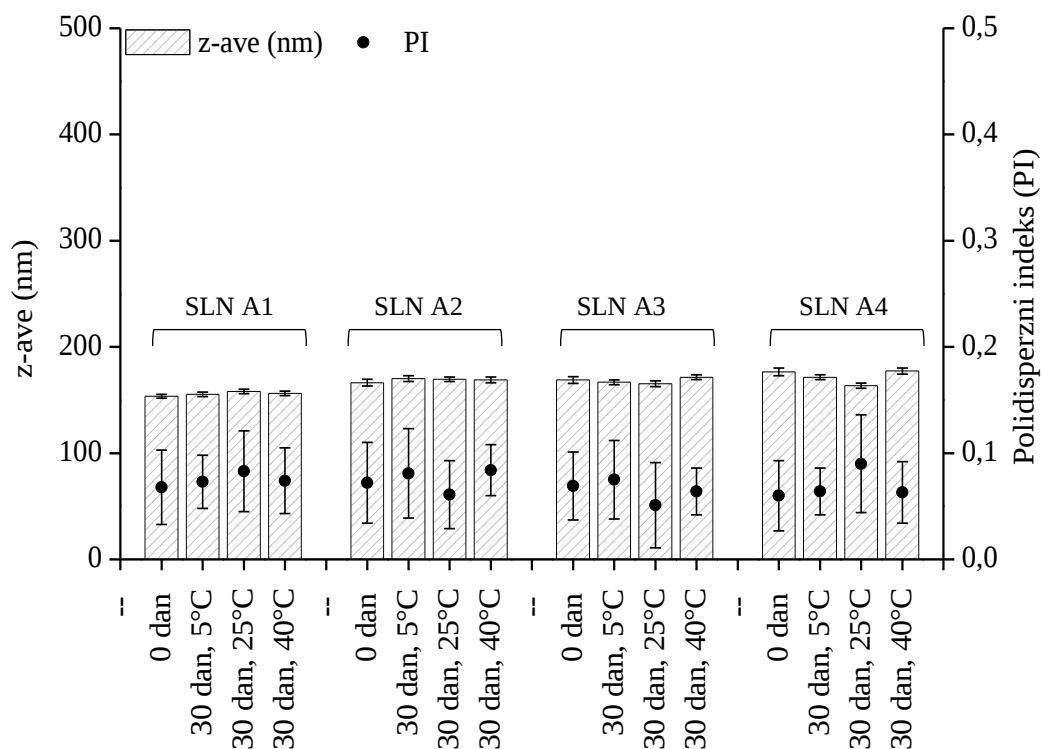
(SOP). Rezultati sprovedenih ispitivanja prikazani su na slikama 5.1.7. - 5.1.12.



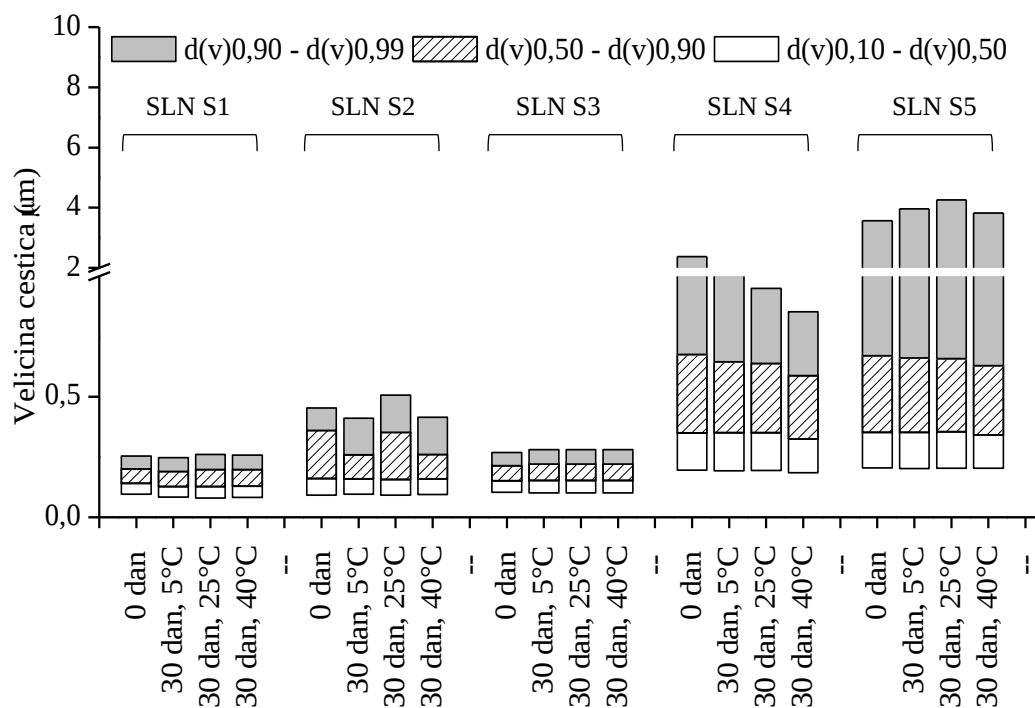
Slika 5.1.7. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih estrima saharoze nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana



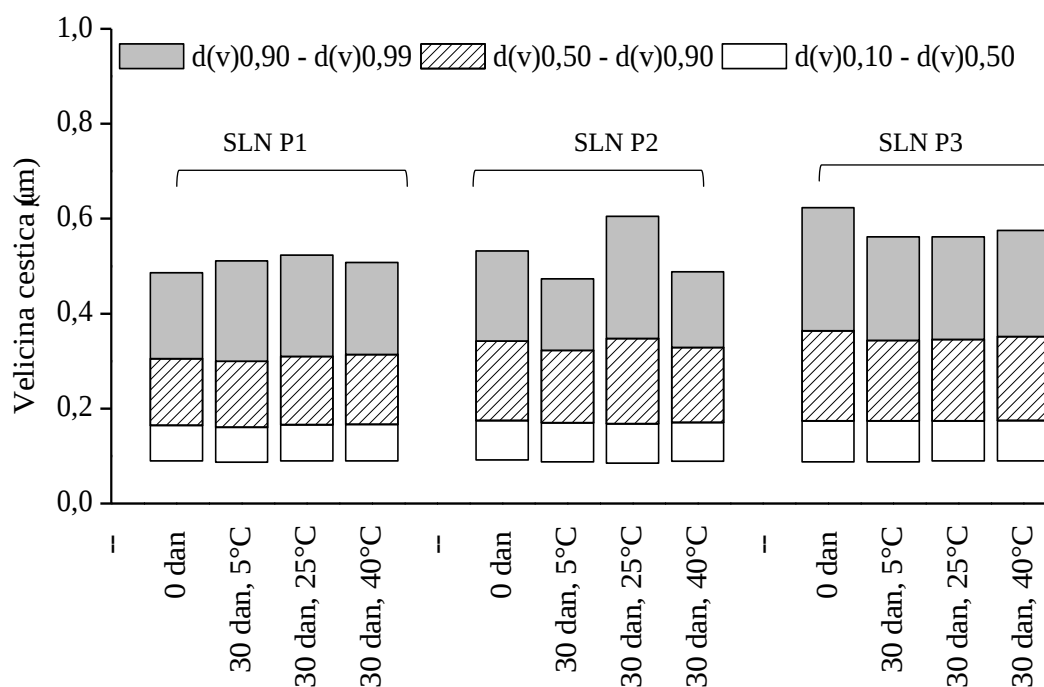
Slika 5.1.8. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih poliglicerolskim estrima masnih kiselina nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana



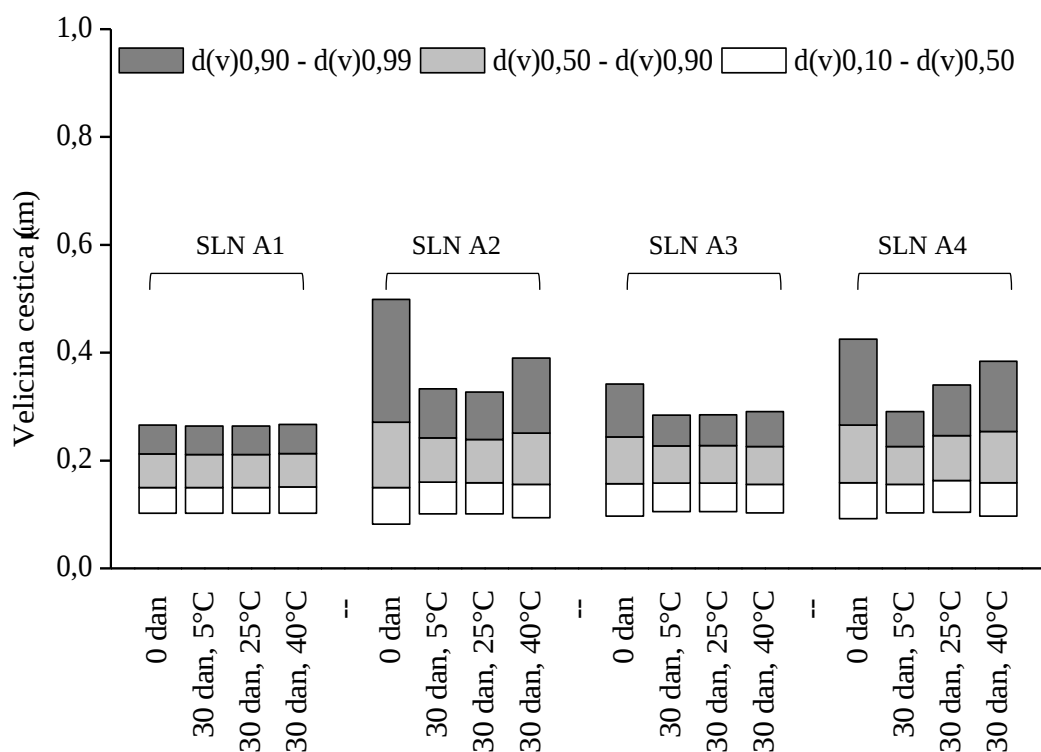
Slika 5.1.9. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih alkil poliglukozidima nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana



Slika 5.1.10. Parametri veličine čestica (LD-podaci) u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih estrima saharoze nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana

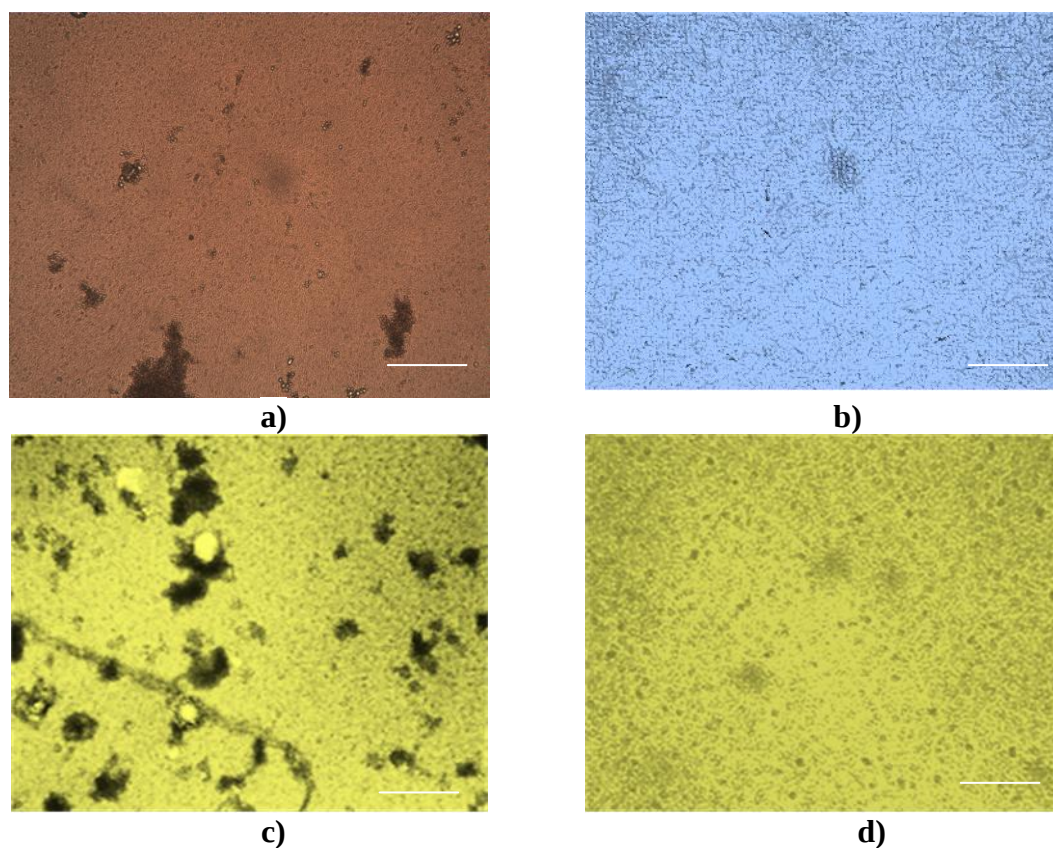


Slika 5.1.11. Parametri veličine čestica (LD-podaci) u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih poliglicerolskim estrima masnih kiselina nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana

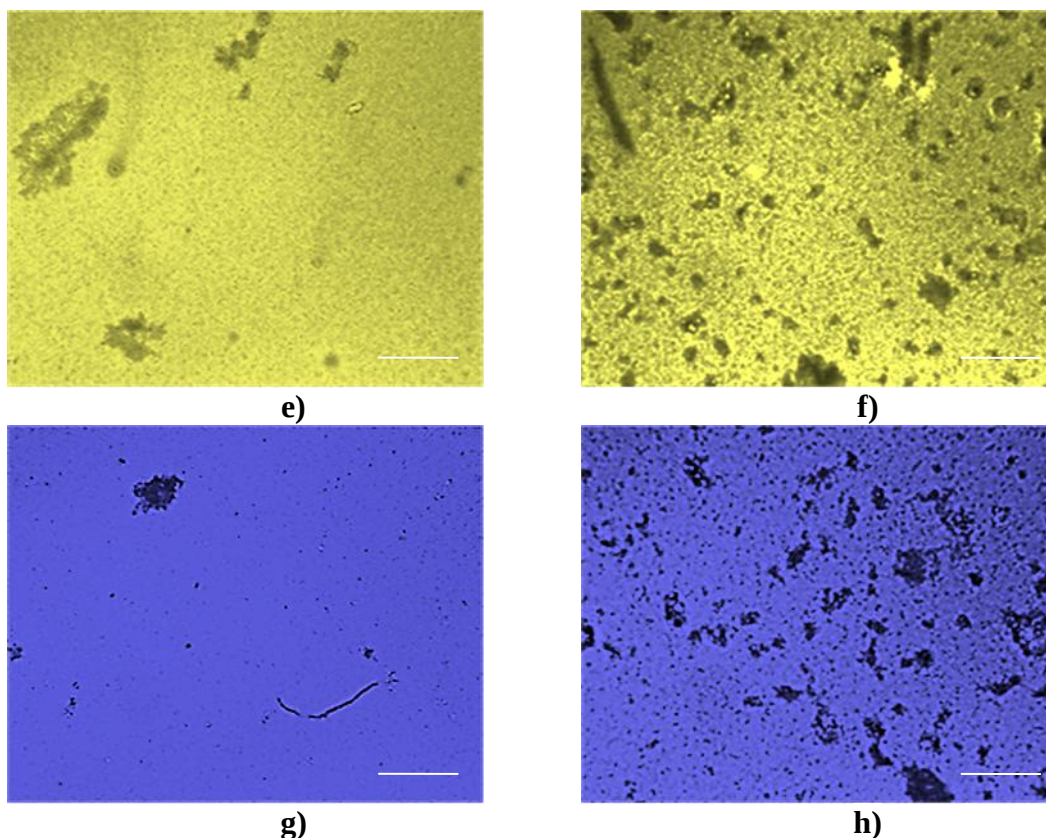


Slika 5.1.12. Parametri veličine čestica (LD-podaci) u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih alkil poliglukozidima nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana

Nakon 30 dana čuvanja uzoraka na različitim temperaturama, z-ave i PI bili su gotovo identični vrednostima dobijenim neposredno nakon izrade. U disperzijama stabilizovanim saharoza polilauratom i saharoza polistearatom, $d(v)_{0,99}$ bio je iznad $1\mu\text{m}$, ali više od 90 % čestica imalo je dijametar ispod $1\mu\text{m}$. Prema tome, u ovim uzorcima je tokom čuvanja na različitim temperaturama uočeno malo povećanje u dijametru većih čestica. Prisustvo većih čestica potvrđeno je svetlosnom mikroskopijom (slika 5.1.13.). Ostale formulacije stabilizovane polihidroksilnim surfaktantima bile su stabilne u toku ispitivanog perioda i pod uslovima koji su primenjeni u studiji i ni u jednoj formulaciji nije uočeno prisustvo čestica mikrometarskih veličina. Takođe, na osnovu rezultata mikroskopske analize nisu uočene razlike između ispitivanih formulacija.



Slika 5.1.13. (legenda na narednoj strani)



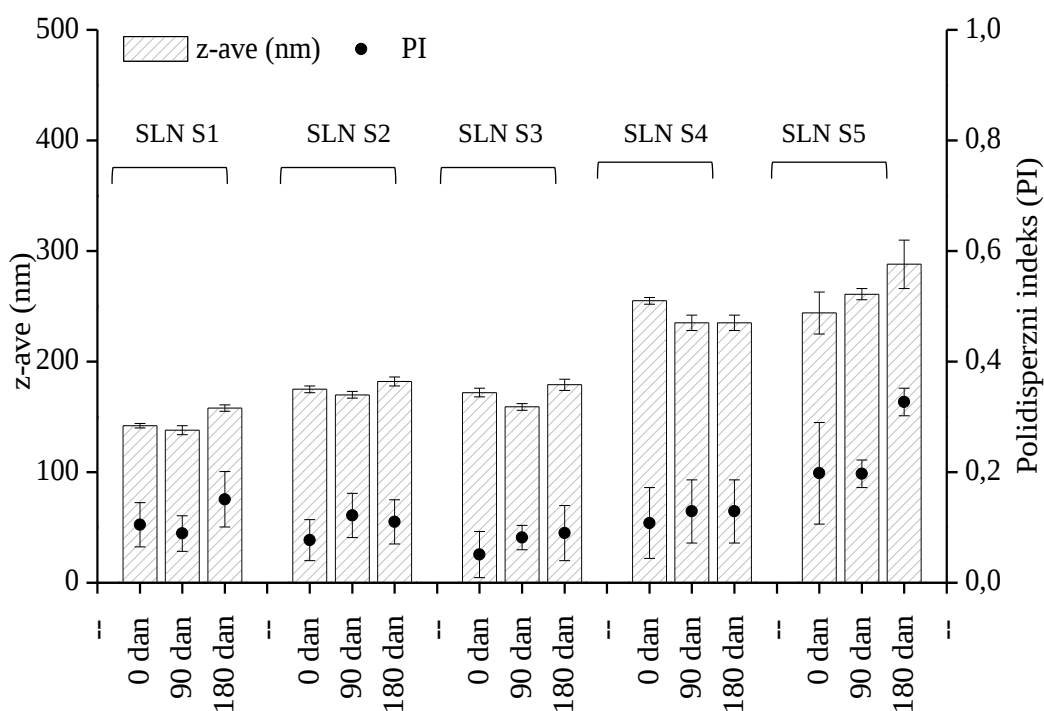
Slika 5.1.13. Mikrografije čvrstih lipidnih nanočestica koje sadrže surfaktante saharozu polilaurat (SLN S4) i saharozu polistearat (SLN S5) nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana (uveličanje 160x, bar, 50 μm): a) SLN S4 (0 dan); b) SLN S5 (0 dan); c) SLN S4 (30 dan, 5 ± 3 °C); d) SLN S5 (30 dan, 5 ± 3 °C); e) SLN S4 (30 dan, 25 ± 2 °C); f) SLN S5 (30 dan, 25 ± 2 °C); g) SLN S4 (30 dan, 40 ± 2 °C); h) SLN S5 (30 dan, 40 ± 2 °C)

5.1.3.2. Dugoročna studija fizičke stabilnosti na sobnoj temperaturi

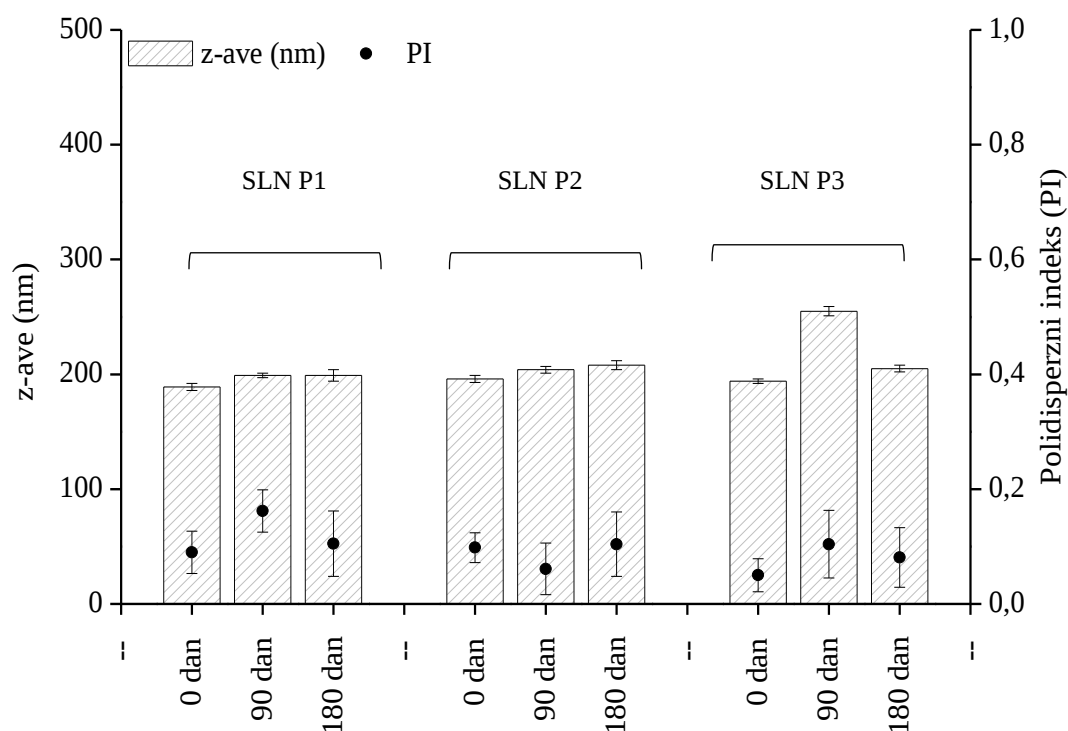
U cilju ispitivanja dugoročne fizičke stabilnosti vodenih disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima, ispitivane formulacije su čuvane na sobnoj temperaturi (25 ± 2 °C) u periodu od šest meseci. Rezultati merenja veličine čestica i distribucije čestica po veličini prikazani su na slikama 5.1.14. - 5.1.20. Na osnovu dobijenih rezultata se može videti da je nakon šest meseci prosečan dijametar čestica u disperzijama stabilizovanim alkil poliglukozidima, poliglicerolskim estrima masnih kiselina, mono- i diestrima saharoze bio oko 200 nm, dok je raspodela čestica po veličini ostala nepromenjena ($PI \sim 0,1$). Interesantno je da je i prosečan dijametar čestica u disperzijama stabilizovanim saharozu polilauratom i saharozu polistearatom ostao nepromenjen, i iznosio je 235 nm i 259 nm redom. Raspodela čestica po veličini u uzorku koji sadrži surfaktant saharozu polilaurat ostala je

nepromenjena nakon šest meseci, i iznosila je 0,129, dok je u uzorku koji sadrži saharozu polistearat uočeno povećanje PI od 0,198 (nakon izrade) do 0,327 (nakon šest meseci), što ukazuje na određenu nestabilnost u ovom uzorku (slika 5.1.14.).

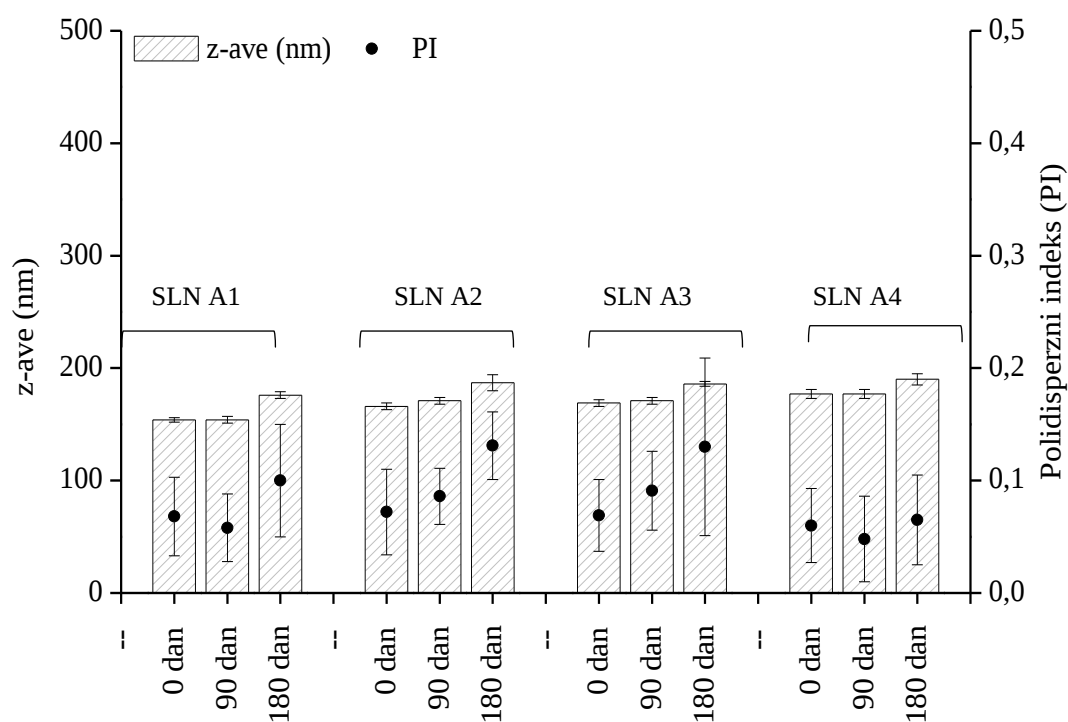
Međutim, kako je PCS ograničena samo na čestice čiji je dijametar manji od $\sim 3 \mu\text{m}$, tj. čestice koje podležu Braunovom kretanju (Müller i Schuhmann, 1996), u cilju dodatne karakterizacije sistema i utvrđivanja prisustva/odsustva većih čestica koristila se tehnika laserske difrakcije. Rezultati laserske difrakcije potvrdili su rezultate PCS za disperzije stabilizovane saharozu palmitatom, alkil poliglukozidima i poligliceril-3 diizostearatom. U ovim formulacijama volumenski dijometri su ostali nepromenjeni i nakon šest meseci čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi.



Slika 5.1.14. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih estrima saharoze tokom perioda od šest meseci

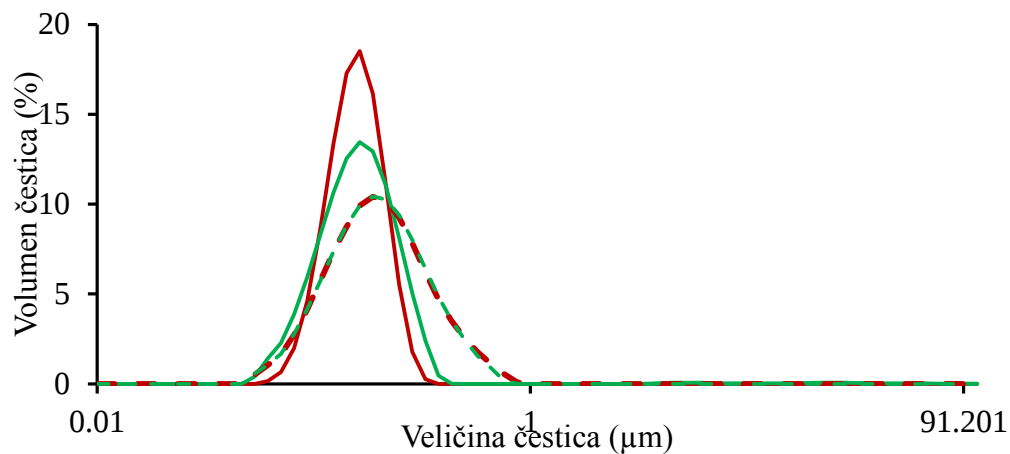


Slika 5.1.15. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih poliglicerolskim estrima masnih kiselina tokom perioda od šest meseci

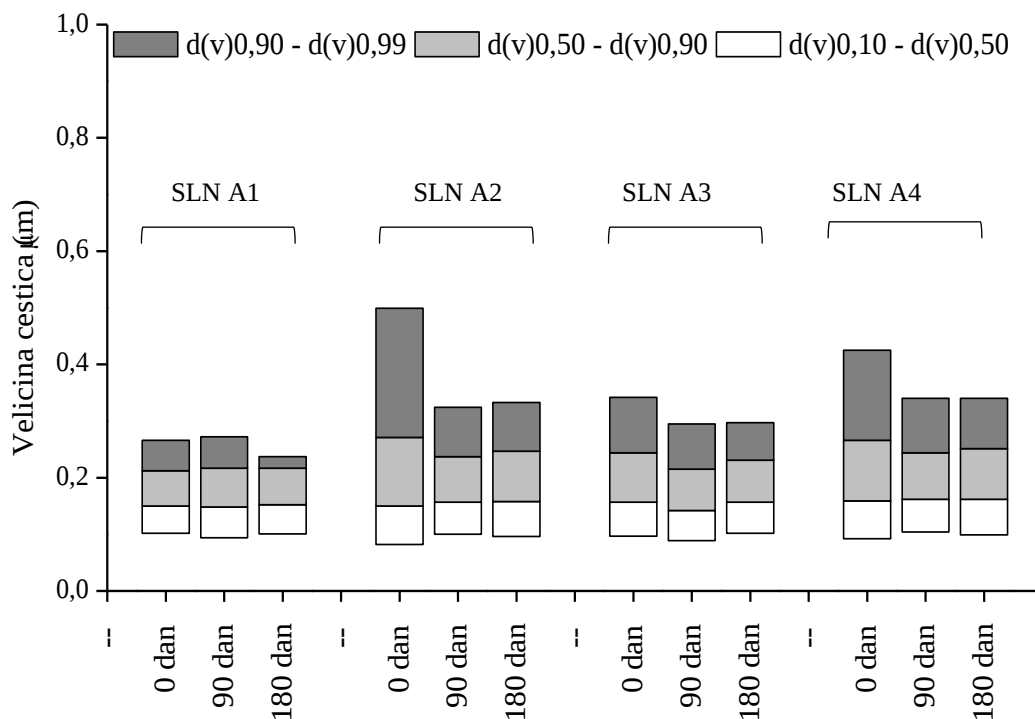


Slika 5.1.16. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih alkil poliglikozidima tokom perioda od šest meseci

Makroskopskim pregledom ispitivanih disperzija uočeno je da su one bile homogene i niskog viskoziteta.



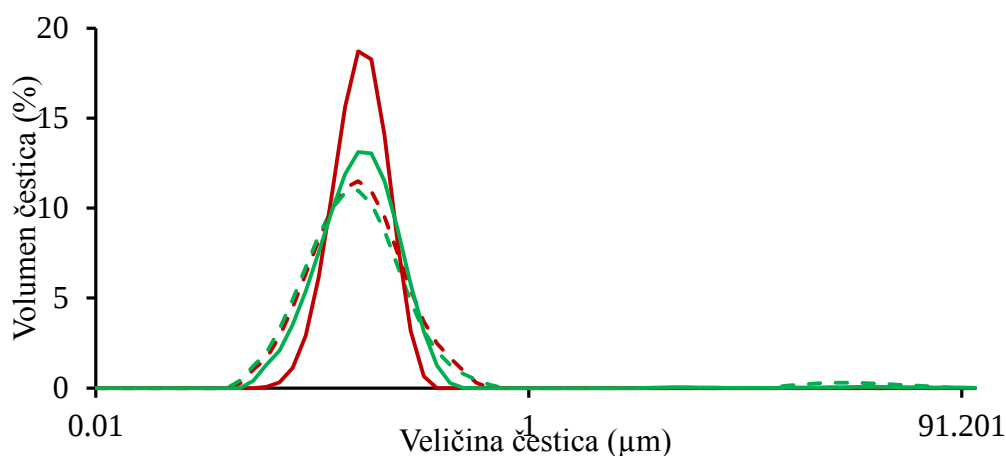
Slika 5.1.17. Raspodela veličine čestica prema volumenu kod čvrstih lipidnih nanočestica koje sadrže surfaktant saharoza palmitat nakon izrade (—) i nakon 180 dana (—) i poligliceril-3 diizostearat nakon izrade (- -) i nakon 180 dana (- -)



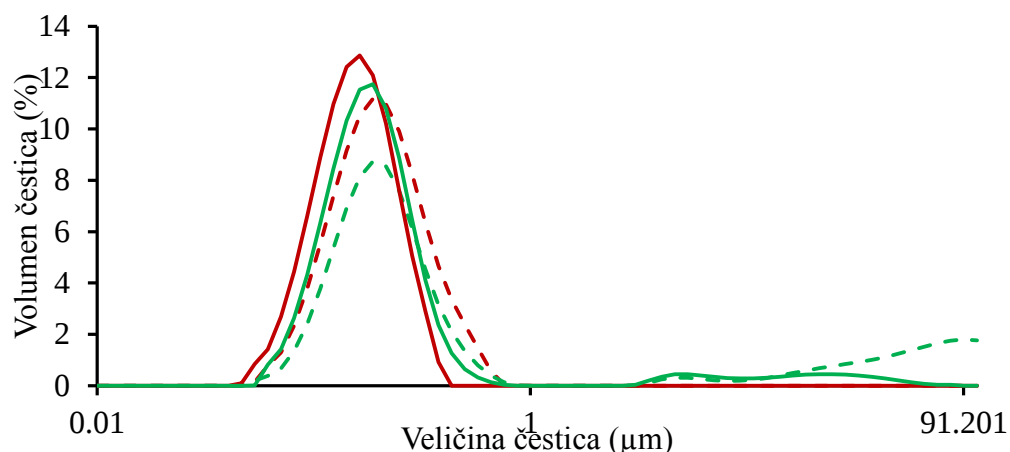
Slika 5.1.18. Parametri veličine čestica (LD-podaci) u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih alkil poliglukozidima tokom perioda od šest meseci

Rezultati prethodnih studija ukazuju na činjenicu da parcijalni gliceridi (mono-, digliceridi i njihove smeše) formiraju rigidne filmove oko površine čestica i na taj način doprinose njihovoj stabilnosti (Westesen i Siekmann, 1997). Međutim, čvrst lipid koji se koristio u ovoj studiji je vosak (cetil palmitat) koji se dobija katalitičkom esterifikacijom cetil alkohola i palmitinske kiseline i ne pokazuje nikakvu površinsku aktivnost. Dakle, za čvrste lipidne nanočestice koje se sastoje od čistog cetil palmitata, prvenstveno su surfaktanti odgovorni za fizičku stabilnost (Saupe i sar., 2005). Na osnovu toga se može zaključiti da su alkil poliglukozidi, saharoza palmitat i poligliceril-3 diizostearat odgovorni za dobru fizičku stabilnost ispitivanih formulacija.

U disperzijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih poligliceril-6 distearatom, poligliceril-6 izostearatom, saharoza stearatom i saharoza distearatom, posle šest meseci dijametar $d(v)$ 0,99 je bio u mikrometarskom opsega, ali je više od 95 % čestica (poligliceril-6 distearat i saharoza distearat) odnosno 90 % (za saharoza stearat i poligliceril-6 izostearat) još uvek imalo dijametar ispod 1 μm (slike 5.1.19. i 5.1.20.).



Slika 5.1.19. Raspodela veličine čestica prema volumenu kod čvrstih lipidnih nanočestica koje sadrže surfaktant saharoza distearat nakon izrade (—) i nakon 180 dana (—) i poligliceril-6 distearat nakon izrade (- -) i nakon 180 dana (- -)



Slika 5.1.20. Raspodela veličine čestica prema volumenu kod čvrstih lipidnih nanočestica koje sadrže surfaktant saharoza stearat nakon izrade (—) i nakon 180 dana (- -) i poligliceril-6 izostearat nakon izrade (—) i nakon 180 dana (- -)

Uočeni znaci nestabilnosti u ovim formulacijama mogu se povezati sa rezultatima DSC studije. Čvrste lipidne nanočestice stabilizovane ovim surfaktantima imaju veći stepen kristaliniteta (indeks kristalizacije) od ostalih uzoraka (tabela 5.1.4.). Freitas i Muller (1998, 1999) uočili su da se sa povećanjem indeksa kristalizacije čvrstih lipidnih nanočestica nestabilnost povećava u sistemu. zur Mühlen (1996) je zapazila da usled sudara čestica i delimične destrukcije filma surfaktanta, površine lipida ostaju „nezaštićene”. U tom slučaju dolazi do „premošćavanja” čestica (engl. *bridging*), i obrazovanja većih čestica, što vodi povećanju indeksa kristalizacije i nestabilnosti sistema. Analiza veličine čestica u formulacijama stabilizovanim saharoza polilauratom i polistearatom pokazala je sličan trend povećanja veličine čestica koji je bio praćen i sličnim vrednostima indeksa kristalizacije. Osim toga, saharoza polilaurat i saharoza polistearat sadrže više lanaca masnih kiselina u svojoj strukturi, pa se pretpostavlja da veći broj lanaca masnih kiselina u strukturi, ima negativan uticaj na efekat stabilizacije. Prvo, usled potencijalne interakcije sa lipidnim matriksom čestica, što može doprineti povećanju kristalizacije lipidnog matriksa, i drugo usled sternih smetnji. Veći broj lanaca masnih kiselina čini molekul surfaktanta hidrofobnijim, odnosno manje rastvornim u vodenoj fazi, što je u skladu sa HLB vrednosti surfaktanata koje su naveli proizvođači (tabela 4.1). Stoga je sposobnost ovih surfaktanata da stabilizuje lipidne nanočestice koje u osnovi spadaju u sistem u/v tipa manja u odnosu na surfaktante koji imaju višu HLB vrednost. Rezultati dobijeni nakon LD analize takođe mogu da navedu

na zaključak da neki surfaktanti stupaju u interakciju sa lipidnim matriksom čestica, što može doprineti povećanju kristalizacije lipidnog matriksa odnosno voditi ka nestabilnosti sistema (zur Mühlen, 1996).

5.1.4. Ispitivanje površinskog naelektrisanja čvrstih lipidnih nanočestica

Naelektrisanje čestica jedan je od parametara koji određuje fizičku stabilnost disperznih sistema. Poznato je da zeta potencijal približno karakteriše površinsko naelektrisanje čestica i jedan je od faktora koji određuje njihovu fizičku stabilnost. Ako sve čestice u disperziji imaju visok pozitivan ili visok negativan zeta potencijal, doći će do njihovog međusobnog odbijanja, što sprečava koalescenciju i povećava stabilnost sistema (Müller, 1996). Apsolutne vrednosti zeta potencijala veće od 30 mV uglavnom ukazuju na dobru fizičku stabilnost, dok vrednosti iznad 60 mV ukazuju na veoma dobru dugoročnu stabilnost. Za vrednost zeta potencijala oko -20 mV smatra se da obezbeđuje kratkoročnu stabilnost, dok vrednosti u rasponu od -5 do +5 mV ukazuju na agregaciju. Ovo se međutim, odnosi isključivo na surfaktante niske molekulske mase i sisteme u kojima je dominantan mehanizam stabilizacije elektrostatička stabilizacija. U sistemima u kojima su prisutni stabilizatori velike molekulske mase tj. u slučaju sterne stabilizacije vrednosti zeta potencijala oko ± 20 mV ili znatno niže mogu obezbediti zadovoljavajuću fizičku stabilnost (Muller, 1996; Ney, 1973; Riddick, 1968).

U ovom radu zeta potencijal je meren u vodi (za određivanje Stern-ovog potencijala) i u originalnom disperzionom medijumu (za potpuno razumevanje mehanizma stabilizacije). Za merenja u vodi disperzije čvrstih lipidnih nanočestica razblaživane su destilovanom vodom, čija električna provodljivost je prethodno podešena na 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ uz dodatak 0,9 % rastvora natrijum-hlorida. Polihidroksilni surfaktanti su nejonski sterni stabilizatori, te se na prvi pogled moglo očekivati da će vrednosti zeta potencijala biti niske. Međutim, u toku merenja originalna disperzija lipidnih nanočestica se razblažuje destilovanom vodom. Hidroksilne grupe u molekulu polihidroksilnih surfaktanata imaju visok afinitet za vodu, što može da dovede do desorpcije surfaktanta sa površine čestica. Osim toga, tokom razblaživanja uzorka sa vodom usled potencijalne desorpcije surfaktanta sa površine čestica, dolazi do pomeranja ravni smicanja ka površini čestice što za posledicu ima povećanje zeta potencijala. Stoga, se izmereni zeta

potencijal kod ovih sistema može dovesti u vezu ne samo sa surfaktantima upotrebljenim za stabilizaciju nego i sa površinskim potencijalom čestica. Iz tog razloga bilo je neophodno odrediti zeta potencijal u originalnom disperzionom medijumu, paralelno sa određivanjem u vodi. Razlike između zeta potencijala u vodi i u originalnom disperzionom medijumu mogu da se koriste za predviđanje mehanizma stabilizacije. Originalni disperzioni medijum dobijao se rastvaranjem surfaktanta u vodi u koncentraciji koja je identična koncentraciji surfaktanta u formulaciji. Poliglicerolski estri masnih kiselina, saharoza distearat, saharoza polilaurat i saharoza polistearat su surfaktanti koji se ne rastvaraju u vodi, te stoga za lipidne nanočestice stabilizovane ovim surfaktantima nije bilo moguće izmeriti zeta potencijal u originalnom disperzionom medijumu.

Za ostale surfaktante za koje je bilo moguće izmeriti zeta potencijal u originalnom disperzionom medijumu vrednosti su bile niže nego u vodi. Smanjenje zeta potencijala ukazuje na činjenicu da su surfaktanti u većoj meri adsorbovani na površinu čestice u originalnom medijumu nego u vodi. Deblji sloj surfaktanta na površini čestice pomera ravan smicanja dalje od čestica, što doprinosi smanjenju zeta potencijala.

Razlike u vrednosti zeta potencijala u originalnom disperzionom medijumu u odnosu na vodu najviše su izražene kod disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih alkil poliglukozidima, odnosno C8-10 alkil poliglukozidom (25 mV), a najmanje u disperzijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih saharoza stearatom (~8 mV).

U nastavku studije zeta potencijal čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih različitim surfaktantima se poredio sa električnom provodljivosti vode i disperzionog medijuma i rezultati su prikazani u tabeli 5.1.2. Analiza dobijenih rezultata pokazala je da promene u električnoj provodljivosti disperzionog medijuma prate promene u zeta potencijalu. Naime, najveće promene u električnoj provodljivosti između originalnog disperzionog medijuma i vode dobijene su za čestice stabilizovane alkil poliglukozidima. U ovom slučaju sterna efekat imao je veliki doprinos u stabilizaciji lipidnih nanočestica. Nasuprot tome, veoma male promene u električnoj provodljivosti u originalnom disperzionom medijumu u odnosu na vodu dobijene su za lipidne nanočestice stabilizovane saharoza stearatom. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa rezultatima u prethodnom segmentu istraživanja, gde su zabeležene male razlike u vrednostima zeta potencijala u vodi i u originalnom disperzionom medijumu.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da se stabilizacija lipidnih nanočestica polihidroksilnim surfaktantima može opisati kao kombinacija elektrostatičkog i sternog efekta koji su uzajamno komplementarni. U skladu sa literaturnim podacima za disperzije stabilizovane elektrostatičkim i sternim mehanizmom stabilizacije zeta potencijal od oko $|-20|$ mV može biti dovoljan za očuvanje fizičke stabilnosti disperzija (Jacobs i Müller, 2002). Na osnovu izmerenih vrednosti zeta potencijala koje su za sve formulacije u vodi bile iznad $|30|$ mV, a u originalnom disperzionom medijumu između $|-23|$ mV i $|-35|$ mV (tabela 5.1.2.) može se zaključiti da polihidroksilni surfaktanti u koncentraciji od 1 % (m/m) mogu obezbediti zadovoljavajuću fizičku stabilnost čestica.

Tabela 5.1.2. Zeta (ζ) potencijal (mV) i električna provodljivost (σ) ($\mu\text{S/cm}$) čvrstih lipidnih nanočestica nakon razblaživanja sa različitim medijumima (n=30, srednja vrednost $\pm$ SD)

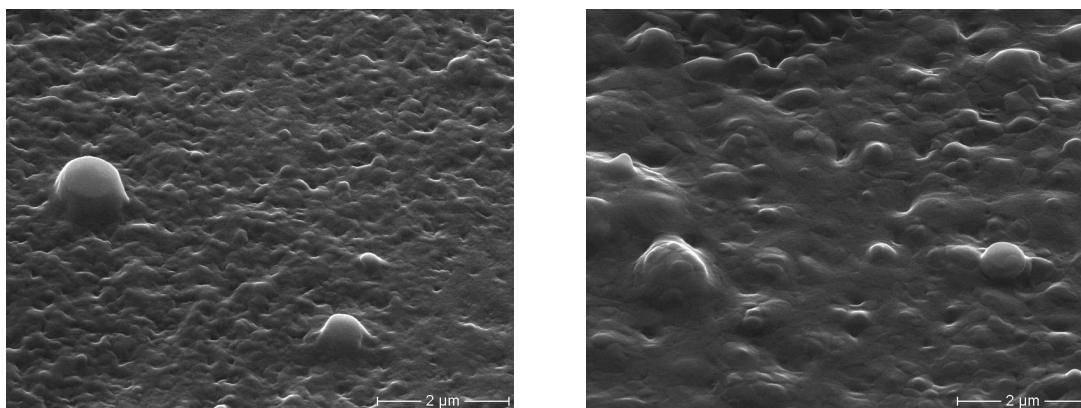
Uzorak	ζ potencijal $\pm$ SD		$\sigma \pm$ SD	
	destilovana voda	originalni medijum	destilovana voda	originalni medijum
SLN S1	$-39,3 \pm 1,3$	$-23,5 \pm 0,5$	57 ± 2	406 ± 9
SLN S2	$-41,6 \pm 1,8$	$-33,1 \pm 0,4$	56 ± 1	107 ± 1
SLN S3	$-38,6 \pm 1,6$	*	54 ± 0	*
SLN S4	$-40,9 \pm 0,2$	*	55 ± 1	*
SLN S5	$-50,1 \pm 1,8$	*	57 ± 1	*
SLN P1	$-31,5 \pm 1,3$	*	54 ± 1	*
SLN P2	$-44,4 \pm 0,3$	*	54 ± 0	*
SLN P3	$-34,2 \pm 0,8$	*	53 ± 0	*
SLN A1	$-52,4 \pm 0,9$	$-27,4 \pm 0,8$	58 ± 2	529 ± 3
SLN A2	$-47,5 \pm 1,7$	$-35,3 \pm 0,8$	56 ± 0	317 ± 4
SLN A3	$-52,2 \pm 0,9$	$-30,1 \pm 0,3$	59 ± 1	469 ± 1
SLN A4	$-46,3 \pm 0,6$	$-28,5 \pm 1,1$	51 ± 0	458 ± 5

* Surfactanti se ne rastvaraju u vodi i stoga se zeta potencijal u originalnom medijumu nije mogao izmeriti.

5.1.5. Ispitivanje morfologije i površinskih karakteristika čvrstih lipidnih nanočestica

Pregledom mikrofotografija lipidnih nanočestica neposredno nakon izrade može se zaključiti da su sve izrađene čestice imale blago deformisan sferičan oblik (slika 5.1.21.). Veličina većine čestica bila je manja od 1 μm , ali je uočen izvestan broj čestica čija veličina je bila iznad 1 μm . Ovaj fenomen bi se mogao pripisati agregaciji čestica do koje je verovatno došlo tokom pripreme uzoraka za analizu. Detaljnim uvidom u ove agregate uočeno je da se oni sastoje od manjih čestica čija veličine nije prelazila 1 μm .

Poznato je da se tehnikom homogenizacije pod visokim pritiskom mogu dobiti lipidne nanočestice različitog oblika. U poređenju sa nesfernim česticama za stabilizaciju sfernih čestica su potrebne niže koncentracije surfaktanata. Osim toga, Bunjes i Siekmann (2006) i Teeranachaideekul (2008) u svojim radovima navode da u poređenju sa nesfernim česticama, sferne čestice obezbeđuju bolju zaštitu inkorporirane lekovite supstance, kao i veću mogućnost kontrolisanja brzine oslobađanja leka iz čestice. Isti autori ovaj fenomen objašnjavaju činjenicom da je kontakt lekovite supstance sa okolnim medijumom kod sfernih čestica manji, kao i da je difuzioni put koji prelazi lekovita supstanca kod sfernih čestica najduži.

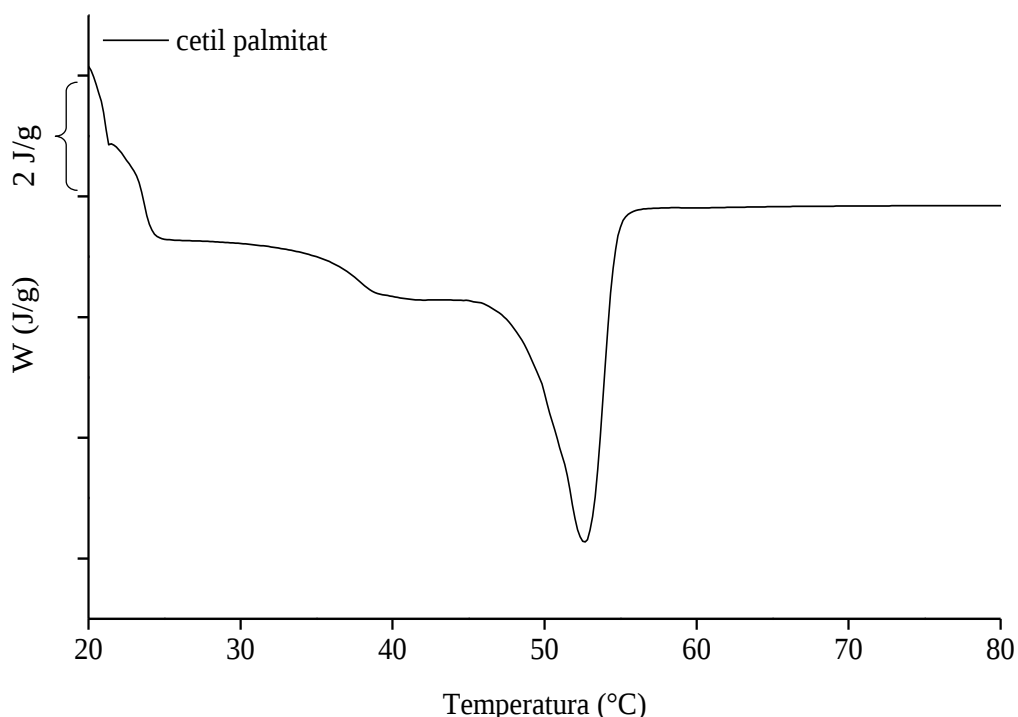


Slika 5.1.21. Skenirajuće elektronske mikrofotografije disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih saharoza stearatom (levo) i C8-10 alkil poliglukozidnim surfaktantom (desno)

5.1.6. Karakterizacija lipida i surfaktanata u *bulk* stanju

Razvoj formulacija lipidnih nanočestica podrazumeva fizičku stabilnost i u pogledu veličine čestica i u pogledu strukture lipidnog matriksa. S tim u vezi, u ovom radu su se promene u fizičkoj stabilnosti disperzija dovodile u vezu sa kristalnom strukturom lipidnog matriksa nanočestica. Analiza strukture lipidnog matriksa nanočestica izvodila se termalnom tehnikom i komparirala se sa strukturom čvrstog lipida u *bulk* stanju. Čvrst lipid u *bulk* stanju bio je podvrgnut istim temperaturnim promenama kao i lipid u čvrstim lipidnim nanočesticama u toku pripreme formulacija. Za analizu lipidnog matriksa nanočestica i lipida u *bulk* stanju temperaturni maksimumi pikova, onset temperatura i entalpija topljenja, preko koje je posredno izračunat indeks rekristalizacije uzeti su kao sveobuhvatni parametri za poređenje uzoraka.

DSC termogram cetil palmitata u *bulk* stanju nakon izlaganja temperaturi od 75 °C u trajanju od 1 h prikazan je na slici 5.1.22. Pikovi uočeni na 38,92 °C i 52,44 °C odgovaraju α i β modifikaciji lipida. Ovaj rezultat je u skladu sa ranije objavljenim rezultatom (Saupe i sar., 2005).



Slika 5.1.22. DSC termogram cetil palmitata (Cutina® CP) u *bulk* stanju (podatak iz tabele 5.1.3.)

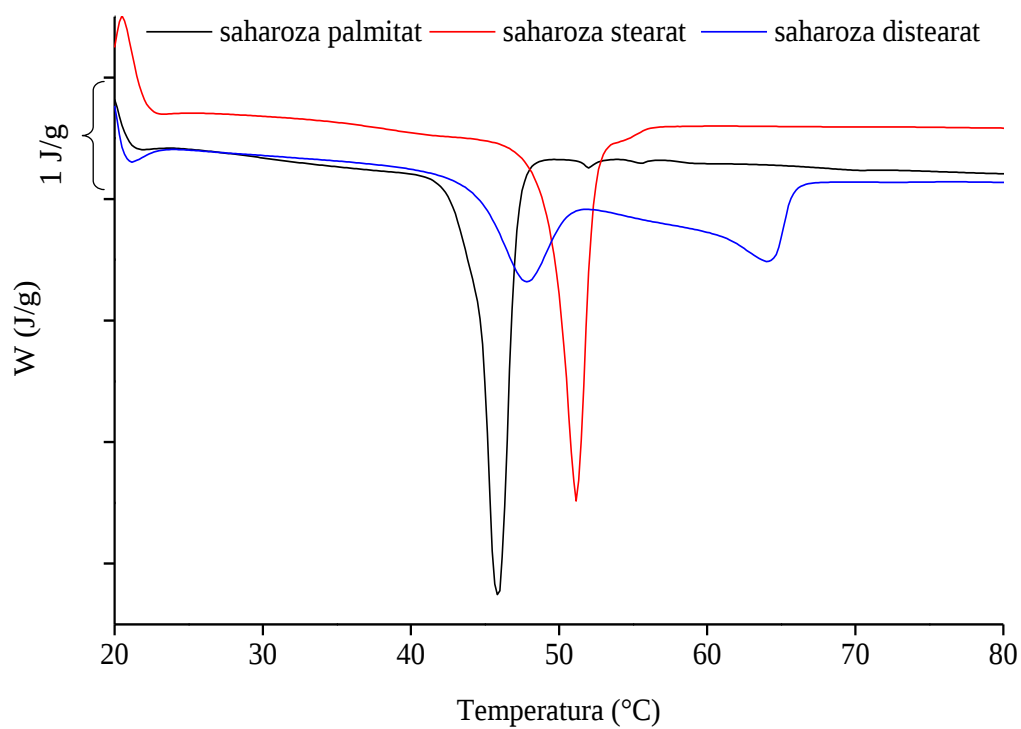
DSC termalno ponašanje čistih surfaktanata prikazano je u tabeli 5.1.3. i na slikama

5.1.23. i 5.1.24. Saharoza palmitat, saharoza stearat, saharoza polistearat i poligliceril-6 distearat imaju izražene pikove, koji odgovaraju tranziciji tj. topljenju i prelasku surfaktanata iz čvrstog stanja u izotropnu tečnost (rastop). Sličan trend uočava se i kod saharoza distearata, s tim što je pik podeljen u dva manja.

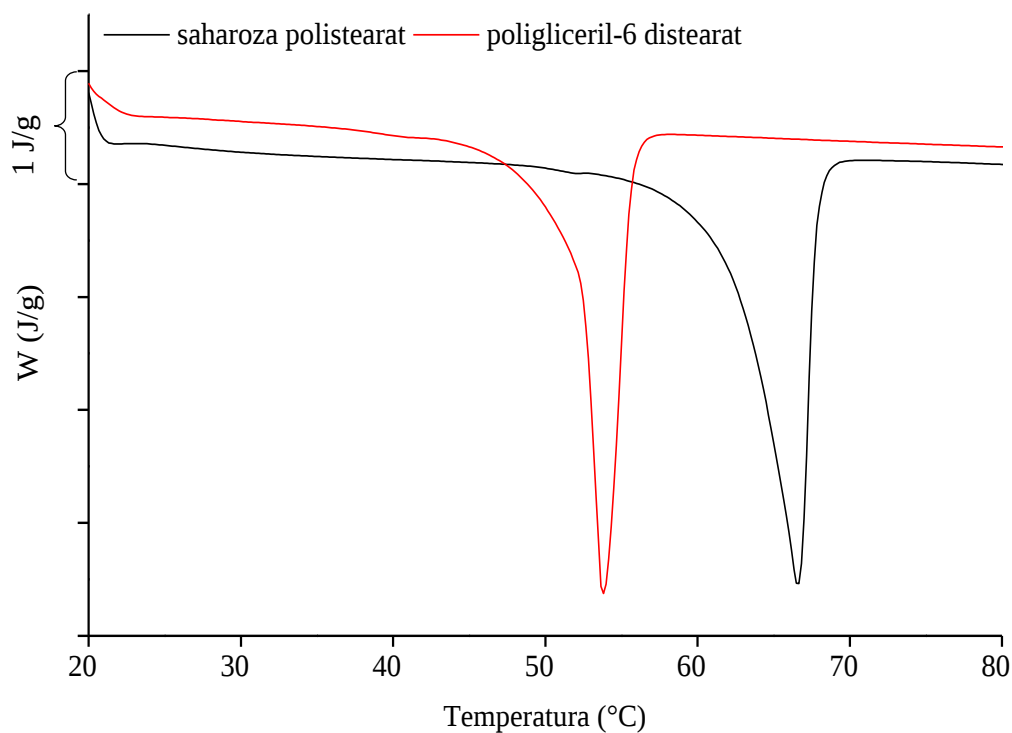
Poligliceril-6 izostearat, poligliceril-3 diizostearat, C8-10 alkil poliglukozid, C8-14 alkil poliglukozid, C10-16 alkil poliglukozid i C12-16 alkil poliglukozid su surfaktanti koji su u tečnom agregatnom stanju na sobnoj temperaturi, tako da se u ovom delu radu nije pratilo njihovo termalno ponašanje.

Tabela 5.1.3. DSC parametri (onset temperatura (t_o (°C)), temperatura topljenja (t_t (°C)) i ukupna entalpija topljenja (ΔH (J/g)) cetil palmitata jedan sat nakon temperiranja na 75 °C i polihidroksilnih surfaktanata u *bulk* stanju

lipid/surfaktant (hemijski naziv)	lipid/surfaktant (komerc. naziv)	t_o (°C)	t_t (°C)	ΔH (J/g)
cetil palmitat	Cutina [®] CP	47,89	52,44	220,46
saharoza palmitat	Sisterna [®] PS 750-C	44,33	46,07	45,23
saharoza stearat	Surfhope [®] C-1815	49,20	51,28	39,93
saharoza distearat	Surfhope [®] C-1805	44,58	47,91	16,13
		59,98	64,24	10,79
saharoza polilaurat	Surfhope [®] C-1201	19,95	21,04	32,62
saharoza polistearat	Surfhope [®] C-1801	62,23	66,94	87,36
poligliceril- 6 distearat	Plurol Stearique [®] WL1009	51,82	53,50	72,00



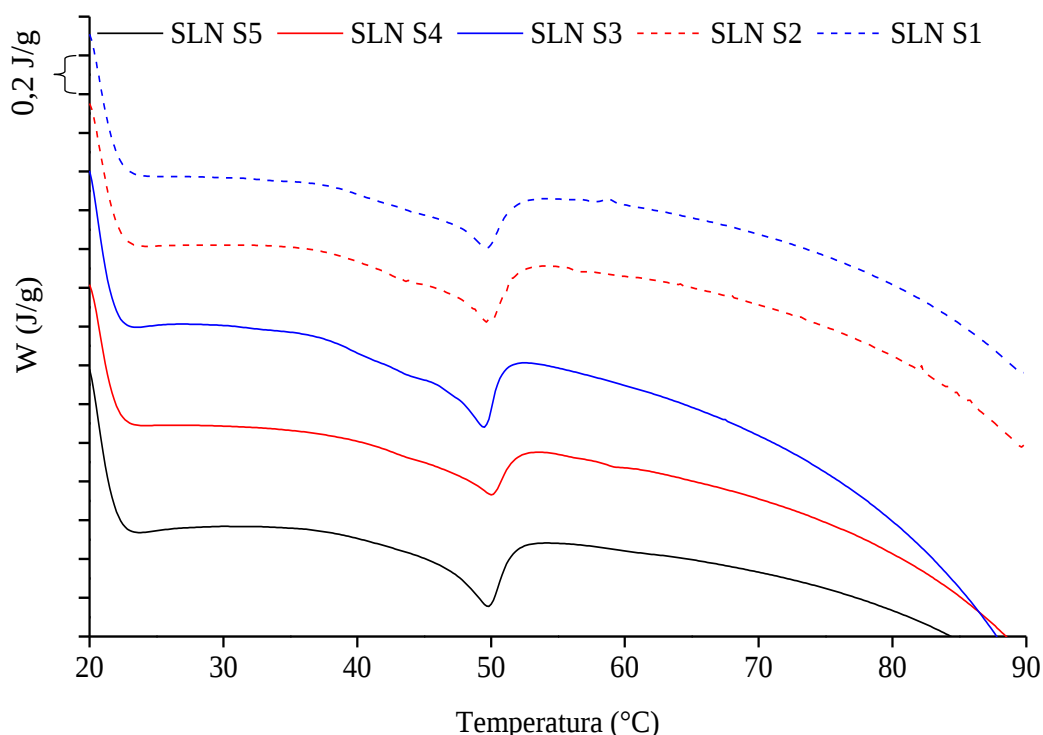
Slika 5.1.23. DSC termogrami saharoza palmitata, saharoza stearata i saharoza distearat u *bulk* stanju (podatak iz tabele 5.1.3.)



Slika 5.1.24. DSC termogrami saharoza polistearata i poligliceril-6 distearata u *bulk* stanju (podatak iz tabele 5.1.3.)

5.1.7. Karakterizacija strukture čvrstih lipidnih nanočestica

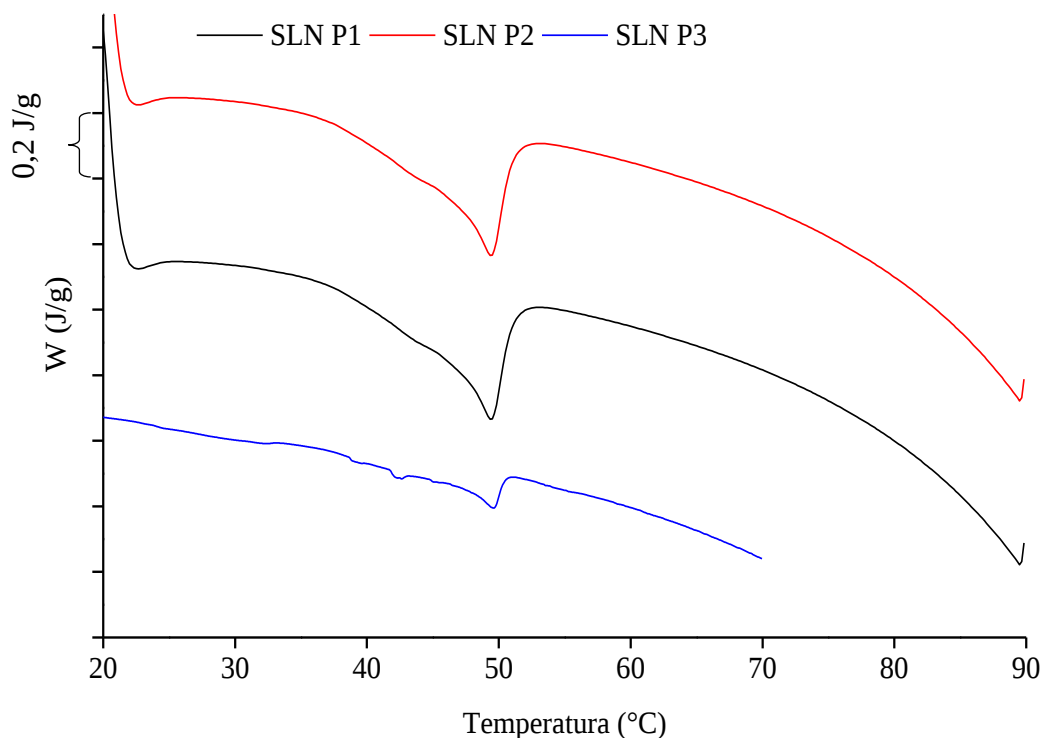
DSC termogrami lipidnih nanočestica prikazani su na slikama 5.1.25. - 5.1.27. Rezultati DSC analize potvrdili su da je došlo do delimične rekristalizacije lipida u nanočesticama (tabela 5.1.4.). Za razliku od lipida u *bulk* stanju nakon termalne analize lipida u nanočesticama, uočeno je prisustvo samo jednog pika i fazni prelazi su bili širi. Ovakav rezultat se objašnjava malom veličinom lipidnih nanočestica i smanjenjem kristalne strukture lipida u nanočestici (Bunjies i sar., 1996).



Slika 5.1.25. DSC termogrami čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih estrima saharoze, koji se razlikuju po stepenu esterifikacije i vrsti masne kiseline koja reaguje sa saharozom. Merenja su izvedena tri meseca nakon pripreme disperzija i čuvanja na 25 ± 2 °C (krive su prikazane duž ordinate zbog bolje preglednosti)

U svim uzorcima čvrstih lipidnih nanočestica potvrđeno je prisustvo čvrste faze i temperatura topljenja čvrste faze bila je iznad temperature tela. Ovaj rezultat ukazuje na činjenicu da će čestice zadržati čvrsto stanje tokom skladištenja na sobnoj temperaturi, ali i pri fiziološkoj temperaturi (tj. posle primene na kožu). Rezultati DSC studije (tabela 5.1.4.) ukazali su na činjenicu da je u svim uzorcima došlo do smanjenja onset temperature i temperature topljenja u poređenju sa lipidom u *bulk* stanju. Promene u ovim parametrima objašnjavaju se mnogo većim odnosom površina/zapremina u

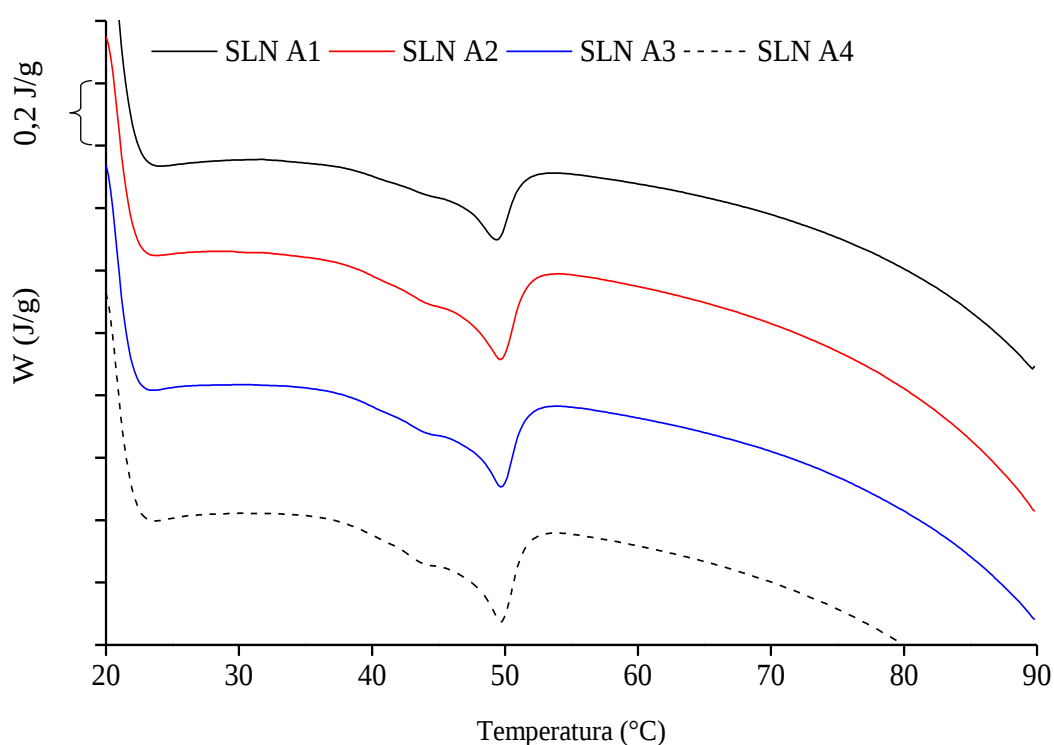
lipidnim nanočesticama u poređenju sa lipidom u *bulk* stanju. Ovaj fenomen bliže je objašnjen *Gibs-Thomson*-ovom jednačinom. Pored toga, nepotpuna kristalizacija lipida u nanočesticama može se objasniti i potencijalnom interakcijom surfaktanta sa lipidnim matriksom nanočestica. Bunjes i Siekmann (2006) navode da usled površinskog napona na površini čestica, dolazi do pomeranja temperature topljenja i onset temperature lipida ka nižim vrednostima.



Slika 5.1.26. DSC termogrammi čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih poliglicerolskim estrima masnih kiselina, koji se razlikuju po stepenu polimerizacije poliglicerolskog ostatka i vrsti masnih kiselina koje reaguju sa poliglicerolima. Merenja su izvedena tri meseca nakon pripreme disperzija i čuvanja na 25 ± 2 °C (krive su prikazane duž ordinate zbog bolje preglednosti)

U nekoliko prethodnih studija pratio se uticaj surfaktanata na temperaturu topljenja i kristalizaciono ponašanje lipidnih nanočestica (Bunjes i sar., 2003; Han i sar., 2008; Siekmann i Westesen, 1994c). Na kristalizaciju čestica mogu uticati različiti faktori kao što su inkorporirana aktivna supstanca, veličina čestica, vrsta i tip upotrebljenog surfaktanta i lipida, interakcija surfaktant-lipid, temperatura čuvanja uzoraka, fizički tretman (npr. homogenizacija, liofilizacija, sušenje raspršivanjem) (Mehnert i Mäder, 2012; Souto, 2005). Prethodna istraživanja sa nanočesticama sastavljenim od gliceril tripalmitata pokazala su da su „rigidni” lanci surfaktanata neophodni da bi došlo do

kristalizacije gliceril tripalmitata (Bunjes i sar., 2002). Smatra se takođe, da je uticaj surfaktanta na kristalizaciju lipidnih nanočestica naročito važan u formulacijama u kojima su lipidne nanočestice sastavljene od lipida koji imaju nisku tačku topljenja. Pomenuta vrsta nanonosača može biti interesantna u formulacijama koje sadrže osetljive, termolabilne supstance (peptidi i proteini), pri čijoj formulaciji se ne mogu koristiti lipidi koji poseduju visoke temperature topljenja. Pored toga, studije o uticaju surfaktanta na proces kristalizacije i kristalnu strukturu matriksa nanočestica mogu pružiti uvid u interakciju između dipsergovanog lipida i surfaktanta (Souto, 2005).



Slika 5.1.27. DSC termogrami čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih alkil poliglukozidima, koji se razlikuju u dužini alkil lanca masnih kiselina. Merenja su izvedena tri meseca nakon pripreme disperzija i čuvanja na 25 ± 2 °C (krive su prikazane duž ordinate zbog bolje preglednosti)

Rezultati naše studije ukazuju na činjenicu da surfaktanti nisu imali uticaja na temperaturu topljenja, preciznije temperature topljenja čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih različitim surfaktantima bile su u intervalu od 48,79 - 49,18 °C (tabela 5.1.4. i slika 5.1.29). Sa druge strane, surfaktanti su imali određeni uticaj na indeks kristalizacije lipidnih nanočestica. Naime, RI čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih alkil poliglukozidima, saharoza palmitatom i poligliceril-6 izostearatom iznosio je 32,2 %, 41,73 % i 39,64 %, redom (tabela 5.1.4.). Nakon istog vremenskog intervala pod

identičnim uslovima skladištenja RI lipidnih nanočestica stabilizovanih saharoza distearatom, saharoza stearatom, poligliceril-6 distearatom i saharoza polistearatom bio je viši i iznosio je 54,66 %, 52,84 %, 60,33 % i 47,35 % redom. Razlog različitim vrednostima RI može se naći u razlikama u hemijskoj strukturi surfaktanata. Saharoza distearat, saharoza stearat, poligliceril-6 distearat i saharoza polilaurat sadrže C18 masne kiseline u svojoj strukturi. Temperatura topljenja ovih surfaktanata u *bulk* stanju je viša od temperature topljenja ostalih surfaktanata (tabela 5.1.4.). Rezultat toga je da lipidne nanočestice stabilizovane surfaktantima koji imaju više tačke topljenja poseduju više vrednosti RI.

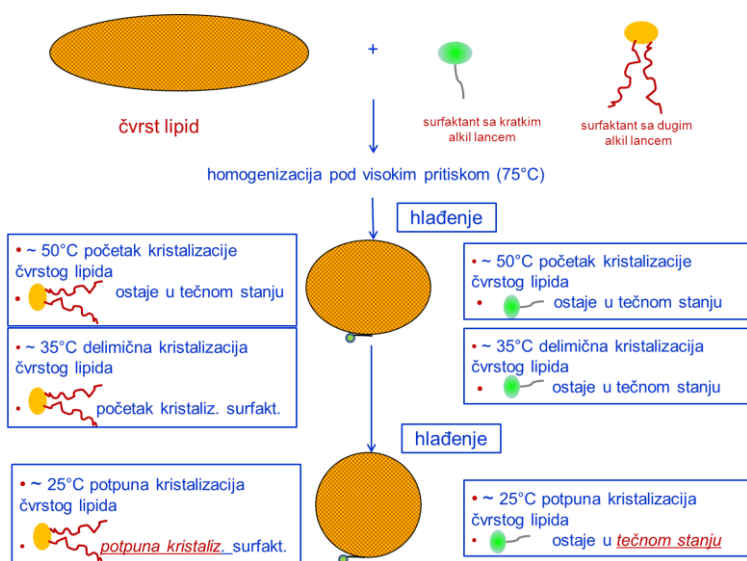
Tabela 5.1.4. DSC parametri (onset temperatura (t_o (°C)), temperatura topljenja (t_t (°C)), ukupna entalpija topljenja (ΔH (J/g) i indeks rekristalizacije (RI)(%)) čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima nakon tri meseca čuvanja na 25 ± 2 °C (temperaturni opseg 20 - 90 °C, brzina skeniranja 10 K/min)

Uzorak	Surfaktant	t_o (°C)	t_t (°C)	ΔH (J/g)	RI (%)
SLN S1	saharoza palmitat	44,75	49,03	8,74	39,64
SLN S2	saharoza stearat	44,28	49,18	12,05	54,66
SLN S3	saharoza distearat	44,49	49,04	11,65	52,84
SLN S4	saharoza polilaurat	43,71	49,39	8,44	38,28
SLN S5	saharoza polistearat	44,74	49,11	10,44	47,35
SLN P1	poligliceril-6 distearat	43,80	48,80	13,30	60,33
SLN P2	poligliceril-6 izostearat	44,98	49,11	12,20	55,34
SLN P3	poligliceril-3 diizostearat	44,75	49,03	5,17	23,45
SLN A1	C8-10 alkil poliglukozid	44,60	48,79	7,12	32,30
SLN A2	C8-14 alkil poliglukozid	44,50	49,20	8,87	40,23
SLN A3	C10-16 alkil poliglukozid	45,01	49,15	9,33	42,32
SLN A4	C12-16 alkil poliglukozid	45,00	49,15	10,23	46,40

Catanoiu i sar. (2011) navode da u emulzionim sistemima, procesom difuzije surfaktanti mogu da se raspodele iz vodene (uljane) faza kroz međufazu u uljanu (vodu) fazu u

zavisnosti od rastvorljivosti surfaktanta u jednoj od te dve faze, dok se ne postigne ravnotežno stanje. Na osnovu literaturnih podataka zavisno od HLB vrednosti molekuli surfaktanata se različito raspodeljuju između vodene faze, uljane faze i međufaze. Slična situacija se može očekivati i u disperzijama lipidnih nanočestica. Ako se surfaktanti ne rastvaraju u vodi, teorijski određeni deo molekula surfaktanta može biti lociran u lipidnoj fazi (matriksu čestica). Nasuprot tome, surfaktanti koji se rastvaraju u vodi će biti lokalizovani u vodenoj fazi (u obliku monomera ili micela). Prema tome, u ovom slučaju, neće biti interakcije između surfaktanta i lipidnog matriksa čestica, te se stoga ne očekuje da će surfaktanti imati uticaj na kristalinitet čestica.

Kao što je prethodno navedeno polihidroksilni surfaktanati koji su se koristili u ovom radu se razlikuju u hemijskoj strukturi. Alkil poliglukozidi imaju jedan lanac masnih kiselina koji je kratak (C8-10 i C8-14) ili srednje dužine (C10-16 i C12-16) vezan za hidrofilni deo sastavljen od molekula glukoze koja se prostire u vodenu fazu. Rezultat toga je, da ovi surfaktanti verovatno formiraju mobilan i „labav” sloj oko čestica. Sa druge strane, surfaktanti koji mogu da povećavaju kristalinitet čestica (poligliceril-6 distearat, saharoza distearat, saharoza stearat i saharoza polistearat) sadrže duge alkil lance masnih kiselina u svojoj strukturi. Zbog sličnosti u strukturi surfaktanata sa strukturom čvrstog lipida (cetil palmitat), teorijski ovi surfaktanti mogu biti uključeni u matriks nanočestica i u određenoj meri povećati kristalinitet čestica (slika 5.1.28.).



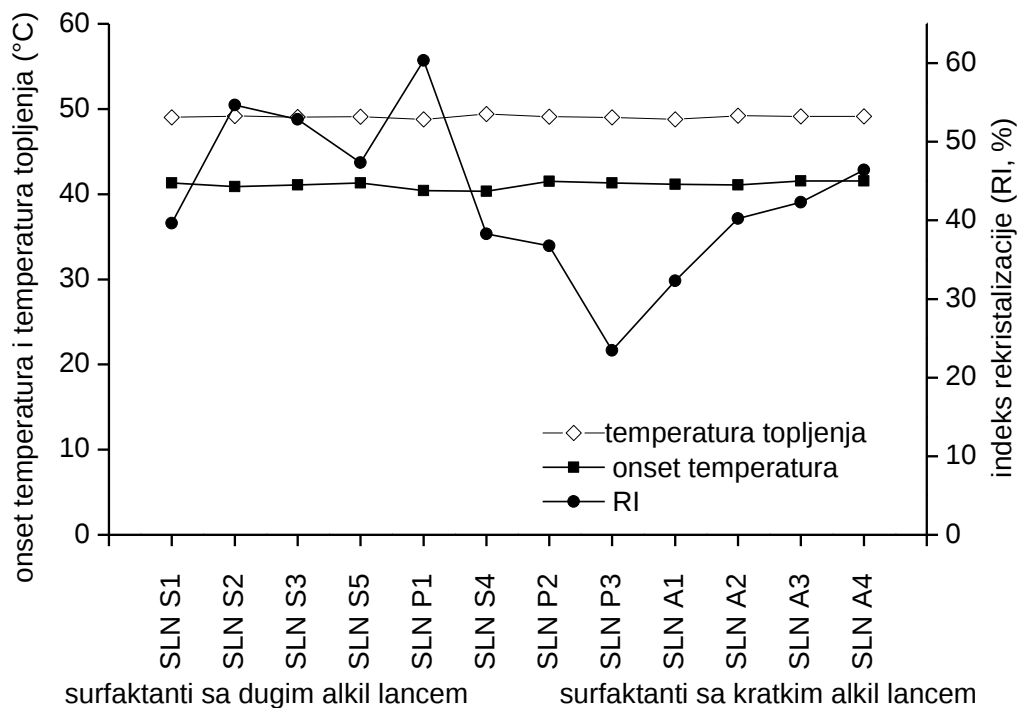
Slika 5.1.28. Predloženi mehanizam uticaja hemijske strukture surfaktanta na kristalnu strukturu lipidnih nanočestica

Kao rezultat ovih pretpostavki lipidne nanočestice stabilizovane alkil poliglukozidima, imaju niži RI od čestica stabilizovanih poligliceril-6 distearatom, saharoza distearatom, saharoza stearatom i saharoza polistearatom (slika 5.1.29.). U slučaju saharoza palmitata može se pretpostaviti da postoji drugačiji mehanizam interakcije između surfaktanta i lipida. Saharoza palmitat je surfaktant koji je u čvrstom agregatnom stanju na sobnoj temperaturi (tabela 4.1). Međutim, RI lipidnih nanočestica stabilizovanih ovim surfaktantom bio je veoma sličan RI lipidnih nanočestica stabilizovanih alkil poliglukozidima, poligliceril-6 izostearatom i poligliceril-3 diizostearatom, odnosno saharoza palmitat nije uticao na RI lipidnih nanočestica. Razlog za to može biti dužina alkil lanca masnih kiselina u ovom stabilizatoru, koja je slična dužini lanca masnih kiselina lipidnog matriksa nanočestica (tj. cetil palmitat). Pretpostavlja se da se ovaj surfaktant samo inkorporira u lipidni matriks nanočestice, ali zbog sličnosti u strukturi sa lipidom ne utiče na kristalinitet čestica. Teorijski, ovaj tip stabilizatora bi trebalo da omogućiti obrazovanje najstabilnijih čestica. Nasuprot alkil poliglukozidima, poligliceril-6 izostearatu i poligliceril-3 diizostearatu, saharoza palmitat je čvrsto vezan za lipidni matriks čestica, što doprinosi fizičkoj stabilnosti. S druge strane, ovaj stabilizator ne utiče na kristalinitet čestica, što može dovesti do fizičke nestabilnosti (Freitas i Müller, 1998, 1999).

PCS podaci dobijeni tokom šest meseci čuvanja čestica potvrđuju ovu teoriju. Praktično u formulacijama lipidnih nanočestica stabilizovanih saharoza palmitatom nije došlo do povećanja PCS-dijametara i PI, dok je u formulacijama stabilizovanim alkil poliglukozidima došlo do blagog porasta od oko 20 nm u veličini čestica nakon šest meseci. Do povećanja u veličini čestica nakon šest meseci došlo je i kod drugih uzoraka stabilizovanih estrima saharoze i poliglicerolskim estrima masnih kiselina.

Međutim, podaci dobijeni nakon merenja na LD ukazuju na činjenicu da je do najmanje agregacije došlo u disperzijama lipidnih nanočestica stabilizovanih alkil poliglukozidima. Ovi surfaktanti poseduju najviše HLB vrednosti, najniži kontaktni ugao na lipidnom filmu i najviše vrednosti zeta potencijala i kao što je gore navedeno, ne očekuje se da će ovi surfaktanti uticati na kristalinitet lipidnog matriksa čestica. Međutim, takođe je pokazano da je saharoza distearat pogodan kao stabilizator čvrstih lipidnih nanočestica, zbog toga što su samo male promene u PCS dijametru i PI i samo ograničena agregacija uočeni tokom čuvanja uzoraka. Ovaj stabilizator poseduje nisku

HLB vrednost i relativno visok kontaktni ugao na lipidnom matriksu i utvrđeno je da on ne utiče na kristalizaciju lipidnog matriksa čestica.



Slika 5.1.29. Pregled uticaja polihidroksilnih surfaktanata na kristalizaciono ponašanje čvrstih lipidnih nanočestica tri meseca nakon pripreme disperzija i čuvanja na 25 ± 2 °C

Na osnovu svega prethodno navedenog može se zaključiti da parametri za koje se pretpostavilo u ovom radu da mogu doprineti fizičkoj stabilnosti čestica, kao što su visoka HLB vrednost, nizak kontaktni ugao, visoke vrednosti zeta potencijala i odsustvo interakcija između lipidnog matriksa čestica i surfaktanta mogu biti korisni za predviđanje funkcionalnosti surfaktanta za obrazovanje disperzija lipidnih nanočestica zadovoljavajuće fizičke stabilnosti. Međutim, sa druge strane kao što je pokazano u ovoj studiji, u slučaju nekih surfaktanata (saharoza distearat), ovi parametri nisu dovoljno pouzdani da bi se surfaktant isključio iz studije tokom razvoja formulacije čvrstih lipidnih nanočestica.

5.2. Rezultati i diskusija druge faze istraživanja

5.2.1. Karakterizacija lipida i surfaktanata u *bulk* stanju

U cilju ispitivanja kristalizacionog ponašanja nehomogenizovanog lipidnog matriksa nanočestica, izvedena je termalna analiza kristalizacionog ponašanja čvrstog lipida (cetil palmitata) u *bulk* stanju pre i posle dodatka tečnog lipida (trigliceridi srednje dužine lanca). Preciznije, cilj ovog dela studije bio je da se dobiju dodatne informacije o mogućnosti inkorporiranju različitog udela tečnog lipida u čvrst lipid, posredno preko praćenja promena u temperaturi topljenja i kristalnoj strukturi čvrstog lipida. Termoanalitički parametri koji su izvedeni iz DSC studije prikazani su u tabeli 5.2.1.

Na osnovu dobijenih rezultata, odnosno DSC termograma čvrstog lipida i smeše čvrstog i tečnog lipida uočeno je da čvrst lipid poseduje dva polimorfna oblika čije temperature topljenja iznose 38,94 °C (manji pik) i 52,42 °C (veći pik) (slika 5.2.1). Na osnovu literaturnih podataka izvodi se zaključak da prvi pik sa nižom temperaturom topljenja odgovara α modifikaciji i predstavlja termodinamički nestabilnu modifikaciju čvrstog lipida, dok drugi pik odgovara β modifikaciji i predstavlja termodinamički stabilnu modifikaciju čvrstog lipida. Takođe, rezultati termalne analize ukazali su na činjenicu da se cetil palmitat dobro meša sa trigliceridima srednje dužine lanca, u odnosu koji je upotrebljen za pripremu lipidnog matriksa nanostrukturiranih lipidnih nosača, te se stoga očekuje da će dobijeni matriks biti homogen. Takođe, rezultati DSC analize ukazuju da pri udelu tečnog lipida iznad 20 % (m/m) pik koji potiče od α modifikacije nestaje, a širina pika odnosno razlika između temperature topljenja i onset temperature se povećava. Istovremeno sa proširivanjem pika, visina pika (i površina ispod krive) se smanjuju, odnosno kristalna struktura lipida se zajedno sa tim smanjuje. Na osnovu dobijenih rezultata pretpostavilo se da je tečni lipid molekularno dispergovan u čvrstom lipidu, bar pri nižoj koncentraciji, što je promenilo strukturu lipidnog matriksa od uređene ka neuređenoj. Sniženje temperature topljenja se javlja npr. kada se jedna komponenta rastvara u drugoj komponenti. U okviru naše studije uočeno je sniženje onset temperature i temperature topljenja sa povećanjem udela tečnog lipida unutar lipidne smeše. Onset temperatura i temperatura topljenja se smanjuju čak i pri udelu tečnog lipida od 60 % (m/m). Pri udelu tečnog lipida od 20 % (m/m) razlika između temperature topljenja i onset temperature iznosi 8,82 °C i povećava se do 11,48 °C kada

smeša sadrži 60 % (m/m) tečnog lipida (ulja). Prema tome, za dati koncentracioni opseg tečnog lipida (20 - 60 % (m/m)) sniženje onset temperature nije linearno. Najveće sniženje onset temperature uočeno je pri udelu tečnog lipida od 20 % (m/m) i 30 % (m/m) unutar lipidnog matriksa. Sa daljim povećanjem udela tečnog lipida sniženje u onset temperaturi je slabije izraženo. Širenje pika uslovljeno je kompleksnijom i neuređenom strukturom kristalne rešetke, dok slabije izraženo smanjenje u onset temperaturi pri višem sadržaju tečnog lipida (ulja) unutar lipidnog matriksa ukazuje da je postignut najveći stepen mešanja tečnog i čvrstog lipida. Promene u strukturi kristalne rešetke, tj. prelazak iz uređenog u neuređeno stanje i rušenje uređene kristalne strukture lipidnog matriksa dodatno su potvrđeni smanjenjem entalpije topljenja smeše sa povećanjem udela tečnog lipida u smeši čvrst lipid/tečan lipid. Smanjenje entalpije topljenja od 220,46 - 55,80 J/g pri udelu tečnog lipida od 50 % (m/m) u smeši praćeno je smanjenjem indeksa kristalizacije od 100 - 25,3 %. Takođe, interesantno je da se indeks kristalizacije ne smanjuje pri daljem povećanju udela tečnog lipida u lipidnom matriksu od 50 - 60 % (m/m), tj. indeks kristalizacije ostaje 25,3 %. Ova činjenica je još jedan od pokazatelja da je postignuta maksimalna rastvorljivost tečnog lipida u smeši sa čvrstim lipidom.

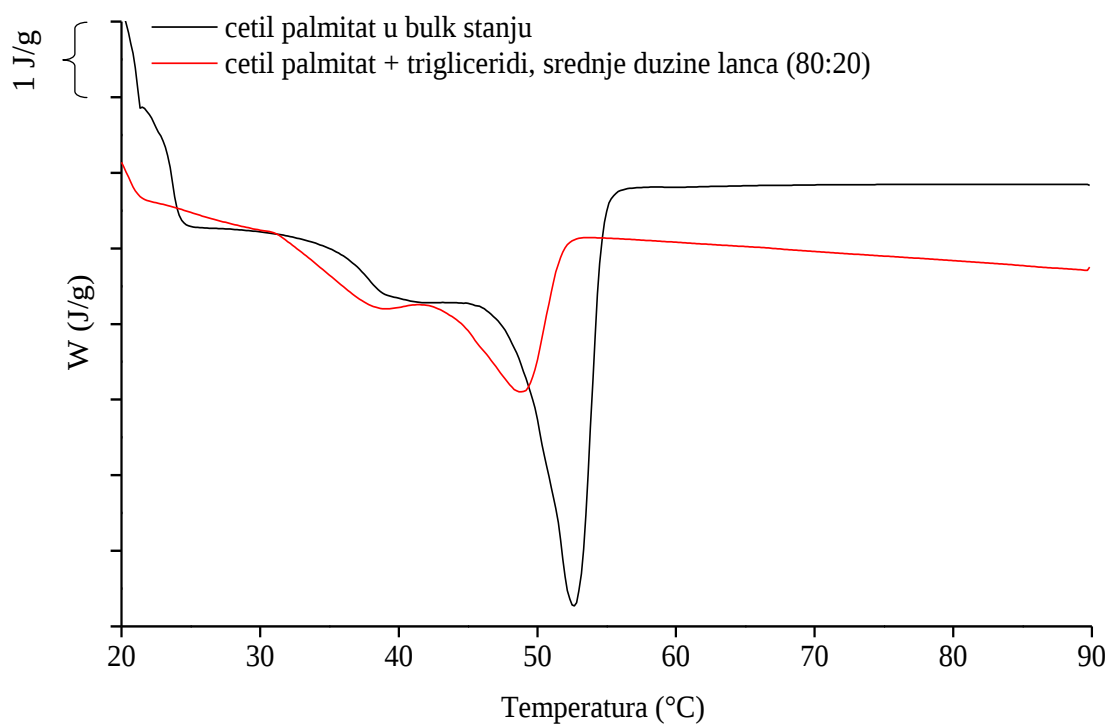
Tabela 5.2.1. Parametri DSC analize (onset temperatura (t_o (°C)), temperatura topljenja (t_t (°C)), ukupna entalpija topljenja (ΔH (J/g)) temperiranog čvrstog lipida u *bulk* stanju i smeše čvrstog lipida i rastućeg udela tečnog lipida (temperaturni opseg 20 - 90 °C, brzina skeniranja 10 K/min).

Lipid	t_o [°C]	t_t [°C]	ΔH [J/g]
čvrst lipid (<i>bulk</i> lipid) (drugi pik)	47,89	52,44	220,46
čvrst lipid + tečni lipid (80:20)	39,88	48,70	124,29
čvrst lipid + tečni lipid (70:30)	38,07	47,72	91,11
čvrst lipid + tečni lipid (60:40)	36,68	46,90	69,87
čvrst lipid + tečni lipid (50:50)	35,54	46,07	55,80
čvrst lipid + tečni lipid (40:60)	33,80	45,28	55,90

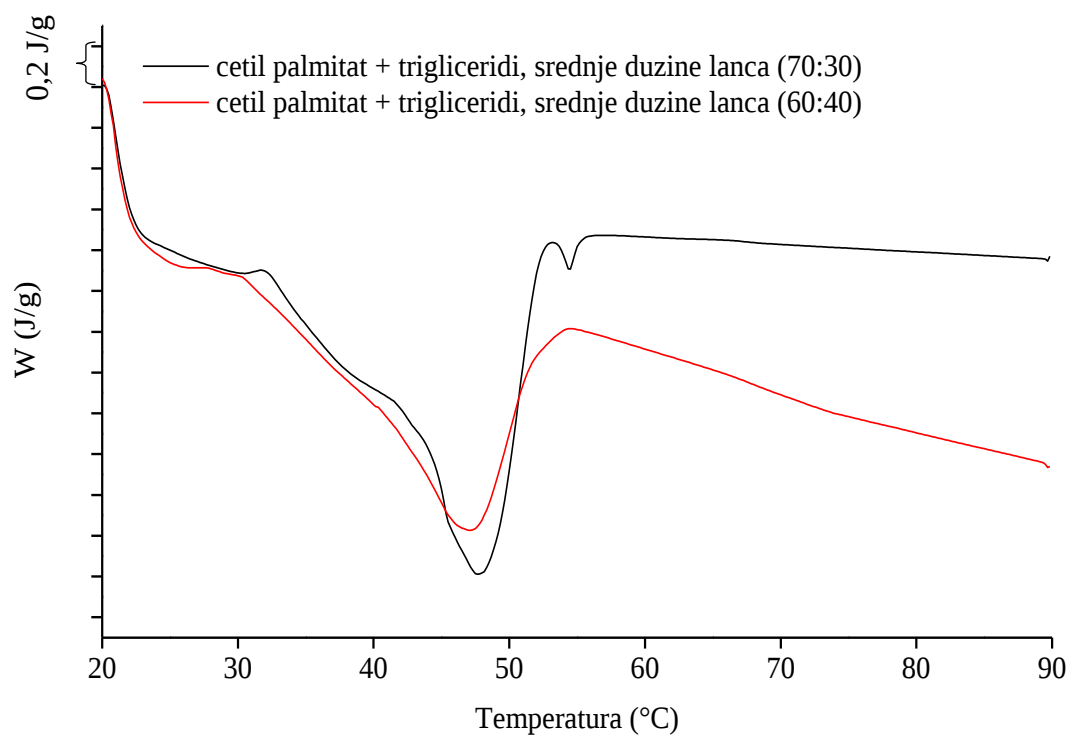
čvrst lipid: cetil palmitat (Cutina[®] CP); tečni lipid: trigliceridi srednje dužine lanca (Miglyol[®]812)

Cetil palmitat i trigliceridi srednje dužine lanca se dobro mešaju, na osnovu čega se može zaključiti da će lipidni matriks nanostrukturiranih lipidnih nosača biti homogen. Na DSC termogramima se uočava da pri sadržaju ulja iznad 20 % , pik koji potiče od α modifikacije lipida nestaje (slika 5.2.1). Pretpostavlja se da je tečan lipid molekularno dispergovan u čvrstom lipidu, u datoj koncentraciji, što ima za posledicu izvesne promene u izgledu DSC krive. Sniženje tačke topljenja može biti pokazatelj rastvorljivosti jedne supstance u drugoj. Na temelju ovih saznanja se određivanje temperature topljenja koristi za utvrđivanje stepena čistoće supstanci. Sa povećanjem udela tečnog lipida (ulja) u čvrstom lipidu, onset temperatura i temperatura topljenja smanjuju se linearno (tabela 5.2.1.). Smanjenje onset temperature i temperature topljenja uočava se čak i pri sadržaju ulja od 60 % (m/m) u smeši, što ukazuje na dobro mešanje čvrstog i tečnog lipida. Pri sadržaju ulja od 20 % (m/m) razlika između temperature topljenja i onset temperature bila je 8,82 °C i povećala se na 11,48 °C, kada je smeša sadržala 60 % (m/m) ulja. Dakle, za dati opseg koncentracija smanjenje temperature topljenja i onset temperature nije bilo linearno. Nagli pad u parametrima DSC analize uočen je pri sadržaju ulja do 20 % (m/m), dok su sa daljim povećanjem sadržaja tečnog lipida smanjenja onset temperature, temperature topljenja i entalpije topljenja slabije izražena (slike 5.2.1. - 5.2.3).

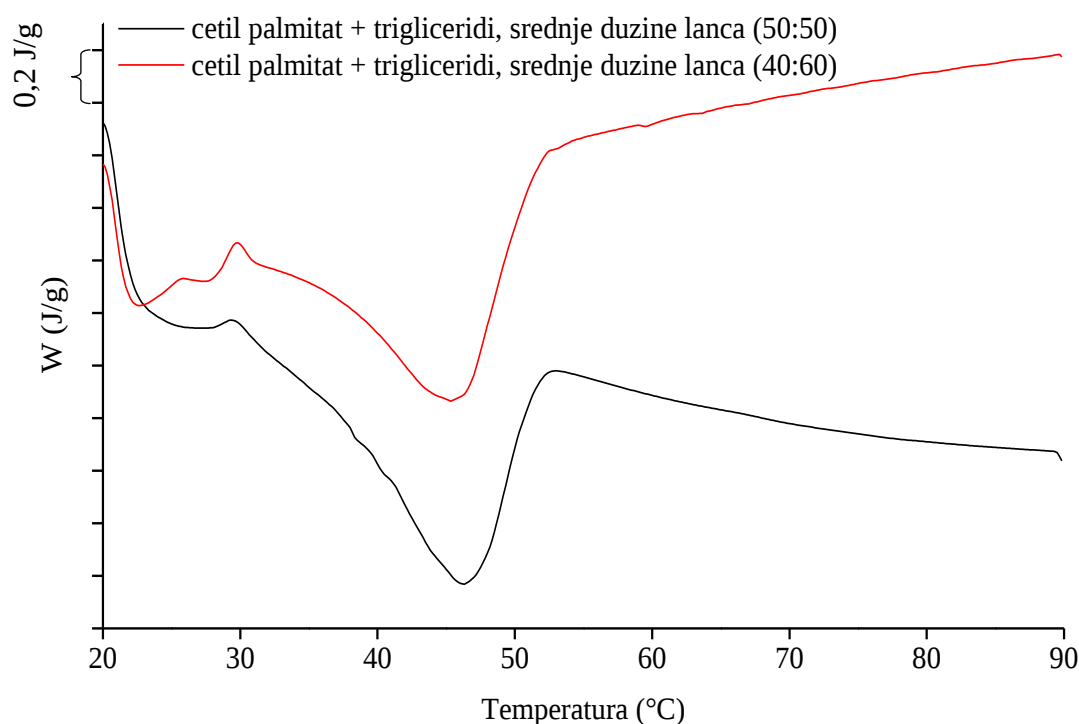
Proširenje DSC termograma koje se uočava sa povećanjem udela tečnog lipida može se objasniti usložnjavanjem strukture kristalne rešetke lipida, dok praktično nepromenjene vrednosti onset temperature sa povećanjem udela tečnog lipida u smeši lipida ukazuju da je dostignuta maksimalna rastvorljivost tečnog lipida u čvrstom lipidu. Istovremeno, sa isčezavanjem pika koji potiče od α modifikacije lipida uočava se da se širina pikova povećava, odnosno povećava se razlika između onset temperature i temperature topljenja, a visina pika (površina ispod krive) se smanjuje, odnosno stepen kristaliniteta lipida se smanjuje.



Slika 5.2.1. DSC termogrami temperiranog čvrstog lipida (cetil palmitat) u *bulk* stanju i temperirane smeše čvrstog lipida i 20 % (m/m) ulja (trigliceridi srednje dužine lanca)



Slika 5.2.2. DSC termogrami temperirane smeše čvrstog lipida (cetil palmitat) i 30 % (m/m) i 40 % (m/m) ulja (trigliceridi srednje dužine lanca)



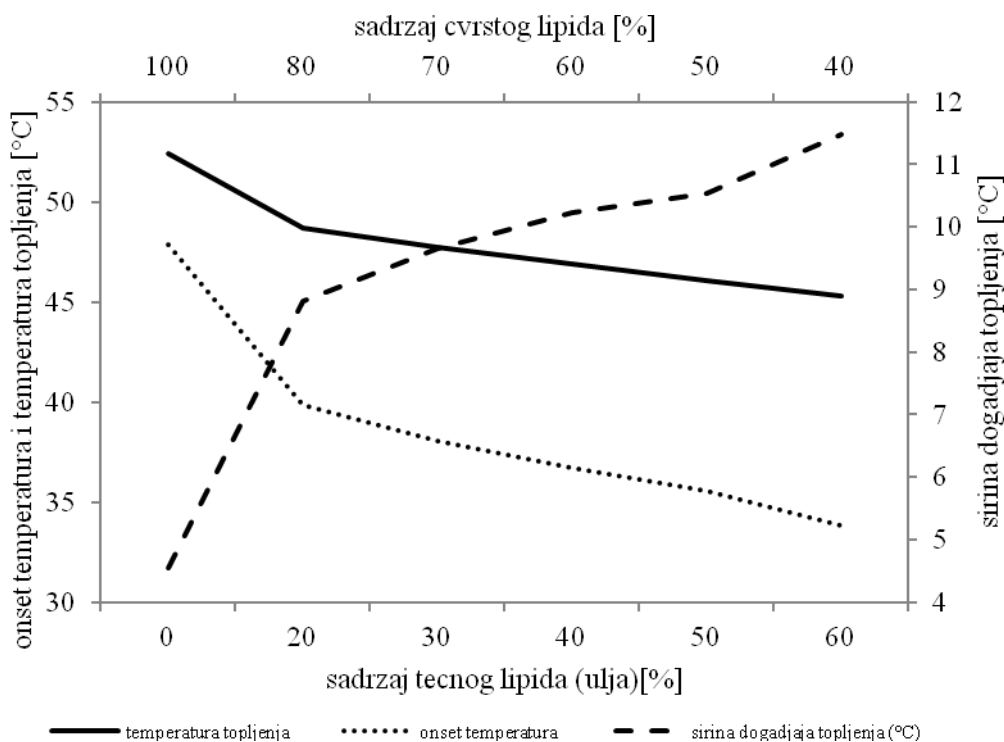
Slika 5.2.3. DSC termogrami temperirane smeše čvrstog lipida (cetil palmitat) i 50 % (m/m) i 60 % (m/m) ulja (trigliceridi srednje dužine lanca)

Smanjenje entalpije topljenja u smeši čvrstog i tečnog lipida ukazuju na promene u strukturi kristalne rešetke i smanjenje stepena kristaliniteta lipidnog matriksa u odnosu na čvrst lipid u *bulk* stanju. Entalpija topljenja se smanjuje od 220,46 J/g (čvrst lipid u *bulk* stanju) do 55,80 J/g kada je sadržaj tečnog lipida u smeši 50 % (m/m), uz istovremeno smanjenje indeksa kristalizacije od 100 - 25,3 %. Interesantno je da indeks kristalizacije i entalpija topljenja ostaju praktično nepromenjene (25,3 %) pri povećanju udela tečnog lipida od 50 - 60 % (m/m) (slika 5.2.4). Ovakav rezultat može ukazati na činjenicu da je dostignuta maksimalna rastvorljivost tečnog lipida u čvrstom lipidu. Literaturni podaci ukazuju da se pri niskim koncentracijama tečnog lipida molekuli tečnog lipida distribuiraju unutar matriksa čvrstog lipida, pri čemu se dobija tzv. „imperfektan” kristalni model nanostrukturiranih lipidnih nosača (Müller i sar., 2002b). Kada se dalje poveća sadržaj tečnog lipida iznad granice njegove rastvorljivosti u čvrstom lipidu obrazuje se „multipli” model nanostrukturiranih lipidnih nosača.

Molekuli tečnog lipida se talože u obliku tzv. tečnih uljanih nanopregradica unutar lipidnog matriksa nanočestica tokom procesa hlađenja. Na visokim temperaturama, otopljeni čvrsti lipid i tečni lipid se potpuno mešaju, dok se tokom procesa hlađenja

smanjuje rastvorljivost tečnog lipida u čvrstom lipidu. Nakon hlađenja, usled nedovoljne rastvorljivosti tečnog lipida u čvrstom lipidu dolazi do odvajanja faza (čvrste i tečne). Tečni lipid (ulje) se odvaja u obliku finih kapljica koje se delimično inkorporiraju u lipidni matriks čvrstog lipida tokom procesa hlađenja nanostrukturiranih lipidnih nosača.

Na osnovu rezultata termalne analize, separacija faza se ne može isključiti tokom procesa pripreme nanostrukturiranih lipidnih nosača sa visokim udelom tečnog lipida i zbog činjenice da se process kristalizacije u nanodimenzijama razlikuju od kristalizacije u *bulk* stanju. Primeri za to su sniženje temperature topljenja (*Gibbs-Thomson*-ov efekat (Perez, 2005) ili nedostatak kristalizacije koji vodi formiranju „superohlađene” otopine.



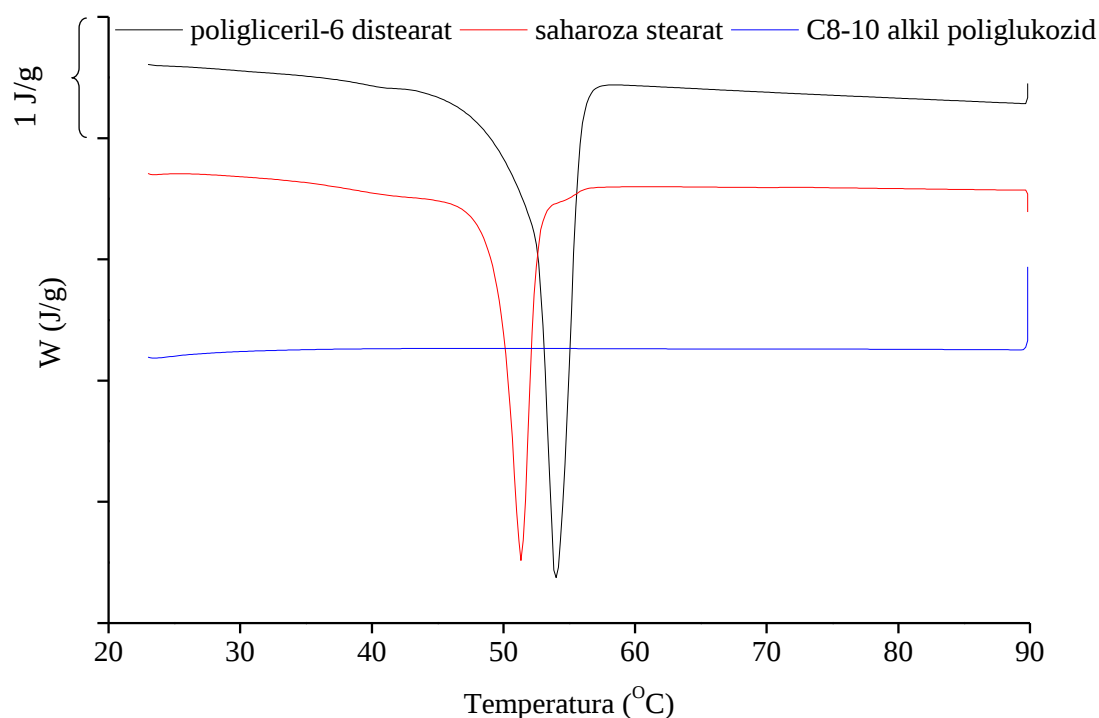
Slika 5.2.4. Smanjenje onset temperature i temperature topljenja i povećanje razlike između temperature topljenja i onset temperature sa povećanjem sadržaja tečnog lipida (ulja) u čvrstom lipidu u *bulk* stanju od 0 - 60 % (m/m) (rezultati DSC studije, podaci iz tabele 5.2.1.)

Postoje kontraverzne diskusije u kojoj fazi se nalazi tečni lipid (ulje). Prema mišljenju Müller i sar. (2002b) uljane nanopregradice su ravnomerno distribuirane kroz čitav lipidni matriks čvrstog lipida (originalni model). Međutim, drugi autori ukazuju na činjenicu da uljane nanopregradice mogu prevashodno biti locirane u rezervoaru ili u membrani čestice (Saupe i sar., 2005), ili pak na samoj površini čestice (sloj ulja na površini čestice) (engl. *spoon like structure*) (Jores i sar., 2005; Jores i sar., 2004).

Međutim, cilj ove doktorske disertacije nije da se detaljno razmotre fizički fenomeni koji se opisuju različitim teorijama, te ovde neće biti detaljnije diskutovani. Jedini zaključak koji se može izvesti jeste da će lokalizacija uljanih pregradica definitivno zavisiti od hemijske prirode čvrstog lipida i tečnog lipida, rastvorljivosti/mešanja tečnog i čvrstog lipida, uslova pod kojima se priprema disperzija lipidnih nanočestica, kao i međupovršinskog napona (međupovršinske energije) između lipidne faze i vodene faze. Ukratko, sve opisane strukture mogu postojati jedna uz drugu, u zavisnosti od vrste lipida koji ulaze u sastav lipidnog matriksa. Pored utvrđivanja stepena mešanja čvrstog lipida i tečnog lipida, termalnom analizom je određena i temperatura topljenja i entalpija topljenja surfaktanata. Ovi rezultati pored toga što ukazuju na fizičko-hemijska svojstva surfaktanata mogu pružiti informacije o potencijalnoj interakciji surfaktant-lipidni matriks čestica. Na osnovu prethodnih eksperimentalnih rezultata surfaktanti sa tzv. „tečnom strukturom” verovatno formiraju fluidniji i manje mobilan sloj oko lipidnih nanočestica i time usporavaju kristalizaciju čestica. Nasuprot tome, surfaktanti koji sadrže duge alkil lance u strukturi teorijski mogu u određenoj meri doprineti kristalizaciji čestica. Na DSC termogramu poligliceril-6 distearata i saharoza stearata uočen je jedan oštar endotermni maksimum na temperaturama 49 °C i 52 °C koji odgovara temperaturi topljenja surfaktanta. S druge strane, na DSC termogramu C8-10 alkil poliglukozida nije uočeni endotermni pik što ukazuje na odsustvo čvrste strukture lipida u ovom slučaju (tabela 5.2.2 i slika 5.2.5.). Na osnovu ovih rezultata može se očekivati da će čestice stabilizovane poligliceril-6 distearatom i saharoza stearatom imati veći RI od čestica stabilizovanih C8 - 10 alkil poliglukozidom.

Tabela 5.2.2. DSC parametri (onset temperatura (t_o (°C)), temperatura topljenja (t_t (°C)) i ukupna entalpija topljenja (ΔH (J/g)) surfaktanata u *bulk* stanju (temperaturni opseg 20 - 90 °C, brzina skeniranja 10 K/min)

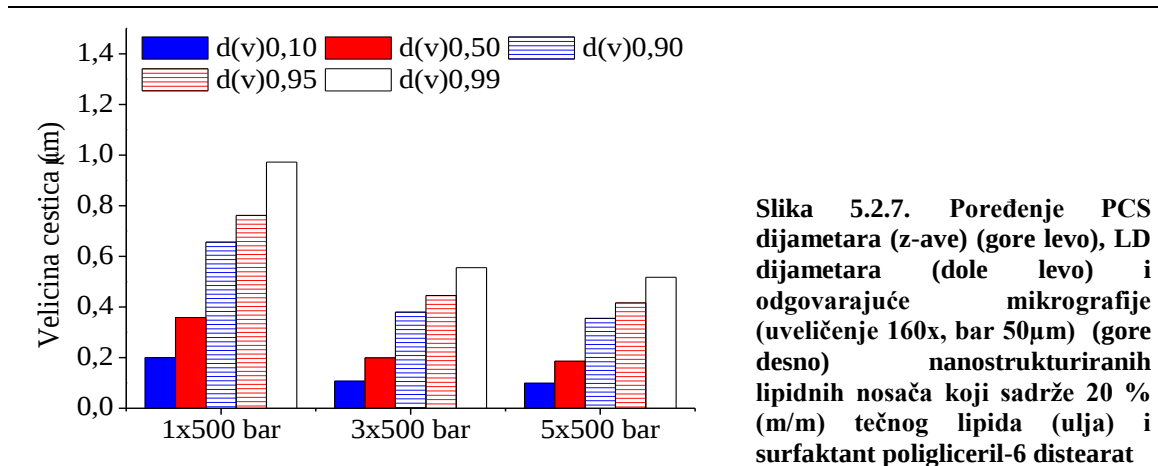
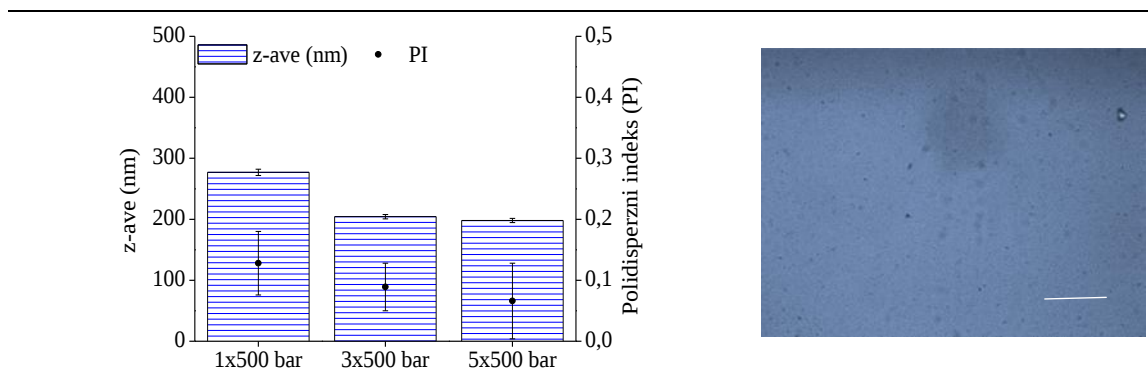
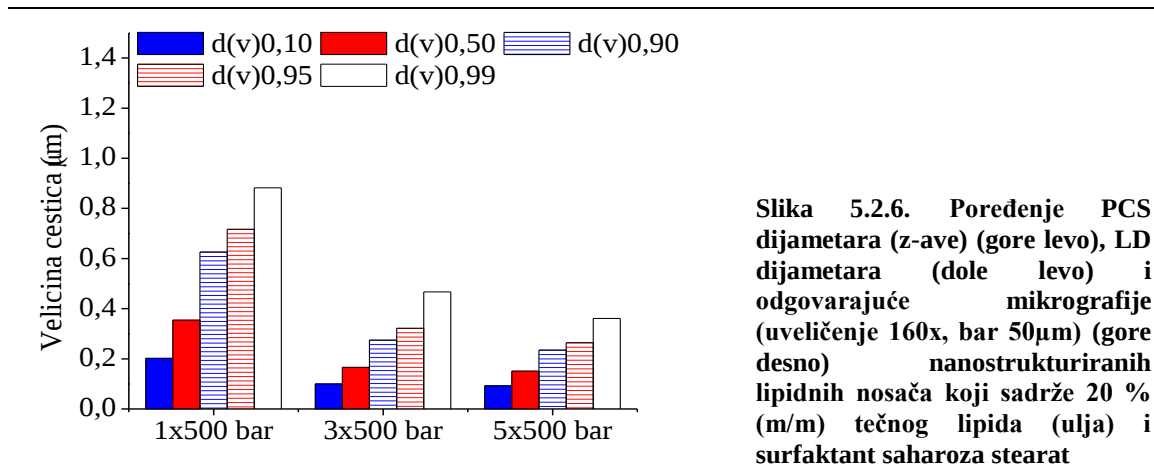
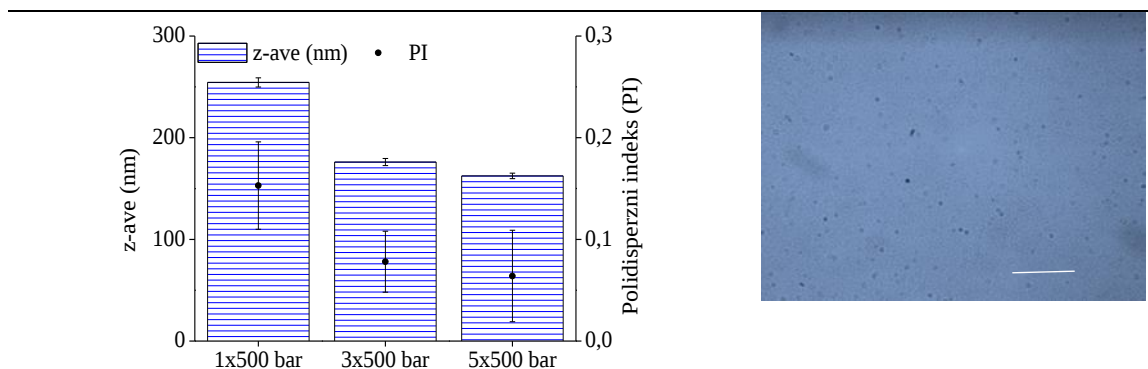
Surfaktant	t_o (°C)	t_t (°C)	ΔH (J/g)
poligliceril-6 distearat	51,82	53,50	72,00
C8-10 alkil poliglukozid	-	-	-
saharoza stearat	49,20	51,28	39,93



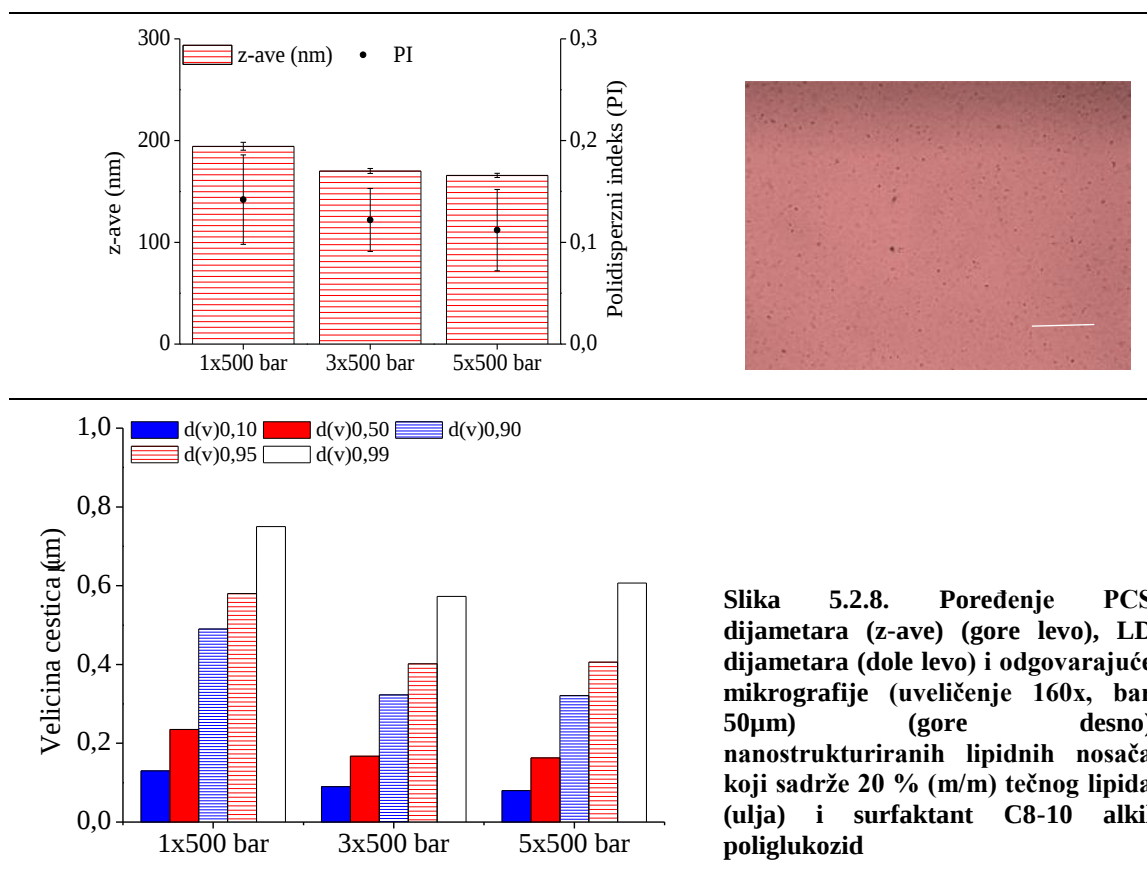
Slika 5.2.5. DSC termogramni surfaktanata (podaci iz tabele 5.2.2.)

5.2.2. Priprema vodenih disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima

Vodene disperzije nanostrukturiranih lipidnih nosača koje se razlikuju u sadržaju tečnog lipida (ulja) i vrsti surfaktanta pripremljene su postupkom tople homogenizacije pod visokim pritiskom. Udeo lipidne faze u formulaciji bio je konstantan (10 % (m /m)), dok je udeo tečnog lipida (ulja) u lipidnom matriksu nanostrukturiranih lipidnih nosača varirao od 20 - 60 % (m/m). Uobičajeni parametri za pripremu vodenih disperzija lipidnih nanočestica na laboratorijskom nivou su pritisak od 500 bara i 3 - 5 ciklusa homogenizacije. Priprema vodenih disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača izvedena je na temperaturid od 75 °C kako bi lipidni matriks ostao u tečnom stanju tokom čitavog procesa pripreme disperzija. Reprezentativni primeri rezultata koji se odnose na svaku PAM-u prikazani su na slikama 5.2.6. - 5.2.8. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je pod optimalnim uslovima pripreme (500 bar, 5 ciklusa homogenizacije, temperatura 75 °C) moguće dobiti nanostrukturirane lipidne nosače malog dijametra sa relativno uniformnom raspodelom čestica po veličini.



Prosečan dijametar čestica bio je ispod 200 nm sa PI ispod 0,15 što ukazuje na monomodalnu raspodelu čestica po veličini. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da se finije disperzije lipidnih nanočestica dobijaju sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije. Pored procesnih parametara, pokazano je da hemijska struktura surfaktanta utiče na karakteristike disperzije lipidnih nanočestica.

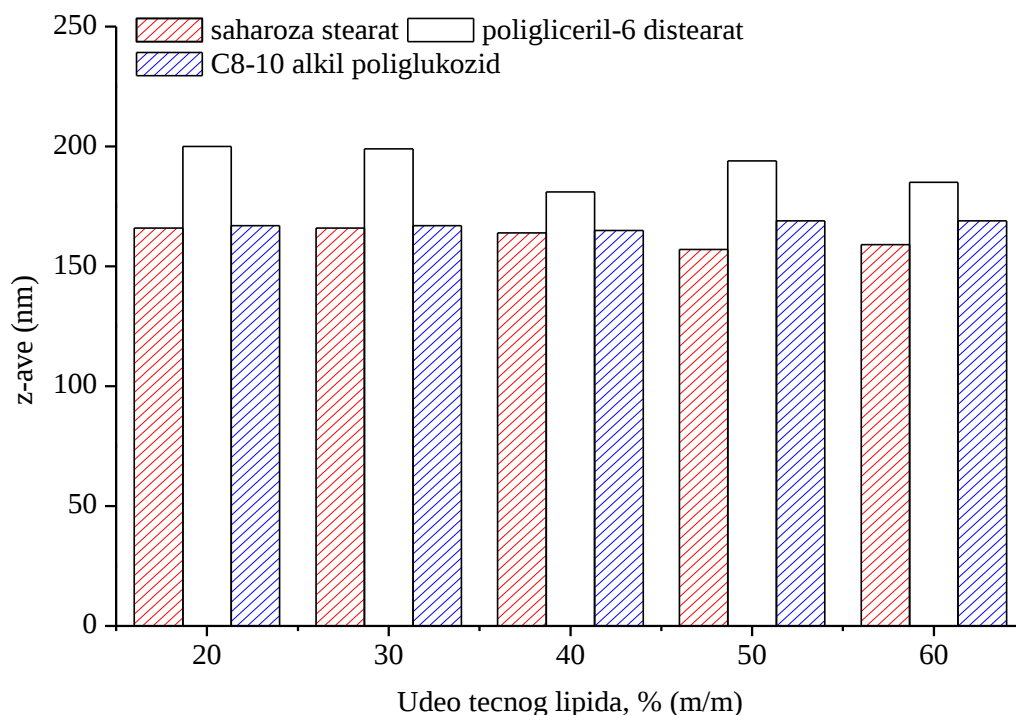


Slika 5.2.8. Poređenje PCS dijametara (z-ave) (gore levo), LD dijametara (dole levo) i odgovarajuće mikrografije (uveličenje 160x, bar 50μm) (gore desno) nanostrukturiranih lipidnih nosača koji sadrže 20 % (m/m) tečnog lipida (ulja) i surfaktant C8-10 alkil poliglukozyd

5.2.3. Analiza veličine čestica i fizička stabilnost vodenih disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima

Karakterizacija vodenih disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača izvedena je tehnikama foton korelacione spektroskopije i laserske difrakcije nakon pripreme formulacija i tokom perioda ispitivanja od 30 dana kada su se uzorci čuvali na različitim temperaturama ($5 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ i $40 \pm 2^\circ\text{C}$). Rezultati istraživanja sprovedeni su u skladu sa definisanim standardnim operativnim postupkom (SOP) i prikazani su na slikama 5.2.9. i 5.2.11. - 5.2.17. Neposredno nakon pripreme prosečan dijametar (z-ave) nanostrukturiranih lipidnih nosača koji sadrže surfaktant poligliceril-6 distearat bio je u

intervalu od 185 - 200 nm, dok je prosečan dijametar čestica u formulacijama sa saharoza stearatom i C8-10 alkil poliglukozidom bio nešto niži i kretao se u intervalu od 157 - 169 nm (slika 5.2.9). Nezavisno od surfaktanta koji se koristio za stabilizaciju, vrednosti PI bile su ispod 0,15 što ukazuje na usku raspodelu čestica po veličini.



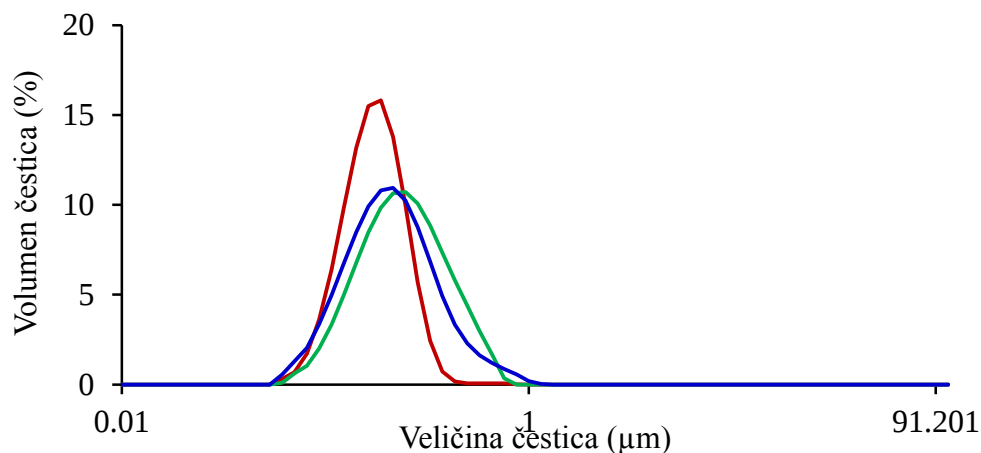
Slika 5.2.9. Z-ave (nm) i PI (PCS-podaci) nakon izrade u vodenim disperzijama nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim udelom tecnog lipid (ulja) u lipidnom matriksu koji sadrže surfaktante saharoza stearat, poligliceril-6 distearat i C8-10 alkil poliglukozid

Prema podacima sa slike 5.2.9. sadržaj tecnog lipida (ulja) u lipidnom matriksu nanočestica uticao je na prosečan dijametar čestica u formulacijama sa poligliceril-6 distearatom, dok je nešto manji odnosno gotovo neznatan uticaj uočen u disperzijama koje sadrže surfaktante saharoza stearat i C8-10 alkil poliglukozid. U skladu sa literaturnim podacima konačna veličina lipidnih nanočestica zavisi od različitih faktora, koji se u najširem smislu mogu podeliti na formulacione i procesne parametre. S obzirom da su isti procesni parametri korišćeni za pripremu formulacija, pretpostavilo se da razlike u veličini čestica u ovoj studiji potiču od formulacionih parametara. Uzimajući u obzir činjenicu da su se sve formulacije pripremale na temperaturi koja je 5 - 10 °C iznad temperature topljenja lipidnog matriksa nanočestica, viskozitet smeše cetil

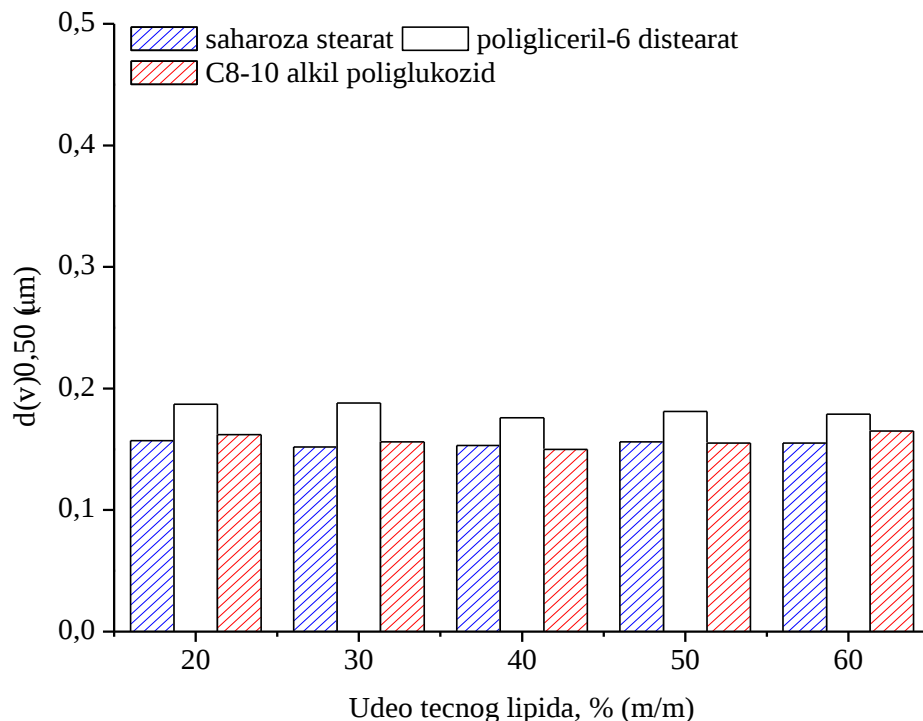
plamitat/trigliceridi srednje dužine lanca je bio identičan na povišenoj temperaturi, te se stoga razlike u efikasnosti homogenizacije usled razlika u viskozitetu lipidnog matriksa mogu isključiti kao razlog za razliku u veličini čestica. Slična zapažanja o odsustvu uticaja viskoziteta triglicerida srednje dužine lanca i gliceril dibehenata na povišenoj temperaturi na veličinu lipidnih nanočestica publikovana su u studiji koju su izveli Jores i sar. (2004). Međutim, poznato je da nakon tople homogenizacije pod visokim pritiskom, dolazi do kristalizacije lipida i obrazovanja čestica sa čvrstim lipidnim matriksom, te da proces kristalizacije u velikoj meri može odrediti oblik čestica, a samim tim uticati na izmerene vrednosti veličine čestica. Uticaj razlike u obliku lipidnih nanočestica nakon kristalizacije već je prethodno opisan u disperzijama lipidnih nanočestica sastavljenim od triglicerida koji su bili u čvrstom (čvrste lipidne nanočestice) i tečnom stanju (superohlađene otopine) (Bunjes, 1998; Bunjes i sar., 1996; Westesen i sar., 2001). Stoga se dobijene razlike u veličini čestica mogu razmatrati u kontekstu razlika u načinu kristalizacije čestica. Sa druge strane, kada je upoređena hemijska struktura poligliceril-6 distearata, saharoza stearata i C8-10 alkil poliglukozida (tabele 4.1. - 4.3.), zapaženo je da poligliceril-6 distearat ima dva duga alkil lanca u ostatku masne kiseline, saharoza stearat jedan dug alkil lanac, a C8-10 alkil poliglukozid jedan kratak alkil lanac, pa je verovatno da ovi surfaktanti zbog svoje geometrije molekula na različit način penetriraju u lipidni matriks čestica i utiču na proces kristalizacije. Međutim, treba istaći da ovaj stav ne može biti generalizovan, zbog toga što je veličina lipidnih nanočestica određena ne samo načinom kristalizacije čestica, nego i funkcionalnošću surfaktanata.

Analiza disperzija laserskom difrakcijom pokazala je da je nakon pripreme u svim formulacijama distribucija čestica po veličini bila unimodalna i relativno uska (slika 5.2.10). Dijametar *bulk* populacije, $d(v)_{0,50}$, bio je ispod $0,2 \mu\text{m}$, dok je $d(v)_{0,99}$, koji predstavlja osetljiv parametar za prisustvo i količinu većih čestica bio ispod $0,6 \mu\text{m}$ (slike 5.2.11. i 5.2.12.). Prisustvo mikročestica u ovim uzorcima je isključeno, tačnije bile su ispod granica detekcije. Dijametar *bulk* populacije u uzorcima stabilizovanim C8-10 alkil poliglukozidom i saharoza stearatom bio je sličan ($d(v)_{0,50} = 0.150 \mu\text{m}$ - $0.166 \mu\text{m}$ za C8-10 alkil poliglukozid i $d(v)_{0,50} = 0.143 \mu\text{m}$ - $0.158 \mu\text{m}$), dok su čestice nešto većeg dijametra dobijene u uzorcima stabilizovanim poligliceril-6 distearatom ($d(v)_{0,50} = 0.173 \mu\text{m}$ - $0.194 \mu\text{m}$). Sa druge strane, dijametar „većih” čestica ($d(v)_{0,99}$)

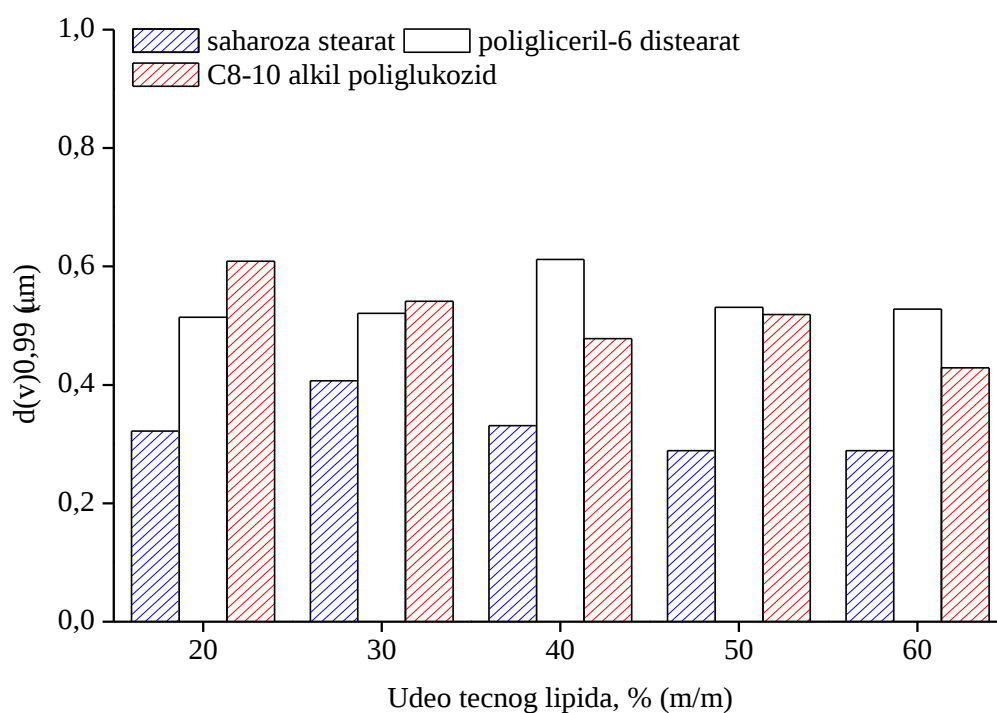
bio je najveći u uzorcima stabilizovanim poligliceril-6 distearatom ($d(v)_{0,99} = 0.496 \mu\text{m} - 0.545 \mu\text{m}$), a najmanji u uzorcima stabilizovanim saharoza stearatom ($d(v)_{0,99} = 0.292 \mu\text{m} - 0.483 \mu\text{m}$). Rezultati PCS i LD su potvrđeni rezultatima svetlosne mikroskopije, tj. nije utvrđeno prisustvo agregata čestica (slika 5.2.13.).



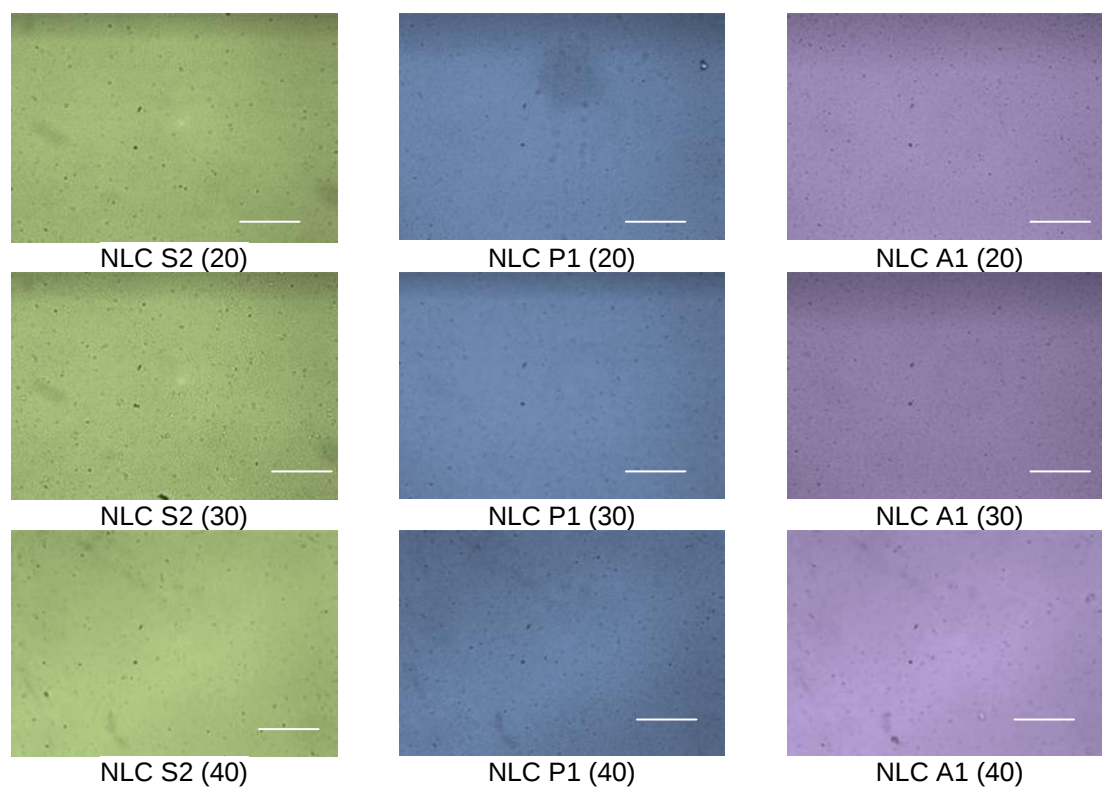
Slika 5.2.10. Raspodela veličine čestica prema volumenu nakon izrade u disperzijama nanostrukturiranih lipidnih nosača sa 20 % (m/m) tečnog lipida u lipidnom matriksu koji sadrže surfaktant saharoza stearat, (—), poligliceril-6 distearat (—) i C8-10 alkil poliglukozyd (—)



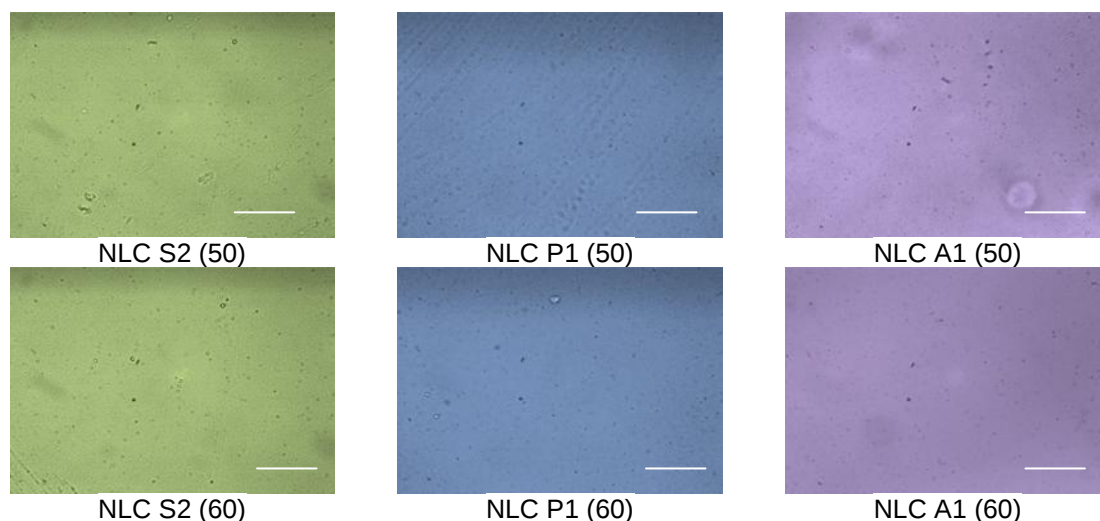
Slika 5.2.11. $d(v)_{0,50} (\mu\text{m})$ (LD-podaci) nakon izrade u vodenim disperzijama nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim udelom tečnog lipida (ulja) u lipidnom matriksu koji sadrže surfaktante saharoza stearat, poligliceril-6 distearat i C8-10 alkil poliglukozyd



Slika 5.2.12. $d(v)_{0,99}$ (μm) (LD-podaci) nakon izrade u vodenim disperzijama nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim udelom tečnog lipida (ulja) u lipidnom matriksu koji sadrže surfaktante saharoza stearat, poligliceril-6 distearat i C8-10 alkil poliglukozid

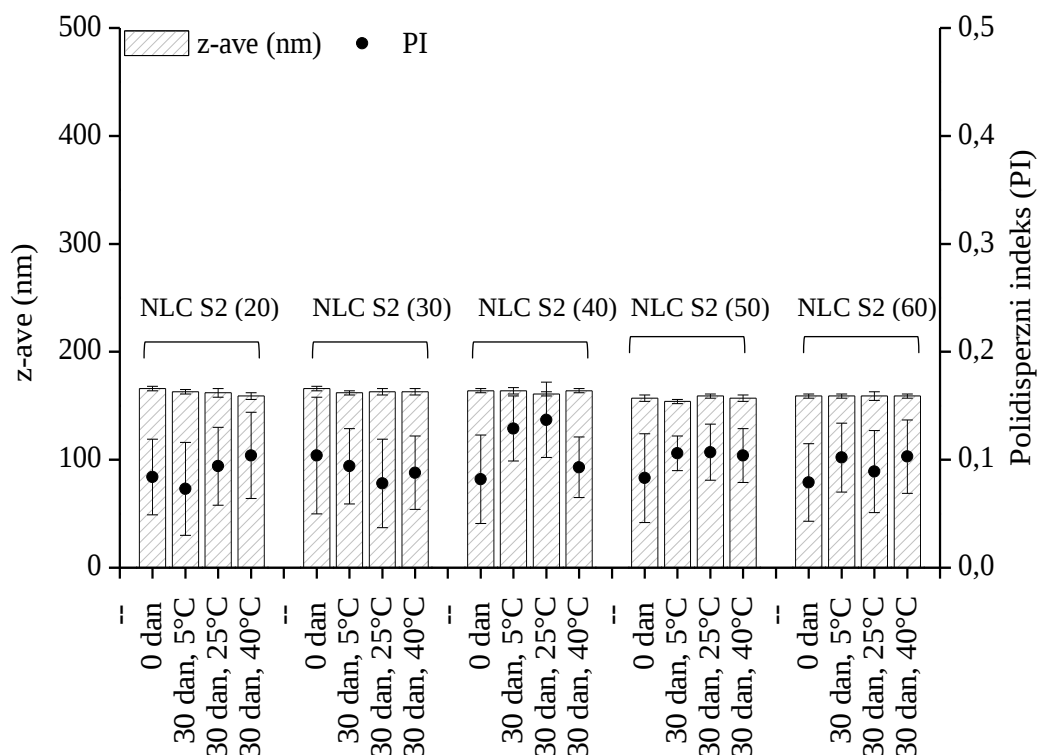


Slika 5.2.13. (legenda na narednoj strani)

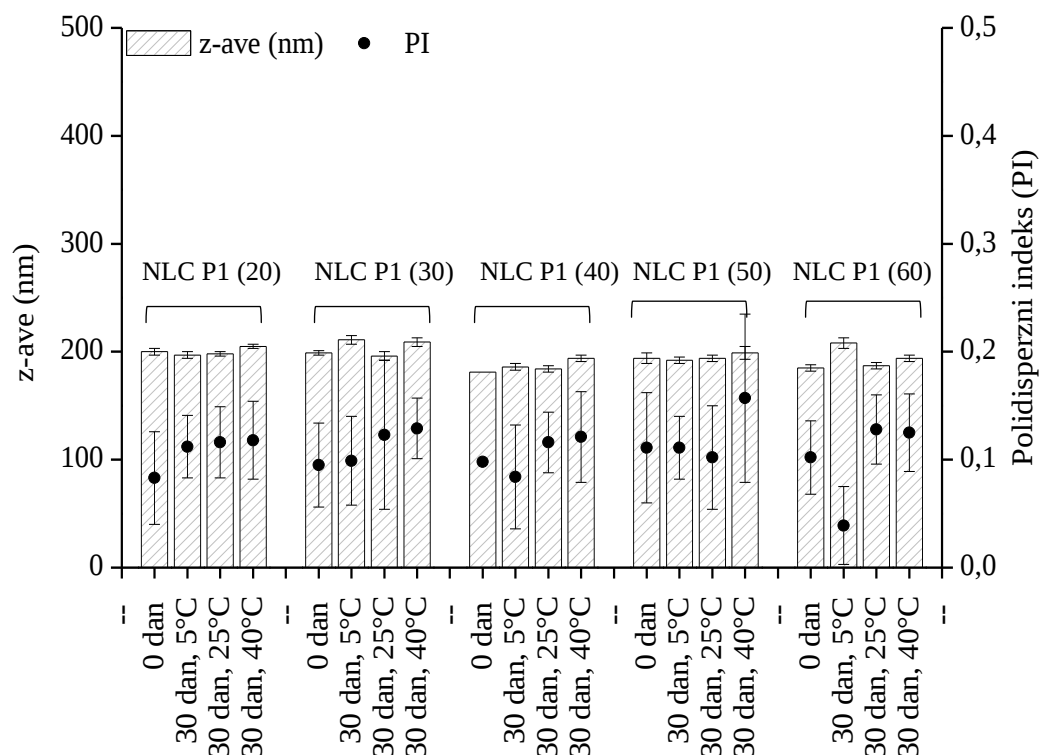


Slika 5.2.13. Svetlosne mikrografije nakon izrade vodenih disperzija nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim udelom tečnog lipida (ulja) u lipidnom matriksu koji sadrže surfaktante saharoza stearat, poligliceril-6 distearat i C8-10 alkil poliglukozid (uveličanje 160x, bar 50 μm)

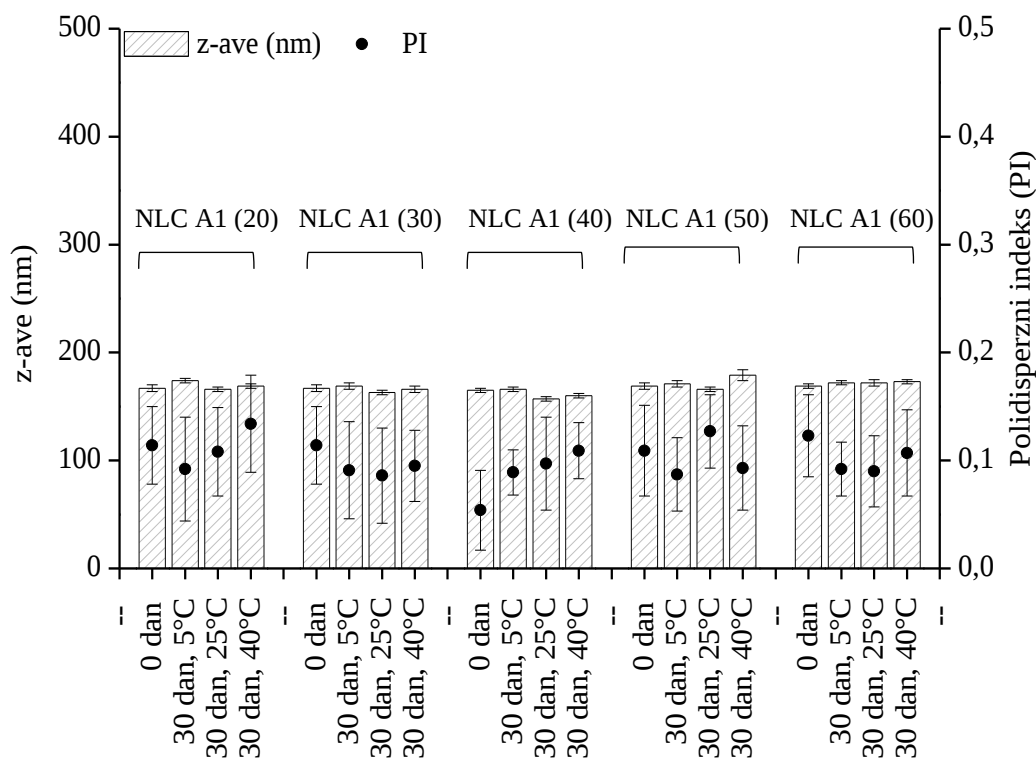
Prosečna veličina čestica i PI praktično se nisu menjali tokom ispitivanog perioda od 30 dana (slike 5.2.14. - 5.2.16.) i iznosili su od 154 - 179 nm za stabilizatore saharoza stearat i C8-10 alkil poliglukozid, tj. 181 - 211 nm za poligliceril-6 distearat. PI je ostao nepromenjen u svim fomulacijama i bio je ispod 0,15.



Slika 5.2.14. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant saharoza stearat nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana

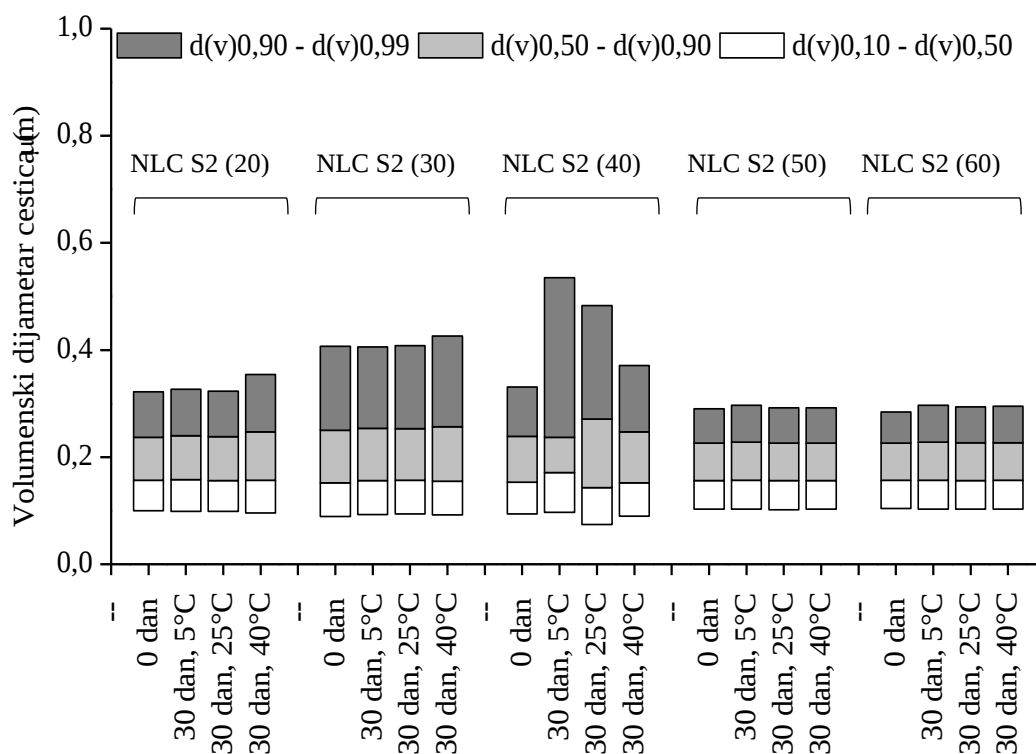


Slika 5.2.15. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant poligliceril-6 distearat nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana

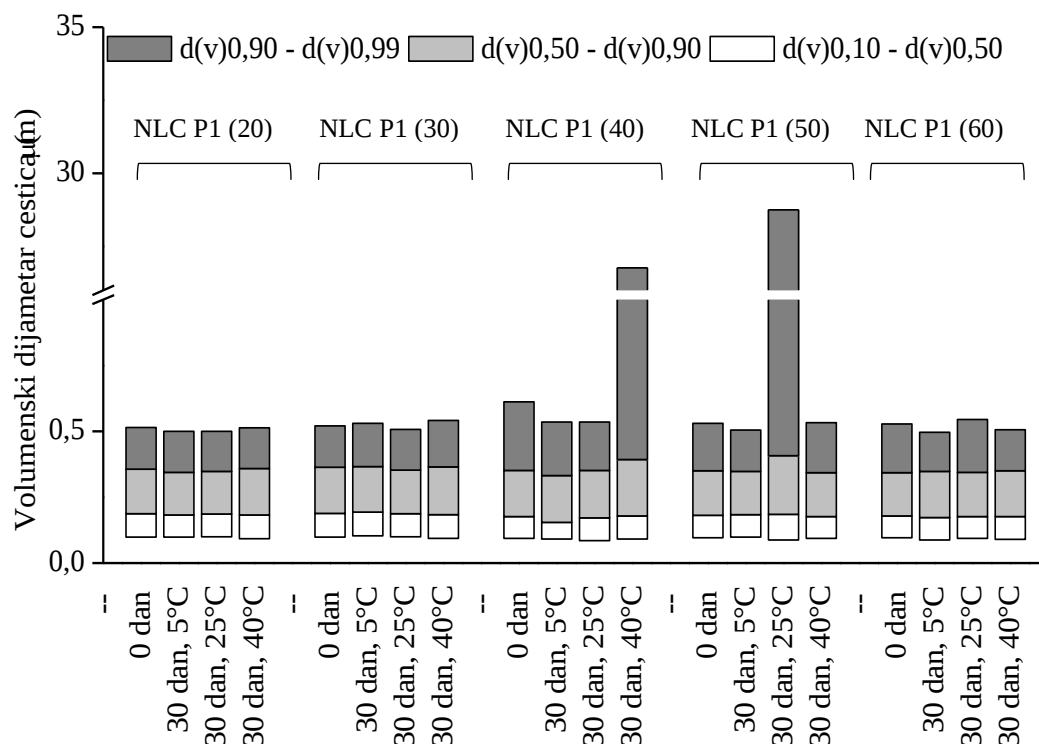


Slika 5.2.16. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant C8-10 alkil poliglukozid nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana

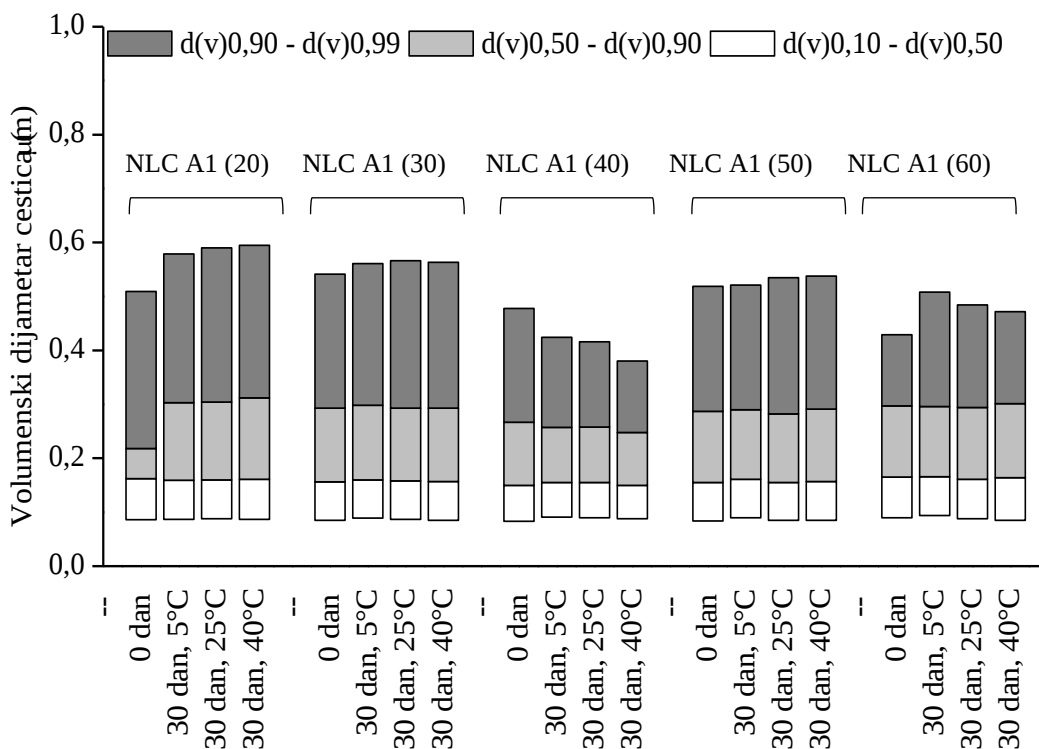
U disperzijama nanostrukturiranih lipidnih nosača sa 40 % (m/m) i 50 % (m/m) tečnog lipida koje sadrže surfaktant poligliceril-6 distearat, tokom čuvanja uzoraka na različitim temperaturama, uočeno je malo povećanje u dijametru većih čestica. Prisustvo većih čestica u ovim uzorcima potvrđeno je i svetlosnom mikroskopijom. Ostale formulacije stabilizovane C8-10 alkil poliglukozidom, saharoza stearatom i poligliceril-6 distearatom bile su stabilne u toku ispitivanog perioda i pod uslovima koji su primenjeni u studiji i ni u jednoj formulaciji nije uočeno prisustvo čestica mikrometarskih veličina (slike 5.2.17-5.2.19.).



Slika 5.2.17. Parametri veličine čestica (LD-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant saharoza stearat nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana



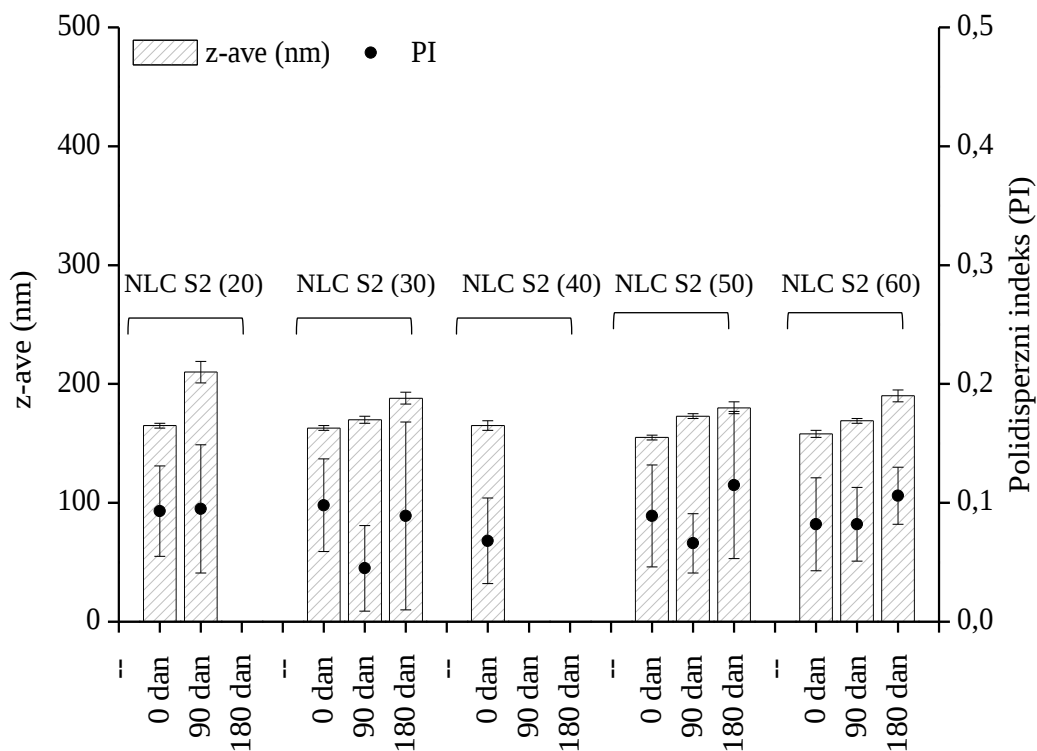
Slika 5.2.18. Parametri veličine čestica (LD-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant poligliceril-6 distearat nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana



Slika 5.2.19. Parametri veličine čestica (LD-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant C8-10 alkil poliglukoizid nakon izrade (0 dan) i nakon 30 dana

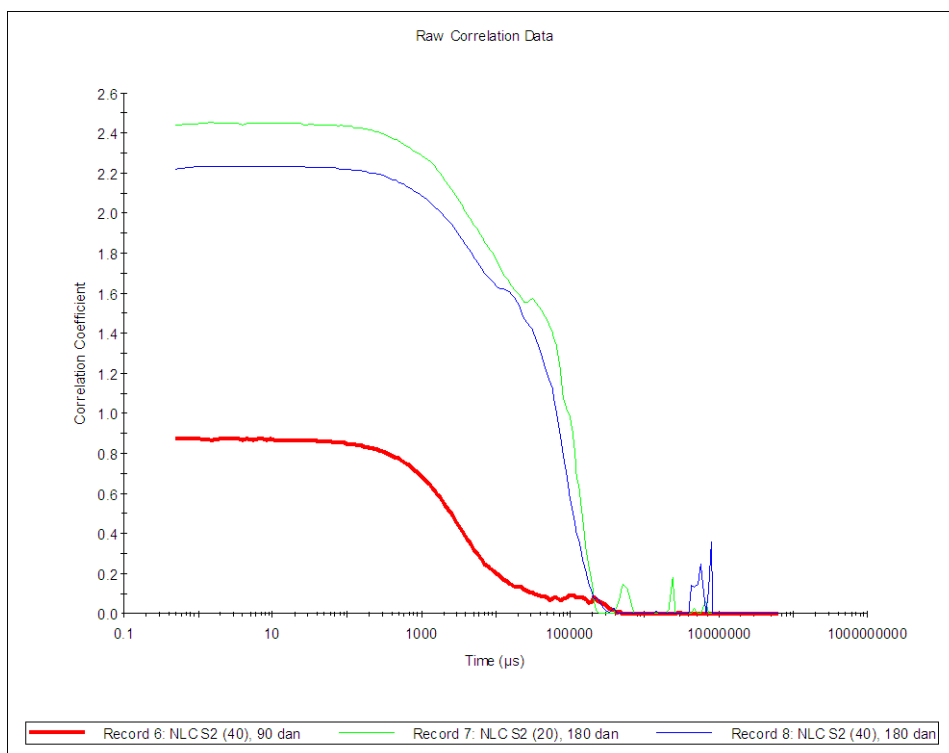
Cetil palmitat je vosak koji se dobija katalitičkom esterifikacijom masnog alkohola (cetil alkohol) i masnih kiselina (palmitinska kiselina) (Saupe i sar., 2005). Rezultati prethodnih studija ukazuju da parcijalni gliceridi (mono-, digliceridi i njihove smeše) imaju površinsku aktivnost, te zahvaljujući toj osobini oni mogu olakšati emulgovanje i formiranje filma PAM oko lipidnih nanočestica koji može doprineti dugoročnoj fizičkoj stabilnosti (Bunjies i sar., 2003; Westesen i sar. 1993). Međutim, u ovom istraživanju kao čvrst lipid upotrebljena je smeša cetil palmitata i triglicerida srednje dužine lanca, što ukazuje na činjenicu da su prvenstveno surfaktanti odgovorni za fizičku stabilnost lipidnih nanočestica (Saupe i sar., 2005). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su generalno C8-10 alkil poliglukozid, saharoza stearat i poligliceril-6 distearat ispoljili dobru funkcionalnost u stabilizaciji čestica u periodu od 30 dana.

U cilju ispitivanja dugoročne fizičke stabilnosti vodene disperzije lipidnih nanočestica čuvane su na kontrolisanoj sobnoj temperaturi u periodu od 180 dana. U formulacijama koje sadrže saharozu stearat kao surfaktant i 30 % (m/m) ulja u lipidnom matriksu dijametar svih čestica ostao je nepromenjen. Nasuprot tome, u formulacijama sa istim surfaktantom koje sadrže 20 % (m/m) i 40 % (m/m) ulja uočeno je prisustvo većih čestica pored čestica nanometarske *bulk* populacije (slika 5.2.20.).



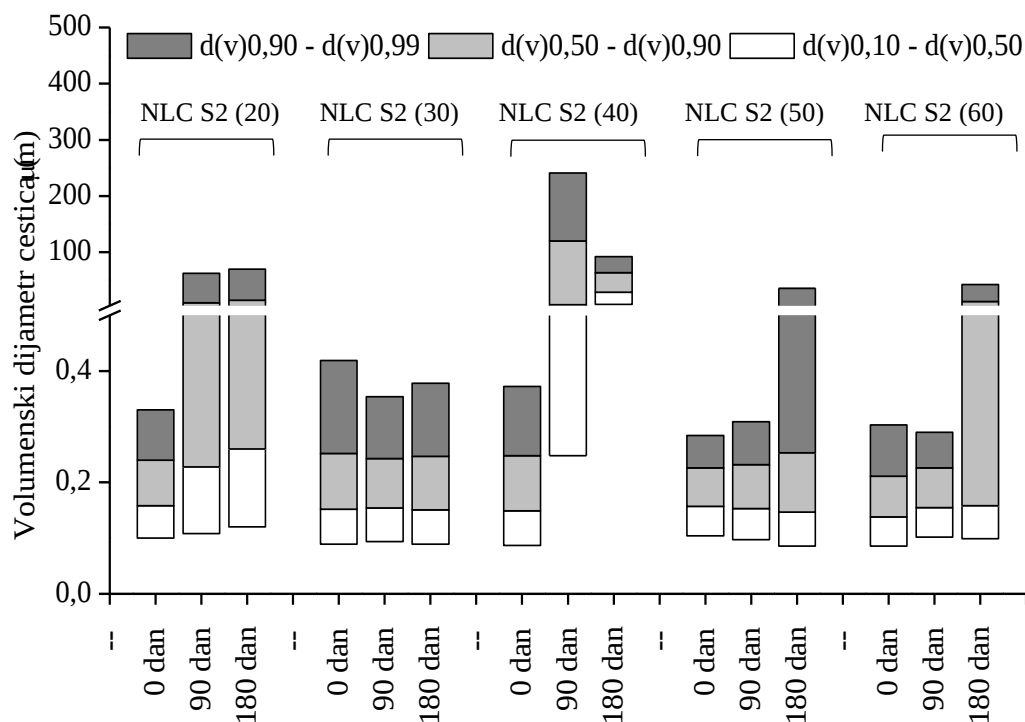
Slika 5.2.20. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant saharozu stearat nakon izrade (0 dan), nakon 90 i 180 dana

S obzirom da je z -ave u formulaciji NLC S2 (20) nakon 180 dana i u formulaciji NLC S2 (40) nakon 90 i 180 dana bio izvan mernog opsega *Zetasizer*-a ($6\text{ }\mu\text{m}$), ovi rezultati se nisu mogli smatrati dovoljno pouzdanim, te stoga i nisu prikazani na slici 5.2.20. Korelacione funkcije pomenutih formulacija dobijene metodom PCS potvrdili su da je distribucija čestica po veličini u pomenutim formulacijama bila veoma široka, da je dijametar čestica prelazio $1\text{ }\mu\text{m}$ i da su u uzorku prisutne veće čestice (slika 5.2.21.). Analizom pomenutih formulacija LD potvrđeni su rezultati dobijeni PCS (slika 5.2.22.).

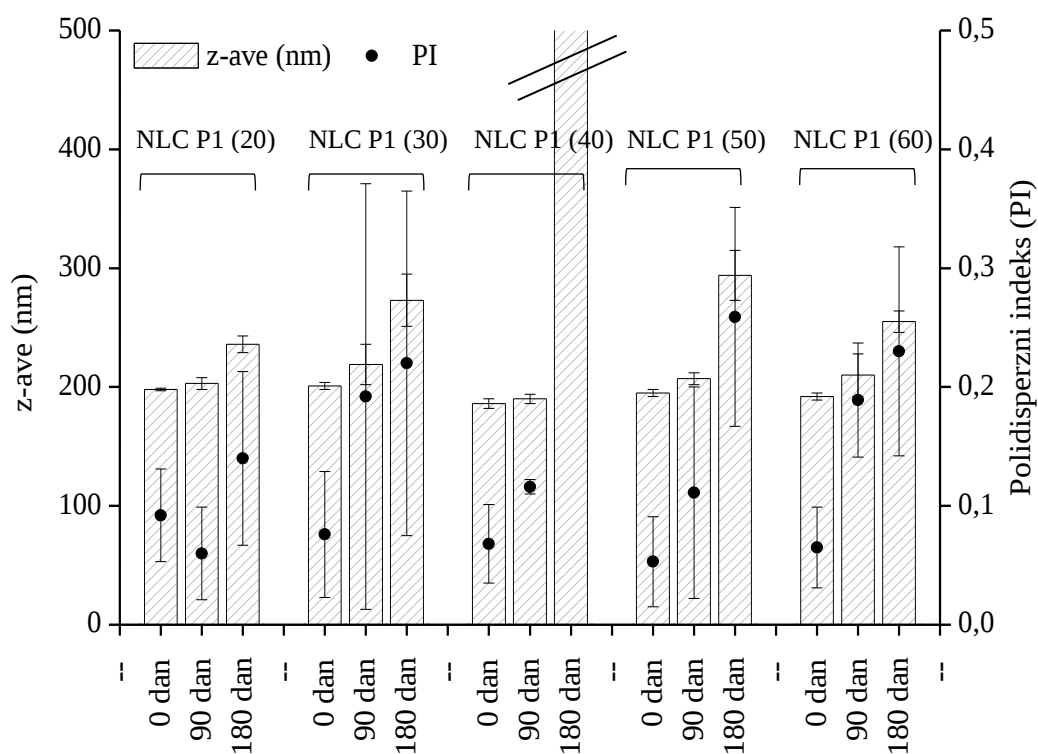


Slika 5.2.21. Korelacione funkcije nanostrukturiranih lipidnih nosača NLC S2 (40) (nakon 90 dana) i NLC S2 (20) (nakon 90 i 180 dana) koje sadrže surfaktant saharoza stearat

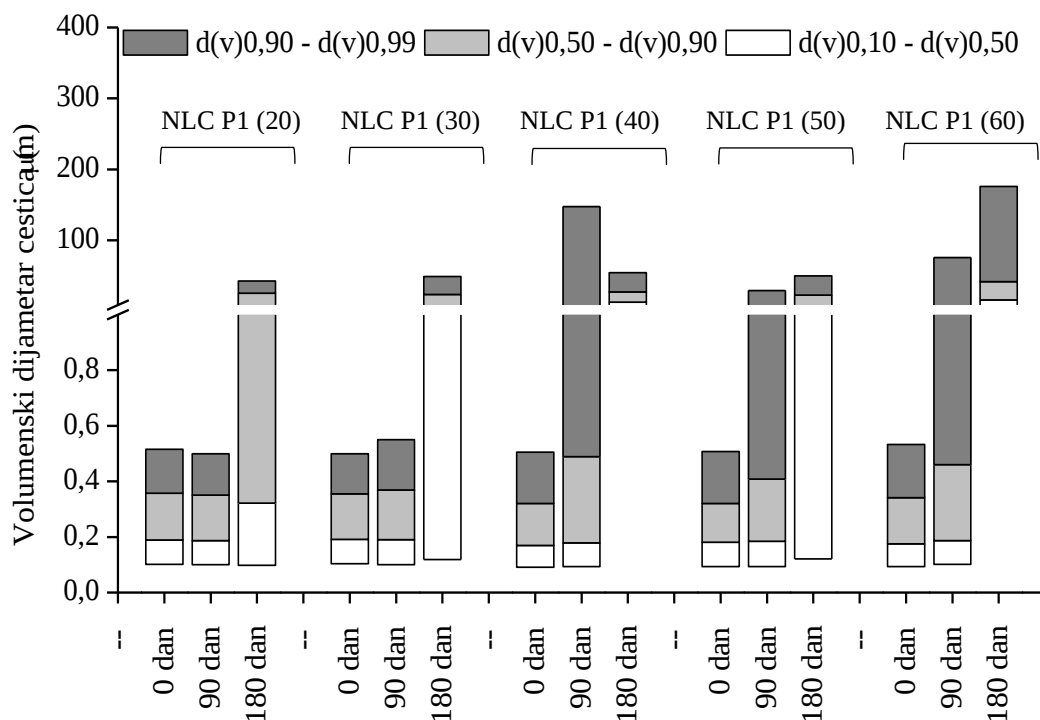
U formulacijama stabilizovanim poligliceril-6 distearatom $d(v)_{0,99}$ bio je i dalje ispod $0,6\text{ }\mu\text{m}$ kada je sadržaj ulja u disperziji bio 20 % (m/m) i 30 % (m/m). Sa povećanjem sadržaja ulja od 40 - 60 % (m/m), uočeno je da je došlo do povećanja z -ave dijametra i dijametra $d(v)_{0,99}$ (slike 5.2.23. i 5.2.24.). Međutim, stepen agregacije bio je mali, zato što je samo dijametar $d(v)_{0,99}$ bio iznad $1\text{ }\mu\text{m}$, dok su dijametri $d(v)_{0,50}$ i $d(v)_{0,90}$ još uvek bili ispod $1\text{ }\mu\text{m}$. Blaga destabilizacija koja se uočava kod ispitivanih uzoraka najverovatnije potiče od isključivanja ulja iz lipidnog matriksa tokom čuvanja uzoraka.



Slika 5.2.22. Parametri veličine čestica (LD-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant saharozu stearat nakon izrade (0 dan), nakon 90 i 180 dana

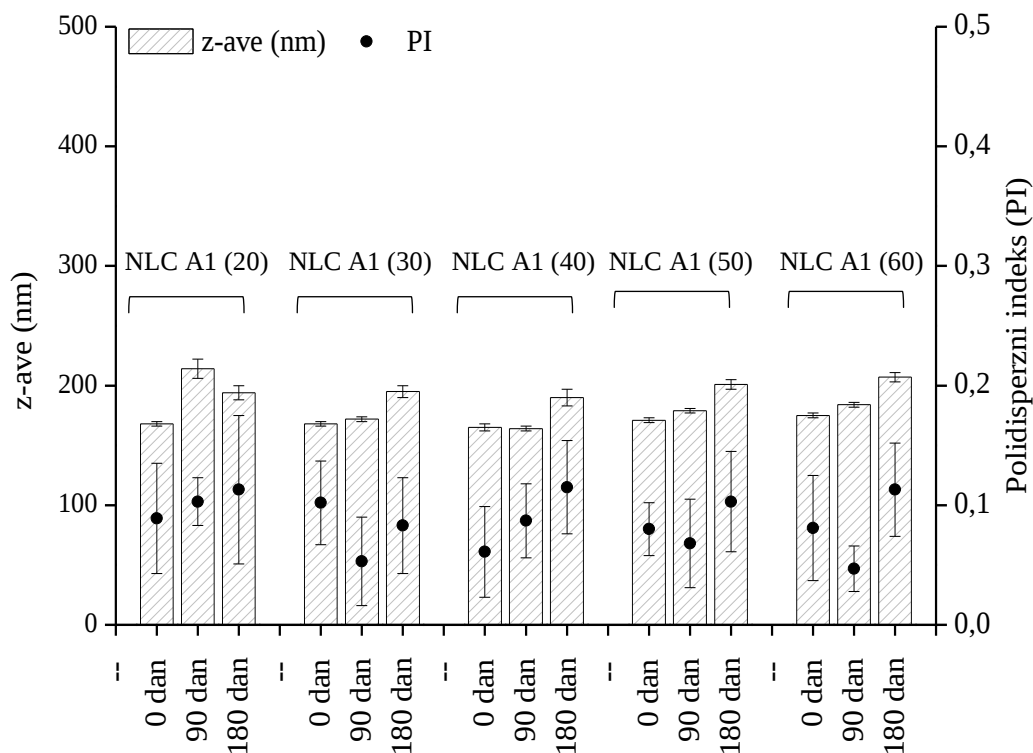


Slika 5.2.23. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant poligliceril-6 distearat nakon izrade (0 dan), nakon 90 i 180 dana

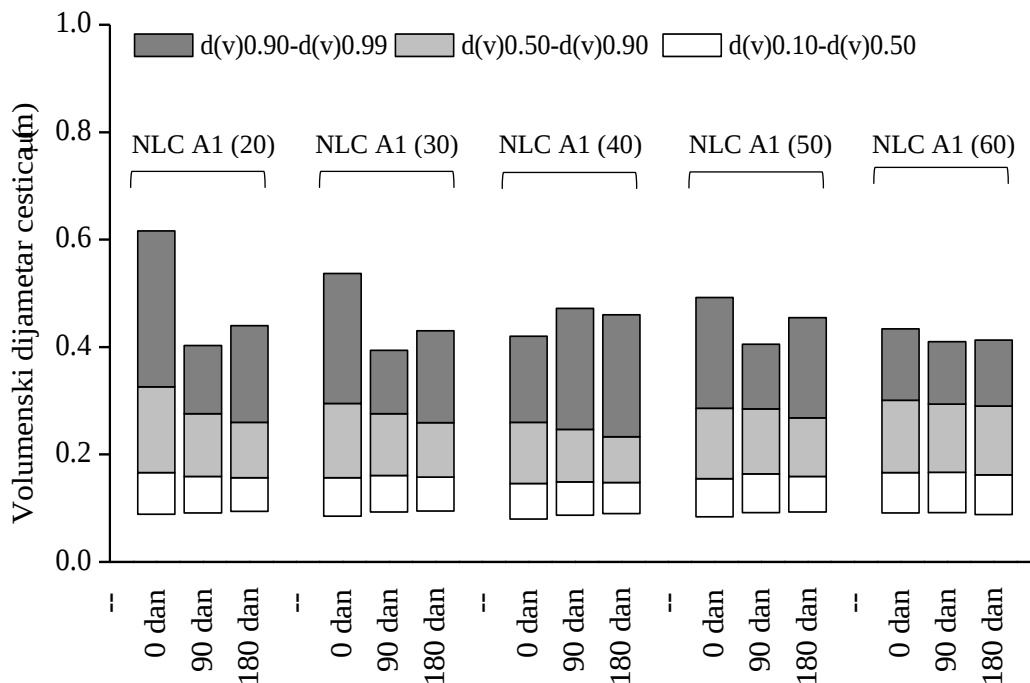


Slika 5.2.24. Parametri veličine čestica (LD-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant poligliceril-6 distearat nakon izrade (0 dan), nakon 90 i 180 dana

Povećanje sadržaja ulja od 40 - 60 % (m/m) rezultiralo je u delimičnom inkorporiranju tečnog lipida u čvrst lipidni matriks čestica. Ovakve pretpostavke potvrđene su rezultatima termalne analize. U sličnoj studiji koju su izveli Lin i sar. (2007) uočeno je da lipidne nanočestice koje se sastoje od monokaprata mogu da inkorporiraju određeni procenat triglicerida srednje dužine lanca u svoj matriks i da se veličina čestica povećava sa povećanjem udela tečnog lipida do određene granice. Nakon dostizanja ove granične vrednosti veličina čestica se smanjuje. Nasuprot formulacijama stabilizovanim poligliceril-6 distearatom i saharoza stearatom u svim formulacijama stabilizovanim C8-10 alkil poliglukozidom veličina čestica je ostala nepromenjena tokom ispitivanog perioda (slike 5.2.25. i 5.2.26.).



5.2.25. Parametri veličine čestica (PCS-podaci) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant C8-10 alkil poliglukozid nakon izrade (0 dan), nakon 90 i 180 dana



5.2.26. Parametri veličine čestica (LD-podaci) nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže surfaktant C8-10 alkil poliglukozid nakon izrade (0 dan), nakon 90 i 180 dana

Fizička stabilnost ovih uzoraka takođe je potvrđena makroskopskim pregledom. Svi uzorci su bili mlečno bele boje bez prisustva vidljivih aglomerata što je dodatno potvrdilo dobru fizičku stabilnost u ovim sistemima. Veličina čestica i fizička stabilnost disperznih sistema određeni su brojnim faktorima, među kojima su važni tip i koncentracija upotrebljenog stabilizatora. Međutim, do danas nije u potpunosti moguće predvideti veličinu i fizičku stabilnost disperzija lipidnih nanočestica bez prethodnog praktičnog rada. Sa druge strane, parametri za procenu fizičke stabilnosti disperzija kao što su zeta potencijal, veličina čestica i PI mogu da ukažu na dobru stabilnost formulacija još u ranoj fazi njihovog razvoja. U toku razvoja kozmetičkih emulzija, jedna od mogućnosti za dobijanje fino dispergovanih i fizički stabilnih formulacija je određivanje „potrebne” HLB vrednosti surfaktanta. To znači da HLB vrednost surfaktanta treba da bude što je moguće bliža HLB vrednosti unutrašnje faze. HLB vrednost stabilizatora može biti izračunata korišćenjem jednačine po *Griffin*-u ili na osnovu vrednosti koje daje proizvođač. Za lipida koji su se koristili u ovoj studiji potreban HLB vrednost je 10 za čvrst lipid i 5 za tečni lipid. Dakle, sa povećanjem količine tečnog lipida HLB vrednost se smanjuje. Surfactanti koji su se koristili u ovoj studiji imaju različite HLB vrednosti. HLB vrednost poligliceril-6 distearata je 9 - 10, C8-10 alkil poliglukozida 15 - 16, a saharoza stearata 15. Teorijski, očekivano je da će se najbolji rezultati (najmanja veličina čestica i najbolja fizička stabilnost) dobiti u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže 20 % (m/m) tečnog lipida i stabilizator poligliceril-6 distearat (HLB 9 - 10). Zaista, ove formulacije su fizički stabilne, a formulacije nanostrukturiranih lipidnih nosača koje sadrže viši procenat tečnog lipida, npr. 40 - 60 % (m/m) su manje stabilne. Međutim, veličina nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih C8-10 alkil poliglukozidom je manja od veličine nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih poligliceril-6 distearatom, iako je HLB vrednost C8-10 alkil poliglukozida mnogo viša, i samim tim ne tako blizu potrebne HLB vrednosti lipida kao kod surfaktanta poligliceril-6 distearata. Takođe, za nanostrukturirane lipidne nosače sa visokim sadržajem tečnog lipida, HLB vrednost lipidne faze je blizu HLB vrednosti poligliceril-6 distearata, ali i pored toga poligliceril-6 distearat nije bio u stanju da dovoljno efikasno stabilizuje pomenute sisteme. Sa druge strane C8-10 alkil poliglukozid koji ima visoku HLB vrednost, ispoljio je veoma dobru funkcionalnost u stabilizaciji svih ispitivanih uzoraka lipidnih nanočestica. Na osnovu

svega prethodno iznetog može se zaključiti da se teorija „potrebne” HLB vrednosti ne može iskoristiti da objasni razlike između ispitivanih stabilizatora. Naime, dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da je formulacija fino dispergovanih i fizički stabilnih lipidnih nanočestica veoma složen zadatak i do danas nedovoljno razjašnjen, te se ne može zasnivati samo na primeni pojednostavljenih pristupa kakav je npr. metod „potrebne” HLB vrednosti.

5.2.4. Ispitivanje površinskog naelektrisanja nanostrukturiranih lipidnih nosača

Zeta potencijal ispitivanih formulacija praćen je u funkciji vremena, dakle neposredno nakon izrade formulacija (dan 0) i nakon čuvanja uzoraka na kontrolisanoj sobnoj temperaturi u periodu od 90 dana. Neposredno nakon izrade vrednosti zeta potencijala kod svih ispitivanih uzoraka bile su u intervalu $|-30|$ do $|-52|$ mV što ukazuje na dobru fizičku stabilnost (Müller, 1996; Riddick, 1968).

Kao što je navedeno u poglavlju 5.1.4., izmereni zeta potencijal kod disperzija čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima potiče od Nernstovog potencijala (naelektrisanje na površini čestice) i dodatnog naelektrisanja od adsorbovanih jona surfaktanta u *Stern*-ovom sloju (Müller, 1996). Zeta potencijal čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih poligliceril-6 distearatom iznosio je $|-30|$ tj. $|-48|$ mV kada je stabilizacija izvršena C8-10 alkil poliglukozidom (tabela 5.2.3). Pretpostavlja se da naelektrisanje kod ovih čestica potiče od površinskog naelektrisanja, odnosno od disosovanih slobodnih masnih kiselina i delimično od soli prisutnih kao nečistoće u surfaktantu. Čvrste lipidne nanočestice stabilizovane C8-10 alkil poliglukozidom imale su isti sastav lipidnog matriksa kao i čestice stabilizovane poligliceril-6 distearatom, ali su vrednosti zeta potencijala bile više. Razlike u zeta potencijalu između ovih uzoraka mogu se pripisati razlikama u hemijskoj strukturi surfaktanata. C8-10 alkil poliglukozid ima jedan hidrofoban alkil lanac pričvršćen za površinu čestica i hidrofilni deo sastavljen od molekula glukoze koji penetriraju u vodenu fazu. Pretpostavlja se da glukoza stupa u interakciju sa molekulima vode, odnosno vezuje potencijalno negativno naelektrisane hidroksilne jone. Poligliceril-6 distearat ima dva hidrofobna alkil lanca i šest molekula glicerola u sredini. Ukoliko se pretpostavi da su oba hidrofobna lanca pričvršćena za površinu čestice, molekul će tada

imati strukturu nalik petlji. Pomenute razlike u strukturi surfaktanata mogu se smatrati jednim od uzroka za različite izmerene vrednosti zeta potencijala.

Tabela 5.2.3. Zeta (ζ) potencijal (mV) nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima nakon izrade (0 dan) i nakon 90 dana

Uzorak	ζ potencijal $\pm$ SD	
	0 dan	90 dan
NLC S2 (20)	-43,3 $\pm$ 0,4	-44,7 $\pm$ 0,4
NLC S2 (30)	-57,7 $\pm$ 0,3	-36,1 $\pm$ 0,8
NLC S2 (40)	-56,2 $\pm$ 0,3	-37,4 $\pm$ 1,8
NLC S2 (50)	-55,2 $\pm$ 1,6	-33,8 $\pm$ 1,3
NLC S2 (60)	-56,4 $\pm$ 0,4	-38,5 $\pm$ 0,4
NLC P1 (20)	-38,1 $\pm$ 1,4	-37,8 $\pm$ 0,3
NLC P1 (30)	-41,6 $\pm$ 0,7	-40,5 $\pm$ 0,8
NLC P1 (40)	-50,5 $\pm$ 0,4	-34,0 $\pm$ 0,6
NLC P1 (50)	-53,3 $\pm$ 4,3	-35,6 $\pm$ 0,9
NLC P1 (60)	-51,1 $\pm$ 0,9	-32,7 $\pm$ 1,3
NLC A1 (20)	-47,9 $\pm$ 0,7	-46,0 $\pm$ 0,9
NLC A1 (30)	-51,8 $\pm$ 3,9	-48,9 $\pm$ 0,9
NLC A1 (40)	-51,7 $\pm$ 2,2	-47,7 $\pm$ 1,5
NLC A1 (50)	-50,2 $\pm$ 3,9	-47,8 $\pm$ 1,0
NLC A1 (60)	-48,0 $\pm$ 2,5	-50,0 $\pm$ 2,5

Sa povećanjem udela tečnog lipida u lipidnom matriksu čestica, zeta potencijal u formulacijama stabilizovanim C8-10 alkil poliglukozidom ostaje nepromenjen. Takođe, zeta potencijal u ovim formulacijama se nije menjao ni u toku ispitivanog perioda od 90 dana, što može da bude jedan od razloga odlične fizičke stabilnosti, koja je zabeležena u ovim formulacijama. Interesantno je primetiti da se zeta potencijal lipidnih nanočestica stabilizovanih poligliceril-6 distearatom povećavao sa povećanjem sadržaja tečnog lipida (ulja) u lipidnom matriksu, odnosno zeta potencijal u formulacijama čvrstih

lipidnih nanočestica iznosio je -32 mV odnosno oko -50 mV (u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača) sa sadržajem ulja od 60 % (m/m). Ukoliko se pođe od pretpostavke da su stabilizatori na isti način locirani na površini čestica unutar svih formulacija sa rastućim udelom tečnog lipida (ulja), može se zaključiti da je povećanje u vrednostima zeta potencijala zapravo rezultat povećanja površinskog potencijala, odnosno promena na površini čestica, koje mogu između ostalog da potiču od prisustva slobodnih masnih kiselina u tečnom lipidu. Rezultati prethodnih istraživanja ukazuju na činjenicu da uljane nanopregradice u nanostrukturiranim lipidnim nosačima mogu da budu uronjene u čvrst lipidni matriks nanočestica (Müller i sar., 2002b) ili lokalizovane na površini čvrstih pločica ili sloja surfaktanta (Jores i sar., 2005). Prema tome, može se zaključiti da ovo povećanje u vrednostima zeta potencijala tokom vremena može biti rezultat promena na površini nanostrukturiranih lipidnih nosača. Promene u vrednostima zeta potencijala nisu uočene u formulacijama lipidnih nanočestica stabilizovanih C8-10 alkil poliglukozidima, što je u skladu sa pretpostavkom da surfaktanti koji se koriste za stabilizaciju lipidnih nanočestica mogu da utiču na strukturu matriksa nanočestica i lokalizaciju ulja u lipidnom matriksu čestica. Tokom 90 dana, zeta potencijal nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih poligliceril-6 distearatom se smanjio sa povećanjem udela tečnog lipida (ulja) u lipidnom matriksu čestica od 40 - 60 % (m/m), verovatno usled promena u sastavu matriksa čestica, koje dovode do promena u površinskom naelektrisanju.

Međutim, da bi se dobile preciznije informacije o ovom fenomenu neophodno je izvesti dodatna istraživanja, zbog toga što bi se u suprotnom diskutovanje potencijalnih razloga za promene u vrednostima zeta potencijala baziralo samo na izvođenju pretpostavki, bez posedovanja čvrstih dokaza. Strukturne promene su očigledno povezane sa promenama u vrsti stabilizatora, s obzirom na činjenicu da se ove promene uočavaju u prisustvu C8-10 alkil poliglukozida, a nisu uočene u prisustvu poligliceril-6 distearata. Razumevanje uticaja surfaktanata na strukturu lipidnog matriksa nanočestica bi moglo da potpomogne izbor optimalnih stabilizatora za disperzije lipidnih nanočestica. Međutim, vrednosti zeta potencijala u formulacijama lipidnih nanočestica stabilizovanih poligliceril-6 distearatom su više od - 30 mV nakon 90 dana čuvanja uzoraka na sobnoj temperaturi, te bi na osnovu teorije zeta potencijala, ove vrednosti bile u opsegu vrednosti za stabilne disperzije. Dakle, uočeni znaci nestabilnosti u uzorcima nanostrukturiranih lipidnih

nosača stabilizovanim poligliceril-6 distearatom koji sadrže 40 - 60 % (m/m) ulja bi se mogli pripisati destabilizirajućim efektima, koji nisu povezani sa rezultatima merenja zeta potencijala. Takođe, treba imati na umu da je povećanje u dijametru $d(v)_{0,90}$ u ovim formulacijama veoma malo, odnosno kao takvo ne utiče na upotrebu nanostrukturiranih lipidnih nosača u dermalnim formulacijama.

5.2.5. Karakterizacija strukture nanostrukturiranih lipidnih nosača

Pored uticaja na fizičku stabilnost, surfaktanti mogu uticati i na kristalnu strukturu lipidnog matriksa i kinetiku polimorfnih prelaza lipida nakon kristalizacije nanočestica (Garti i Yano, 2001). Uticaj surfaktanata na kristalnu strukturu lipidnog matriksa dolazi naročito do izražaja u formulacijama u čiji sastav ulaze lipidi koji imaju nisku tačku topljenja.

Na osnovu literaturnih podataka (Müller i sar., 2002a) pri nižim udelima tečnog lipida u lipidnom matriksu, molekuli tečnog lipida distribuirani su unutar čvrstog lipidnog matriksa, pa se dobija tzv. „imperfektant tip” nanostrukturiranih lipidnih nosača. Pri višim koncentracijama tečnog lipida unutar čvrstog lipidnog matriksa, tj. kada se prekorači maksimalna rastvorljivost tečnog lipida u čvrstom lipidu nastaje tzv. višestruki (multipli) tip nanostrukturiranih lipidnih nosača. Praktično dolazi do precipitacije ulja u vidu tečnih uljanih nanopregradica unutar matriksa nanostrukturiranih lipidnih nosača. Ovaj proces se odvija u toku hlađenja disperzije nanostrukturiranih lipidnih nosača. Pri višoj temperaturi, mešanje između otopljenog čvrstog i tečnog lipida je kompletno. Tokom hlađenja, rastvorljivost tečnog lipida u čvrstom lipidu se smanjuje. Usled toga dolazi do separacije faza, odnosno do obrazovanja finih kapljica ulja koje nisu inkorporirane u čvrst lipidni matriks. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da separacija faza ne može biti isključena kada se pripremaju nanostrukturirani lipidni nosači koji sadrže visok udeo tečnog lipida, pre svega zbog činjenice da se proces kristalizacije u nanodimenziji razlikuje od kristalizacije lipida u *bulk* stanju.

Na osnovu dobijenih parametara (onset temperatura, temperatura topljenja, entalpija topljenja, indeks kristalizacije) (tabela 5.2.4.) zaključeno je da je došlo do smanjenja kristalne strukture lipidnog matriksa i snižavanja onset temperature i temperature topljenja lipida u nanostrukturiranim lipidnim nosačima u odnosu na lipid u *bulk* stanju.

Takođe konstatovano je da je RI nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih poligliceril-6 distearatom i saharoza monostearatom bio viši. Interesantno je da je u ovim uzorcima došlo do smanjenja zeta potencijala tokom vremena (tabela 5.2.3).

Tabela 5.2.4. DSC parametri (onset temperatura (t_o (°C)), temperatura topljenja (t_t (°C)), ukupna entalpija topljenja (ΔH (J/g) i indeks rekristalizacije (RI)(%)) nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima nakon 90 dana čuvanja uzoraka na temperaturi od 25 ± 2 °C (temperaturni opseg 20 - 90 °C, brzina skeniranja 10 K/min)

Uzorak	t_o (°C)	t_t (°C)	ΔH (J/g)	RI (%)
NLC P1 (20)	43,61	47,97	8,15	36,97
NLC P1 (30)	43,90	46,98	4,92	22,32
NLC P1 (40)	42,73	45,77	4,32	19,59
NLC P1 (50)	42,18	45,55	2,70	12,24
NLC P1 (60)			-	
NLC A1 (20)	42,42	47,35	5,16	23,40
NLC A1 (30)	42,06	46,78	3,83	17,37
NLC A1 (40)	45,30	47,15	0,46	2,08
NLC A1 (50)			-	
NLC A1 (60)			-	
NLC S2 (20)	45,12	49,39	3,13	14,20
NLC S2 (30)	44,96	48,89	2,02	9,16
NLC S2 (40)	43,43	50,14	2,91	13,20
NLC S2 (50)			-	
NLC S2 (60)			-	

Sa druge strane, indeks kristalizacije nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih C8-10 alkil poliglukozidom bio je niži i nisu uočene promene u vrednostima zeta potencijala u funkciji vremena. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da ispitivani surfaktanti imaju izvestan uticaj na strukturu matriksa nanostrukturiranih lipidnih

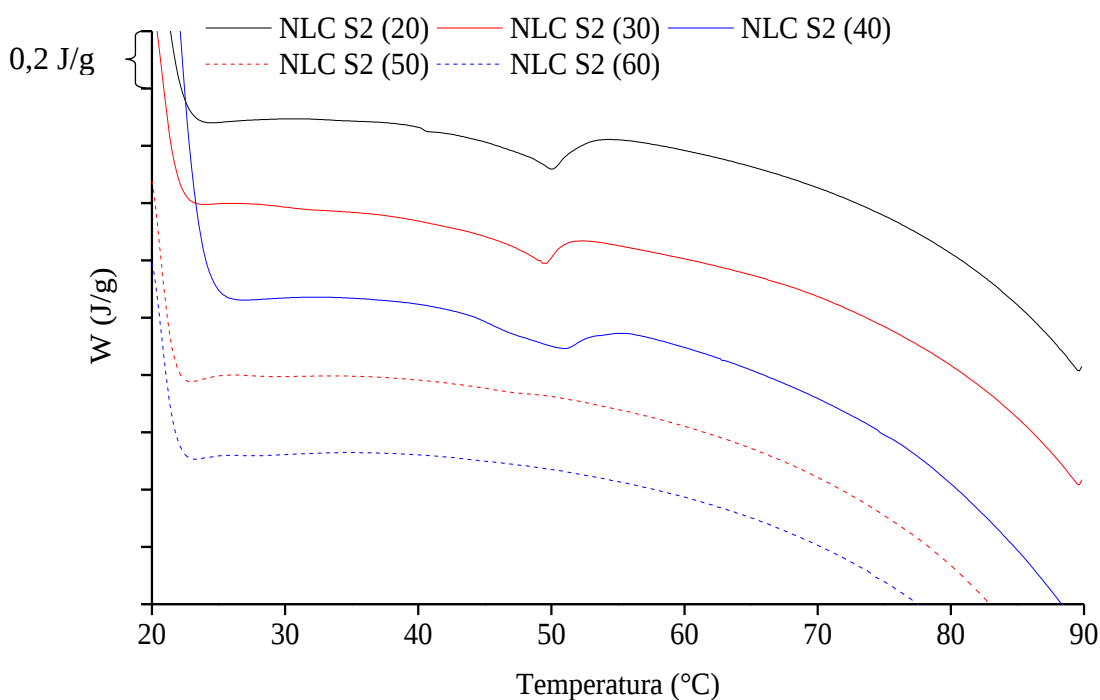
nosača što se posledično reperkutuje i na promene u fizičkoj stabilnosti. I pored činjenice da ispitivani surfaktanti pripadaju istoj hemijskoj grupi (polihidroksilni surfaktanti) postoje izvesne razlike u njihovoj hemijskoj strukturi. Razlike se uočavaju kako u strukturi hidrofilnog (poliglicerol vs. (poli)glukozid vs. šećerni estar) tako i u strukturi hidrofobnog dela surfaktanata (dužina alkil lanca). Hidrofobni deo C8-10 alkil poliglukozida sastoji se od jednog kratkog alkil lanca (C8-10) za koga se pretpostavlja da bi mogao biti zakačen za površinu čestice, dok poligliceril-6 distearat sadrži dva, a saharoza monostearat jedan hidrofobni dugi (C18) alkil lanac koji potencijalno mogu stupiti u interakciju sa lipidnim matriksom nanočestica.

U zavisnosti od lipofilnosti, surfaktanti mogu da se raspodele između vodene faze, međufaze i lipidne faze. Kada dođu u kontakt sa lipidnom fazom, surfaktanti mogu da dovedu do izvestnih promena u temperaturi topljenja i stepenu uređenosti kristalne rešetke lipidnog matriksa. U ovom radu je pokazano da surfaktanti praktični nisu imali većeg uticaja na temperaturu topljenja nanostrukturiranih lipidnih nosača, obzirom na činjenicu da su dobijene približno identične vrednosti temperature topljenja nosača stabilizovanih sa tri različita surfaktanta. Slična situacija je i u formulacijama čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih poligliceril-6 distearatom, saharoza monostearatom i C8-10 alkil poliglukozidom kada je reč o vrednostima za temperaturu topljenja.

Sa druge strane, situacija je drugačija kada je reč o RI. Kod čvrstih lipidnih nanočestica, najviši RI (60,33 %) zabeležen je u formulacijama u čiji sastav je ulazio poligliceril-6 distearat kao surfaktant (SLN P1), pa saharoza monostearat (SLN S1), dok je najniža vrednost (32,3 %) izmerena u formulaciji u čiji sastav je ulazio C8-10 alkil poliglukozid (SLN A1) (tabela 5.1.3). Slična situacija je i kod nanostrukturiranih lipidnih nosača, stabilizovanih poligliceril-6 distearat, saharoza monostearatom i C8-10 alkil poliglukozidom, nezavisno od udela tečnog lipida u lipidnom matriksu. RI nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih C8-10 alkil poliglukozidom bio je najniži, potom slede formulacije stabilizovane saharoza monostearatom, dok su najviše vrednosti RI zabeležene u formulacijama stabilizovanim poligliceril-6 distearat. Takođe interesantno je primetiti, da je RI nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanim poligliceril-6 distearatom (NLC P1 (50)) iznosio 12 %, dok u formulaciji sa C8-10 alkil poliglukozidom (NLC A1 (50)) nije bilo moguće izračunati RI. Nakon DSC analize NLC A1 (50) nije uočeno postojanje termalnog događaja, tj. disperzija se ponašala kao

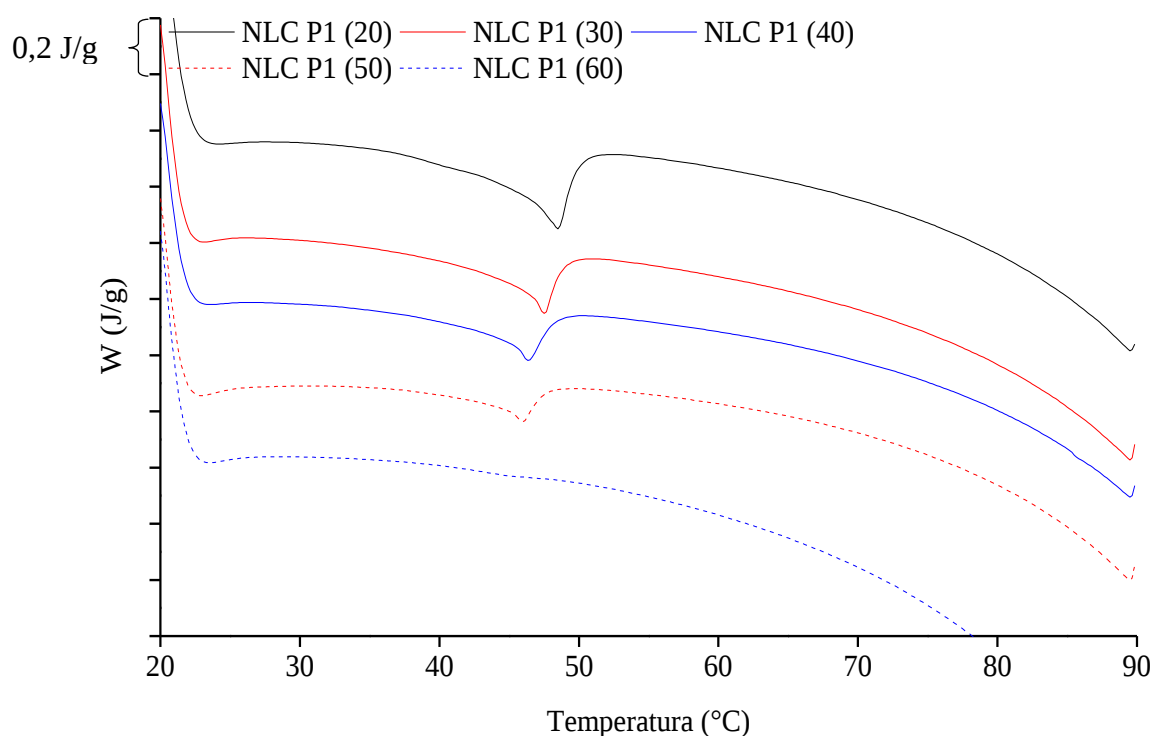
superohlađena otopina, a ne kao lipidna nanočestica sa čvrstim matriksom. Pri sadržaju tečnog lipida u lipidnom matriksu od 60 % (m/m), u sve tri formulacije nanostrukturiranih lipidnih nosača (NLC P1 (60), NLC S2 (60), NLC A1 (20)) više nisu posedovale lipidni matriks u čvrstom stanju. Ovaj podatak ukazuje na izvestan uticaj surfaktanta na kristalnu strukturu lipidnog matriksa, a takođe predstavlja i primer razlika u rekristalizaciji između *bulk* i nanomaterijala. Smanjenje temperature topljenja i entalpije topljenja, tj. rušenje uređene kristalne rešetke u nanostrukturiranim lipidnim nosačima nakon dodatka tečnog lipida identično je rušenju uređene strukture u *bulk* stanju, ali je više izraženo u nanodimenzijama. Slabije uređen matriks nanostrukturiranih lipidnih nosača pogodniji je za inkapsulaciju veće količine aktivne supstance (viši kapacitet opterećenja lekom).

Razlike u obliku DSC krivih (slike 5.2.27. - 5.2.29.) ukazuju na činjenicu da je unutrašnja struktura lipidnih nanočestica određena tipom polihidroksilnog surfaktanta koji se koristi za stabilizaciju.



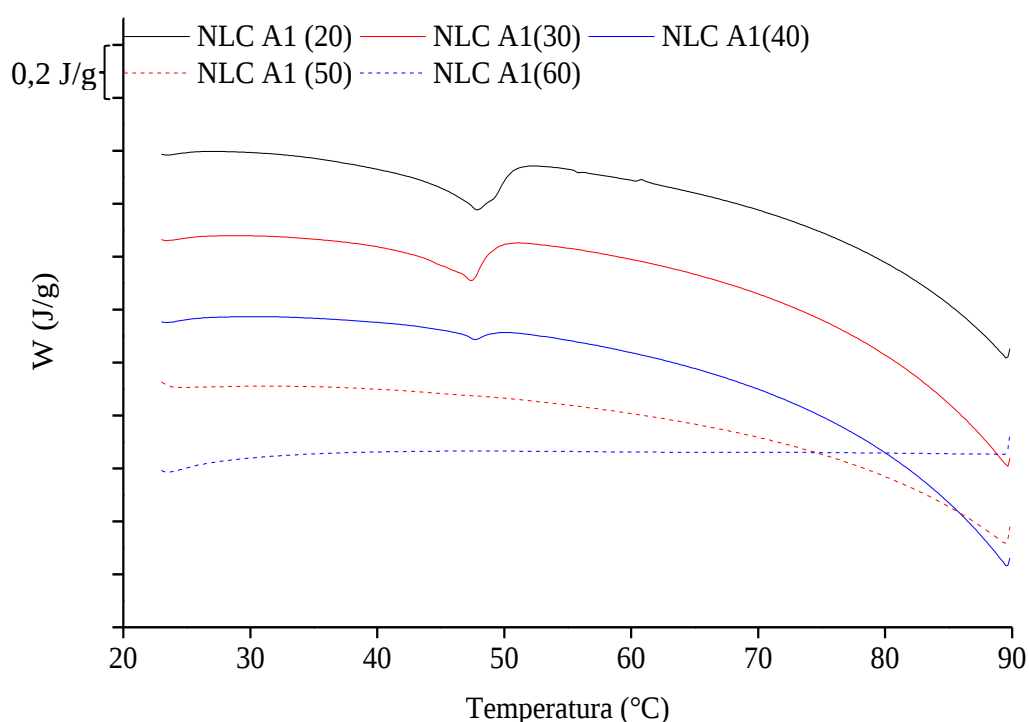
Slika 5.2.27. DSC termogrammi nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim sadržajem ulja u lipidnom matriksu stabilizovanih saharoza monostearatom. Merenja su izvedena nakon 90 dana čuvanja uzoraka na 25 ± 2 °C (krive su prikazane duž ordinate zbog bolje preglednosti)

Poznato je da surfaktanti mogu uticati na rezultujuću strukturu lipidnog matriksa nanočestica. U u/v emulzijama koje sadrže emulgatore sa dugim zasićenim lancima masnih kiselina, povećana tendencija ka kristalizaciji dispergovane faze povezana je sa obrazovanjem templata emulgatora u kapima ulja. Istraživanja na tripalmitin nanočesticama ukazala su na činjenicu da su rigidni dugi zasićeni alkil lanci surfaktanata neophodni da bi se indukovala kristalizacija lipidnog matriksa nanočestica. Poligliceril-6 distearat, surfaktant koji sadrži dug zasićeni alkil lanac (čvrst surfaktant) može inicirati kristalizaciju lipidnog matriksa nanočestica, čime se objašnjavaju više vrednosti indeksa rekristalizacije dobijene u uzorcima nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih ovim surfaktantom. Usled afiniteta surfaktanta (poligliceril-6 distearata) za cetil palmitat, mali deo molekula surfaktanta može biti lokalizovan u lipidnoj fazi (particioni koeficijent) i tako unaprediti rekristalizaciju lipidnog matriksa. Deo surfaktanta može biti uključen u lipidni matriks nanočestica, odnosno ne mora samo biti vezan za površinu nanočestice.



Sika 5.2.28. DSC termogrami nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim sadržajem ulja u lipidnom matriksu stabilizovanih poligliceril-6 distearatom. Merenja su izvedena nakon 90 dana čuvanja uzoraka na 25 ± 2 °C (krive su prikazane duž ordinate zbog bolje preglednosti)

Nasuprot tome, C8-10 alkil poliglukozid sa kratkim hidrofnim alkil lancima (tečni surfaktant) manje je hidrofan i stoga u manjoj meri lokalizovan u lipidnom matriksu nanočestice, s obzirom da je suviše mobilan da bi indukovao kristalizaciju lipida u nanostrukturiranim lipidnim nosačima koji sadrže visok udeo tečnog lipida. Ovaj surfaktant verovatno obrazuje fluidniju, manje rigidnu membranu oko kapi nanometarskih veličina sa nižim mikroviskozitetom. Stoga, poligliceril-6 distearat (sa rigidnim lipidnim ostatkom) dovodi do različite interakcije sa molekulima lipidnog matriksa u odnosu na C8-10 alkil poliglukozid (surfaktant sa mobilnijim ostatkom).



Slika 5.2.29. DSC termogrammi nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim udelom ulja u lipidnom matriksu stabilizovanih C8-10 alkil poliglukozidom. Merenja su izvedena nakon 90 dana čuvanja uzoraka na temperaturi od 25 ± 2 °C (krive su prikazane duž ordinate zbog bolje preglednosti)

Onset temperatura i temperatura topljenja čvrstih lipidnih nanočestica i nanostrukturiranih lipidnih nosača bile su više od 40 °C što je naročito važno kod nosača lekovitih i kozmetički aktivnih supstanci koje treba da ostvare svoje delovanje na koži. Za ovakve čestice postoji zahtev da one treba da ostanu u čvrstom agregatnom stanju kada se primene na kožu. Nanostrukturirani lipidni nosači stabilizovani poligliceril-6 distearatom poseduju viši indeks kristalizacije od nosača stabilizovanih

C8-10 alkil poliglukozidom. Lipidni matriks sa uređenijom strukturom lipidnog matriksa može da dovede do separacije faza, odnosno isključenja lekovite supstance ili takođe potencijalno do isključenja tečnog lipida iz čvrstog lipidnog matriksa, što posledično može dovesti do promena u površinskom sastavu lipidnih nanočestica i promena u Nernstovom i zeta potencijalu. S obzirom da se zeta potencijal smanjuje tokom vremena, ovaj fenomen može takođe da dovede do nestabilnosti sistema.

5.3. Rezultati i diskusija treće faze istraživanja

5.3.1. Selekcija i karakterizacija lipida za pripremu lipidnih nanočestica sa takrolimusom

5.3.1.1. Određivanje rastvorljivosti takrolimusa u lipidima

S obzirom na činjenicu da do danas još uvek ne postoje definisane smernice za određivanje rastvorljivosti model lekovite supstance u čvrstom lipidu, u ovom radu, 1 % (m/m) takrolimusa je dodato u različite lipide koji se mogu koristiti kao lipidni matriks nanočestica. Lipidi koji su se koristili u studiji rastvorljivosti bili su voskovi (karnauba vosak, beli pčelinji vosak, cetil palmitat) i acilgliceroli koji su se razlikovali u sadržaju monoglicerida i dužini lanca masnih kiselina (tabela 5.3.1.), zbog čega je bilo neophodno uraditi karakterizaciju izabranih lipida, da bi se mogli izabrati odgovarajući lipidi. Rezultati eksperimenata su pokazali da se takrolimus praktično ne rastvara u voskovima, a slabo se rastvara u trigliceridima i smeši diglicerida i triglicerida (gliceril tristearat, gliceril tripalmitat, gliceril trimiristat, smeša gliceril distearata, tristearata, dipalmitata i tripalmitata, smeša gliceril mono-, di- i tribehenata). Najveća količina takrolimusa (~ 200 mg/g) rastvorila se u smeši monoglicerida i diglicerida (gliceril monokaprilat/monokaprat, gliceril monolaurat, gliceril monostearat).

Tabela 5.3.1. Pregled lipida (komercijalno i hemijsko ime) i vreme potrebno da se rastvori takrolimus [(+) rastvoren, (-) nerastvoren]

Lipid (komercijalno ime)	Lipid (hemijsko ime)	vreme (min)			
		15	30	45	60
Apifil	PEG-8 beli pčelinji vosak	-	-	-	-
Bees wax white	beli pčelinji vosak	-	-	-	-
Carnauba wax 2442L	karnauba vosak	-	-	-	-
Compritol HD5ATO	behenoil polioksil 8-gliceridi	-	-	-	-
Compritol® 888 ATO	gliceril monobehenat, gliceril dibehenat i gliceril tribehenat	-	-	+	+
Cutina® CP	cetil palmitat	-	-	-	-
Dynacet® 211	acetilovani gliceridi	-	+	+	+
Dynasan® 110	gliceril trikaprilat	-	-	-	+
Dynasan® 114	gliceril trimiristat	-	-	-	-
Dynasan® 116	gliceril tripalmitat	-	-	-	-
Dynasan® 118	gliceril tristearat	-	-	+	+
Imwitor® 900 P	gliceril monostearat	+	+	+	+
Imwitor® 308	gliceril monokaprilat i gliceril monokaprat	+	+	+	+
Imwitor® 312	gliceril monolaurat	+	+	+	+
Precirol® ATO	gliceril distearat, tristearat, dipalmitat i tripalmitat	-	-	+	+
Softisan® 142	hidrogenovani koko-gliceridi	-	-	-	-
Softisan® 154	hidrogenovano palmينو ulje	-	-	-	-
Miglyol® 812	trigliceridi, srednje dužine lanca	-	-	+	+
Eutanol® G	oktil dodekanol	-	-	+	+
Hemp seed oil	-	-	-	-	-

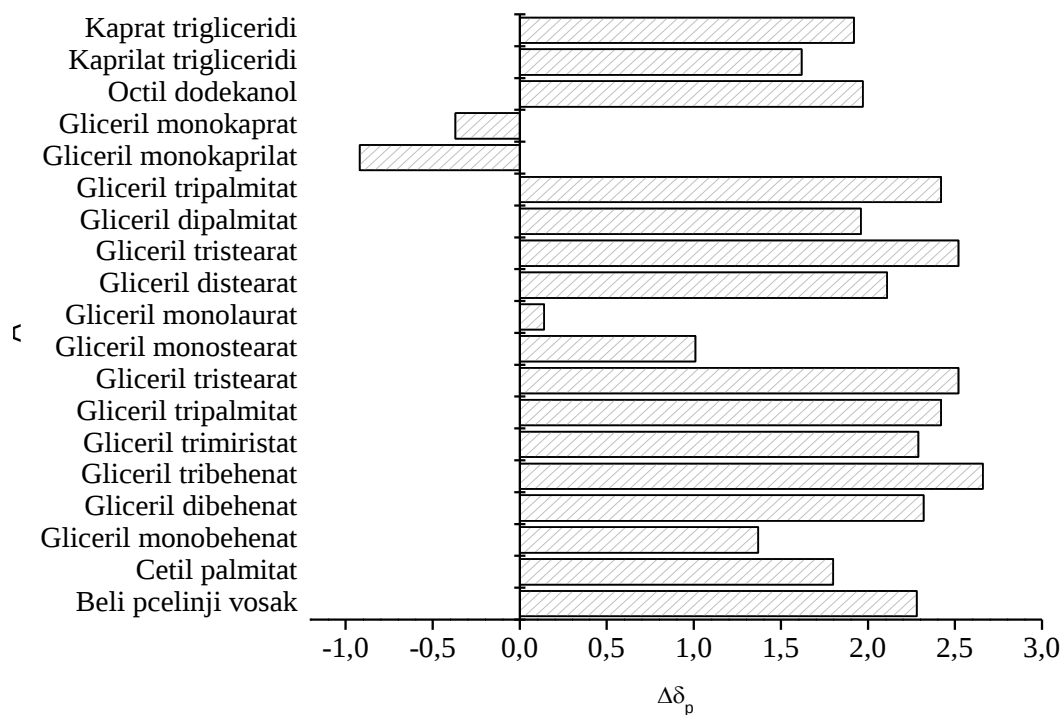
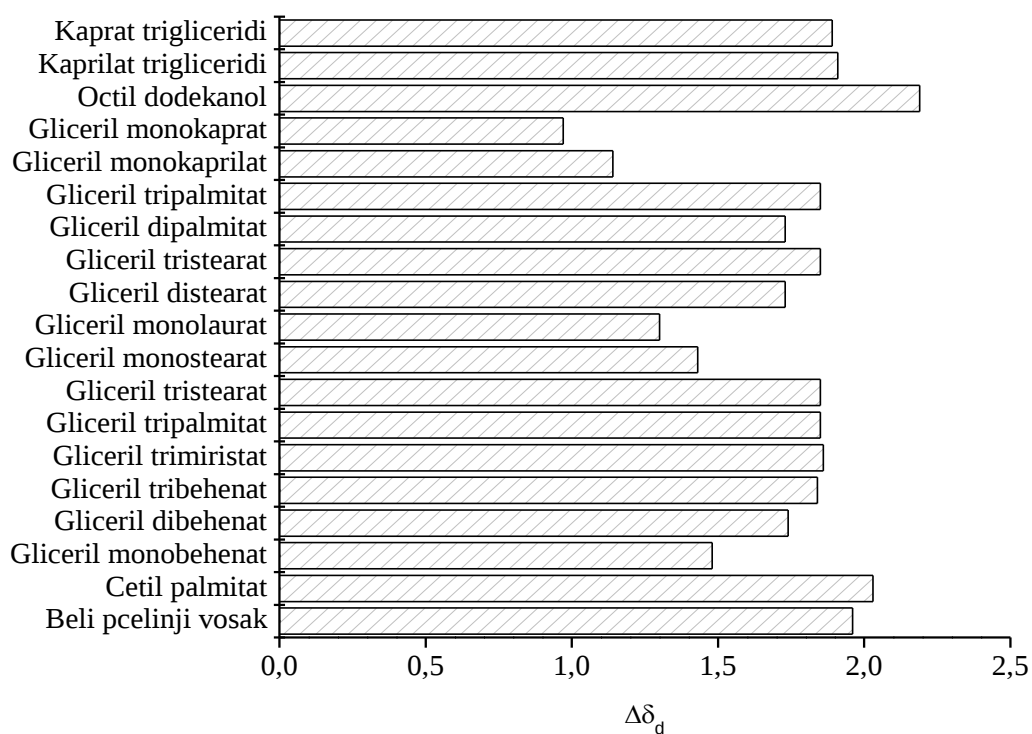
5.3.1.2. Izračunavanje parametara rastvorljivosti takrolimusa u lipidima i analiza podataka

Pored eksperimentalnog pristupa u selekciji lipida za matriks nanočestica, poslednjih godina, od strane nekih istraživača predlaže se kombinovana primena eksperimentalnog i teorijskog pristupa u određivanju rastvorljivosti model lekovitih supstanci u čvrstim lipidima (Li i sar., 2006; Shah i Agrawal, 2013). U tabeli 5.3.2. prikazane su razlike u parcijalnim parametrima rastvorljivosti, ukupnim parametrima rastvorljivosti i polarnosti između takrolimusa i lipida. Vrednosti entalpije mešanje (ΔH_M) između takrolimusa i lipida pružaju informacije o količini energije koja je potrebna da se postigne uzajamno mešanje lipida i leka. Prema tome, najbolje mešanje leka (rastvorena supstanca) i lipida (koji se smatra rastvaračem) očekuje se kada su intermolekularne sile (disperzione, polarne i sile vodoničnog vezivanja) između rastvorene supstance i rastvarača (čvrsta ili tečna komponenta sa kojom se rastvorena supstance meša) slične (Barton, 1991). Uzimajući u obzir razlike u ukupnim parametrima rastvorljivosti, polarnosti i entalpiji mešanja između takrolimusa i lipida (slike 5.3.1. i 5.3.2.) zaključuje se da su najbolji kandidati za rastvaranje takrolimusa gliceril monokaprat/monokaprilat, gliceril monolaurat, gliceril monostearat i gliceril behenat. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su teorijski izračunate vrednosti parametara rastvorljivosti u skladu da eksperimentalno dobijenim podacima.

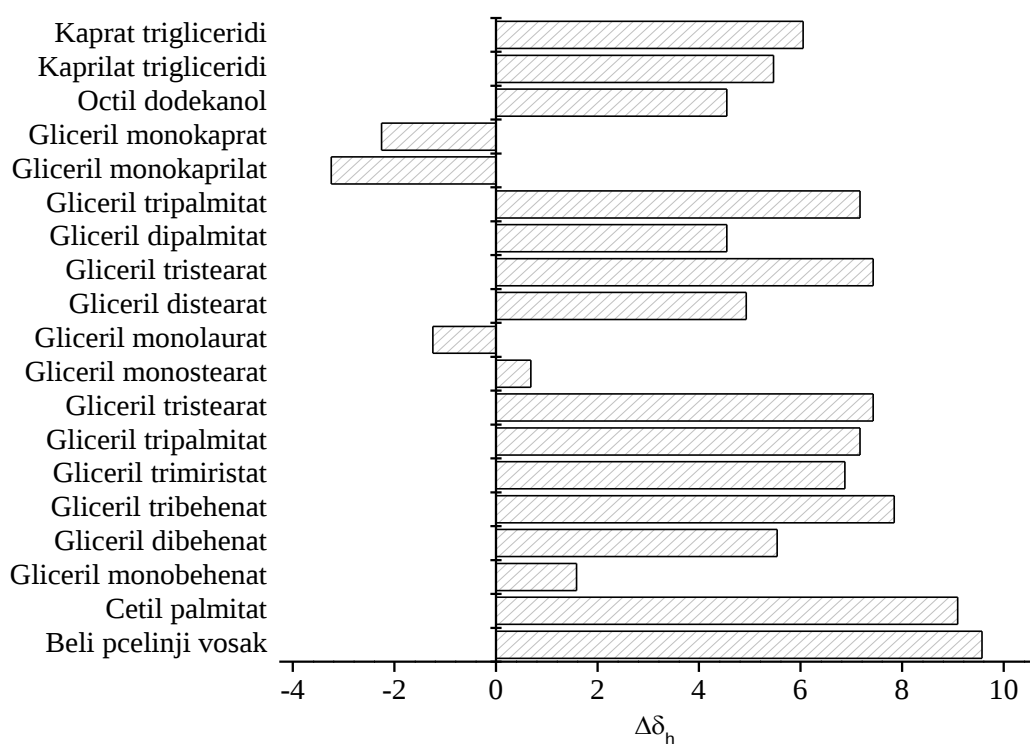
Uzimajući u obzir činjenicu da su gliceril monokaprat/monokaprilat i gliceril monolaurat lipidi sa niskom temperaturom topljenja koji imaju veliku sklonost ka stvaranju dodatnih koloidnih struktura (tečni kristali, micle, vezikule) u disperzionom medijumu, koje mogu biti potencijalno mesto lokalizacije leka, ovi lipidi su isključeni iz istraživanja i formulacija je nastavljena sa gliceril monostearatom i gliceril behenatom.

Tabela 5.3.2. Izračunate vrednosti parametra parcijalne rastvorljivosti (δ_d , δ_p , δ_h), ukupne rastvorljivosti (δ_{total}) i polarnosti takrolimusa i različitih lipida

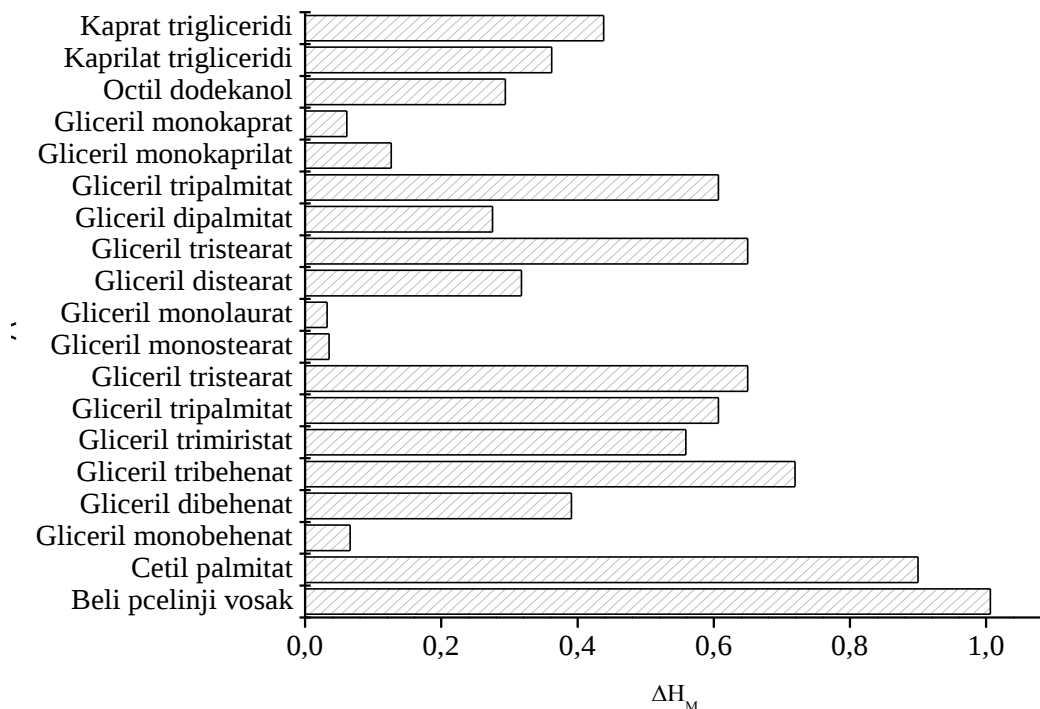
Lekovita supstanca/lipid	Hemijski sastav	δ_d	δ_p	δ_h	δ_{total}	Polarnost
Takrolimus	-	18,55	3,40	12,11	22,41	0,315
Beli pčelinji vosak	triakontanil palmitat (glavna komponenta)	16,59	1,12	2,54	16,82	0,027
Cutina [®] CP	Cetil palmitat	16,52	1,60	3,02	16,87	0,041
Compritol [®] 888 ATO	Gliceril monobehenat	17,07	2,03	10,52	20,15	0,280
	Gliceril dibehenat	16,81	1,08	6,57	18,08	0,140
	Gliceril tribehenat	16,71	0,74	4,27	17,27	0,062
Dynasan [®] 114	Gliceril trimiristat	16,69	1,11	5,24	17,53	0,093
Dynasan [®] 116	Gliceril tripalmitat	16,70	0,98	4,94	17,43	0,083
Dynasan [®] 118	Gliceril tristearat	16,70	0,88	4,68	17,37	0,075
Imwitor [®] 900P	Gliceril monostearat	17,12	2,39	11,42	20,72	0,317
Imwitor [®] 312	Gliceril monolaurat	17,25	3,26	13,35	22,05	0,390
	Gliceril distearat	16,82	1,29	7,18	18,33	0,160
	Gliceril tristearat	16,70	0,88	4,68	17,37	0,075
Precirol [®] ATO	Gliceril dipalmitat	16,82	1,44	7,56	18,50	0,170
	Gliceril tripalmitat	16,70	0,98	4,94	17,43	0,083
	Gliceril monokaprilat	17,41	4,32	15,35	23,61	0,460
Imwitor [®] 308	Gliceril monokaprat	17,58	3,77	14,36	23,01	0,416
Eutanol G	Octil dodekanol	16,36	1,43	7,56	18,08	0,180
Miglyol [®] 812	Kaprilat trigliceridi	16,64	1,78	6,64	18,00	0,150
	Kaprat trigliceridi	16,66	1,48	6,06	17,79	0,120



Slika 5.3.1. Razlike u parcijalnim parametrima rastvorljivosti ($\Delta\delta_d$, $\Delta\delta_p$ i $\Delta\delta_h$) između takrolimusa i lipida



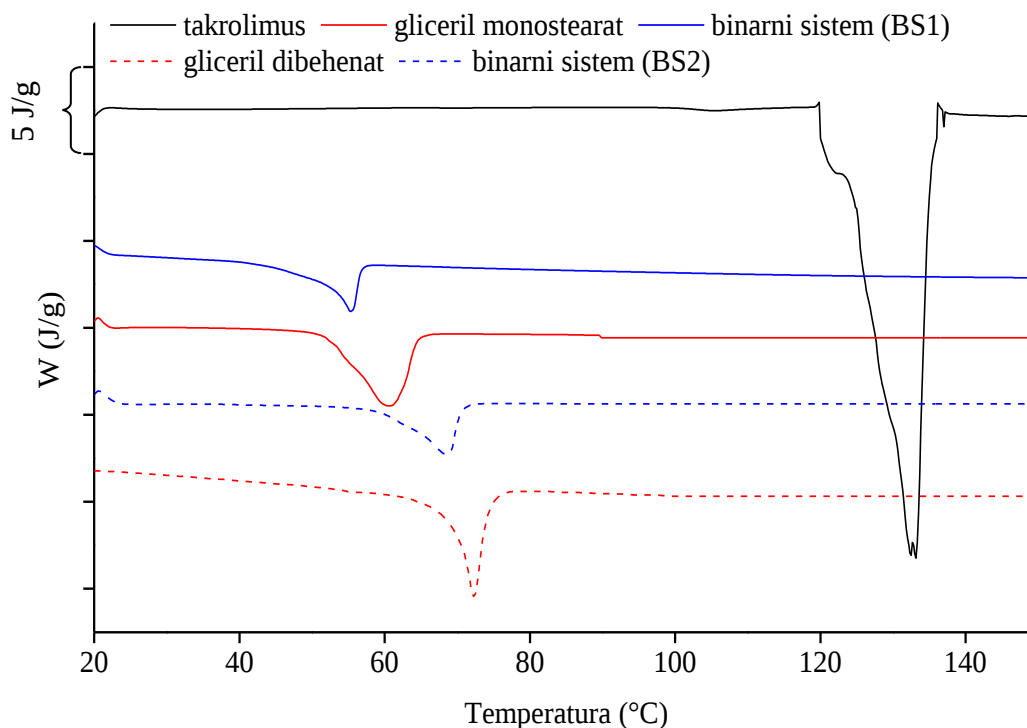
Slika 5.3.1. Razlike u parcijalnim parametrima rastvorljivosti ($\Delta\delta_\phi$, $\Delta\delta_p$ i $\Delta\delta_h$) između takrolimusa i lipida (nastavak)



Slika 5.3.2. Razlike u entalpijama mešanja (ΔH_M) između takrolimusa i lipida

5.3.1.3. Karakterizacija lipida i smeše lipida sa model lekovitim supstancom

Interakcija između takrolimusa i gliceril monostearata analizirana je termalnom analizom i difrakcijom X zraka pod širokim uglom. Na slici 5.3.3. i u tabeli 5.3.3. prikazani su rezultati DSC analize takrolimusa, gliceril monostearata, gliceril dibehenata i binarnog sistema koji se sastoji od takrolimusa i gliceril monostearata (BS1), tj. takrolimusa i gliceril dibehenata (BS2). U oba binarna sistema sadržaj takrolimusa iznosio je 1 % (m/m). S obzirom da u binarnim sistemima nisu uočeni endotermni događaji koji potiču od takrolimusa, može se pretpostaviti da je lekovita supstanca (i) rastvorena, (ii) solubilizovana ili (iii) prisutna u amorfnom obliku u pomenutim lipidima (gliceril monostearata i gliceril dibehenata).



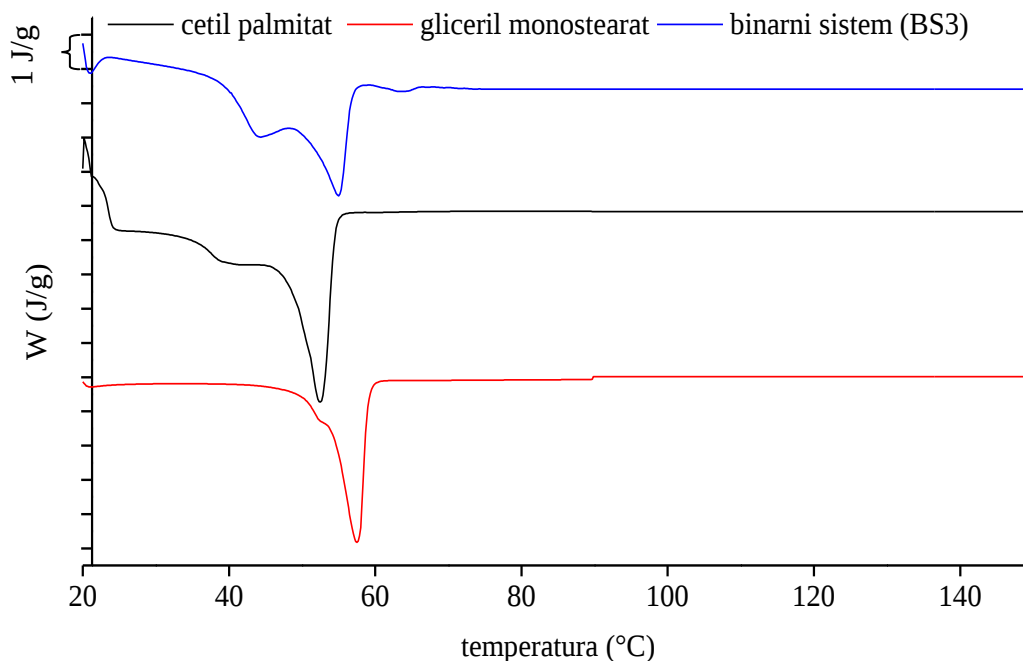
Slika 5.3.3. DSC profili takrolimusa, gliceril monostearata, gliceril dibehenata i binarnih sistema BS1 i BS2

Tabela 5.3.3. Parametri DSC analize (onset temperatura (t_0 (°C)), temperatura topljenja (t_t (°C)) i ukupna entalpija topljenja (ΔH (J/g)) takrolimusa, gliceril monostearata, gliceril dibehenata i binarnih sistema BS1 i BS2

Uzorak	t_0 (°C)	t_t (°C)	ΔH (J/g)
takrolimus	124,91	130,18	1031,12
gliceril monostearat	53,18	60,31	192,33
gliceril dibehenat	68,89	71,86	102,76
binarni sistem (BS1)	51,12	55,17	89,42
binarni sistem (BS2)	67,49	73,80	117,81

Gliceril monostearat je korišćen kao čvrst lipid za lipidne nanočestice, ali u specifikaciji proizvođača i u radovima nekih autora (Bhalekar i sar., 2009) se navodi da se on pre može smatrati surfaktantom, nego čvrstim lipidom. S tim u vezi u ovom radu, gliceril monostearat se mešao sa cetil palmitatom, čvrstim lipidom koji se najčešće koristi kao matriks lipidnih nanočestica. U cilju dobijanja homogenog matriksa lipidnih nanočestica, tj. izbegavanja mogućeg razdvajanje lipida i formiranja odvojenih struktura u disperzionom medijumu, koje bi potencijalno mogle postati mesto lokalizacije lekovite supstance, odabrane komponente treba da se mešaju dobro u odnosu koji se koristi za pripremu lipidnog matriksa nanočestica. Da bi se izbegla separacija lipida cetil palmitat i gliceril monostearat su se mešali u masenom odnosu 8:2. Nakon pripreme dobijeni binarni sistem (BS3) je podvrgnut DSC i WAXD analizi. Komparativno sa ovom analizom izvedena je i DSC i WAXD analiza cetil palmitata i gliceril monostearata nakon njihovog izlaganja temperaturi od 65 °C u trajanju od 1 h. Nakon DSC analize kod cetil palmitata uočeno je prisustvo dva endotermna pika (slika 5.3.4., tabela 5.3.4.). Prvi pik sa nižom temperaturom topljenja odgovara α -polimorfnom obliku (termodinamička nestabilna modifikacija lipida), dok drugi pik odgovara β -polimorfnom obliku (stabilna modifikacija lipida) (Saupe i sar., 2005). Nakon termalne analize gliceril monostearata uočeno je prisustvo jednog endoternog pika, sa ekstrapolisanom onset temperaturom i temperaturom topljenja od 53,41 i 57,29 °C. Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa rezultatom do koga je došla Radtke (2003). Nakon dodatka gliceril monostearata u cetil palmitat (binarni sistem BS3) uočeno je prisustvo samo termalnog događaja koji potiče od cetil palmitata. Odsustvo dodatnih

termalnih događaja ukazuje na činjenicu da je gliceril monostearat ugrađen u lamelarnu strukturu cetil palmitata barem u datom odnosu masa (slika 5.3.4., tabela 5.3.4).



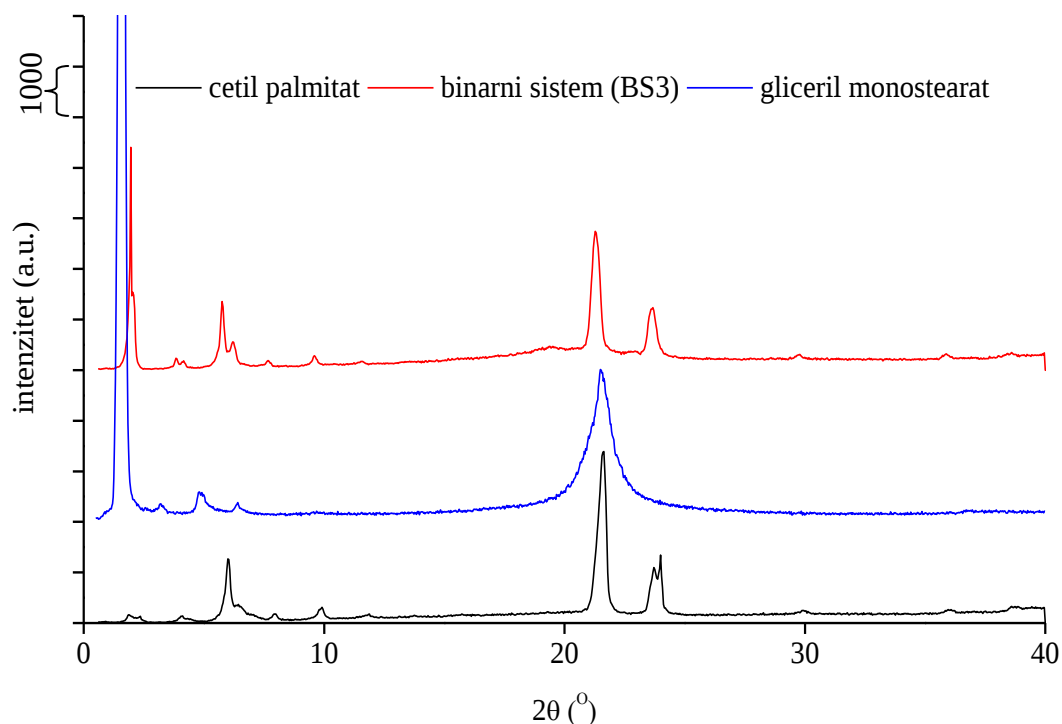
Slika 5.3.4. DSC profili cetil palmitata, gliceril monostearata (nakon izlaganja temperaturi od 65 °C u trajanju od 1 h) i binarnog sistema BS3

Tabela 5.3.4. Parametri DSC analize ((onset temperatura (t_o (°C)), temperatura topljenja (t_t (°C)), ukupna entalpija topljenja (ΔH (J/g) i razlika između t_t i t_o) gliceril monostearata, cetil palmitata (nakon izlaganja temperaturi od 65 °C u trajanju od 1 h) i binarnog sistema BS3

Uzorak	t_o (°C)	t_t (°C)	ΔH (J/g)	$t_t - t_o$ (°C)
gliceril monostearat	53,41	57,29	120,92	3,88
cetil palmitat	47,89	52,44	220,46	4,55
binarni sistem (BS3)	43,09	49,75	186,99	6,66

WAXD profili cetil palmitata, gliceril monostearata (nakon izlaganja temperaturi od 65 °C u trajanju od 1 h) i binarnog sistema BS3 prikazani su na slici 5.3.5. Na WAXD difraktogramima cetil palmitata uočavaju se dva pika većeg intenziteta na 21,3° i 23,3° i jedan pik manjeg intenziteta na 6,1°. Na WAXD difraktogramu gliceril monostearata uočava se jedan pik na 21,4° i jedan pik veoma velikog intenziteta na 1,6°. U binarnom sistemu BS3 uočavaju se refleksije na 1,96°, 5,7°, 21,2° i 23,5° koje dominantno

odgovaraju refleksijama karakterističnim za cetil palmitat, što ukazuje na činjenicu da je gliceril monostearat uklopljen u strukturu cetil palmitata bar u datom odnosu masa. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima DSC analize.



Slika 5.3.5. WAXD profili cetil palmitata, gliceril monostearata (nakon izlaganja temperaturi od 65 °C u trajanju od 1 h) i binarnog sistema BS3

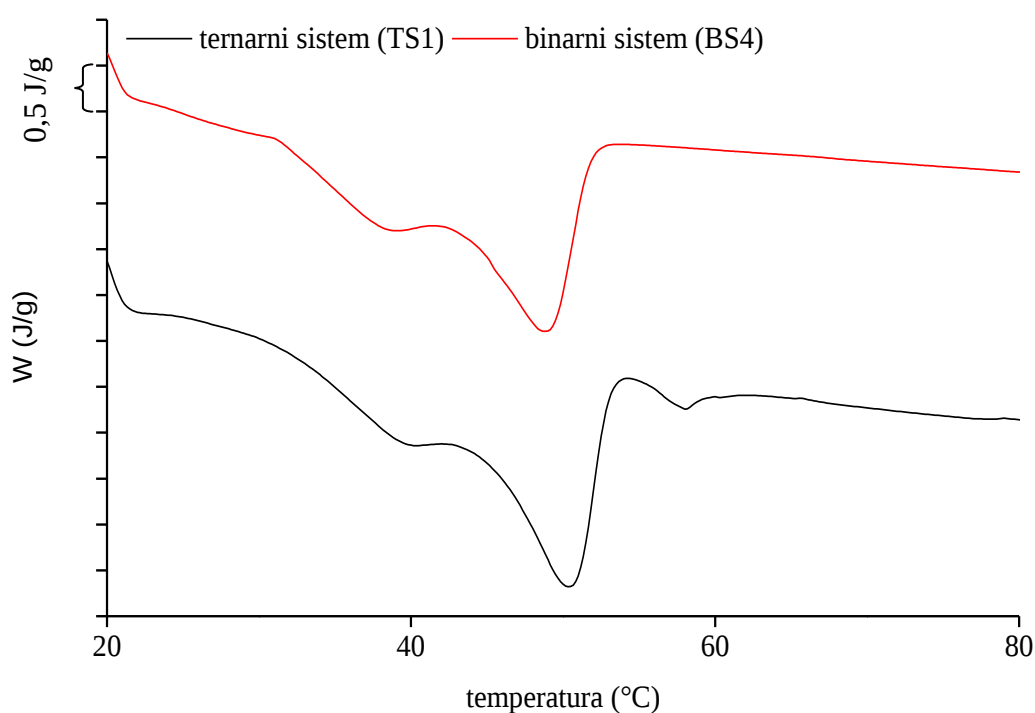
U nastavku studije u cilju povećanja kapaciteta inkapsulacije takrolimusa u lipidne nanočestice, tj. obrazovanja nanostrukturiranog lipidnog matriksa izvršena je supstitucija dela čvrstog lipida (binarni sistem BS3 i gliceril dibehenat) tečnim lipidom (trigliceridi srednje dužine lanca). Na osnovu literaturnih podataka (Müller i sar., 2002b) pretpostavilo se da će dodavanje triglicerida srednje dužine lanaca u binarni sistem BS3 i gliceril dibehenat imati za posledicu formiranje neuređenog lipidnog matriksa koji će obezbediti prostor za inkorporiranje lekovite supstance. Trigliceridi srednje dužine lanca su izabrani kao tečni lipid za nanostrukturirane lipidne nosače, zbog toga što se oni mešaju sa cetil palmitatom i gliceril monostearatom, lipidima koji ulaze u sastav binarnog sistema BS3, odnosno sa gliceril dibehenatom kao i zbog činjenice da se lekovita supstanca rastvara u ovom tečnom lipidu. U cilju dobijanja homogenog lipidnog matriksa, izabrani čvrsti i tečni lipid treba da se dobro mešaju u

datom odnosu masa. Ukoliko tečni lipid ne formira homogeni lipidni matriks sa čvrstim lipidom moglo bi da dođe do preraspodele tečnog lipida u disperzioni medijum i formiranja dodatnih koloidnih struktura (u/v nanoemulzija), koje nisu nanostrukturirani lipidni nosači. Inicijalno, inkorporiranje triglicerida srednje dužine lanca u binarni sistem BS3 i gliceril dibehenat ispitivano je nakon nanošenja dela binarnog lipidnog sistema na hidrofilan filter papir. Obzirom da na filter papiru nije uočeno prisustvo kapi ulja koje bi poticale od nekompletnog mešanja lipida pretpostavilo se da se tečni lipid dobro meša sa čvrstim lipidima, barem u datom masenom odnosu.

Obrazovanje homogenog lipidnog matriksa u ternarnom sistemu (TS1) koji se sastojao od cetil palmitata, gliceril monostearata i triglicerida srednje dužine lanaca dodatno je ispitano termalnom analizom i rezultati su prikazani na slici 5.3.6. i u tabeli 5.3.5. Na osnovu rezultata termalne analize uočeno je da je došlo do sniženja onset temperatura i temperatura topljenja ternarnog sistema TS1 u odnosu na binarni sistem BS3. Pored toga i entalpija topljenja ternarnog sistema TS1 u odnosu na binarni sistem BS3 smanjila se od 186,99 - 136,90 J/g. Na osnovu literaturnih podataka (Bunjes, 1998) da smanjenje temperature topljenja i entalpije topljenje ukazuju na rastvaranje/mešanje jednog jedinjenja sa drugim, zaključeno je da se čvrst i tečan lipid dobro mešaju u odabranom odnosu masa.

U sledećem koraku razvoja formulacije nanostrukturiranih lipidnih nosača, gliceril monostearat je kompletno zamenjen trigliceridima srednje dužine lanca (binarni sistem, BS4). Očekivalo se da će nakon dodatka veće količine ulja, rastvorljivost tečnog lipida u čvrstom lipidu biti prekoračena. Prema Müller i sar. (2002b) u ovom slučaju tokom procesa hlađenja dolazi do izdvajanja ulja i njegovog taloženja u vidu uljanih nanopregradica na površini čvrstog lipida. Uljane nanopregradice mogu da budu homogeno distribuirane kroz lipidni matriks čestica (original model) (Muller i sar. 2002a), locirane u rezervoaru ili u membrani čestica (Saupe i sar., 2005). U tom smislu bilo je neophodno ispratiti uticaj triglicerida srednje dužina lanca na kristalnu strukturu cetil palmitata. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na slici 5.3.6. i u tabeli 5.3.5. Na osnovu rezultata termalne analize binarnog sistema BS4 uočeno je postojanje termalnog događaja nižeg intenziteta pri temperaturi od 38,94 °C i termalnog događaja višeg intenziteta pri temperaturi od 48,70 °C sa ekstrapolisanim onset temperaturom od 39,88 °C. U odnosu na cetil palmitat, u *bulk* stanju (tabela 5.3.4.), uočeno je da je u binarnom

sistemu BS4 došlo do sniženja entalpije topljenja i temperature topljenja. Istovremeno, uočeno je i izvesno proširenje termalnog događaja, koje se reflektovalo u povećanju razlike između temperature topljenja i onset temperature ($t_t - t_o$), kao i smanjenje visine pika, odnosno površine ispod krive (slike 5.3.4. i 5.3.6.). Širina termalnog događaja predstavlja temperaturni opseg unutar kome dolazi do topljenja. Prema nekim autorima (Severino i sar., 2012; Westesen i Siekmann, 1993) veća širina termalnog događaja ima za rezultat veći stepen neuređenosti kristalne rešetke lipida. Sniženje entalpije topljenja zajedno sa proširenjem termalnog događaja i smanjenjem intenziteta endoternog pika, mogu tkđ. biti pokazatelji smanjenja stepena kristaliniteta cetil palmitata nakon dodatka triglicerida srednje dužine lanca.

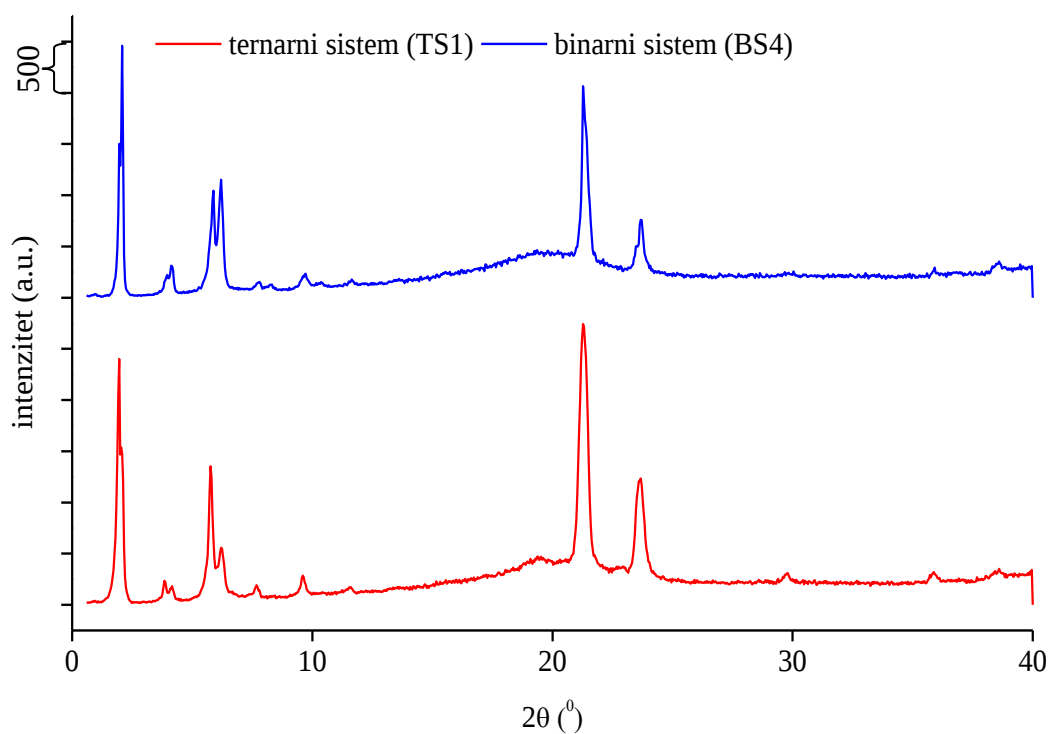


Slika 5.3.6. DSC profili ternarnog sistema (TS1) i binarnog sistema (BS4)

Tabela 5.3.5. Paramateri DSC analize (onset temperatura (t_o (°C)), temperatura topljenja (t_t (°C)), ukupna entalpija topljenja (ΔH (J/g)) i razlika između t_t i t_o kod binarnog sistema (BS4) i ternarnog sistema (TS1)

Uzorak	t_o (°C)	t_t (°C)	ΔH (J/g)	$t_t - t_o$ (°C)
binarni sistem (BS4)	39,88	48,70	124,29	8,82
ternarni sistem (TS1)	42,55	50,11	136,90	7,56

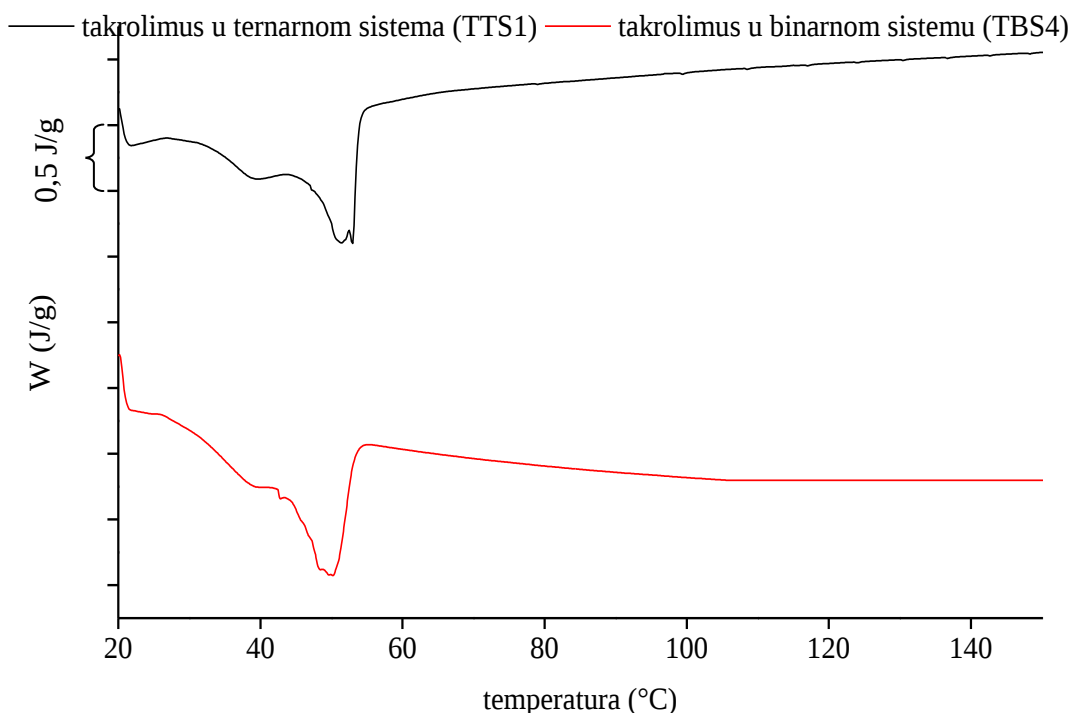
Rezultati WAXD analize ternarnog sistema TS1 i binarnog sistema BS4 prikazani su na slici 5.3.7. Na WAXD difraktogramima ternarnog sistema uočavaju se dva pika većeg intenziteta na $21,3^\circ$ i na $23,3^\circ$ i jedan pik manjeg intenziteta na $6,1^\circ$. Pik na $1,6^\circ$ koji odgovara gliceril monostearata znatno slabije je izražen u odnosu na pik uočen kod čistog gliceril monostearata (slika 5.3.5.) što ukazuje na činjenicu da je gliceril monostearat uklopljen u strukturu cetil palmitata barem u datom odnosu masa. U binarnoj smeši cetil palmitata i tečnog lipida uočavaju se refleksije na $21,2^\circ$ i $23,5^\circ$ koje po položaju dominantno odgovaraju refleksijama karakterističnim za cetil palmitat, što ukazuje na činjenicu da je tečni lipid rastvoren u cetil palmitatu. Takođe je uočeno da se intenzitet pika koji odgovara cetil palmitatu smanjio u binarnom i ternarnom sistemu u odnosu na lipid u bulk stanju. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima DSC analize.



Slika 5.3.7. WAXD profili binarnog sistema BS4 i ternarnog sistema TS1

U nastavku studije ispitivana je potencijalna interakcija između takrolimusa i odabranih lipidnih smeša i rezultati su prikazani na slici 5.3.8. i u tabeli 5.3.6. Takrolimus ima kristalnu strukturu što je i potvrđeno nakon detekcije endoternog pika sa ekstrapolisanimom temperaturom topljenja od $130,18^\circ\text{C}$. Veoma izraženi pik koji se vidi na slici 5.3.3., ukazuje na visok stepen kristaliniteta takrolimusa. Posle termalne analize

fizičke smeše takrolimusa i sistema BS4 i TS1 uočava se samo prisustvo endotermnih događaja koji potiču od sistema BS4 i TS1, tj. temperaturni prelazi koji ukazuju na prisustvo takrolimusa nisu uočeni. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da su oba lipidna matriksa (BS4 i TS1) pogodna za inkorporiranje leka, tj. mogu se koristiti za formulaciju lipidnih nanočestica sa takrolimusom.



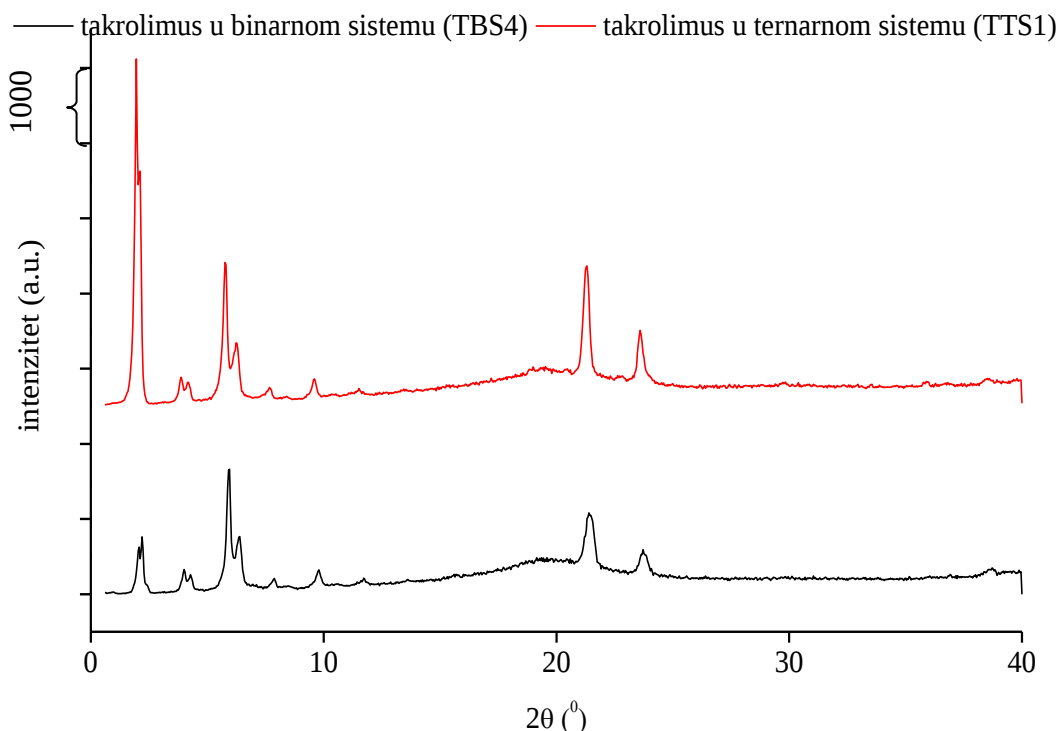
Slika 5.3.8. DSC profili takrolimusa u ternarnom sistemu (TTS1) i binarnom sistemu (TBS4)

Tabela 5.3.6. Parametri DSC analize (onset temperatura (t_o (°C)), temperatura topljenja (t_t (°C)), ukupna entalpija topljenja (ΔH (J/g) i razlika između t_t i t_o) takrolimusa u ternarnom (TTS1) i binarnom sistemu (TBS4)

Uzorak	t_o (°C)	t_t (°C)	ΔH (J/g)	$t_t - t_o$ (°C)
TTS1	41,19	49,07	134,53	7,88
TBS4	43,76	50,02	130,09	6,26

Rezultati WAXD analize takrolimusa u ternarnom sistemu (TS1) i binarnom sistemu (BS4) prikazani su na slici 5.3.9. Na WAXD difraktogramu takrolimusa u ternarnom sistemu (TS1) uočavaju se oštri pikovi na 1,96°; 5,76°; 21,2° i 23,5°. Na WAXD difraktogramu takrolimusa u binarnom sistemu (BS4) uočavaju se pikovi na 2,2°; 5,92°; 21,3° i 23,6°. Istovremeno, nije uočeno prisustvo oštarih i jasnih difrakcionih pikova

karakterističnih za kristalnu strukturu čistog takrolimusa (Hane i sar., 1992), što može da ukaže na činjenicu da je takrolimus rastvoren u izabranim lipidnim smešama.



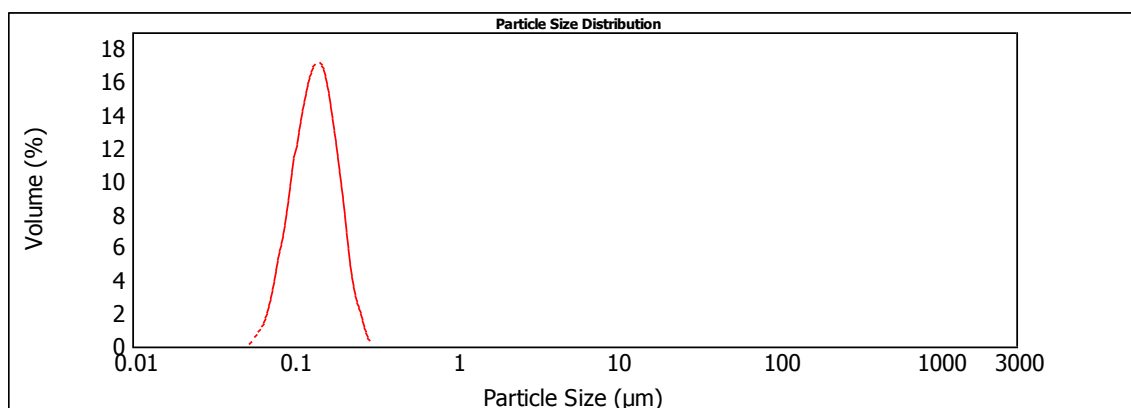
Slika 5.3.9. WAXD profili takrolimusa u binarnom sistemu (BS4) i ternarnom sistemu (TS1)

5.3.2. Formulacija lipidnih nanonosača sa takrolimusom

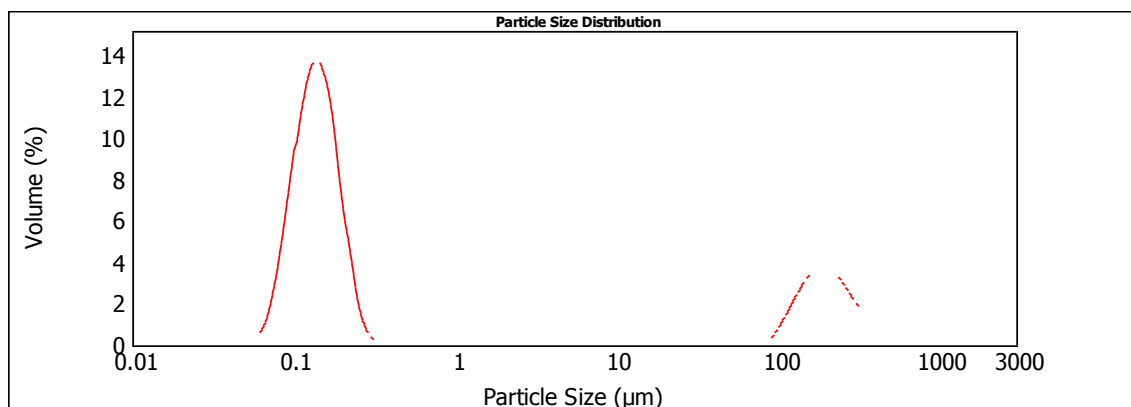
Zbog visoke efikasnosti u smanjenju veličine čestica i sužavanju distribucije čestica po veličini, homogenizacija pod visokim pritiskom je izabrana kao metoda izbora za pripremu čvrstih lipidnih nanočestica i nanostrukturiranih lipidnih nosača sa takrolimusom (Lippacher i sar., 2001; Muchow i sar., 2008). Pripremljene formulacije su se razlikovale u strukturi lipidnog matriksa i njihov sastav prikazan je u tabeli 4.7.

U formulacijama TCL-NLC A i TCL-NLC B neposredno nakon izrade uočeno je prisustvo čestica mikrometarskih veličina (slike 5.3.10. i 5.3.11.). Moguće objašnjenje za povećanje veličine čestica u ovim formulacijama moglo bi se pronaći u činjenici da odnos između cetil palmitata i gliceril monostearata u ovim formulacijama nije bio odgovarajući, te stoga lipidni matriks nije bio stabilan. Pretpostavlja se da je u tom slučaju zbog prevelikog udela gliceril monostearata u cetil palmitatu, došlo do isključivanja gliceril monostearata iz lipidnog matriksa i obrazovanja odvojene frakcije čestica koja nije mogla biti stabilizovana surfaktantom.

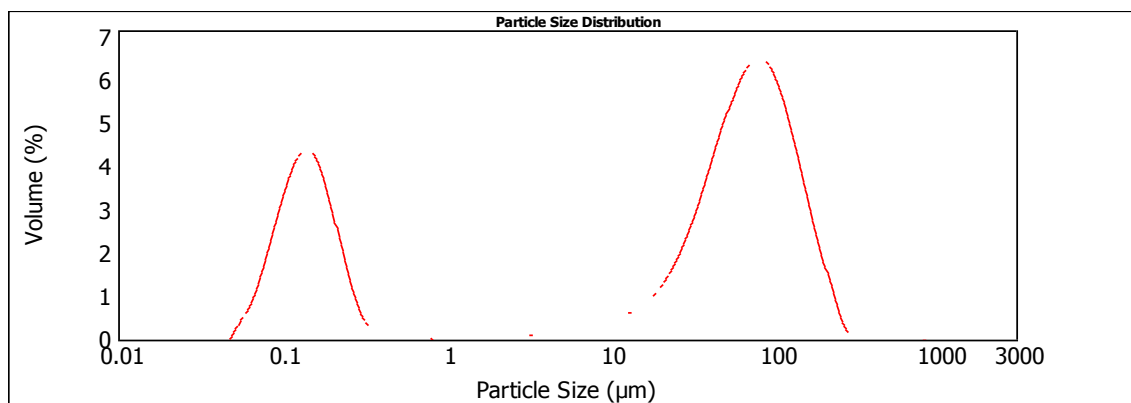
U formulaciji TCL-NLC 3 neposredno nakon izrade nije uočeno prisustvo kristala takrolimusa. Međutim, jedan dan nakon izrade u formulaciji TCL-NLC 3 uočeno je prisustvo čestica mikrometarskih veličina i kristala lekovite supstance (slika 5.3.12.). Rast čestica, tj. obrazovanje mikročestica, a time i povećanje RI verovatno su doveli do isključivanja lekovite supstance iz lipidnog matriksa, te stoga ova formulacija u nastavku istraživanja više nije praćena.



Slika 5.3.10. Veličina čestica (LD-podaci) u formulaciji TCL-NLC A neposredno nakon izrade



Slika 5.3.11. Veličina čestica (LD-podaci) u formulaciji TCL-NLC B neposredno nakon izrade



Slika 5.3.12. Veličina čestica (LD-podaci) u formulaciji TCL-NLC 3 jedan dan nakon izrade

Rezultati merenja veličine čestica PCS i LD u funkciji broja primenjenih ciklusa homogenizacije za ostale formulacije prikazani su na slikama 5.3.13. i 5.3.14. Za detaljnije tumačenje smanjenja veličine čestica nije dovoljno analizirati pomenute slike, već je neophodno uzeti u razmatranje tačne podatke o veličini čestica (tabela 5.3.7. i 5.3.8.).

Tabela 5.3.7. Smanjenje veličine čestica (PCS podaci prikazani kao z-ave u nm i PI) u funkciji broja ciklusa homogenizacije za lipidne nanočestice i nanoemulziju sa lekovitom supstancom (n = 10), (pritisak = 500 bar, t = 65 °C)

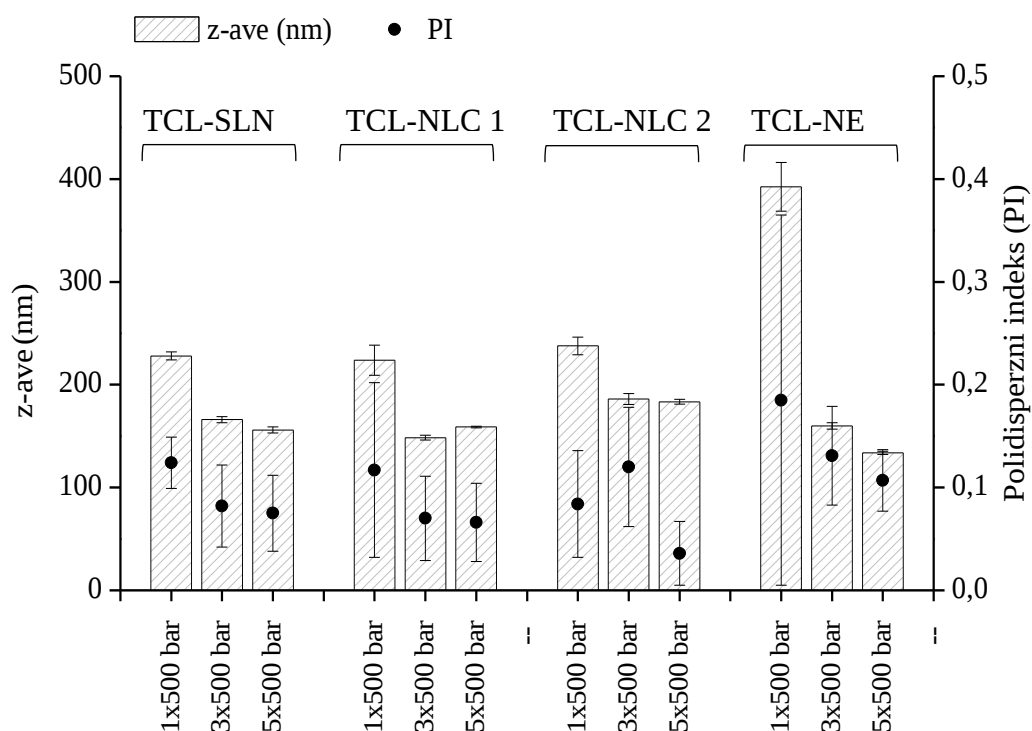
Uzorak	Broj ciklusa homog.	z-ave $\pm$ SD	PI $\pm$ SD
TCL-SLN	1	228 $\pm$ 4	0,124 $\pm$ 0,025
	3	166 $\pm$ 3	0,082 $\pm$ 0,040
	5	156 $\pm$ 3	0,075 $\pm$ 0,037
TCL-NLC 1	1	224 $\pm$ 15	0,117 $\pm$ 0,085
	3	149 $\pm$ 2	0,070 $\pm$ 0,041
	5	159 $\pm$ 1	0,066 $\pm$ 0,038
TCL-NLC 2	1	238 $\pm$ 9	0,084 $\pm$ 0,052
	3	186 $\pm$ 5	0,120 $\pm$ 0,058
	5	183 $\pm$ 2	0,036 $\pm$ 0,031
TCL-NE	1	392 $\pm$ 24	0,185 $\pm$ 0,180
	3	160 $\pm$ 3	0,131 $\pm$ 0,048
	5	133 $\pm$ 2	0,096 $\pm$ 0,019

Na osnovu rezultata prikazanih u tabelama, može se zaključiti da su nakon samo jednog ciklusa homogenizacije dobijene čestice nanometarskih veličina. Međutim, cilj ove studije bio je da se dobiju čestice u što nižem opsegu nanovelicina. Naime, sa smanjenjem veličine čestica povećava se njihova adhezivnost za kožu, zbog velikog odnosa površina/zapremina koji obezbeđuje blizak kontakt čestica sa *stratum corneum*-om. Pored toga, mala veličina nanočestica u direktnoj je korelaciji sa bržim Braunovim kretanjem čestica, što disperzije čini kinetički stabilnijom (Jores i sar., 2004). Dalje

smanjenje veličine čestica može se postići povećanjem broja ciklusa homogenizacije ili povećanjem pritiska u toku homogenizacije (tj. unosom dodatne energije u sistem). U tom kontekstu, dalji razvoj formulacije išao je u pravcu povećanja broja ciklusa homogenizacije pri konstantnom pritisku od 500 bara. Tokom prva tri ciklusa homogenizacije uočeno je gotovo konstantno smanjenje z -ave u svim formulacijama. Sa daljim unosom energije u sistem, ostvareno je veoma malo smanjenje u veličini, što se može videti na slikama 5.3.13. i 5.3.14. po eksponencijalnom opadanju veličine čestica nakon trećeg ciklusa homogenizacije.

Tabela 5.3.8. Smanjenje veličine čestica (LD podaci prikazani kao volumenski dijametri ($d(v)_{0,10}$ - $d(v)_{0,99}$) u funkciji broja ciklusa homogenizacije za lipidne nanočestice i nanoemulziju sa lekovitom supstancom ($n = 5$), (pritisak = 500 bar, $t = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$)

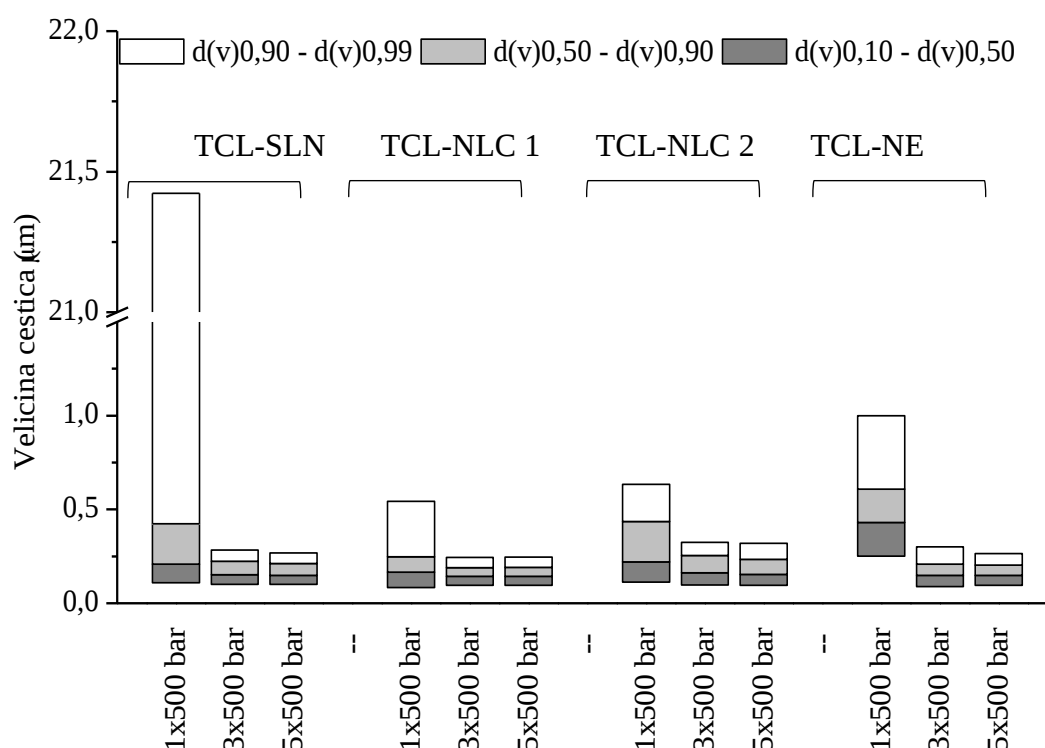
Uzorak	Broj ciklusa	$d(v)_{0,10}$	$d(v)_{0,50}$	$d(v)_{0,90}$	$d(v)_{0,95}$	$d(v)_{0,99}$
TCL-SLN	1	0,110	0,208	0,423	0,531	22,539
	3	0,100	0,152	0,223	0,245	0,284
	5	0,100	0,149	0,212	0,231	0,268
TCL-NLC 1	1	0,083	0,165	0,350	0,448	0,646
	3	0,096	0,143	0,206	0,225	0,260
	5	0,096	0,144	0,207	0,226	0,261
TCL-NLC 2	1	0,113	0,221	0,435	0,509	0,634
	3	0,098	0,163	0,255	0,283	0,325
	5	0,096	0,153	0,234	0,261	0,319
TCL-NE	1	0,251	0,430	0,769	0,900	1,160
	3	0,088	0,148	0,240	0,271	0,332
	5	0,095	0,149	0,223	0,245	0,285



Slika 5.3.13. Smanjenje veličine čestica (PCS-podaci prikazani kao z-ave u nm i PI) u funkciji broja ciklusa homogenizacije za lipidne nanočestice i nanoemulziju sa lekovitom supstancom (n = 10), (pritisak = 500 bar, t = 65 °C)

Rezultati prethodnih studija ukazuju na činjenicu da je za datu formulaciju pri konstantnom pritisku i temperaturi moguće postići samo određeni stepen smanjenja veličine čestica (Keck i Müller, 2006). Kada se dostigne plato, dalje povećanje broja ciklusa homogenizacije ne dovodi do promena u veličini čestica ili čak vodi povećanju veličine (Jahnke, 1998). Kao potencijalno objašnjene za ovu pojavu navodi se podatak da dodatan unos energije u sistem samo dovodi do ubrzanja čestica, odnosno čestice dobijaju dovoljno kinetičke energije koja je dovoljna da se prevaziđe stabilizacija surfaktantom (Shegokar i sar., 2011). Ovaj fenomen se uočava u formulaciji TCL-NLC 1, u kojoj sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije sa tri do pet dolazi do povećanja veličine čestica od 149 - 159 nm. Pored smanjenja veličine čestica, uvođenje energije u sistem povećava homogenost disperzije. PI kao mera za širinu raspodele čestica po veličini menja se na sličan način kao i veličina čestica. Sužavanje distribucije čestica po veličini najviše je izraženo između prvog i trećeg ciklusa homogenizacije, dok naknadni unos energije u sistem neznatno utiče na promene u PI. Konstantno smanjenje PI ukazuje na činjenicu da se sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije uglavnom

uklanjaju veće čestice, dok je smanjenje veličine čestica koje čine *bulk* populaciju ograničeno. Interesantno je uočiti da u formulaciji TCL-NLC 2 smanjenje PI posle prvog ciklusa homogenizacije bilo praćeno povećanjem PI. Ovakav rezultat verovatno je posledica aglomeracije čestica tokom homogenizacije. Međutim, tokom naredna dva ciklusa aglomerati se razbijaju, što je potvrđeno sa daljim smanjenjem PI od 0,120 - 0,036.



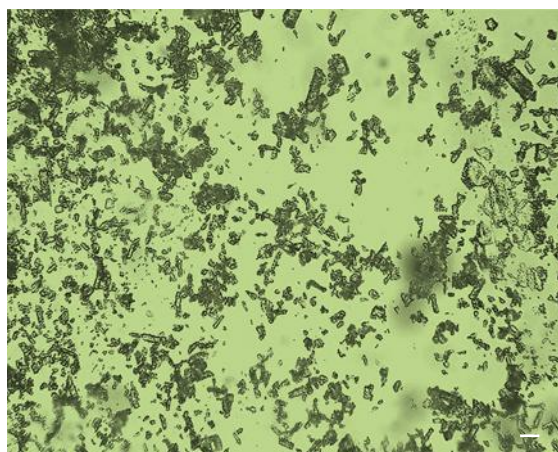
Slika 5.3.14. Smanjenje veličine čestica (LD-podaci prikazani kao volumenski dijagrami ($d(v)_{0,10} - d(v)_{0,99}$)) u funkciji broja ciklusa homogenizacije za lipidne nanočestice i nanoemulziju sa lekovitom supstancom ($n = 5$), (pritisak = 500 bar, $t = 65^{\circ}\text{C}$)

U cilju dobijanja preciznijih informacija o distribuciji čestica po veličini, izvedena je detaljnija analiza veličine čestica metodom LD (slika 5.3.14.). Dijametar $d(v)_{0,50}$ korišćen je za procenu srednje veličine čestica koje čine *bulk* populaciju dok dijagrami $d(v)_{0,90}$ i $d(v)_{0,99}$ pružaju informacije o prisustvu i količini većih čestica. Primena samo jednog ciklusa homogenizacije bila je dovoljna da se dostigne prečnik $d(v)_{0,50}$ od 0,208 μm u formulaciji TCL-SLN odnosno 0,165 μm i 0,221 μm u formulacijama TCL-NLC 1 (sa gliceril monostearatom) i TCL-NLC 2 (bez gliceril monostearata). Sa daljim povećanjem broja ciklusa homogenizacije uočeno je da je došlo do daljeg smanjenja

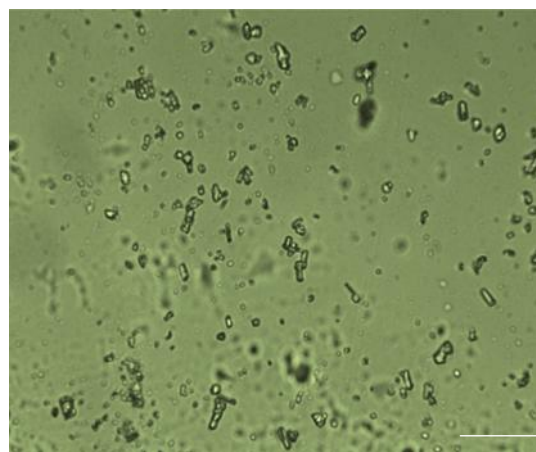
dijametra $d(v)_{0,50}$ i to za 0,022 μm ; 0,058 μm i 0,056 μm redom u formulacijama TCL-NLC 1, TCL-NLC 2, TCL-SLN. Takođe, pokazano je da sa daljim povećanjem broja ciklusa homogenizaciju iznad tri nije došlo do vidljivijeg smanjenja veličine nanostrukturiranih lipidnih nosača. Naprotiv, nakon trećeg ciklusa homogenizacije uočeno je povećanje dijametra $d(v)_{0,50}$ u formulaciji TCL-NLC 1 (sa gliceril monostearatom). Ovakav rezultat je u skladu sa povećanjem prosečnog dijametara čestica koje je zabeleženo u PCS studiji. Dijametari $d(v)_{0,90}$ i $d(v)_{0,99}$ su se smanjivali na identičan način kao dijametar $d(v)_{0,50}$. Međutim, dok je smanjenje dijametara $d(v)_{0,50}$ između prvog i trećeg ciklusa homogenizacije bilo manje od 0,1 μm , smanjenje dijametara $d(v)_{0,90}$ i $d(v)_{0,99}$ bilo je nešto veće. Ovakav rezultat može se pripisati činjenici da se sa povećanjem broja ciklusa homogenizacije dobija uniformniji uzorak zbog smanjenja dijametara većih čestica.

5.3.3. Karakterizacija lipidnih nanonosača sa takrolimusom

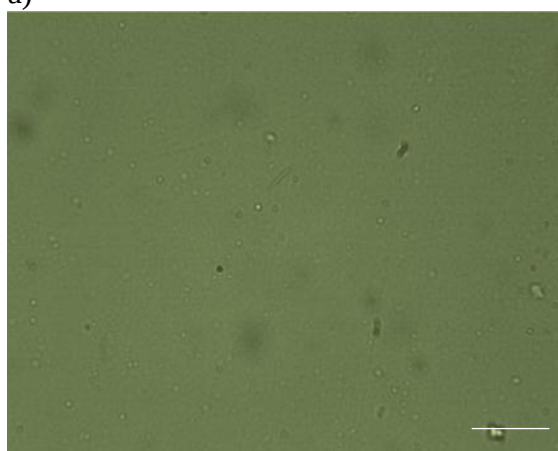
Prosečan dijametar čestica u svim formulacijama (nanostrukturirani lipidni nosači i nanoemulzija) bio je ispod 200 nm, dok su vrednosti PI bile manje od 0,1. Odgovarajuće vrednosti prosečne veličine čestica ($z\text{-ave}$) (tabela 5.3.7.) bile su komplementarne sa dobijenim vrednostima volumenskih dijametara (tabela 5.3.8.). Veličina čestica u formulaciji TCL-NLC 1 (nanostrukturirani lipidni nosači koji kao lipidni matriks sadrže smešu čvrstog u tečnog lipida u odnosu 9:1) i formulaciji TCL-SLN bila je manja od veličine čestica u formulaciji TCL-NLC 2 (nanostrukturirani lipidni nosači koji kao lipidni matriks sadrže smešu čvrstog u tečnog lipida u odnosu 8:2). U nastavku istraživanja u cilju dobijanja informacija o prisustvu/odsustvu većih čestica/agregata čestica i kristala lekovite supstance, izvedena je mikroskopska analiza uzoraka. Svetlosnom mikroskopijom nije moguće dobiti precizne informacije o veličini lipidnih nanočestica, zbog granice detekcije mikroskopa. Međutim, ovom metodom se mogu dobiti informacije o eventualnom prisustvu/odsustvu aglomerata čestica, čije prisustvo potencijalno može biti maskirano tokom faze pripreme uzoraka za analizu tehnikom PCS i LD (Keck, 2010). Nakon analize ispitivanih uzoraka metodom svetlosne mikroskopije (slika 5.3.15.) nije uočeno prisustvo kristala lekovite supstance i agregata čestica. Mikrografije koje su dobijene na polarizacionom mikroskopu su upotpunile dobijene navode.



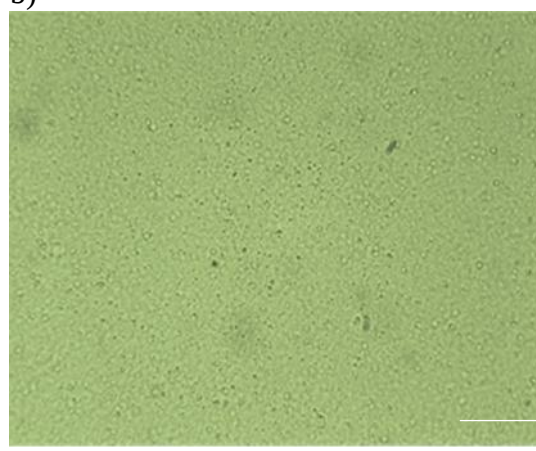
a)



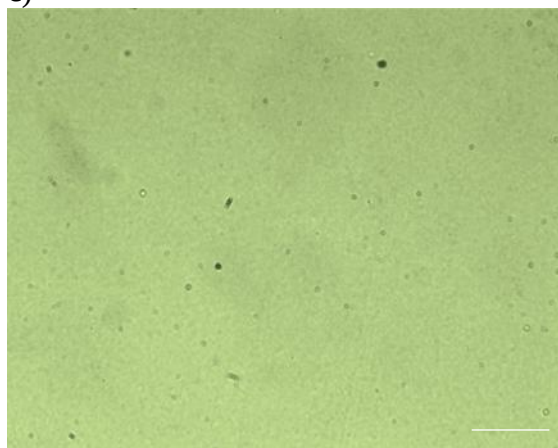
b)



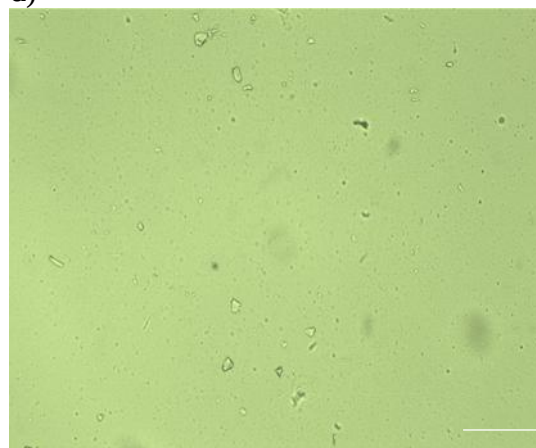
c)



d)



e)

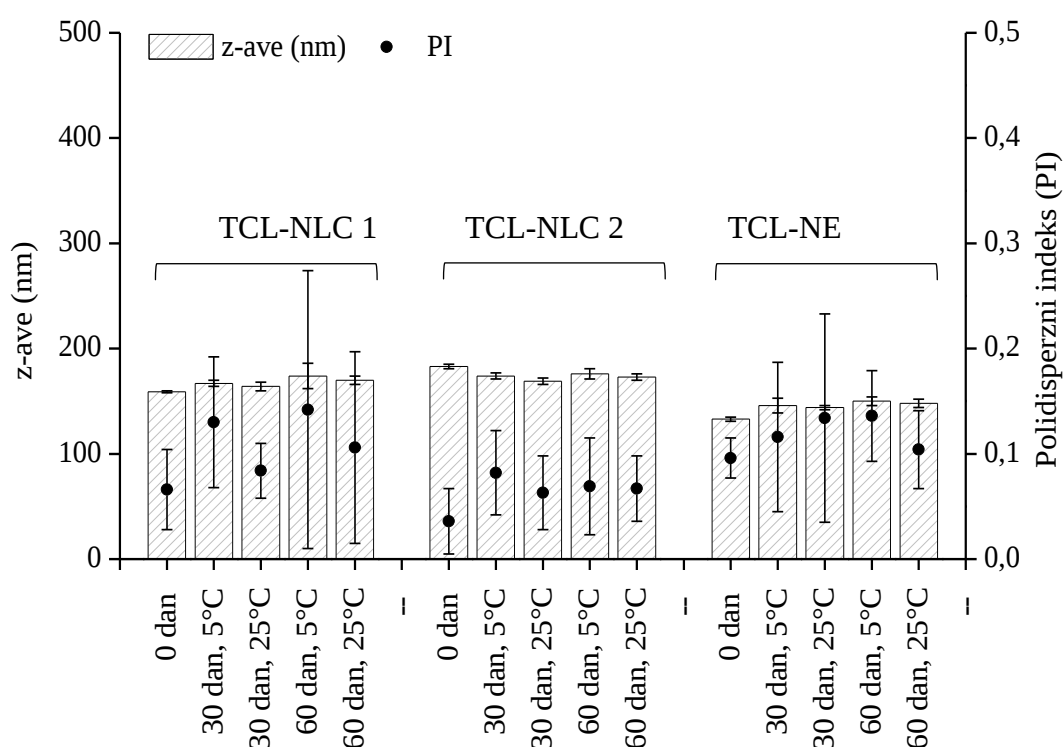


f)

Slika 5.3.15. Svetlosne mikrofije model lekovite supstance i ispitivanih uzoraka sa model lekovitom supstancom neposredno nakon izrade pod uveličanjem 160x i 630x (bar 10 μm): a) takrolimus, 160x; b) takrolimus, 630x; c) TCL-SLN, 630x; d) TCL-NLC 1, 630x; e) TCL-NLC 2, 630x; f) TCL-NE, 630x

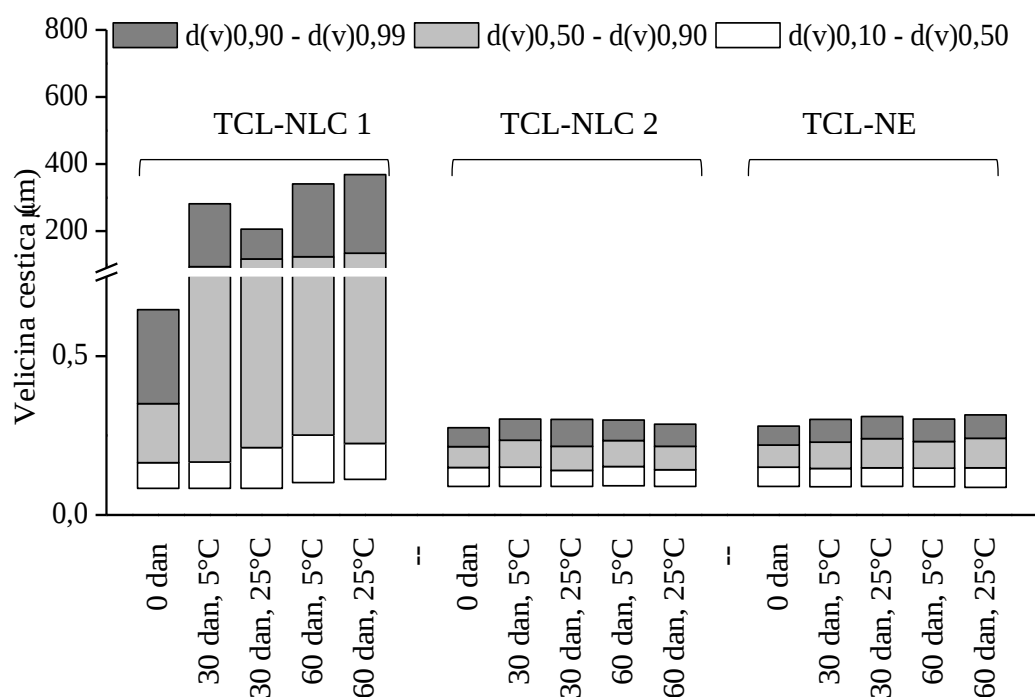
Fizička stabilnost nanoemulzija i nanostrukturiranih lipidnih nosača sa lekovitom supstancom je praćena tokom 60 dana čuvanja uzoraka na temperaturama od $5 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Rezultati dobijeni nakon analize ispitivanih uzoraka PCS tehnikom prikazani

su na slici 5.3.16. Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da je tokom ispitivanog perioda došlo do povećanja z-ave za 14 - 17 nm u formulaciji TCL-NLC 1. Komparativno sa povećanjem z-ave, uočeno je i blago proširivanje raspodele čestica po veličini. Međutim, vrednosti PI još uvek su bile ispod 0,15, što ukazuje i dalje na usku raspodelu čestica po veličini. Manja veličina čestica u nanoemulziji u odnosu na nanostrukturirane lipidne nosače može se objasniti nižim viskozitetom nanoemulzije, što za posledicu ima obrazovanje čestica manjeg dijametra, tokom pripreme uzoraka metodom tople homogenizacije pod visokim pritiskom (Hu i sar., 2005).



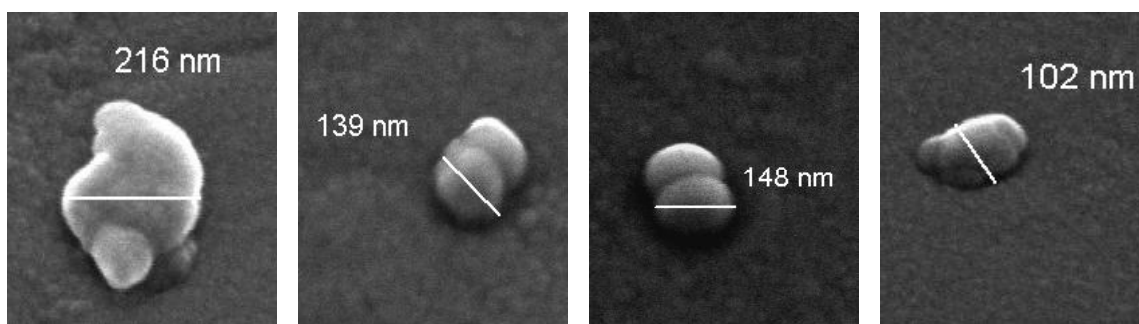
Slika 5.3.16. Fizička stabilnost nanostrukturiranih lipidnih nosača i nanoemulzije sa takrolimusom (PCS-podaci)

U svim ispitivanim formulacijama volumenski dijametri $d(v)_{0,50}$ i $d(v)_{0,99}$ bili su ispod $0,2 \mu\text{m}$ odnosno $0,6 \mu\text{m}$, neposredno nakon izrade. Posle 30 i 60 dana čuvanja uzoraka na temperaturama od $5 \pm 3^\circ\text{C}$ i $25 \pm 2^\circ\text{C}$, dijametar $d(v)_{0,99}$ je i dalje bio ispod $0,6 \mu\text{m}$ kod nanoemulzije i formulacije nanostrukturiranih lipidnih nosača označene kao TCL-NLC 2 (slika 5.3.17.). Nasuprot tome, u formulaciji TCL-NLC 1, došlo je do povećanja dijametara $d(v)_{0,99}$, što se može pripisati prisustvu gliceril monostearata u lipidnom matriksu čestica.



Slika 5.3.17. Fizička stabilnost nanostrukturiranih lipidnih nosača i nanoemulzije sa takrolimusom (LD-podaci)

Skenirajuća elektronska mikrofografije (slika 5.3.18.) je potvrdila da su nanostrukturirani lipidni nosači sa takrolimusom imali blago deformisan sferičan oblik. Veličina čestica bila je u intervalu od 102 - 216 nm, što je u skladu sa prosečnim dijametrom čestica (z_{ave}) koji je dobijen nakon merenja ispitivanih uzoraka metodom PCS.



Slika 5.3.18. Skenirajuće elektronske mikrofografije nanostrukturiranih lipidnih nosača sa takrolimusom nakon izrade

Ispitivanje površinskih karakteristika nanostrukturiranih lipidnih nosača i nanoemulzija sprovedeno je merenjem zeta potencijala uzoraka u destilovanoj vodi, čija električna

provodljivost je iznosila $50 \mu\text{Scm}^{-1}$ i u originalnom disperzionom medijumu. Rezultati sprovedenih ispitivanja prikazani su u tabeli 5.3.9.

Tabela 5.3.9. Zeta (ζ) potencijal (mV) nanostrukturiranih lipidnih nosača i nanoemulzije sa takarolimusom

Uzorak	ζ potencijal $\pm$ SD	
	destilovana voda	originalni disperzioni medijum
TCL-NLC 1	$-50,0 \pm 0,9$	$-29,6 \pm 0,9$
TCL-NLC 2	$-51,1 \pm 0,6$	$-29,3 \pm 0,3$
TCL-NE	$-55,7 \pm 0,4$	$-29,4 \pm 1,2$

Nakon merenja u destilovanoj vodi, vrednosti zeta potencijala u svim ispitivanim formulacijama, bile su oko $|-50|$ mV. Kada se merenja zeta potencijala izvode u destilovanoj vodi, dobijene vrednosti su veoma blizu *Stern*-ovog potencijala čestica, koji reperkutuje potencijal površine čestica (*Nernst*-ov potencijal). Veće vrednosti *Stern*-ovog potencijala ukazuju na veće vrednosti *Nernst*-ovog potencijala, što se dovodi u vezu sa visokim zeta potencijalom, tj. dobrom fizičkom stabilnošću. Zeta potencijal bio je sličan u svim ispitivanim formulacijama, što se moglo i očekivati, uzimajući u obzir činjenicu da zeta potencijal potiče od (i) visine *Nernst*-ovog potencijala i (ii) dodatnog naelektrisanja koje nastaje kao rezultat adsorpcije jona ili molekula stabilizatora u *Stern*-ovom sloju. S obzirom da su obe formulacije u ovom radu stabilizovane istim stabilizatorom, kaprilo/kaprilnim glukozidom (Plantacare® 810), očekivalo se da će dobijene vrednosti zeta potencijala biti slične. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima merenja zeta potencijala dobijenim u prvoj i drugoj fazi istraživanja.

Vrednosti zeta potencijala u svim ispitivanim formulacijama kada su merenja izvedena u originalnom disperzionom medijumu bile su oko $|-30|$ mV. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da su elektrostatičke i sterne interakcije uključene u stabilizaciju čestica. Zeta potencijal u vodi bio je viši od zeta potencijala u originalnom disperzionom medijumu, verovatno zbog desorpcije stabilizatora sa površine čestice pri razblaživanju nanostrukturiranih lipidnih nosača i nanoemulzije sa vodom tokom merenja. Desorpcija stabilizatora prilikom razblaživanja ispitivanih uzoraka sa vodom tokom merenja

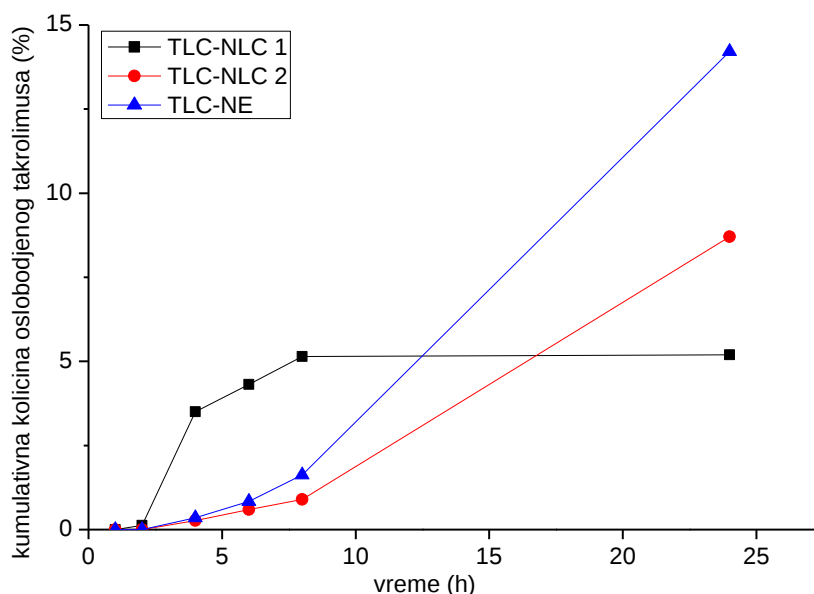
dovodi do pomeranja ravni smicanja ka površini čestice i povećanja ukupnog zeta potencijala (Müller, 1996).

Nasuprot tome, kada se merenja izvedu u originalnom disperzionom medijumu, stabilizator je čvrsto vezan za površinu čestice, te je difuzni sloj oko čestice zaštićen od uklanjanja tokom merenja. U zavisnosti od dimenzija sloja stabilizatora oko površine čestice, ravan smicanja će biti pomerena u većoj ili manjoj meri od površine čestice. Samim tim, zeta potencijal će se meriti na većoj udaljenosti od Stern-ovog sloja i vrednosti zeta potencijala će biti niže.

5.3.4. *In vitro* ispitivanje oslobađanja takrolimusa iz lipidnih nanonosača

Kao akceptorski medijum tokom *in vitro* ispitivanja oslobađanja takrolimusa iz ispitivanih formulacija nanostrukturiranih lipidnih nosača i poredbene formulacije (nanoemulzije), upotrebljena je smeša prečišćene vode, propilenglikola i etanola (96 %) u masenom odnosu 25:35:40. Studija rastvorljivosti pokazala je da je najveća rastvorljivost takrolimusa upravo postignuta u smeši ova tri rastvarača u datom masenom odnosu. Ukupna koncentracija surfaktanta (C8-10 alkil poliglukozid) u ispitivanim formulacijama i poredbenoj formulaciji nanoemulzije bila je identična, tako da se uticaj surfaktanta prilikom poređenja brzine oslobađanja lekovite supstance iz ovih nosača može zanemariti. Sve formulacije su tečnosti niskog viskoziteta, tako da uticaj viskoziteta na *in vitro* oslobađanje leka iz lipidnih nanonosača nije razmatran. Rezultati ispitivanja brzine oslobađanja takrolimusa iz lipidnih nanonosača prikazani su grafički (slika 5.3.19.). Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost šest određivanja za svaki uzorak, u toku ispitivanog perioda od 24 h. Ukupna količina takrolimusa, koja je oslobođena posle 24 h iz ispitivanih formulacija i poredbene formulacije bila je znatno ispod koncentracije od 30 % (m/m), što je u skladu sa empirijskim pravilom za dermofarmaceutske preparate (Vuleta i sar., 2012). Prilikom poređenja profila brzine oslobađanja primećena je razlika u brzini oslobađanja takrolimusa u zavisnosti od strukture/sastava lipidnog matriksa nanonosača. Brzina oslobađanja bila je slična kod uzoraka TCL-NE i TCL-NLC 2 tokom prva tri sata, dok je kod uzorka TCL-NLC 1 tokom prva tri sata primećeno nešto brže oslobađanje. U slučaju formulacije TCL-NLC 1, profil oslobađanje lekovite supstance iz nosača bio je

bifazan. Tokom prva 2 h oko 1 % lekovite supstance oslobodilo se u akceptorski medijum, dok se kumulativna količina leka koja se oslobodi tokom naredna 2 h, povećala na oko 4 %. Posle 8 h i 24 h procenat oslobođenog takrolimusa ostao je nepromenjen i iznosi je oko 5,5 %. U formulaciji TCL-NLC 2, nakon početnog sporog oslobađanja, uočeno je povećanje u količini oslobođene supstance, tako da se količina oslobođene supstance u poslednjem satu ispitivanja približila količini lekovite supstance koja se oslobodila iz poredbene formulacije nanoemulzija.



Slika 5.3.19. Profili *in vitro* oslobađanja takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih nosača i poredbene formulacije (nanoemulzije)

Dobijeni rezultati *in vitro* ispitivanja oslobađanja takrolimusa bili su u skladu sa zapažanjima do kojih se došlo u okviru strukturne karakterizacije nanonosača. Vodene disperzije nanostrukturiranih lipidnih nosača i nanoemulzija razlikuju se u sastavu lipidnog matriksa i stoga se razlike u profilima oslobađanja aktivne supstance, usled drugih činilaca mogu isključiti. Kumulativna količina oslobođene lekovite supstance bila je najviša kod nanoemulzije (oko 14 %), verovatno zbog tečnog karaktera kapi emulzija i samim tim slabijeg afiniteta supstance za nosač. U vodenim disperzijama nanostrukturiranih lipidnih nosača (TCL-NLC 1 i TCL-NLC 2), takrolimus je vezan za čvrst lipidni matriks, tako da su difuzija supstance unutar nosača, a samim tim i oslobađanje supstance u akceptorski medijum ograničeni. Osim toga, nakon nanošenja disperzije nanostrukturiranih lipidnih nosača na membranu od celuloza acetata, u

otvorenom delu *Franz*-ove ćelije, tokom perioda ispitivanja od 24 h, spoljašnja (vodena) faza disperzije isparava, dolazi do fuzije čestica na membrani i formiranja lipidnog filma. Takrolimus ostaje lokalizovan unutar ovog lipidnog filma, usled čega se njegovo oslobađanje odlaže. Na osnovu studije i parametara rastvorljivosti, zapaženo je da je u prisustvu ternarnog sistema cetil palmitat/gliceril monostearat/trigliceridi srednje dužine lanca kapacitet lipidnog matriksa za rastvaranje takrolimusa veći u odnosu na binarni sistem cetil palmitat/trigliceridi srednje dužine lanca. Na taj način se u formulaciji TCL-NLC2 smanjuje kapacitet lipidnog matriksa za rastvaranje takrolimusa. Uz to, pri masenom odnosu čvrstog i tečnog lipida u lipidnom matriksu 8:2, tj. kod uzorka TCL-NLC2, udeo tečnog lipida je veći, te je u ovom slučaju verovatno više izražen suficit tečnog lipida, na površini čestice. Tečni lipid, koji ima određeni kapacitet za rastvaranje lekovite supstance u ovoj formulaciji doprinosi slabijem inkorporiranju takrolimusa u lipidni matriks čestice, čime se povećava ukupna količina oslobođene lekovite supstance, te su se dobijeni rezultati mogli protumačiti slično rezultatima koji su dobijeni kod uzoraka nanoemulzija. Međutim, ovaj proces je izražen u manjoj meri nego kod formulacije nanoemulzija, pa se stoga takrolimus generalno sporije oslobađa iz uzorka TCL-NLC2 u odnosu na nanoemulziju.

Za karakterizaciju profila oslobađanja takrolimusa iz lipidnih nanonosaa primenjeni su kinetika nultog reda, kinetika prvog reda, *Higuchi*-jev model, *Korsmeyer-Peppas*-ov model i *Hixson-Crowel*-ov model. U tabeli 5.3.10. prikazani su koeficijenti korelacije dobijeni fitovanjem profila brzine rastvaranja takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih nosaa i nanoemulzije u matematičke jednačine koje opisuju upotrebljene modele, kao i odgovarajuće konstante brzine oslobađanja i transmembranski fluks. Transmembranski fluks je izračunat kao količnik brzine oslobađanja takrolimusa i površine membrane raspoložive za difuziju ($0,64 \text{ cm}^2$). Oslobađanje takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih nosaa bez gliceril monostearata (TCL-NLC 2) i iz nanoemulzije (TCL-NE) najbolje je opisano *Korsmeyer-Peppas*-ovim modelom, dok se primenjenim modelom slabije moglo opisati oslobađanje takrolimusa iz formulacije nanostrukturiranih lipidnih nosaa sa gliceril monostearatom (TCL-NLC 1).

Tabela 5.3.10. Parametri dobijeni fitovanjem profila oslobađanja takrolimusa iz nanostrukturiranih lipidnih nosača i nanoemulzije modelima kinetike nultog reda, kinetike prvog reda, Higuchi, Korsmeyer-Peppas-ovim i Hixon-Crowel-ov modelom (r^2 -kvadrat koeficijenta korelacije; k- konstanta brzine oslobađanja; F-transmembranski fluks)

Uzorak	Kinetika nultog reda	Kinetika prvog reda	<i>Higuchi</i>	<i>Korsmeyer- Peppas</i>	<i>Hixon- Crowel</i>
	r^2				
TCL-NLC 1	0,3580	0,3775	0,7204	0,7229	0,3710
TCL-NLC 2	0,8842	0,8763	0,5510	0,9998	0,8790
TCL-NE	0,8841	0,8708	0,5500	0,9999	0,8753
k (mgh ^{-1/2})					
TCL-NLC 1	0,296	0,003	1,283	1,396	0,001
TCL-NLC 2	0,317	0,003	1,049	0,014	0,001
TCL-NE	0,517	0,005	1,710	0,024	0,002
F (mgh ^{-1/2} cm ²)					
TCL-NLC 1	0,462	0,005	2,005	2,181	0,002
TCL-NLC 2	0,495	0,005	1,639	0,022	0,002
TCL-NE	0,808	0,008	2,672	0,037	0,003

6. Zaključak

Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

- Ispitivanjem uticaja dvanaest nejonskih polihidroksilnih surfaktanata, iz grupe alkil poliglukozida, poliglicerolskih estara masnih kiselina i šećernih (saharoznih) estara, u formulaciji disperzija čvrstih lipidnih nanočestica koje se sastoje od cetil palmitata kao čvrstog lipida, u inicijalnoj fazi istraživanja, pokazano je da je korišćenjem postupka tople homogenizacije pod visokim pritiskom i niskih koncentracija surfaktanata (1 % (m/m)) moguće uspešno formulisati disperzije čvrstih koloidnih lipidnih čestica prosečnog dijametra od 150 - 200 nm (sa izuzetkom saharoza polilaurata i saharoza polistearata), uske i monomodalne distribucije čestica po veličini ($PI < 0,15$). Uzimajući u obzir eksperimentalno određene vrednosti z -ave, PI i volumenskih dijametara uočeno je da su se veličina lipidnih nanočestica i fizička stabilnost mogli dovesti u vezu sa fizičko-hemijskim osobinama surfaktanata. Nakon prvog ciklusa homogenizacije, najveću efikasnost u stabilizaciji novostvorenih površina nanočestica imali su surfaktanti koji su posedovali visoku HLB vrednost, nizak kontaktni ugao na cetil palmitatu i nisku molekulsku masu. Nakon petog ciklusa homogenizacije, dobijeni su slični rezultati kao i nakon prvog ciklusa homogenizacije, s tim da su čestice najmanjeg dijametra dobijene u formulaciji sa saharoza palmitatom, kao stabilizatorom. Pored toga, uočeno je da su dužina alkil lanca kao i stepen esterifikacije surfaktanata, uticali na njihovu funkcionalnost u stabilizaciji čvrstih lipidnih nanočestica. U grupi alkil poliglukozida najpovoljnije osobine u stabilizaciji čvrstih lipidnih nanočestica imao je surfaktant sa najkraćim alkil lancem, C8-10 alkil poliglukozid, koji je iz tog razloga izabran za stabilizaciju nanostrukturiranih lipidnih nosača u nastavku istraživanja. U grupi estara saharoze bolju efikasnost u stabilizaciji čestica pokazali su estri saharoze sa nižim stepenom esterifikacije, odnosno mono- i diestri saharoze. Sa druge strane, nije uočeno da postoji uticaj stepena izomerizacije surfaktanata iz grupe poliglicerolskih estara masnih kiselina na prosečnu veličinu lipidnih nanočestica. Studija je pokazala da se korišćenjem podataka prikupljenih iz literature, koji su vezani za hemijsku strukturu surfaktanata i HLB vrednosti, kao i vrednosti kontaktnog ugla koja je dobijena

eksperimentalno u izvesnoj meri može ograničiti obim eksperimentalnog rada prilikom izbora potencijalnih kandidata iz grupe polihidroksilnih surfaktanata koji bi se mogli koristiti u fazi razvoja formulacija čvrstih lipidnih nanočestica.

- Dobijeni rezultati za prosečnu veličinu čestica ($z\text{-ave}$) i volumenske dijametare čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih sa 1 % (m/m) određenog polihidroksilnog surfaktanta, poredili su se sa literaturnim podacima za čvrste lipidne nanočestice stabilizovane sa 1,2 % (m/m) polietoksilovanog surfaktanta (Polisorbat 20, 40, 60, 80). Veličina čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih nekim polisorbatom, bila je u intervalu od 229 - 237 nm, dakle veća u odnosu na prosečnu veličinu čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih polihidroksilnim surfaktantima, i pored niže upotrebljene koncentracije surfaktanata.
- Pored uticaja na veličinu čestica i fizičku stabilnost, pokazano je da su surfaktanti imali izvestan uticaj i na kristalnu strukturu lipidnog matriksa. Indeks kristalizacije čestica bio je veći u prisustvu poligliceril-6 distearata, saharoza monostearata, saharoza distearata i saharoza polistearata. Ovi surfaktanti poseduju dug i rigidan alkil lanac u svojoj strukturi, relativno visok kontakti ugao na cetil palmitatu i višu temperaturu topljenja od temperature topljenja matriksa čvrstih lipidnih nanočestica. Usled uočenog pozitivnog uticaja pomenutih surfaktanata na kristalnu strukturu čestica, oni bi se potencijalno mogli koristiti u budućnosti u razvoju lipidnih nanočestica, prosečnog dijametra ispod 100 nm, upravo zbog svog pozitivnog uticaja na formiranje čvrstog lipidnog matriksa čestica, što pored veličine čestica predstavlja veoma kritičan momenat u razvoju ovih nosača. Iz tog razloga dva surfaktanta iz ove grupe (poligliceril-6 distearat i saharoza monostearat) izabrani su da budu korišćeni u formulaciji nanostrukturiranih lipidnih nosača, sa rastućim udelom tečnog lipida u lipidnom matriksu u nastavku istraživanja. Surfaktanti sa kratkim, tj. alkil lancem srednje dužine u svojoj strukturi iz grupe alkil poliglukozida, koji istovremeno poseduju temperaturu topljenja nižu od temperature topljenja lipidnog matriksa nanočestica, u manjoj meri su uticali na kristalnu strukturu čestica u odnosu na prethodno pomenute surfaktante iz grupe estara saharoze i poliglicerolskih estara masnih kiselina. Sa druge strane, uočeno je da je stepen agregacije čestica u prisustvu ovih surfaktanata bio najmanji, što se pretpostavlja da je upravo povezano sa odsustvom uticaja surfaktanta na kristalnu strukturu matriksa čestica.

- Na osnovu izmerenih vrednosti zeta potencijala koje su za sve formulacije u vodi bile iznad $|30|$ mV, a u originalnom disperzionom medijumu između $|-23|$ mV i $|-35|$ mV može se zaključiti da polihidroksilni surfaktanti u koncentraciji od 1 % (m/m) mogu obezbediti zadovoljavajuću fizičku stabilnost čvrstih lipidnih nanočestica. Uzimajući u obzir eksperimentalno izmerene vrednosti zeta potencijala u dva medijuma (voda i originalni disperzioni medijum), može se konstatovati da se stabilizacija čvrstih lipidnih nanočestica polihidroksilnim surfaktantima opisuje kao kombinacija elektrostatičkog i sternog efekta, koji su uzajamno komplementarni.

Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

- U okviru ove faze ispitivana je efikasnost tri polihidroksilna surfaktanta koji se razlikuju u hemijskoj strukturi na formiranje nanostrukturiranih lipidnih nosača sa rastućim udelom tečnog lipida u lipidnim matriksu. Kao potencijalni surfaktanti ispitivane su sledeće nejonske površinski aktivne materije: C8-10 alkil poliglukozid, saharoza stearat i poligliceril-6 distearat. Dobijeni rezultati su sugerisali da su ovi surfaktanti u koncentraciji od 1 % (m/m) bili efikasni u stabilizaciji nanostrukturiranih lipidnih nosača. Prosečna veličina čestica bila je veoma slična veličini čvrstih lipidnih nanočestica stabilizovanih istim surfaktantima i kretala se u intervalu od 150 - 200 nm. Vrednosti volumenskih dijametara i PI ukazali su na monomodalnu i usku distribuciju čestica po veličini. Nakon izrade ni u jednoj formulaciji nije uočeno prisustvo mikročestica, ali se efikasnost surfaktanata u formiranju čestica ponovo mogla dovesti u vezu sa hemijskom strukturom surfaktanata. Uzimajući u obzir eksperimentalno određene vrednosti z -ave, PI i volumenskih dijametara konstatovano je da je najveću efikasnost u obrazovanju nanostrukturiranih lipidnih nosača imao surfaktant sa najkraćim alkil lancem u svojoj strukturi, C8-10 alkil poliglukozid. Na osnovu dobijenih rezultata takođe je uočeno da postoji izvestan uticaj udela tečnog lipida u lipidnom matriksu na veličinu čestica.
- Vodene disperzije nanostrukturiranih lipidnih nosača sa sadržajem ulja u matriksu nižim od 30 % (m/m) bile su fizički stabilne tokom ispitivanog perioda od 90 dana. Međutim, sa daljim povećanjem sadržaja ulja iznad 40 % (m/m) uočeni su znaci blagog povećanja veličine većih čestica ($d(v)_{0,99}$) u formulacijama nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovanih surfaktantima koji sadrže C18 alkil lance (poligliceril-6 distearat i

saharoza stearat). Ovakav efekat se pripisuje većem stepenu kristaliniteta lipidnog matriksa, kao i efektu isključivanja tečnog lipida (ulja) iz lipidnog matriksa čestica. Formulacije nanostrukturiranih lipidnih nosača stabilizovane surfaktantom sa kraćim alkil lancem, C8-C10 alkil poliglukozidom, bile su fizički stabilne bez obzira na sadržaj ulja u matriksu.

- Interesantno je uočiti da sve formulacije nanostrukturiranih lipidnih nosača sa sadržajem ulja od 50 % (m/m) i 60 % (m/m) nisu posedovale lipidni matriks u čvrstom agregatnom stanju, nasuprot smeši lipida koja ulazi u sastav lipidnog matriksa kada je u *bulk* stanju. Ovakav rezultat ukazuje na izvesna ograničenja u tzv. nanostrukturiranju lipidnog matriksa čestica nakon dodatka tečnog lipida i razlike u rekristalizaciji lipida u nanodimenzijama u odnosu na lipid u *bulk* stanju. Uočene razlike u tendenciji lipida ka kristalizaciji u prisustvu različitih surfaktanata mogu se pripisati različitoj dužini zasićenog hidrofobnog lanca u molekulu polihidroksilnih surfaktanata. Ovakva zapažanja idu u prilog pretpostavkama koje su postavljene u prvoj fazi istraživanja da je efekat surfaktanata na kristalnu strukturu lipidnog matriksa čestica zapravo funkcija i hemijske strukture surfaktanta i potencijalne interakcije surfaktanata i lipidnog matriksa čestica. Uočeni uticaj hemijske strukture surfaktanata na strukturu lipidnog matriksa čestica, kao i potencijalne interakcije sa matriksom u budućnosti bi se mogle iskoristiti u razvoju nanostrukturiranih lipidnih nosača koji poseduju željeni stepen kristaliniteta lipidnog matriksa i kapacitet opterećenja za izabranu model supstancu.
- Hemijska struktura surfaktanta takođe je imala uticaj na površinsko naelektrisanje (zeta potencijal) čestica. Pretpostavlja se da se polihidroksilni surfaktanti sa jednim hidrofobnim alkil lancem u strukturi (C8-10 alkil poliglukozid i saharoza stearat) pričvršćuju za površinu čestica, dok hidrofilni deo koji se sastoji od molekula glukoze, odnosno saharoze penetrira u vodenu fazu. Molekuli glukoze i saharoze verovatno stupaju u interakciju sa molekulima vode, odnosno vezuju potencijalno negativno naelektrisane hidroksilne jone za sebe. Sa druge strane, poligliceril-6 distearat ima dva hidrofobna alkil lanca u svojoj strukturi i šest molekula glicerola u sredini. Ako se pretpostavi da su oba hidrofobna lanca pričvršćena za površinu čestice, molekul surfaktanta na površini čestice će imati strukturu nalik petlji. Pomenute razlike u hemijskoj strukturi surfaktanata, odnosno njihovoj orijentaciji na površini čestice se mogu smatrati jednim od uzroka za različite izmerene vrednosti zeta potencijala.

Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

- U okviru preformulacionih studija, koje su bile dizajniranje tako da se izvrši selekcija i karakterizacija lipidnih ekscipijenasa koji se mogu koristiti za pripremu lipidnih nanonosača, na osnovu parametara rastvorljivosti i eksperimentalnog pristupa u određivanju rastvorljivosti, izvršena je selekcija lipidnih ekscipijenasa koji su se koristili kao matriks nanočestica sa takrolimusom. Rastvorljivost takrolimusa u voskovima bila je niska, nešto bolja rastvorljivost zabeležena je u trigliceridima i smeši diglicerida i triglicerida, dok je najveća rastvorljivost takrolimusa zabeležena u smeši monoglicerida i diglicerida. Najveći kapacitet za rastvaranja takrolimusa imali su gliceril monokaprilat/monokaprat, gliceril monolaurat i gliceril monostearat, dok je nešto manja, ali još uvek dovoljna rastvorljivost takrolimusa zabeležena u gliceril palmitostearatu i gliceril dibehenatu. Relativno visoka rastvorljivost takrolimusa u smeši monoglicerida i diglicerida u odnosu na triglyceride, ukazala je na činjenicu da će čvrst lipidni matriks sastavljen dominantno od smeše monoglicerida i diglicerida verovatno imati veći kapacitet opterećenja i efikasnost inkapsulacije lekovite supstance od lipidnog matriksa u čijem sastavu dominiraju trigliceridi.
- Koristeći postupak tople homogenizacije pod visokim pritiskom pripremljene su formulacije lipidnih nanočestica (čvrste lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači), koje su se razlikovale u strukturi lipidnog matriksa i sadržaju čvrstog i tečnog lipida. Svi ispitivani uzorci nakon izrade bili su tečnosti niskog viskoziteta. Prosečna veličina čestica u ispitivanim uzorcima neposredno nakon izrade bila je manja nego od 200 nm, dok je distribucija čestica po veličini bila monomodalna. I pored uočene dobre rastvorljivosti takrolimusa u smeši monoglicerida i diglicerida, nije bilo moguće pripremiti stabilne formulacije nanostrukturiranih lipidnih nosača sa gliceril dibehenatom. Čestice koje su se pripremale sa ovim lipidom pokazivale su tendenciju rasta vrlo brzo nakon izrade, što je dovelo do povećanje indeksa kristalizacije i isključivanja lekovite supstance iz lipidnog matriksa čestica u okolni vodeni disperzioni medijum.
- Formulacije nanostrukturiranih lipidnih nosača, čiji se lipidni matriks sastojao od smeše voskova i glicerida (monogliceridi ili trigliceridi) takođe su posedovale visok kapacitet za inkorporiranje takrolimusa i zadovoljavajuću fizičku stabilnost. Nešto

bolja fizička stabilnost zabeležena je u formulaciji nanostrukturiranih lipidnih nosača sa većim udelom tečnog lipida u lipidnom matriksu (TCL-NLC 2). Zadovoljavajuća fizička stabilnost formulacija pre svega se pripisala visokom afinitetu surfaktanta za lipidni matriks nanočestica, koje su dobijene u toku studije merenja kontaktnog ugla na cetil palmitatu, koji je činio veći deo lipidnog matriksa čestica, formulisanih u prvoj fazi eksperimentalnog rada. Visoke vrednosti zeta potencijala kod ispitivanih čestica takođe su bile jedan od indikatora zadovoljavajuće fizičke stabilnosti nosača.

- Dobijeni rezultati *in vitro* ispitivanja brzine oslobađanja takrolimusa od 5 - 14 % za 24 h, ukazali su generalno na značaj izbora komponenata koje ulaze u sastav lipidnog matriksa nanočestica za postizanje određene brzine oslobađanja lekovite supstance. Pretpostavlja se da je produženo/odloženo oslobađanje takrolimusa iz lipidnih nanočestica (uzorak TCL-NLC 1) rezultat jače interakcija lipid-lekovita supstancu, odnosno da je pomenuta interakcija bila povezana sa interakcijom čvrst lipid-tečan lipid-lekovita supstancu. Sa druge strane, u toku 24 h kod uzorka TCL-NLC 2 je zabeleženo trenutno oslobađanje takrolimusa (oko 9 %), a iz poredbene formulacije nanoemulzije (oko 14 %), na osnovu čega se može zaključiti da je interakcija između čvrstog lipida i lekovite supstance bila slabija prisutna, tj. da je takrolimus dominantno bio lociran unutar tečnog lipida.

7. Literatura

Agarwal W, Bajpai M. Stability issues related to nanosuspensions: a review. *Pharmaceutical nanotechnology*. 2013;1(2):85-92.

Alaiti S, Kang S, Fiedler VC, Ellis CN, Spurlin DV, Fader D, et al. Tacrolimus (FK506) ointment for atopic dermatitis: A phase I study in adults and children. *J Am Acad Dermatol*. 1998;38(1):69-76.

Allen A, Siegfried E, Silverman R, Williams ML, Elias PM, Szabo SK, et al. Significant absorption of topical tacrolimus in 3 patients with Netherton syndrome. *Arch Dermatol*. 2001;137(6):747-750.

Almawi WY, Melemedjian OK. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol*. 2002;71(1):9-15.

Alomar A, Berth-Jones J, Bos JD, Giannetti A, Reitamo S, Ruzicka T, et al. The role of topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2004;151(70):3-27.

Arica YB, Benoit JP, Lamprecht A. Paclitaxel - loaded lipid nanoparticles prepared by solvent injection or ultrasound emulsification. *Drug Dev Ind Pharm*. 2006;32(9):1089-1094.

Attwood D, Florence AT. *Physical pharmacy*, 2nd ed. London: Pharmaceutical Press, 2012.

Aulmann W, Sterzel W. Toxicology of alkyl polyglucosides. U: Hill K, Rybinski WV, Stoll G, eds. *Alkyl polyglucosides: technology, properties and applications*. Weinheim: VCH-Wiley Verlag GmbH & Co. KgaA, 1997, 158-172.

Barnes GT, Gentle IR. *Interfacial science - an introduction*, 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2011.

Barton AFM. *The CRC Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters*, 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1991.

Beck LA. The efficacy and safety of tacrolimus ointment: A clinical review. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(2):S165-170.

Bergh M, Magnusson M, Nilsson JLG, Karlberg AT. Contact allergenic activity of Tween 80 before and after air exposure. *Contact Dermatitis*. 1997;37(1):9-18.

Bergh M, Magnusson K, Nilsson JLG, Karlberg AT. Formation of formaldehyde and peroxides by air oxidation of high purity polyoxyethylene surfactants. *Contact Dermatitis*. 1998a;39(1):14-20.

Bergh M, Ping Shao L, Hagelthorn G, Gäfvert E, Nilsson JLG, Karlberg AT. Contact allergens from surfactants. Atmospheric oxidation of polyoxyethylene alcohols, formation of ethoxylated aldehydes, and their allergenic activity. *J Pharm Sci*. 1998b;87(3):276-282.

Bergh M, Ping Shao L, Magnusson K, Gäfvert E, Nilsson JLG, Karlberg AT. Atmospheric oxidation of poly(oxyethylene) alcohols. Identification of ethoxylated formates as oxidation products and study of their contact allergenic activity. *J Pharm Sci*. 1999;88 (4): 483-488.

Bhalekar M, Pokharkar V, Madgulkar A, Patil N, Patil N. Preparation and evaluation of miconazole nitrate - loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(1):289-296.

Blasi P, Giovagnoli S, Schoubben A, Ricci M, Rossi C. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(6):454-477.

- Bodin A, Linnerborg M, Nilsson JLG, Karlberg AT. Novel hydroperoxides as primary autoxidation products of a model ethoxylated surfactant. *J Surfactants Deterg.* 2002;5(2):107-110.
- Bodin A, Linnerborg M, Nilsson JLG, Karlberg AT. Structure, elucidation, synthesis, and contact allergenic activity of a major hydroperoxide formed at autoxidation of the ethoxylated surfactant C12E5. *Chem Res Toxicol.* 2003;16(5):575-582.
- Bodin A, Shao LP, Nilsson JLG, Karlberg AT. Identification and allergenic activity of hydroxylaldehydes - a new type of oxidation product from an ethoxylated non-ionic surfactant. *Contact Dermatitis.* 2001;44(4):207-212.
- Boguniewicz M, Fiedler VC, Raimer S, Lawrence ID, Leung DY, Hanifin JM. A randomized, vehicle-controlled trial of tacrolimus ointment for treatment of atopic dermatitis in children. *Pediatric tacrolimus study group. J Allergy Clin Immunol.* 1998;102(4):637-644.
- Bornhovd EC, Schuller E, Bieber T, Wollenberg A. Immunosuppressive Makrolide und ihr Einsatz in der Dermatologie. *Hautarzt.* 2000;51(9):646-654.
- Bunjes H. Einflußnahme unterschiedlicher Faktoren auf Struktur und Eigenschaften von Nanopartikeln aus festen Triglyceriden. *Doktorska disertacija, Friedrich-Schiller-Universität Jena*, 1998.
- Bunjes H. Characterization of solid lipid nano- and microparticles. U: Nastruzzi C, eds. *Lipospheres in drug targets and delivery, approaches, methods and applications.* Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005, 43-70.
- Bunjes H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2011;16(5):405-411.
- Bunjes H, Koch MHJ. Saturated phospholipids promote crystallization but slow down polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *J Control Release.* 2005;107(2):229-243.
- Bunjes H, Koch MHJ, Westesen K. Effects of surfactants on the crystallization and polymorphism of lipid nanoparticles. *Prog Colloid Polym Sci.* 2002;121:7-10.
- Bunjes H, Koch MHJ, Westesen K. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. *J Pharm Sci.* 2003;92(7):1509-1520.
- Bunjes H, Siekmann B. Manufacture, characterization and applications of solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. U: Benita S, eds. *Microencapsulation: methods and industrial applications*, 2nd ed. New York, London: Taylor and Francis Group, 2006, 213-268.
- Bunjes H, Siekmann K, Westesen K. Emulsions of supercooled melts - a novel drug delivery system. U: Benita S, eds. *Submicron emulsions in drug targeting and delivery.* Amsterdam: Harwood Academic Publisher, 1998, 175-218.
- Bunjes H, Unruh T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(6):379-402.
- Bunjes H, Westesen K. Influence of colloidal state on physical properties of solid fats. U: Garti N, Sato K, eds. *Crystallization processes in fats and lipid systems.* New York: Marcel Dekker, 2001, 457-483.
- Bunjes H, Westesen K, Koch MHJ. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *Int J Pharm.* 1996;129(1-2):159-173.
- Catanoiu G, Carey E, Patil SR, Engelskirchen S, Stubenrauch C. Partition coefficients of nonionic surfactants in water/n-alkane systems. *J Colloid Interface Sci.* 2011;355(1):150-156.

- Cerdeira AM, Mazzotti M, Gander B. Miconazole nanosuspensions: Influence of formulation variables on particle size reduction and physical stability. *Int J Pharm.* 2010;396(1-2):210-218.
- Chai JL, Li, GZ, Zhang GY, Lu JJ, Wang ZN. Studies on the phase behavior of the system APG/alcohol /alkane/H₂O with fish like diagrams. *Colloid Surface A Physicochem Eng Asp.* 2003;231(1-3):173-180.
- Chen DB, Yang TZ, Lu WL, Zhang Q. In vitro and in vivo study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2001;49(11):1444-7.
- Choi D, Cho H. Effect of tacrolimus derivatives on immunosuppression. *Arch Pharm Res.* 2009;32(4):549-57.
- Chorny M, Fishbein I, Danenberg HD, Golomb G. Study of the drug release mechanism from tyrophostin AG-1295-loaded nanospheres by in situ and external sink methods. *J Control Release.* 2002;83(3):401-14.
- Columbo M, Bochner BS, Marone G. Human skin mast cells express functional beta1 integrins that mediate adhesion to extracellular matrix proteins. *J Immunol.* 1995;154(11):6058-64.
- Dagastine RR, Stevens GW. Direct force measurement at liquid/liquid interfaces. U: Watarai H, Teramae N, Sawada T, eds. *Interfacial nanochemistry: Molecular science and engineering at liquid-liquid interfaces.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, 77-95.
- DAZ: Atopische Dermatitis: Tacrolimus erhält Zulassung zur Behandlung der atopischen Dermatitis. *Deutsche Apotheker Zeitung.* 2002;142(12):47.
- De Groot AC, Flyvholm M-A, Lensen G, Menné T, Coenraads P-J. Formaldehyde-releasers: relationship to formaldehyde contact allergy. Contact allergy to formaldehyde and inventory of formaldehyde-releasers. *Contact Dermatitis.* 2009;61(2):63-85.
- Decker C, Marchal J. Caractérisation de réactions primaires de dégradation oxydante au cours de l'autoxydation des polyoxyéthylènes à 25 °C: étude en solution aqueuse avec amorçage par radiolyse du solvant VI. Polyoxyéthylène: produits d'oxydation et schéma cinétique. *Die Makromolekulare Chemie.* 1973;166:155-178.
- Desrumaux A, Marcand, J. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristics. *Int J Food Sci Tech.* 2002;37(3):263-269.
- Dingler A, Gohla S. Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *J Microencapsul.* 2002;19(1):11-16.
- Dobson KS, Williams KD, Boriack CJ. The preparation of polyglycerol esters suitable as low-caloric fat substitutes. *J Am Oil Chem Soc.* 1993;70(11):1089-1092.
- Doktorovova S, Araujo J, Garcia M, Rakovsky E, Souto E. Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured lipid carriers (PEG-NLC). *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;75(2):538-542.
- Donbrow M. Stability of the polyoxyethylene chain. U: Schick MJ, eds. *Nonionic surfactants: Physical chemistry.* New York: Marcel Dekker Inc., 1987, 1011-1067.
- Đaković Lj. Koloidna hemija, Zavod za udžbenika i nastavna sredstva, Beograd, 2006.
- Đorđević J. *In vitro* i *in vivo* ispitivanja karakteristika emulzija tipa U/V sa dl α -tokoferol acetatom za primenu na kožu. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, 2001.

Erdogan M, Wright JR, McAlister VC. Liposomal tacrolimus lotion as a novel topical agent for treatment of immune-mediated skin disorders: experimental studies in a murine model. *Br J Dermatol*. 2002;146(6):964-967.

European Medicines Agency (EMA). Summary of Product Characteristics, Annex 1, Protopic 0.03 % ointment. London, 2006a. Dostupno sa: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000374/WC500046824.pdf (poslednji pregled, 22.10.2014).

European Medicines Agency (EMA). Press Release, European Medicines Agency recommends cautious use of Protopic/Protopy and Elidel. Doc. Ref. EMEA/98882/2006b. London, 2006. Dostupno sa: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2009/11/WC500014840.pdf (poslednji pregled, 22.10.2014).

European Pharmacopoeia 7th edition, Strasbourg: Council of Europe, 2011.

Evans AV. The expanding role of topical tacrolimus in dermatology. *Clin Exp Dermatol*. 2005;30(2):111-115.

Evetts S, Kovalski C, Levin M, Stafford M. High-temperature stability of alcohol ethoxylates. *J Am Oil Chem Soc*. 1995;72(7):811-816.

Fleischer AB. Treatment of atopic dermatitis: role of tacrolimus ointment as a topical noncorticosteroid therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(3):S126-130.

Floury J, Desrumaux A, Lardieres J. Effect of high pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2000;1(2):127-134.

Flynn GL, Shah VP, Tenjarla SN, Corbo M, DeMagistris D, Feldman TG, et al. Assessment of value and applications of *in vitro* testing of topical dermatological drug products. *Pharm Res*. 1999;16(9):1325-1330.

Freitas C, Müller RH. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. *Int J Pharm*. 1998;168(2):221-229.

Freitas C, Müller RH. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Biopharm*. 1999;47(2):125-132.

Freeman AK, Linowski GJ, Brady C, Lind L, VanVeldhuisen P, Singer G, et al. Tacrolimus ointment for the treatment of psoriasis on the face and intertriginous areas. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48(4):564-568.

Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporine A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(9):3686-3690.

Garti N, Yano J. The roles of emulsifiers in fat crystallization. U: Sato K, Garti S, eds. *Crystallization processes in fats and lipid systems*. New York: Marcel Dekker Inc., 2001, 211-250.

Gasco MR. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. US Patent 5250236, 1993.

Gmelin E, Sarge SM. Temperature, heat and heat flow rate calibration of differential scanning calorimeters. *Thermochim Acta*. 2000;347(1-2):9-13.

Goldman D. Tacrolimus ointment for the treatment of steroid-induced rosacea: a preliminary report. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(6):995-998.

Gupta AK, Adamiak A, Chow M. Tacrolimus: a review of its use for the management of dermatoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2002;16(2):100-114.

Göppert TM, Müller RH. Plasma protein interactions of Tween 80 and poloxamer 188-stabilized SLN. *J Drug Target*. 2003;11(4):225-231.

Göppert TM, Müller RH. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: Comparison of plasma protein adsorption patterns. *J Drug Target*. 2005;13(3):179-187.

Han F, Li S, Yin R, Liu H, Xu L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2008;315(1-3):210-216.

Hane K, Fujioka M, Namiki Y, Kitagawa T, Kihara N, Shimatani K, et al. Physico-chemical properties of (-)-1*R*,9*S*,12*S*,13*R*,14*S*,17*R*,18*E*,21*S*,23*S*,24*R*,25*S*,27*R*)-17-allyl-1,14-dihydroxy-12-[(*E*)-2-[(1*R*,3*R*,4*R*)-4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1-methylvinyl]-23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetramethyl-11,28-dioxo-4-azatricyclo[22.3.1.0^{4,9}]octacos-18-ene-2,3,10,16-tetrone hydrate (FK-506). *Iyakuhin Kenkyu*. 1992;23:33-43.

Hansen CM, Beerbower A. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 2nd edition, Wiley, New York, 1971;889-910.

Hanson R, Heaney J. A primer on automating the vertical diffusion cell (VDC). *Dissolution Technologies*. 2013;20(2):40-43.

Harper J, Smith C, Rubins A, Green A, Jackson K, Zigure S, et al. A multicenter study of the pharmacokinetics of tacrolimus ointment after first and repeated application to children with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2005;124(4):695-699.

Helgason T, Awad TS, Kristbergsson K, McClements DJ, Weiss J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Colloid Interface Sci*. 2009;334(1):75-81.

Heng PWS, Wong TW, Cheong WS. Investigation of melt agglomeration process with a hydrophobic binder in combination with sucrose stearate. *Eur J Pharm Sci*. 2003;19(5):381-393.

Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne M-C, Proust J-E, Phan-Tan-Luu R, et al. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci*. 2003;18(1):55-61.

Hildebrand JH, Scott RL. *The solubility of nonelectrolytes*. 3rd ed. New York: Dover Publications, Inc., 1964.

Hill K, von Rybinski W, Stoll G. *Alkyl polyglycosides. Technology, properties and applications*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft GmbH, 1997.

Holley W. Emulgieren, homogenisieren, grenzflächenvergrößerung. U: Asche H, Essig D, Schmidt PC, eds. *Technologie von Salben, Suspensionen und Emulsionen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1984, 89-101.

Holmberg K, Jönsson B, Kronberg B, Lindman B. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2002.

Hou D, Xie C, Huang K, Zhu C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*. 2003;24(10):1781-1785.

Hsu CH, Cui Z, Mumper RJ, Jay M. Preparation and characterization of novel coenzyme Q10 nanoparticles engineered from microemulsion precursors. *AAPS PharmSciTech*. 2003;4(3):E32.

Hu FQ, Hong Y, Yuan H. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *Int J Pharm.* 2004;273(1-2):29-35.

Hu FQ, Jiang SP, Du YZ, Yuan H, Ye YQ, Zeng S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005;45(3-4):167-173.

Hunter RJ. *Foundations of Colloid Science.* 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1987.

Huynh TV, Caffin N, Dykes GA, Bhandari B. Optimization of the microencapsulation of lemon myrtle oil using response surface methodology. *Dry Technol.* 2008;26(3):357-368.

Höhne GWH, Flammersheim HJ, Hemminger W. *Differential scanning calorimetry.* 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003.

ISO 13321:1996. Particle size analysis - Photon Correlation Spectroscopy, International Organisation for Standardisation (ISO) 1996.

ISO 13320-1:1999. Particle size analysis - Laser diffraction methods, International Organisation for Standardisation (ISO) 1999.

ISO 14488:2000. Particulate materials - sampling and sample splitting for the determination of particulate properties, International Organisation for Standardisation (ISO) 2000.

Jacobs C, Müller RH. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. *Pharm Res.* 2002;19(2):189-194.

Jafari SM, Assadpoor E, He Y, Bhandari B. Re-coalescence of emulsion droplets during high - energy emulsification. *Food Hydrocoll.* 2008;22(7):1191-202.

Jafari SM, He Y, Bhandari B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - a comparison. *Int J Food Prop.* 2006;9(3):475-485.

Jahnke S. The theory of high pressure homogenization. U: Müller RH, Benita S, Böhm B, eds. *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs.* Stuttgart: MedPharm Scientific Publishers, 1998, 177-200.

Jenning V, Gohla SH. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J Microencapsul.* 2001;18(2):149-158.

Jenning V, Lippacher A, Gohla SH. Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. *J Microencapsul.* 2002;19(1):1-10.

Jenning V, Schäfer-Korting M, Gohla S. Vitamin A - loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J Control Release.* 2000;66(2-3):115-126.

Jillavenkatesa A, Dapkunas SJ, Lum L-S H. *Particle size characterization.* Washington: U.S. Government printing office, 2001.

Johnson W Jr. Final report on the safety assessment of PEG-25 propylene glycol stearate, PEG-75 propylene glycol stearate, PEG-120 propylene glycol stearate, PEG-10 propylene glycol, PEG-8 propylene glycol cocoate, and PEG-55 propylene glycol oleate. *Int J Toxicol.* 2001;20(Suppl4):13-26.

Jolles S, Niclasse S, Benson E. Combination oral and topical tacrolimus in therapy - resistant pyoderma gangrenosum. *Br J Dermatol.* 1999;140(3):564-565.

Jones RM. Particle size analysis by laser diffraction: ISO 13320, standard operating procedures, and Mie theory. *Am Lab.* 2003;44-47.

Jores K, Haberland A, Wartewig S, Mäder K, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil - loaded SLN studied by spectrofluorometry and Raman spectroscopy. *Pharm Res.* 2005;22(11):1887-1897.

Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mäder K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil - loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field - flow fractionation and transmission electron microscopy. *J Control Release.* 2004;95(2):217-227.

Joseph S, Bunjes H. Solid lipid nanoparticles for drug delivery. U: Douroumis D, Fahr A, eds. *Drug delivery strategies for poorly water soluble drugs*, 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2013, 103-133.

Joshi MD, Müller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(2):161-172.

Judefeind A, de Villiers MM. Drug loading into and in vitro release from nanosized drug delivery systems. U: de Villiers MM, Aramwit P, Kwon GS, eds. *Nanotechnology in Drug Delivery*. New York: Springer, 2009, 129-162.

Kamiya H. Characteristics and behavior of nanoparticles and its dispersion systems. U: Hosokawa M, Nogi K, Naito M, Yokoyama T, eds. *Nanoparticle technology handbook*, 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2007, 115-119.

Kang S, Lucky AW, Pariser D, Lawrence I, Hanifin JM. Long - term safety and efficacy of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in children. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44(1):S58-64.

Karlberg AT, Bodin A, Matura M. Allergenic activity of an air - oxidized ethoxylated surfactant. *Contact Dermatitis.* 2003;49(5):241-247.

Keck CM. Cyclosporine nanosuspensions: optimised size characterisation & oral formulations. *Doktorska disertacija*, Freie Universität Berlin, 2006.

Keck CM. Particle size analysis of nanocrystals: Improved analysis method. *Int J Pharm.* 2010;390(1):3-12.

Keck CM, Müller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;62:3-16.

Keck CM, Müller RH. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry - 90 % of the published measurements are false. *Int J Pharm.* 2008;355(1-2):150-163.

Kikuchi K, Tagami H. Comparison of the effects of daily applications between topical corticosteroid and tacrolimus ointments on normal skin: Evaluation with noninvasive methods. *Dermatology.* 2002;205(4):378-382.

Klang V, Matsko N, Raupach K, El-Hagin N, Valenta C. Development of sucrose stearate - based nanoemulsions and optimisation through gamma - cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;79(1):58-67.

Klang V, Valenta C, Matsko NB. Electron microscopy of pharmaceutical systems. *Micron* 2013;44:45-74.

Kohyama T, Takizawa H, Kawasaki S, Akiyama N, Sato M, Ito K, et al. A potent immunosuppressant FK506 inhibits IL-8 expression in human eosinophils. *Mol Cell Biol Res Commun.* 1999;1(1):72-77.

Koo JY, Fleischer AB Jr, Abramovits W, Pariser DM, McCall CO, Horn TD, et al. Tacrolimus ointment is safe and effective in the treatment of atopic dermatitis: Results in 8000 patients. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(2):195-205.

Kristl J, Volk B, Gašperlin M, Šentjerc M, Jurkovič P. Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. *Eur J Pharm Sci.* 2003;19(4):181-189.

Kroft EB, Erceg A, Maimets K, Vissers W, van der Valk PGM, van de Kerkhof PCM. Tacrolimus ointment for the treatment of severe facial plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005;19(2):249-251.

Kumar S, Randhawa JK. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(4):1842-1852.

Kyllönen H, Remitz A, Mandelin JM, Elg P, Reitamo S. Effects of 1-year intermittent treatment with topical tacrolimus monotherapy on skin collagen synthesis in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2004;150(6):1174-1181.

Lane BC, Miller LN, Kawai M, Or YS, Wiedeman P, Holzman TF, et al. Evaluation of calcineurin's role in the immunosuppressive activity of FK 506, related macrolactams and cyclosporine. *Transplant Proc.* 1993;25(1):644-646.

Lanigan RS. Final report on the safety assessment of PEG-2, -3, -5, -10, -15, and -20 cocamine. *Int J Toxicol.* 1999;18(Suppl 1):43-50.

Lanigan RS, Yamarik TA. Final report on the safety assessment of PEG-6, -8, and -20 sorbitan beeswax. *Int J Toxicol.* 2001; 20(Suppl 4):27-38.

Lebwohl M, Freeman A, Chapman MS, Feldman S, Hartle J, Henning A. Proven efficacy of tacrolimus for facial and intertriginous psoriasis. *Arch Dermatol.* 2005;141(9):1154.

Lener EV, Brieva J, Schachter M, West LE, West DP, el-Azhary RA. Successful treatment of erosive lichen planus with topical tacrolimus. *Arch Dermatol.* 2001;137(4):419-422.

Li Y, Taulier N, Rauth AM, Wu XY. Screening of lipid carriers and characterization of drug-polymer-lipid interactions for the rational design of polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN). *Pharm Res.* 2006;23(8):1877-1887.

Liang Y, Hilal N, Langston P, Starov V. Interaction forces between colloidal particles in liquid: Theory and experiment. *Adv Colloid Interface Sci.* 2007;134-135:151-166.

Liedtke S, Wissing S, Müller RH, Mäder K. Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics. *Int J Pharm.* 2000;196:183-185.

Lim SJ, Kim CK. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int J Pharm.* 2002;243(1-2):135-146.

Lim SJ, Lee MK, Kim CK. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. *J Control Release.* 2004;100(1):53-61.

Lin X, Li X, Zheng L, Yu L, Zhang Q, Liu W. Preparation and characterization of monocaprato nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2007;311(1-3):106-111.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers. *Int J Pharm.* 2000;196(2):227-230.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2001;214(1-2):9-12.

Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Semisolid SLNTM dispersions for topical application: Influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002;53(2):155-160.

- Lippacher A, Müller RH, Mäder K. Liquid and semisolid SLNTM dispersions for topical application: Rheological characterization. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(3):561-567.
- Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, et al. Inhibition of T cell signaling by immunophilin - ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry.* 1992;31(16):3896-3901.
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine-A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 1991;66(4):807-815.
- Lombardi Borgia S, Regehy M, Sivaramakrishnan R, Mehnert W, Korting NC, Danker K, et al. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement - correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and paretic spectroscopy. *J Control Release.* 2005;110(1):151-63.
- Lucks JS, Müller RH. Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen, Feste Lipidnanosphären (SLN)., Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN), European Patent No. 0605497, 1996.
- Manconi M, Sinico C, Valenti D, Lai F, Fadda AM. Niosomes as carriers for tretinoin. III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicle - incorporated tretinoin. *Int J Pharm.* 2006;311(1-2):11-19.
- Matura M, Bodin A, Skare L, Nyrén M, Hovmark A, Lindberg M, et al. Multicentre patch test study of air - oxidized ethoxylated surfactants. *Contact Dermatitis.* 2004;51(4):180-188.
- McClements DJ. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: implications for emulsion - based delivery systems. *Adv Colloid Interface Sci.* 2012;174:1-30.
- McClements DJ, Decker EA, Weiss J. Emulsion - based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J Food Sci.* 2007;72(8):R109-124.
- Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:83-101.
- Mehnert W, zur Mühlen A, Dingler A, Weyhers H, Müller RH. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) - ein neuartiger Wirkstoff - Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika, II. Wirkstoff-Inkorporation, Freisetzung und Sterilisierbarkeit. *Pharm Ind.* 1997;59(6):511-514.
- Messinger H, Aulmann W, Kleber M, Koehl W. Investigations on the effects of alkyl polyglucosides on development and fertility. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(8):1375-1382.
- Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallosungen. *Ann Phys.* 1908;25(3):377-445.
- Miller A, Neogi P. Fundamentals of wetting, contact angle, and adsorption. U: Miller A, Neogi P, eds. *Interfacial phenomena: equilibrium and dynamics effects*, 2nd ed. Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2008, 61-109.
- Morris R. Modes of action of FK506, cyclosporine A, and rapamycin. *Transplant Proc.* 1994;26(6):3272-5.
- MRK656-01, Dynamic light scattering - an introduction in 30 minutes, Technical Note (version 4), Malvern Instruments Ltd., UK, 2014. Dostupno sa: <http://www.malvern.com> (poslednji pregled, 22.10.2014).
- MRK1806-01, A basic guide to particle characterization, Inform white paper, Malvern Instruments Ltd., UK, 2012. Dostupno sa: <http://www.malvern.com> (poslednji pregled, 22.10.2014).

MRK1872-04, Mastersizer 3000 smarter particle sizing, Technical note, Malvern Instruments Ltd., UK.
Dostupno sa: <http://www.malvern.com> (poslednji pregled, 22.10.2014).

Muchow M, Maincent P, Müller RH. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN[®], NLC[®], LDC[®]) for oral drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2008;34(12):1394-1405.

Murphy DB. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. New York: John Wiley & Sons Inc., 2001.

Mäder K, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles - concepts, procedures, and physicochemical aspects. U: Nazzari C, eds. *Liposomes in drug targets and delivery: approaches, methods, and applications*. Boca Raton: CRC Press LLC, 2005, 1-22.

Müller RH. Zetapotential und Partikeladung in der Laborpraxis. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, 1996.

Müller RH, Böhm B. Nanosuspensions. U: Müller RH, Benita S, Böhm B, eds. *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1998, 149-174.

Müller RH, Dingler A. The next generation after the liposomes: Solid lipid nanoparticles (SLNTM, LipopearlsTM) as dermal carrier in cosmetics. *Eurocosmetics*. 1998;7/8:19-26.

Müller RH, Jacobs C. Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: Preparation, optimisation and long-term stability. *Int J Pharm*. 2002;237(1-2):151-161.

Müller RH, Lippacher A, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN[®]) as carrier system for the controlled release of drugs. U: Wise DL, eds. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*. New York: Marcel Dekker Inc., 2000a, 377-391.

Müller RH, Mehnert W, Lucks JS, Schwarz C, zur Mühlen A, Meyhert H, et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) - an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 1995;41(1):62-69.

Müller RH, Mehnert W, Souto EB. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for dermal delivery. U: Bronaugh L, eds. *Percutaneous absorption*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2005, 719-738.

Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000b;50(1):161-177.

Müller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(6):522-530.

Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002a;54(Suppl1):131-155.

Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm*. 2002b;242(1-2):121-128.

Müller RH, Runge S, Ravelli V, Mehnert W, Thünemann AF, Souto EB. Oral bioavailability of cyclosporine: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *Int J Pharm*. 2006;317(1):82-89.

Müller RH, Schuhmann R. Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, 1996.

Müller RH, Shegokar R, Keck CM. 20 years of lipid nanoparticles (SLN, NLC): Present state of development and industrial applications. *Curr Drug Discov Technol*. 2011;8(3):207-227.

Müller RH, Shegokar R, Singh KK. Positively charged nanostructured lipid carriers (NLC) for drug delivery by adhesion. 9th International Symposium on Advances in Technology and Business Potential of New Drug Delivery Systems' Controlled Release Society - Indian Chapter. Mumbai 2009, P150.

Ney P. Zetapotential und Flotierbarkeit von Mineralien. Wien, New York: Springer, 1973.

Nghiem P, Pearson G, Langley RG. Tacrolimus and pimecrolimus: From clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2002;46(2):228-241.

Nikolić S, Keck CM, Anselmi C, Müller RH. Skin photoprotection improvement: Synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters. *Int J Pharm*. 2011;414(1-2):276-284.

Njobuenwu DO, Oboho EO, Gumus RH. Determination of contact angle from contact area of liquid droplet spreading on solid substrate. *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*. 2007; 10:29-38.

Paller AS, Lebwohl M, Fleischer AB Jr, Antaya R, Langley RG, Kirsner RS, et al. Tacrolimus ointment is more effective than pimecrolimus cream with a similar safety profile in the treatment of atopic dermatitis: Results from 3 randomized, comparative studies. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(5):810-822.

Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm*. 2009;366(1-2):170-184.

Pardeike J, Müller RH. Nanosuspensions: A promising formulation for the new phospholipase A₂ inhibitor PX-18. *Int J Pharm*. 2010;391(1-2):322-329.

Pardeike J, Schmidt C, Volz I, Müller RH. NLC as delivery system for the phospholipase A₂ inhibitors PX-18 and PX-13 for dermal application. *Pharmazie*. 2011;66(5):357-361.

Pardeike J, Schwabe K, Müller RH. Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q10 cream and the in vivo skin hydration effect. *Int J Pharm*. 2010;396(1-2):166-173.

Parhi R, Suresh P. Production of solid lipid nanoparticles - drug loading and release mechanism. *J Chem Pharm Res*. 2010;2(1):211-227.

Patravale VB, Ambarkhane AV. Study of solid lipid nanoparticles with respect to particle size distribution and drug loading. *Pharmazie*. 2003;58(6):392-395.

Peppas NA. A model of dissolution-controlled solute release from porous drug delivery polymeric systems. *J Biomed Mater Res*. 1983;17(6):1079-1087.

Perez M. Gibbs-Thomson effects in phase transformations. *Scr Mater*. 2005;52(8):709-712.

Piao H, Kamiya N, Hirata A, Fujii T, Goto M. A novel solid-in-oil nanosuspension for transdermal delivery of diclofenac sodium. *Pharm Res* 2008;25(4):896-901.

Pople PV, Singh KK. Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis. *Int J Pharm*. 2010;398(1-2):165-178.

Pople PV, Singh KK. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;79(1):82-94.

Pople PV, Singh KK. Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis - Part II: In vivo assessment of dermatopharmacokinetics, biodistribution and efficacy. *Int J Pharm*. 2012;434(1-2):70-79.

- Pople PV, Singh KK. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus, Part II - *In vivo* assessment, drug targeting, efficacy, and safety in treatment for atopic dermatitis. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;84(1):72-83.
- Pournaras CC, Lübke J, Saurat JH. Staphylococcal colonization in atopic dermatitis treatment with topical tacrolimus (FK506). *J Invest Dermatol.* 2001;116(3):480-481.
- Radtke M. Nanostructured lipid carriers (NLC): Untersuchungen zur Struktur, Wirkstoffinkorporation und Stabilität. Doktorska disertacija, Freie Universität Berlin, 2003.
- Radtke M, Souto EB, Müller RH. Nanostructured lipid carriers: A novel generation of solid lipid drug carriers. *Pharmaceutical Technology Europe.* 2005;17(4):45-50.
- Rawle A. Basic of principles of particle-size analysis. *Surface coatings international Part A, Coatings journal.* 2003;86:58-65.
- Reddy LH, Murthy RS. Etoposide-loaded nanoparticles made from glyceride lipids: Formulation, characterization, *in vitro* drug release, and stability evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 2005;6(2):E158-166.
- Reitamo S, Harper J, Bos JD, Cambazard F, Bruijnzeel-Koomen C, Valk P, et al. 0.03 % tacrolimus ointment applied once or twice daily is more efficacious than 1 % hydrocortisone acetate in children with moderate to severe atopic dermatitis: results of a randomized double-blind controlled trial. *Br J Dermatol.* 2004;150(3):554-562.
- Reitamo S, Ortonne JP, Sand C, Cambazard F, Bieber T, Fölster-Holst R, et al. A multicentre, randomized, double-blind, controlled study of long-term treatment with 0.1 % tacrolimus ointment in adults with moderate to severe atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2005;152(6):1282-1289.
- Reitamo S, Rissanen J, Remitz A, Granlund H, Erkkö P, Elg P, et al. Tacrolimus ointment does not affect collagen synthesis: results of a single-center randomized trial. *J Invest Dermatol.* 1998;111(3):396-398.
- Reitamo S, Wollenberg A, Schopf E, Perrot JL, Marks R, Ruzicka T, et al. Safety and efficacy of 1 year of tacrolimus ointment monotherapy in adults with atopic dermatitis. The European Tacrolimus Ointment Study Group. *Arch Dermatol.* 2000;136(8):999-1006.
- Remitz A, Harper J, Rustin M, Goldschmidt WF, Palatsi R, van der Valk PG, et al. Long-term safety and efficacy of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in children. *Acta Derm Venereol.* 2007;87(1):54-61.
- Remitz A, Kyllönen H, Granlund H, Reitamo S. Tacrolimus ointment reduces staphylococcal colonization of atopic dermatitis lesions. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(1):196-197.
- Remitz A, Reitamo S, Erkkö P, Granlund H, Lauerma AI. Tacrolimus ointment improves psoriasis in a microplaque assay. *Br J Dermatol.* 1999;141(1):103-107.
- Richter-Hintz D, Schuppe HC, Homey B, Lehmann P, Ruzicka T. Topical tacrolimus (FK506) is effective in the treatment of pyoderma gangrenosum. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(2):304-305.
- Riddick TM. Control of colloidal stability through zeta potential. New York: Zeta Meter Inc., 1968.
- Rogueda P. Novel hydrofluoroalkane suspension formulations for respiratory drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2005;2(4):625-638.
- Rosen MJ, Kunjappu JT. Surfactants and interfacial phenomena, 4th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

- Rowe RC. Interactions of lubricants with microcrystalline cellulose and anhydrous lactose - a solubility parameter approach. *Int J Pharm.* 1988;41(3):223-226.
- Rubins A, Gutmane R, Valdmāne N, Stevenson P, Foster C, Undre N. Pharmacokinetics of 0.1 % tacrolimus ointment after first and repeated application to adults with moderate to severe atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2005;125(1):68-71.
- Ruzicka T, Assmann T, Homey B. Tacrolimus: the drug for the turn of the millennium? *Arch Dermatol.* 1999;135(5):574-580.
- Ruzicka T, Bieber T, Schopf E, Rubins A, Dobozy A, Bos JD, et al. A short-term trial of tacrolimus ointment for atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 1997;337(12):816-821.
- Runge SA. Feste Lipid-Nanopartikel (SLN) als kolloidaler Arzneistoffträger für Ciclosporin A. *Doktorska disertacija, Freie Universität Berlin*, 1998.
- Santos Maia C, Mehnert W, Schaller M, Korting HC, Gysler A, Haberland A, et al. Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use. *J Drug Target.* 2002;10(6):489-495.
- Santos Maia C, Mehnert W, Schäfer-Korting M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. *Int J Pharm.* 2000;196(2):165-167.
- Sarmento B, Martin S, Ferreira D, Souto EB. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(4):743-749.
- Saupe A. Pharmazeutisch-kosmetische Anwendungen Nanostrukturierter Lipidcarrier (NLC): Lichtschutz und Pflege. *Doktorska disertacija, Freie Universität Berlin*, 2004.
- Saupe A, Wissing SA, Lenk A, Schmidt C, Müller RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) - structural investigations on two different carrier systems. *Biomed Mater Eng.* 2005;15(5):393-402.
- Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, Takaku F. Novel immunosuppressive agent, FK506. In vitro effects on the cloned T cell activation. *J Immunol.* 1987;139(6):1797-1803.
- Schmid K., Tesmann H. Alkyl polyglycosides. In: *Detergency of specialty surfactants*. edited by Floyd E Friedli, 2001, Marcel Dekker, Inc, Basel, Switzerland, 1-71.
- Schulz MB, Daniels, R. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: Influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;49(3):231-236.
- Schuppe H, Richter-Hintz D, Stierle HE, Homey B, Ruzicka T, Lehmann P. Topical tacrolimus for recalcitrant leg ulcer in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2000;39(1):105-106.
- Schwarz C, Mehnert W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm.* 1997;157(2):171-179.
- Schäfer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(6):427-443.
- SciFinder Scholar - CAS, log P calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 (© 1994-2007, ACD/Labs).
- Sengoku T, Kishi S, Sakuma S, Ohkubo Y, Goto T. FK506 inhibition of histamine release and cytokine production by mast cells and basophils. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22(3):189-201.

- Severino P, Pinho SC, Souto EB, Santana MHA. Crystallinity of Dynasan[®]114 and Dynasan[®]118 matrices for the production of stable Miglyol-loaded nanoparticles. *J Therm Anal Calorim.* 2012;108:101-108.
- Shah M, Agrawal Y. High throughput screening: an *in silico* solubility parameter approach for lipids and solvents in SLN preparations. *Pharm Dev Technol.* 2013;18(3):582-590.
- Shegokar R, Singh KK, Müller RH. Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles: From lab to industrial scale. *Int J Pharm.* 2011;416:461-470.
- Siekman B. Untersuchungen zur Herstellung und zum Rekristallisationsverhalten schmelzemulgierter intravenös applizierbarer Glyceridnanopartikel. Doktorska disertacija, Technische Universität Carolo Wilhelmina Braunschweig, 1994.
- Siekman B, Westesen K. Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. I. Preparation and particle size determination. *Pharm Pharmacol Lett.* 1994a;3:194-197.
- Siekman B, Westesen K. Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. II. Physicochemical characterization and lyophilisation. *Pharm Pharmacol Lett.* 1994b;3:225-228.
- Siekman B, Westesen K. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1994c;3(3):159-175.
- Siekman B, Westesen K. Submicron lipid suspensions (solid lipid nanoparticles) versus lipid nanoemulsions - similarities and differences. U: Benita S, eds. *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998, 205-218.
- Siewert M, Dressman J, Brown C, Shah VP. FIP/AAPS Guidelines for dissolution/*in vitro* release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech.* 2003;4(1):E7.
- Silverberg NB, Lin P, Travis L, Farlez-Li J, Mancini AJ, Wagner AM, et al. Tacrolimus ointment promotes repigmentation of vitiligo in children: A review of 57 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(5):760-766.
- Sivaramakrishnan R, Nakamura C, Mehnert W, Korting HC, Kramer KD, Schäfer-Korting M. Glucocorticoid entrapment into lipid carriers - characterisation by preelectric spectroscopy and influence on dermal uptake. *J Control Release.* 2004;97:493-502.
- Soter NA, Fleischer AB Jr, Webster GF, Monroe E, Lawrence I. Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adult patients: part II, safety. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44(Suppl1):S39-46.
- Souto EB. SLN and NLC for topical delivery of antifungals. Doktorska disertacija, Freie Universität Berlin, 2005.
- Souto EB, Almeida AJ, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN[®], NLC[®]) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. *J Biomed Nanotechnol.* 2007;3(4):317-31.
- Souto EB, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN and NLC) for drug delivery. U: Domb AJ, Tobata Y, Kumar MNVR, Farber S, eds. *Nanoparticles for pharmaceutical applications.* Valencia: American Scientific Publishers, 2007a, 103-122.
- Souto E B, Müller RH. Rheological and *in vitro* release behaviour of clotrimazole-containing aqueous SLN dispersions and commercial creams. *Die Pharmazie* 2007b;62:505-509.

Souto EB, Müller RH. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - lipid nanoparticles for medicals and pharmaceuticals. U: Nalwa HS, eds. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology Volumen 23. Valencia: American Scientific Publishers, 2009, 313-328.

Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Müller RH. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm.* 2004;278(1):71-7.

Spergel J, Prenner B, Rico MJ. Tacrolimus ointment monotherapy is a safe and effective treatment for mild atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2)(Suppl1):S156.

Steber J, Guhl W, Stelter N, Schröder FH. Ecological evaluation of alkyl polyglucosides. U: Hill K, von Rybinski W, Stoll G, eds. Alkyl Polyglucosides: technology, properties and applications. Weinheim: VCH-Wiley Verlag GmbH & Co. KGaA, 1997, 177-191.

Steele JA, Choi C, Kwong PC. Topical tacrolimus in the treatment of inverse psoriasis in children. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(4):713-716.

Stepkowski SM. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med.* 2000;2(4):1-23.

Stratton JA. Electromagnetic theory. New York: John Wiley & Sons Inc., 2007.

Stubenrauch C. Sugar surfactants - aggregation, interfacial, and adsorption phenomena. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2001;6(2):160-170.

Sznitowska M, Gajewska M, Janicki S, Radwanska A, Lukowski G. Bioavailability of diazepam from aqueous - organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001;52(2):159-163.

Szűts A, Szabó-Révész P. Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems-A mini-review. *Int J Pharm.* 2012;433(1-2):1-9.

Söderman O, Johansson I. Polyhydroxyl-based surfactants and their physico-chemical properties and applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 1999;4(6):391-401.

Tadros TF. Applied surfactants - principles and applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.

Tadros TF, Vincent B. Influence of temperature and electrolytes on the adsorption of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer on polystyrene latex and on the stability of the polymer-coated particles. *J Phys Chem C.* 1980;84(12):1575-1580.

Tahara Y, Honda S, Kamiya N, Piao H, Hirata A, Hayakawa E, et al. A solid-in-oil nanodispersion for transcutaneous protein delivery. *J Control Release.* 2008;131(1):14-18.

Takegami S, Kitamura K, Kawada H, Matsumoto Y, Kitade T, Ishida H, et al. Preparation and characterization of a new lipid nano-emulsion containing two cosurfactants, sodium palmitate for droplet size reduction and sucrose palmitate for stability enhancement. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2008;56(8):1097-102.

Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H, Hatanaka H, Kinot T, Goto T, et al. Structure of FK506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. *J Am Oil Chem Soc.* 1987;109(16):5031-5033.

Teeranachaideekul V. Nanostructured lipid carriers (NLC) - stability improvement and release modification of ascorbyl palmitate and coenzyme Q10. Doktorska disertacija, Mahidol University, 2008.

The United State Pharmacopoeia 36, The National Formulary 31 (USP/NF). Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2013.

Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit.* 1995;17(6):584-591.

Tsushima R. Surfactants and related products from natural raw materials. *Proceedings of the 4th World Surfactant Congress. Vol I, Barcelona, Spain, 1995, 43-56.*

Tzachev CT, Svilenov HL. Lipid nanoparticles at the current stage and prospects - a review article. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2013;18(1):103-115.

US FDA Guidance for Industry. Nonsterile semisolid dosage forms, scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. Rockville: U.S. Department of health and human services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 1997.

van de Hulst HC. Light scattering by small particles. New York: Dover Publications Inc., 1981.

van Krevelen DW, Te Nijenhuis K. Properties of polymers. Their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions, 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2009.

Venkateswarlu V, Manjunath K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *J Control Release.* 2004;95(3):627-638.

Vente C, Reich K, Rupprecht R, Neumann C. Erosive mucosal lichen planus: response to topical treatment with tacrolimus. *Br J Dermatol.* 1999;140(2):338-342.

Vivek K, Reddy H, Murthy RS. Investigations of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, in vitro release, and physical stability of olanzapine - loaded solid lipid nanoparticles. *AAPS PharmSciTech.* 2007;8(4):E83.

von Rybinski W, Hill K. Alkyl polyglucosides - properties and application of a new class of surfactants. *Angew Chem Int Ed.* 1998;37(10):1328-1345.

Vuleta G, Milić J, Primorac M, Savić S. *Farmaceutska tehnologija I.* Beograd: Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, 2012.

Wang Y, Deng Y, Mao S, Jin S, Wang J, Bi D. Characterization and body distribution of beta-elemene solid lipid nanoparticles (SLN). *Drug Dev Ind Pharm.* 2005;31(8):769-778.

Wang JX, Sun X, Zhang ZR. Enhanced brain targeting by synthesis of 3',5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine incorporation into solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002;54(3):285-290.

Washington C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *Int J Pharm.* 1990;58(1):1-12.

Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J Control Release.* 1997;48(2-3):223-236.

Westesen K, Drechsler M, Bunjes H. Colloidal dispersions based on solid lipids. U: E. Dickinson, R. Miller, eds. *Food Colloids: Fundamentals of Formulation.* Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001, 103-115.

Westesen K, Siekmann B, Koch MH. Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. *Int J Pharm.* 1993;93(1-3):189-199.

Westesen K, Siekmann B. Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 1997;15(1):35-45.

Westesen K, Siekmann B. Solid lipid particles, particles of bioactive agents and methods for the manufacture and use thereof. European Patent No. 0687172 B1, 1998.

Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(9):1257-1272.

Wissing SA, Lippacher A, Müller RH. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Cosmet Sci.* 2001;52(5):313-324.

Wissing S, Müller RH. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *Int J Pharm.* 2002;242(1-2):377-379.

Wissing SA, Müller RH. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity - in vivo study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003;56(1):67-72.

Wohlrab J. Calcineurin inhibitors for topical therapy in psoriasis. *Hautarzt.* 2006;57(8):685-9.

Wollenberg A, Bieber T. FK-506/Tacrolimus. U: *Strategies for Immunointerventions in dermatology*, Burg G, Dummer RG, eds. Springer-Verlag: Heidelberg, 1997, 53-57.

Wollenberg A, Bieber T. Topical immunomodulatory agents and their targets in inflammatory skin diseases. *Transplant Proc.* 2001;33(2):2212-2216.

Yang Y, Corona Ill A, Schubert B, Reeder R, Henson MA. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. *J Colloid Interface Sci.* 2014;418:261-272.

Yang SC, Lu LF, Cai Y, Zhu JB, Liang BW, Yang CZ. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J Control Release.* 1999a; 59(3):299-307.

Yang S, Zhu J, Lu Y, Liang B, Yang C. Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharm Res.* 1999b;16(5):751-757.

Yang SC, Zhu JB. Preparation and characterization of camptothecin solid lipid nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002;28(3):265-274.

Yasuda H. Contact angle and wettability. U: *Luminous Chemical Vapor Deposition and Interface Engineering*, Hubbard AT, ed. Marcel Dekker: New York, 2005;525-559.

Yoshida H, Tamura S, Toyoda T, Kado K, Ohnishi N, Ibuki R. In vitro release of Tacrolimus from Tacrolimus ointment and its speculated mechanism. *Int J Pharm.* 2004;270(1-2):55-64.

Yuan Y, Lee TR. Contact angle and wetting properties. U: *Surface science techniques*, Bracco G, Holst B, ed. Springer: Berlin, Heidelberg, 2013, 3-34.

Zetasizer Nano Series User Manual, Malvern Inc., UK, 2007.

Zimmermann I. Possibilities and limitations of laser light scattering techniques for particle size analysis. U: *Particle and surface characterization methods*, Muller RH, Mehnert W, ed. Medpharm Scientific Publishers: Stuttgart, 1997.

Zimmermann E, Müller RH. Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001;52(2):203-210.

zur Mühlen A. Feste Lipid Nanopartikel mit prolongierter Wirkstoffliberation. Doktorska disertacija, Freie Universität Berlin, 1996.

zur Mühlen A, Mehnert W. Drug release and release mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles. Pharmazie. 1998;53(8):552-555.

zur Mühlen A, Schwarz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-drug release and release mechanism. Eur J Pharm Biopharm. 1998;45(2):149-155.

elektronske baze podataka:

i) www.ciberlipid.org/glicer/glic0013.htm (poslednji pristup 22.10.2014.)

8. Prilozi

8.1. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

8.1.1. Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu

Radovi u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck, CM. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on the particle size, physical stability and particle matrix structure. Int. J. Pharm. 2011, 406, 163-172 (doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.036).
2. Keck, CM. Kovačević A, Müller RH, Savić S, Vuleta G, Milić J. Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): The value of different alkyl polyglucoside surfactants. Int. J. Pharm. 2014, 474 (1-2), 33-41 (doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.08.008).

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu

3. Kovačević A, Müller RH, Savić S, Vuleta G, Keck, CM. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. Colloid. Surface A. 2014, 444, 15-25 (doi: 10.1016/j.colsurfa.2013.12.023).

8.1.2. Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini

1. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck CM. Oil loaded lipid nanoparticles stabilized with polyglycerol fatty acid esters: a physico-chemical characterization. 7th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valetta, Malta, 8-11.3.2010., p. 32, #115.
2. Kovacevic A, Müller RH, Savic S, Vuleta G, Keck CM. Preparation and characterization of alkylpolyglucoside - based solid lipid nanoparticles The 38th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Maryland, USA, 30.7-3.8.2011. (usmeno predavanje)
3. Kovacevic A, Isailovic T, Milic J, Vuleta G, Savic S. Formulacija nanoemulzija variranjem tipa surfaktanta pripremljenih homogenizacijom pod visokim pritiskom II Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Banja Luka, Republika Srpska, 17-20.11.2011., 256-258.
4. Kovacevic A, Milinkovic J, Milic J, Vuleta G, Savic S. Formulacija nanoemulzija sa visokim udelom masne faze II Kongres farmaceuta Bosne i

Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Banja Luka, Republika Srpska, 17-20.11.2011., 259-261.

5. Kovacevic A, Milic J, Vuleta G, Isailovic T, Milinkovic J, Savic S. Formulation and physical stability evaluation of a polyhydroxy surfactant stabilized nanoemulsions with varying oil content. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul, Turkey, 19-22.3.2012., P 117.
6. Kovacevic AB, Müller RH, Savic SD, Vuleta GM, Keck CM. Successful formulation of solid lipid nanoparticles (SLN) using polyhydroxy surfactants. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 40, Honolulu/Hawaii, 21-24.7.2013., #409.
7. Kovacevic A, Müller RH, Savic S, Milic J, Vuleta G, Keck CM. Lipid nanoparticles stabilized with an alkyl polyglucoside surfactant for dermal delivery of tacrolimus, 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisbon, 31.3-3.4.2014., p. 36, #234.
8. Kovacevic A, Müller RH, Savic S, Vuleta G, Milic J, Keck CM. Sugar esters for the formulation of lipid nanoparticles, 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics & Pharmaceutical Technology, Lisbon, 31.3-3.4.2014., p. 24, #11.

8.1.3. Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu

1. Kovacevic A, Savic S, Müller RH, Keck CM. Evaluation of sucrose esters as novel stabilizers for solid lipid nanoparticles (SLNs), Annual Conference of the German Pharmaceutical Society, Jena, Germany, 28.9-1.10.2009., p C03.
2. Müller RH, Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Keck CM. Alkyl polyglucosides - novel stabilizers for dermal solid lipid nanoparticles (SLNs), Annual Conference of the German Pharmaceutical Society, Jena, Germany, 28.9-1.10.2009., p C29.
3. Kovacevic A, Savic S, Milic J, Müller RH, Keck CM. Polyglycerol fatty acid ester based lipid nanoparticles: a physical stability & crystalline status, 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Graz, Austria, 16-18.9.2010., USB stick
4. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck CM. Formulation, physical stability and crystalline status of polyhydroxy surfactant based SLN and NLC Annual Conference of the German Pharmaceutical Society, Braunschweig, Germany, 4-7.10.2010., T049.
5. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck CM. Formulation of SLN and NLC using PEG-free surfactants, Overview of activities in Nanotechnologies/Nanodata, Metz, France, 24-25.11.2010., P22.

6. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck CM. Preparation and stability investigation of alkyl polyglucoside based solid lipid nanoparticles (SLN) for dermal application, Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting & International Symposium of the Thuringian ProExcellence Initiative NanoConSens, Jena, Germany, 15-16.3.2011., P30.
7. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck CM. Development of polyhydroxy surfactant based lipid nanoparticles, Pharm Sci Fair 2011, Prague, Czech Republic, 13-17.7.2011., P-254.
8. Kovacevic A, Müller RH, Keck, CM. *In vitro* release of tacrolimus from the nanostructured lipid carriers (NLC), CRS German Chapter Annual Meeting, Würzburg, Germany, 29-30.3.2012., P 5-3.
9. Kovacevic A, Müller RH, Savic S, Vuleta G, Keck, CM. Influence of nonionic polyhydroxy surfactants on the formation of the lipid nanoparticles, 9th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology 2012, Dubrovnik, Croatia, 20-22.9.2012., PP-27, p.98.
10. Kovacevic A, Müller RH, Schmhardt C, Volz I, Savic S, Vuleta G, Keck CM. Tacrolimus loaded nanostructured lipid carriers (NLC) formulation for dermal application, 9th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology 2012, Dubrovnik, Croatia, 20-22.9.2012., PP-79, p.153.
11. Kovacevic A, Müller RH, Keck CM. Physicochemical characterization of alkyl polyglucoside surfactants based lipid nanoparticles, 9th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology 2012, Dubrovnik, Croatia, 20-22.9.2012., PP-28, p.99.
12. Keck CM, Kovacevic A, Müller RH. Natural surfactant of polyglycerol fatty acid esters type as stabilizers for lipid nanoparticles, DPhG-Jahrestagung, Greifswald, Germany, 11-13.10.2012., P 063.
13. Kovacevic A, Sinambela, P, Müller, RH, Savic, S, Keck, CM. Development of a controlled release formulation for tacrolimus based on nanostructured lipid carriers (NLC), AAPS Annual Meeting and Exposition 2012, Chicago, USA, 14-18.10.2012., R6135.
14. Keck CM, Kovacevic A, Savic S, Milic J, Müller RH. Sucrose esters in the lipid nanoparticles formulation, 7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences: Interdisciplinary research for Pharmacy, Gdansk, Poland, 24-25.5.2013., p.44.

8.1.4. Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu

1. Kovačević A, Savić S, Vuleta G. In vitro ispitivanje brzine oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskih preparata za primenu na koži, In vitro ispitivanje brzine rastvaranja: uloga u biofarmaceutskoj karakterizaciji preparata, Biofarm 2007, Beograd, Srbija, 27.9.2007., P11.
2. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Milic J, Müller RH. Formulacija lipidnih nanočestica za poboljšanu isporuku lekovitih supstanci u kožu: takrolimus kao model lek, Uticaj faktora formulacije i procesa proizvodnje na bioraspoloživost lekova, Biofarm 2009, Beograd, Srbija, 23.10.2009., P08.
3. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Milic J, Keck CM, Müller RH. Lipidne nanočestice stabilizovane poliglicerolskim estrima masnih kiselina: fizička stabilnost i okluzivne osobine, V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 13-17.10.2010. (Arhiv za farmaciju 2010, 60/5:738-739, PP-3).
4. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Milic J, Keck CM, Müller RH. Formulacija i ispitivanje stabilnosti lipidnih nanočestica sa takrolimusom, V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 13-17.10.2010. (Arhiv za farmaciju 2010, 60/5:740-741, PP-4).
5. Kovacevic A, Milic J, Isailovic T, Milinkovic T, Vuleta G, Savic S. Uticaj formulacionih i procesnih parametara na karakteristike nanoemulzija kao potencijalnih nosača za slabo rastvorne lekovite supstance, Biofarm 2011, Beograd, Srbija, 27.10.2011., P8.
6. Kovačević A, Savić S, Vuleta G, Milić J, Müller RH, Keck CM. Polihidroksilni surfaktanti u formulaciji koloidnih nosača tipa lipidnih nanočestica, VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 15-19.10.2014., 124-125 (usmeno predavanje).

8.1.5. Nagrade

Kovacevic A, Keck CM, Savic S, Milic J, Müller RH. Development of nanostructured lipid carriers (NLC) formulations stabilized with sugar ester, 7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences: Interdisciplinary research for Pharmacy, Gdansk, Poland, 24-25.5.2013., p.65
(Best poster award in recognition of the outstanding scientific contribution and the high quality presentation)



Pharmaceutical Nanotechnology

Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure

A. Kovacevic^a, S. Savic^a, G. Vuleta^a, R.H. Müller^b, C.M. Keck^{c,d,*}^a Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia^b Department of Pharmaceutics, Biopharmaceutics & NutriCosmetics, Freie Universität Berlin, Kelchstr. 31, 12169 Berlin, Germany^c Department of Applied Logistics and Polymer Sciences, University of Applied Sciences Kaiserslautern, Pirmasens, Germany^d Institute of Biosciences (IBS), University Putra Malaysia (UPM), Serdang-Kuala Lumpur, Malaysia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2010

Received in revised form

21 December 2010

Accepted 27 December 2010

Available online 8 January 2011

Keywords:

Polyhydroxy surfactants

Solid lipid nanoparticles

SLN

Nanostructured lipid carriers

NLC

Physical stability

Crystallinity

ABSTRACT

The two polyhydroxy surfactants polyglycerol 6-distearate (Plurol® Stearique WL1009 – (PS)) and caprylyl/capryl glucoside (Plantacare® 810 – (PL)) are a class of PEG-free stabilizers, made from renewable resources. They were investigated for stabilization of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN) and nanostructured lipid carrier (NLC) dispersions. Production was performed by high pressure homogenization, analysis by photon correlation spectroscopy (PCS), laser diffraction (LD), zeta potential measurements and differential scanning calorimetry (DSC). Particles were made from Cutina CP as solid lipid only (SLN) and its blends with Miglyol 812 (NLC, the blends containing increasing amounts of oil from 20% to 60%). The obtained particle sizes were identical for both surfactants, about 200 nm with polydispersity indices below 0.20 (PCS), and unimodal size distribution (LD). All dispersions with both surfactants were physically stable for 3 months at room temperature, but Plantacare (PL) showing a superior stability. The melting behaviour and crystallinity of bulk lipids/lipid blends were compared to the nanoparticles. Both were lower for the nanoparticles. The crystallinity of dispersions stabilized with PS was higher, the zeta potential decreased with storage time associated with this higher crystallinity, and leading to a few, but negligible larger particles. The lower crystallinity particles stabilized with PL remained unchanged in zeta potential (about –50 mV) and in size. These data show that surfactants have a distinct influence on the particle matrix structure (and related stability and drug loading), to which too little attention was given by now. Despite being from the same surfactant class, the differences on the structure are pronounced. They are attributed to the hydrophobic–lipophilic tail structure with one-point anchoring in the interface (PL), and the loop conformation of PS with two hydrophobic anchor points, i.e. their molecular structure and its interaction with the matrix surface and matrix bulk. Analysis of the effects of the surfactants on the particle matrix structure could potentially be used to further optimization of stability, drug loading and may be drug release.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lipid nanoparticles were developed in the last decade of the last century as alternative carrier system to emulsions, liposomes and polymeric nanoparticles (Lucks and Müller, 1996; Mehnert and Mäder, 2001; Müller et al., 2000a,b, 1995). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) are the two main types of lipid nanoparticles. The research activities in SLN and NLC in the last two decades focussed mainly on pharmaceutical non-dermal administration routes, i.e. parenteral (Blasi et al., 2007; Joshi

and Müller, 2009; Wissing et al., 2004), peroral (Muchow et al., 2008; Müller et al., 2006; Sarmiento et al., 2007), ocular (Attama et al., 2007; Ugazio et al., 2002) and pulmonary (Liu et al., 2008) administration. During the last 5 years SLN and NLC have been intensively investigated for dermal application because of many positive features that have been reported after their application to the skin (Müller et al., 2007, 2002b). Due to the lipid matrix, the small particle size and related adhesive properties, the residence time of SLN and NLC on the skin is prolonged. There is a lipid interaction of the particle matrix with skin surface lipids, affecting drug absorption (Lombardi Borgia et al., 2007; Santos Maia et al., 2002). Occlusive properties, increase in skin hydration, modified release of actives, targeting effects to specific skin strata – especially when the drug is located at the particle surface – are also positive features of lipid nanoparticles (Müller et al., 2007). SLN were found to enhance the skin penetration of several dermally applied drugs

* Corresponding author at: Department of Applied Logistics and Polymer Sciences, University of Applied Sciences Kaiserslautern, Pirmasens, Germany.
Tel.: +49 (0)6331 2483 20; fax: +49 (0)6331 2483 44.

E-mail addresses: ck@ckc-berlin.de, conny-keck@web.de (C.M. Keck).

(Lombardi Borgia et al., 2005; Souto et al., 2004; Stecova et al., 2007). The imperfections and fluid domains in the lipid matrix of NLC show a higher loading capacity for a number of drugs than SLN and avoid/minimize potential expulsion of drug during the storage (Mehnert and Mäder, 2001; Pardeike et al., 2009).

Due to the production from physiological and biodegradable lipids, SLN and NLC exhibit good skin tolerability. Good skin tolerability requires also the use of well tolerated surfactants or polymeric stabilizers. A variety of different stabilizers have been used up to now for lipid nanoparticles including ionic (e.g. sodium cholate), non-ionic (e.g. polysorbates), amphoteric surfactants (phospholipids), and polymeric stabilizers (e.g. poloxamers, polyvinyl alcohols) (Siekmann, 1994; Siekmann and Westesen, 1994a,b). Polymeric stabilizers are particularly advisable for dermal application since they are less likely to penetrate beyond the stratum corneum and hence, they are less likely to cause skin irritation. However, the use of polymers as only stabilizers sometimes requires relatively high amounts for effective stabilization of lipid nanoparticles (Siekmann, 1994; Siekmann and Westesen, 1994a). For example, Siekmann and Westesen (1994a) reported that 2% (w/w) Tyloxapol® were insufficient to stabilize a 10% (w/w) tripalmitine lipid nanoparticles dispersion.

Non-ionic surfactants being uncharged have a low skin sensitization potential and therefore they are preferentially used for dermal application. Two main groups of non-ionic surfactants are the ethylene oxide-based surfactants with polyethylene glycol (PEG) blocks and the polyhydroxy (polyol based) surfactants, having a polyhydroxy head group chain. Nowadays cosmetic industry moves away from ethoxylated surfactants, PEG-free is becoming a quality criterion (Cosmetic Ingredient Reviews, 1999; Johnson, 2001; Lanigan and Yamarik, 2001; Tadros, 2005). In addition, with the increasing awareness of environmental issues the cosmetic and pharmaceutical industry has a trend to use excipients made from renewable materials. In this sense, there is growing interest in polyhydroxy surfactants as the polyhydroxy head group can be derived from a naturally occurring carbohydrate. Polyhydroxy surfactants have been developed substituting ethylene oxide by hydroxy groups. Linking the hydrophilic and hydrophobic parts in different ways affects HLB and stabilizing properties of these molecules.

Typical hydrophilic building blocks in their structure are glycerol, carbohydrates and their alcohols (sucrose, glucose, sorbitol) and glycols. The main categories of polyhydroxy surfactants are: glycolesters, glycerol (and polyglycerol) esters, glucosides (and polyglucosides), sucrose and sorbitan esters.

Polyhydroxy surfactants have the properties of showing stronger lipophilicity and hydrophilicity compared to ethoxylated surfactants. The stronger hydrophilicity results from the hydroxy groups in the structure providing stronger hydrogen bonds with water compared to the oxygen in the PEG. Consequently at high temperature dehydration of the hydrophilic head group can be prevented. Thus, they have a higher critical flocculation temperature. Fatty acid or alcohol chains as hydrophobic part of the molecule are more hydrophobic than the propylene oxide chain in e.g. PEG-containing poloxamers. In addition, these chains are able to anchor in the surface of oil droplets or lipid nanoparticles. Additional reasons for the increasing interest in these molecules can be their minor susceptibility to pH changes and electrolyte presence compared to ethoxylated stabilizers (Söderman and Johansson, 1999). Polyhydroxy surfactants possess therefore favourable technological and dermatological properties, which is why they are meanwhile often used in dermal formulations. Therefore they were investigated in this study for their ability to stabilize lipid nanoparticles, both SLN and NLC.

Besides the physical stability, the stabilizers can have effects on the crystallinity and the kinetics of polymorphic transitions of

lipid after crystallization of nanoparticles (Garti and Yano, 2001). Previous investigations on tripalmitin nanoparticles indicated that rigid stabilizer chains are needed to induce crystallization of tripalmitin at higher temperatures (Bunjes et al., 2002). The influence of stabilizers onto the crystallization is particularly important in the formulation of lipid nanoparticles made from low melting lipids. These nanocarriers can be interesting for the processing and the formulation of temperature-sensitive actives such as peptides and proteins, excluding the use of high melting lipids. Additionally, studies about the effect of stabilizers on the crystallization process and crystalline structure of the resulting particle matrix may provide insight into the interaction of the dispersed lipid and the stabilizer used (Souto, 2005).

The first aim of the present study was to evaluate the ability of polyhydroxy surfactants to create small sized lipid nanoparticle dispersions with narrow size distribution. Two surfactants with basically different structures having glycerol and glucose as hydrophilic groups (polyglycerol versus polyglucoside chain), were used in this study (Table 1). Particle formation was systematically studied using cetyl palmitate as solid lipid only (SLN) and also using mixtures of this solid lipid with increasing amounts of Miglyol 812 (NLC). Secondly, the influence of the surfactant onto the physical stability and the crystalline state of the particle matrix was investigated. This should provide information about the stabilizing ability, and to which extent the two different surfactants influence the lipid structure of the particles, in comparison to each other and to bulk lipid.

2. Materials and methods

2.1. Materials

For the production of the lipid nanoparticles, the solid lipid cetyl palmitate (Cutina® CP) was kindly provided by Cognis (Düsseldorf, Germany). The medium chain triglyceride oil (Miglyol® 812) was purchased from Caelo GmbH (Hilden, Germany). Polyglycerol 6-distearate (Plurol® Stearique WL1009 (PS)) was kindly provided by Gattefosse (Weil am Rhein, Germany) and caprylyl/capryl glucoside (Plantacare® 810 (PC)) by Cognis (Düsseldorf, Germany). The purified water was obtained by reverse osmosis from a Milli Q Plus, Millipore system (Schwalbach, Germany). All chemicals were used directly as received without further purification.

2.2. Methods

2.2.1. Characterization of the bulk lipid material

Differential scanning calorimetry (DSC) was employed to investigate the effect on the crystalline structure after inclusion of oil into the solid lipid. In order to mimic the production conditions of NLC, the bulk mixtures of solid lipid and oil at different ratios (Table 2) were heated up to 75 °C, kept at that temperature for 1 h and subsequently cooled to room temperature. This imitates the production process of lipid nanoparticles by homogenization in the melted condition, and the subsequent cooling and recrystallization. These tempered lipid blends were then investigated using a Mettler DSC 821e apparatus (Mettler Toledo; Gießen, Switzerland) using accurately weighed samples of 1–2 mg.

2.2.2. Preparation of lipid nanoparticles

The total amount of lipid phase (solid lipid, oil) was kept constant in all lipid nanoparticle suspensions (10%, w/w). SLN contained solid lipid only (Cutina CP) while in NLC a portion of the solid lipid has been replaced by oil (Miglyol® 812). The lipid nanoparticles in suspension were stabilized using 1% (w/w) of polyhydroxy surfactants, either PS or PL. Table 3 provides the composition of

Table 1

Trade names, chemical names and structure of polyhydroxy surfactants used for the preparation of the lipid nanoparticle dispersions.

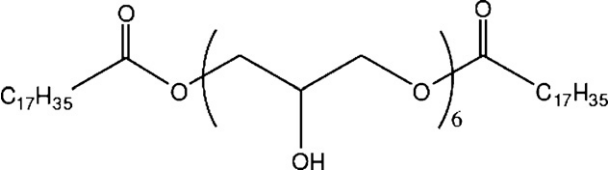
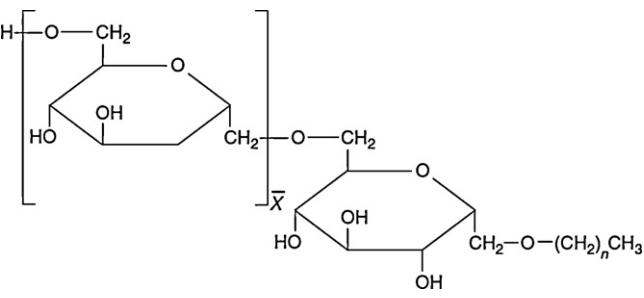
Trade name of surfactant	Structural formula and chemical name of surfactant
Plurol Stearique® WL 1009 (PS) HLB = 9–10	
Plantacare® 810 (PL) HLB = 15–16	

Table 2

DSC parameters of the tempered bulk solid lipid and bulk lipid blends with increasing oil content.

Lipid	Melting temperature [°C]	Onset temperature [°C]	Enthalpy [J/g]	Integral (mJ)
Cutina® CP(bulk lipid)	52.44	47.89	220.46	296.52
80% Cutina® CP + 20% Miglyol® 812	48.70	39.88	124.29	202.09
70% Cutina® CP + 30% Miglyol® 812	47.72	38.07	91.11	164.82
60% Cutina® CP + 40% Miglyol® 812	46.90	36.68	69.87	123.95
50% Cutina® CP + 50% Miglyol® 812	46.07	35.54	55.80	116.30
40% Cutina® CP + 60% Miglyol® 812	45.28	33.80	55.90	103.87

the formulations, from SLN (=100% solid lipid) and the NLC with increasing oil content in the lipid blend from 20% Miglyol 812 to 60%.

Preparation of the lipid nanoparticle suspensions was carried out by hot high pressure homogenization (HPH). Briefly, the lipid phase was melted at 75 °C and subsequently dispersed by high speed stirring (8000 rpm for 1 min) in the hot aqueous surfactant solution of identical temperature. The dispersing was performed using an Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, Staufen, Germany). The obtained pre-emulsion was then subjected to HPH using a Micron LAB 40 (APV Deutschland GmbH, Germany). Five homogenization cycles at 500 bar and a temperature of 75 °C were applied. After HPH the obtained hot o/w nanoemulsion was filled in silanized transparent glass vials (glass quality II), which were immediately sealed. Despite using glass quality II, the vials were siliconized to further minimize the adsorption of nanoparticles onto the walls. This

adsorption is known to promote aggregation by fusion of adsorbed nanoparticles. The vials were placed into a water bath adjusted to 20 °C to control the cooling rate of the nanoemulsions and the velocity of crystallization. To investigate the physical stability, the lipid dispersions were stored at 25 ± 2 °C for a period of 90 days. The samples were analyzed at previously determined time intervals (day 0, 1st, 30th and 90th day).

2.2.3. Particle size analysis

Particle size analysis was performed by dynamic light scattering (DLS), also known as photon correlation spectroscopy (PCS), using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Prior to the measurements all samples were diluted using ultra-purified water to yield a suitable scattering intensity. DLS data were analyzed at 25 °C using the general purpose mode. DLS yields the hydrodynamic diameter (intensity weighted mean diameter, z-average,

Table 3

Composition of the lipid nanoparticle dispersions (% w/w) produced with Plurol Stearique® WL 1009 (PS) or produced with Plantacare® 810 (PL). The particle matrix consisted of pure solid lipid, i.e. PS (SLN) and PL (SLN), or contained an increasing amount of Miglyol 812 oil from 20% to 60%, e.g. PS (20) to PS (60).

Formulation	Cutina® CP	Miglyol® 812	Plurol Stearique® WL 1009	Plantacare® 810	Purified water up to
PS (SLN)	10.0	–	1.0	–	100.0
PS (20)	8.0	2.0	1.0	–	100.0
PS (30)	7.0	3.0	1.0	–	100.0
PS (40)	6.0	4.0	1.0	–	100.0
PS (50)	5.0	5.0	1.0	–	100.0
PS (60)	4.0	6.0	1.0	–	100.0
PL (SLN)	10.0	–	–	1.0	100.0
PL (20)	8.0	2.0	–	1.0	100.0
PL (30)	7.0	3.0	–	1.0	100.0
PL (40)	6.0	4.0	–	1.0	100.0
PL (50)	5.0	5.0	–	1.0	100.0
PL (60)	4.0	6.0	–	1.0	100.0

z-ave) and the polydispersity index (PI) as a measure of the width of the particle size distribution. The PI ranges from 0 to 1 while monodisperse populations yield theoretically a PI of 0. Very narrow distributed particle populations possess PI values of about 0.02–0.05, o/w emulsions for parenteral nutrition by intravenous infusion typically from 0.10 to 0.25. The z-average and PI of the investigated samples were obtained by calculating the average of 10 measurements at an angle of 173° in 10 mm diameter disposable plastic cells.

The measuring range of the Zetasizer is from approximately 6 nm to 6 µm. Therefore, in order to detect potential larger particles and oil droplets static light scattering (SLS), also known as laser diffractometry (LD), with a measuring range up to 2000 µm was applied as additional characterization method using a Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). SLS data were analyzed using the Mie theory with the optical parameters 1.456 (real refractive index) and 0.01 (imaginary refractive index). The SLS data yield a volume distribution. The volume weighted diameters $d(v)$ 50%, $d(v)$ 90% and $d(v)$ 99% were used to characterize the dispersions. The diameter values indicate the percentage of particles possessing a diameter equal or lower than the given values (Rawle). For example, $d(v)$ 99% means that 99% of the volume of the particles is below the given size. Sonification prior and during the measurement was not performed to avoid the destruction of possible aggregates within the sample. Such aggregates are a sensitive marker for insufficient stabilization, and will mainly affect the diameters 90% and 99%.

2.2.4. Zeta potential analysis

The zeta potential was determined by the measurement of the electrophoretic mobility using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). The field strength applied was 20 V/cm. The conversion into the zeta potential was performed using the Helmholtz–Smoluchowski equation:

$$\zeta = EM \times \frac{4\pi\eta}{\varepsilon}$$

where ζ is zeta potential, EM the electrophoretic mobility, η the viscosity of the dispersion medium and the dielectric constant ε . To avoid the fluctuation in the zeta potential due to variations in the conductivity of purified water, which can range from 1 to 10 µS/cm, the conductivity of the water was adjusted to 50 µS/cm using 0.9% (w/v) sodium chloride solution. The pH during the measurements was in the range of 5.5–6.0. Each sample was measured three times and mean value and standard deviation (SD) are presented.

2.2.5. Differential scanning calorimetry investigations of the lipid nanoparticle suspensions

Thermal analysis was performed using again the Mettler DSC 821e apparatus (Mettler Toledo, Gießen, Switzerland). The amount of the sample (aqueous dispersion) was calculated this way, that it contained approx. 1–2 mg lipid (accurately weighted). For a 10% NLC dispersion this is approx. 10–20 µl, which were placed in 40 µl aluminum pans. The heating runs were performed from 20 to 90 °C at a heating rate of 10 K min⁻¹. An empty aluminum pan was used as reference. Onset temperature, melting point, enthalpy and integral were calculated by the STAR[®] Software (Mettler Toledo, Switzerland). Furthermore, the recrystallization index (RI) i.e. percentage of re-crystallized solid lipid related to initial solid lipid concentration (not total lipid concentration of solid and liquid lipid!) was calculated using the following equation (Freitas and Müller, 1999):

$$RI(\%) = \frac{\Delta H_{\text{aqueous SLN or NLC dispersion}}}{\Delta H_{\text{bulk material}} \times \text{concentration lipid phase}} \times 100$$

where $\Delta H_{\text{aqueous SLN or NLC dispersion}}$ and $\Delta H_{\text{bulk material}}$ are the melting enthalpy (J/g) of SLN and NLC dispersion and bulk material, respectively. The concentration of the lipid phase is given in parts solid lipid in the total suspension (e.g. 10% suspension is 10/100 parts = 0.1, a 10% NLC suspension composed of 8% solid lipid and 2% oil is = 0.08). In case the RI of the tempered bulk material is calculated, the concentration is = 1.

2.2.6. Light microscopy

SLS measurements can overlook a small number of larger particles besides a small-sized main particle population (Keck and Müller, 2008). Therefore to detect potential instability and aggregates during storage, the dispersions were additionally monitored using a light microscope (Orthoplan Leitz, Wetzlar, Germany). The microscope was equipped with a CMEX 3200 digital camera (Euromex microscopes, Arnheim, Netherlands) connected to the Image Focus software version 1.3.1.4. Microscopic pictures were taken from the undiluted lipid nanoparticle dispersions to increase the probability of detecting even a few large aggregates. Aim was not to analyze the nanoparticles themselves, because they are below the detection limit (about 500 nm) of the microscope. Magnifications applied were 160, 400, 630 and 1000 fold.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of bulk lipid material

A DSC study was performed to understand the blending behaviour of the solid lipid Cutina CP with increasing amounts of oil, i.e. Miglyol 812. It should provide information about the influence of the oil onto the melting behaviour and change in crystallinity to obtain information on the inclusion of the oil into the bulk of solid lipid. The thermo-analytical parameters as derived from the DSC measurements are given in Table 2. Cetyl palmitate revealed two peaks at 38.94 °C (small peak) and 52.42 °C (main peak) (Fig. 1). Based on literature data, the first peak with lower melting point is attributed to the α -polymorphic form (thermodynamic instable modification) whereas the second peak belongs to the β -polymorphic form (stable modification) (Saupe et al., 2005).

Cetyl palmitate and medium chain triglycerides exhibit a good miscibility and thus a homogeneous lipid matrix should be obtained in the NLC. The DSC thermograms show that above 20% oil, the separate peak of the α -modification disappears (Fig. 1, middle), at the same time the peak broadens (increase in difference between melting temperature and onset) and the peak height (also area under the curve) decreases, hence the crystallinity is reduced (Fig. 1, middle and lower). This supports that the oil is molecularly dispersed in the lipid blend, at least at lower concentrations, which creates distortion in the lipid matrix.

A melting point depression occurs, if a second compound is dissolved in a first compound. Therefore the melting point determination is also used for purity analysis of materials. With increasing concentration of the second compound, the melting point decreases in a linear fashion. A decreasing melting point, and onset temperature, was observed with increasing oil content in the lipid blends (Table 2). The decrease was linear up to 60% oil in the lipid blend, indicating good miscibility.

With 20% (w/w) of oil the difference between the melting and the onset temperatures was 8.82 °C and increased to 11.48 °C when the blends contained 60% (w/w) of the oil. Therefore, for the given concentration range the depression of the onset temperatures did not occur in a linear fashion. There is a strong decay up to 20% and 30% oil content, then the decay flattens with increasing contents of oil (Fig. 2). The broadening of the peak is caused by a more complex,

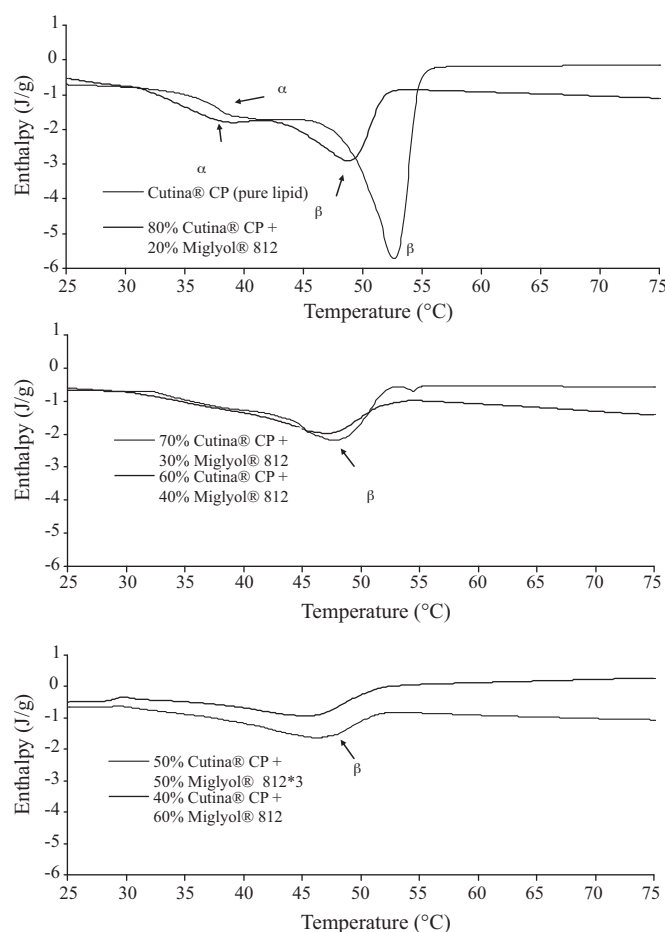


Fig. 1. DSC heating thermograms of tempered bulk solid lipid Cutina CP and tempered lipid blends with increasing Miglyol 812 content from 20% to 60%.

distorted structure of the lattice, the flattening of the onset temperature decay might indicate, that one approaches the maximum solubility of the oil in the solid lipid.

Distortion of the lattice and reduced crystallinity is clearly seen by the decrease in melting enthalpy of the blends with increasing oil content compared to the pure solid lipid. The enthalpy decreases from about 220 J/g to 55 J/g at 50% oil content in the blend, accompanied by a decrease in crystallinity from 100% to 25.3% (Table 2).

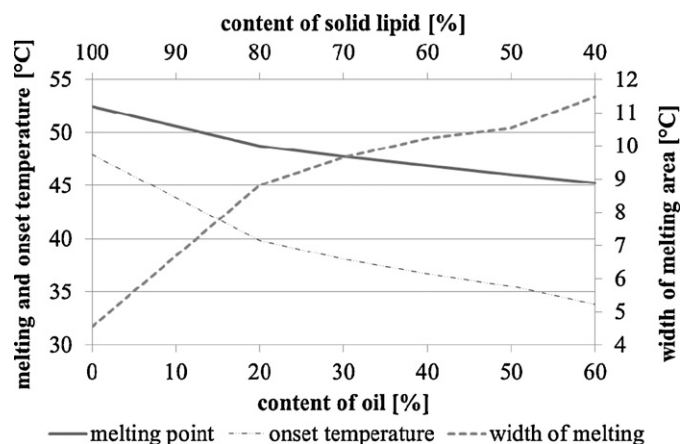


Fig. 2. Decrease of melting temperature and onset temperature, and increase of width between these two temperatures at increasing oil content of the bulk lipids from 0% to 60%, as determined by DSC (data from Table 1).

Interestingly, the crystallinity does not further decrease when moving from 50% oil to 60% oil, it stays unchanged at 25.3%. This can also be seen as indication that one approaches the solubility limit of the oil in the blend.

According to Müller et al. at low oil concentration, the oil molecules are distributed within the solid lipid matrix and the imperfect type of NLC is obtained (Müller et al., 2002a). In case the oil exceeds its solubility in the solid lipid, the multiple type of NLC is formed. The oil precipitates separately e.g. in liquid nanocompartments within the lipid particle matrix. This occurs during the cooling process. At high temperatures, complete miscibility occurs between the melted solid lipid and oil. During the cooling down process the solubility of the oil in the solid lipid is exceeded. Therefore, due to the miscibility gap phase separation occurs. The oil precipitates in the form of fine droplets being incorporated into the solid lipid matrix during the cooling process of NLC. Based on the DSC bulk data, a phase separation cannot be excluded when producing NLC with the high oil concentrations, especially because crystallization processes in the nanodimension differ from bulk crystallisation. Examples are the reduction of the melting temperature (Gibbs–Thomson effect (Perez, 2005)) or the lack of re-crystallization by formation of supercooled nanoparticles.

There is a kind of controversy discussion, where the phase separated oil is located. Müller et al. (2002a) and zur Mühlen and Mehnert suggest location in form of nanocompartments throughout the solid lipid matrix (original model). However, the nanocompartments might be enriched in the core or the shell (Saupe et al., 2005) or located at the surface (oil layer on surface?). There are also spoon-like structures suggested (Jores et al., 2005, 2004). It is outside the scope of this article to discuss in detail the physics behind the various theories. At least it can be stated, that the location will definitely differ depending on the chemical nature of solid and liquid lipid, the solubility/miscibility of lipids in each other, production conditions, and interfacial tensions between lipid and water phase (interfacial energies). As conclusion, the described structures could exist besides each other, depending on the lipids used.

3.2. Particle size analysis and physical stability

Table 3 gives an overview of the formulations produced. The total amount of lipid phase was kept constant (10%, w/w), the percentage of oil in the lipid matrix of the NLC was increased from 20% to 60%, according to the investigated bulk lipids. The particle sizes for all formulations have been evaluated by DLS and SLS immediately after production and during a storage period of up to 90 days.

Under optimized production conditions (500 bar, five homogenization cycles, 75 °C) small lipid nanoparticles with a relatively uniform size distribution were obtained. Figs. 3 and 4 show the obtained results. The mean DLS particle diameters were around or below 200 nm with PI values below 0.2 indicating monomodal size distributions. During the observation period of 90 days the mean diameters and PI values did practically not change. This indicates good physical stability of the lipid nanoparticles stabilized with both polyhydroxy surfactants.

Cetyl palmitate is a wax produced by catalytic esterification of fatty alcohol (cetyl alcohol) and fatty acids (palmitic acid) (Saupe et al., 2005). It was suggested that surface active partial glycerides (mono-, and diglycerides and their mixtures) facilitate emulsification and form more rigid surfactant films around the lipid nanoparticles and thus improve long term physical stability (Bunjjes et al., 2003; Westesen et al., 1993). However, for a relatively pure cetyl palmitate as used in this study, primarily the surfactant used is responsible for physically stable lipid nanoparticles (Saupe et al.,

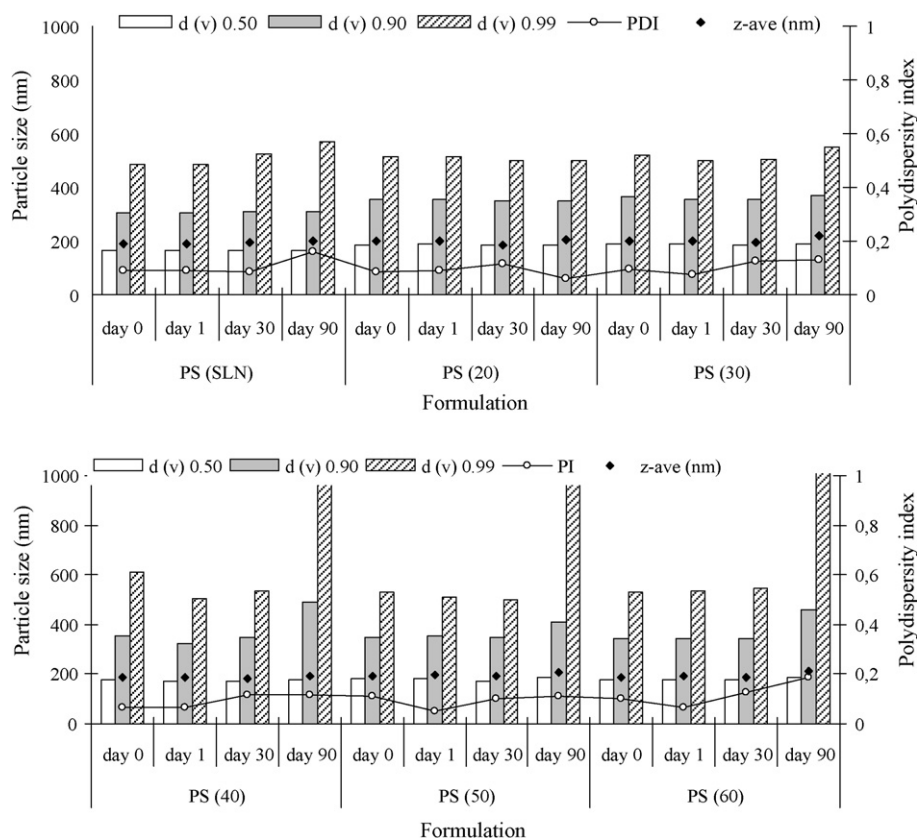


Fig. 3. PCS data (diameter and PI) and LD data (diameters $d(v)$ 50%, $d(v)$ 90% and $d(v)$ 99%) of the formulations stabilized with PS (polyglyceryl 6-distearate) plotted as function of time (0, 1, 30, 90 days).

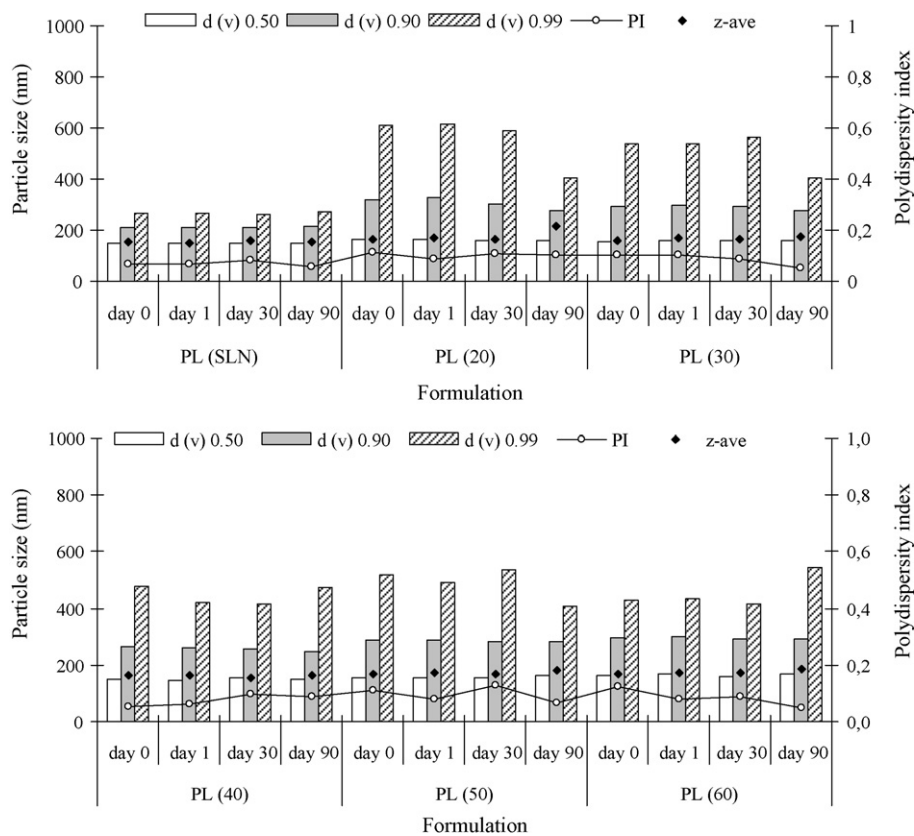


Fig. 4. PCS data (diameter and PI) and LD data (diameters $d(v)$ 50%, $d(v)$ 90% and $d(v)$ 99%) of the formulations stabilized with PL (caprylyl/capryl glucoside) plotted as function of time (0, 1, 30, 90 days).

2005). The mean diameters reflect the ability of the polyhydroxy surfactants for stabilization.

All lipid nanoparticles stabilized with PS (Plurol Stearique, polyglycerol 6-distearate) had a mean diameter of about 200 nm, whereas the mean diameter of the samples stabilized with PL (Plantacare 810, caprylyl/capryl glucoside) was around 170 nm. PI values around 0.2 indicate a relatively narrow particle size distribution for the both surfactants. The oil content did not influence the mean particle size. The explanation is that during the production of NLC, the lipid mixture was in the melted state. The viscosity of melted pure cetyl palmitate and the cetyl palmitate/oil blends at this temperature is not that different. Applying the same homogenization energy, NLC containing different amounts of oil should yield the same mean particle size (Jores et al., 2004). The final size obtained may depend on various factors, such as the chemical structure of the lipids, the surfactants used, as well as their chemical interaction (Lin et al., 2007). For example, the surfactants need to be able to stabilize fast the formed droplets when they leave the homogenization gap, to avoid subsequent coalescence. Obviously the polyhydroxy surfactants are able to do this, whereas PL yields smaller particles (DLS data).

SLS and light microscopy were applied as additional methods to check for the absence of aggregates. Immediately after production a unimodal, relatively narrow particle size distribution was observed by SLS (curves not shown). The diameters $d(v)$ 50% were below 200 nm, the diameters $d(v)$ 99% as sensitive parameter for the presence and quantity of larger particles below 600 nm (Figs. 3 and 4). Thus, the presence of microparticles in these samples can be excluded, to be precise: are below the detection limit. These data were in agreement with light microscopy (data not shown).

The physical stability was monitored for 90 days. In the formulations stabilized with PS the $d(v)$ 50% and $d(v)$ 99% were below 200 nm and 600 nm, respectively at the production day. At day 90, $d(v)$ 99% was still below 600 nm for an oil content up to 30% (w/w). Increasing the oil content from 40 to 60% (w/w) led to an increase of $d(v)$ 99% (Fig. 3). Agglomerates found after 90 days in these samples were also confirmed by light microscopy. However, the degree of aggregation was small, as only the diameter $d(v)$ 99% is above 1 μm , whereas $d(v)$ 50% and $d(v)$ 90% are still below 1 μm . The observed slight destabilization seems to result from the expulsion of oil from the lipid matrix during the storage. Increasing the oil content from 40 to 60% (w/w) resulted only partially into incorporation into the solid lipid matrix. This was confirmed by DSC data (cf. below). Similar results were reported for NLC based on the mixture monacaprinate (solid lipid) and medium chain triglycerides which are stabilized with Polysorbate 80 as surfactant (Lin et al., 2007). In contrast to this, all lipid nanoparticle dispersions were perfectly stable when stabilized with PL (Fig. 4).

The physical stability has also been monitored by macroscopic observations. Systems remained stable with a milky-like appearance without any particle sedimentation during the storage. The absence of agglomerates after 90 days in these samples was also confirmed by light microscopy (data not shown).

3.3. Zeta potential (ZP) analysis

Zeta potentials of the formulations have been evaluated immediately after production (day 0) and after storage of 90 days. Immediately after production the zeta potentials were in the range from -30.0 to -52.0 mV for all samples indicating good physical stability (Fig. 5). From the literature, a minimum zeta potential of higher than -60.0 mV is required for excellent physical stability and of higher than -30.0 mV for good physical stability (Müller, 1996; Riddick, 1968).

Polyhydroxy surfactants are nonionic steric stabilizers, therefore at the first glance one would rather expect a low zeta potential. The measured zeta potential originates from the height of the Nernst potential (surface charge) and the additional charges created by adsorbed ions or surfactants or stabilizer molecules in the Stern layer. The SLN produced with solid lipid only possessed a ZP of -30 mV when stabilized with PS, but of -48 mV when stabilized with PL. It is assumed, that the major charge of the PS-stabilized nanoparticles originates from the surface, e.g. dissociated free fatty acids, some contribution potentially from salts present as impurity in the surfactant. The PL-stabilized nanoparticles possess the same particle composition (Cutina CP), but a higher ZP. This higher ZP is obviously created by the different type of stabilizer. The PL has one hydrophobic anchor to be embedded in the surface, and one long hydrophilic tail composed of glucose molecules penetrating into the water phase. The glucoses will strongly interact with water, e.g. attracting potentially negatively charged hydroxyl ions. The PS has two hydrophobic anchors located at the end of the molecule, polyglycerol in the center. Assuming both lipophilic parts anchored into the particle surface, the molecule will have a loop structure on the surface. These differences are considered as cause for the different ZP values.

With increasing oil content in the particle matrix, the ZP of the PL-stabilized nanoparticles stays unchanged. It stays also unchanged during the 90 days of storage, being the reason of the observed perfect physical stability (cf. Section 3.2).

Interestingly, the ZP of the PS-stabilized nanoparticles increases with increasing oil content from -32 mV (no oil) to about -50 mV (60% oil). Assuming an unchanged situation for the stabilizer layer on the surface, this increase in the ZP can only originate from an increase of the surface potential. Obviously there are more charges on the surface, potential source are free fatty acids contained in the solid lipid but also in the oil. The oil nanocompartments of NLC can be embedded into the solid lipid matrix (Müller et al., 2002b) or to be localised at the surface of solid platelets and the surfactant layer (Jores et al., 2005). Therefore this increase in zeta potential can be the result of changes on the NLC surface. These changes did not occur with PL, this supports the theory that the surfactants used also affect the structure of the lipid particle matrix, including localization of oil.

During the storage of 90 days, the zeta potential of the PS-stabilized NLC decreased for an oil content of 40–60%. Obviously there must be changes in the composition of particle matrix and related surface composition and charge. Without additional investigations, discussing potential reasons would be speculative. Further mechanistic investigations are necessary for a better understanding of this effect, because the structural change is obviously stabilizer-related, as it does not occur with PL. The understanding of such influences would allow a more controlled selection of optimal stabilizers for lipid nanoparticle dispersions in the future.

However, in these PS-stabilized formulations the zeta potential is still higher than -30.0 mV after 90 days of storage. Hence from ZP theory, the values are in the range for stable dispersions. Therefore the slight instability observed in these samples with 40–60% oil content might be due to destabilizing effects not accessible by a zeta potential measurement. It should be pointed out, that the increase in the diameter 90% is very low, not affecting the use of these NLC in dermal formulations.

3.4. Influence of hydrophilic–lipophilic-balance (HLB) of the stabilizer on size and stability

The particle size and the physical stability of a disperse system are influenced by many parameters, e.g. type and concentration of the stabilizer. Up today it is not possible to fully predict the size and the physical stability without practical investigations. However,

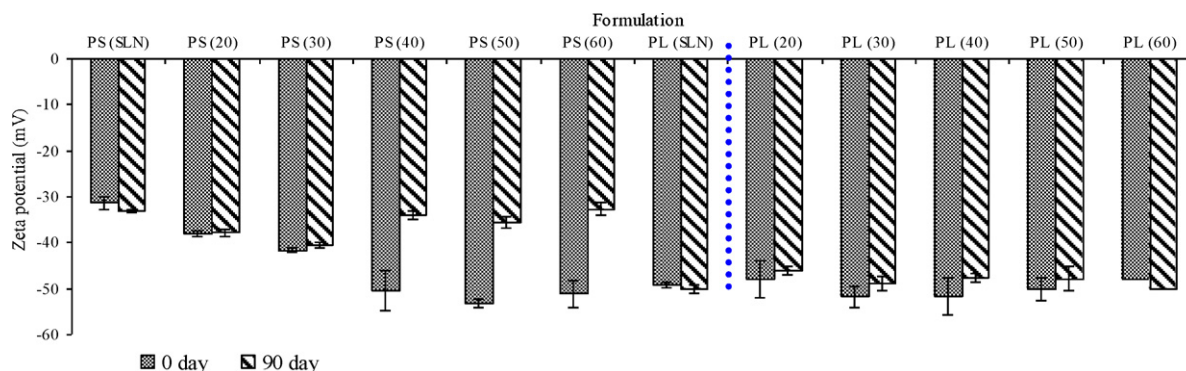


Fig. 5. Zeta potentials of the formulations stabilized with PS and with PL produced from solid lipid only (SLN) or mixtures with increasing percentage of Miglyol from 20% to 60% (for formulation code and composition cf. Table 3).

parameters e.g. zeta potential and polydispersity are important tools, as they can indicate good stability at an early stage of the development. Nevertheless, in the field of emulsion formulation, especially in the cosmetic field, another possibility to obtain finely dispersed and physically stable emulsions is the estimation of the “required HLB”. This means, that the HLB of the stabilizer should match the required HLB of the inner phase as close as possible. Such a required HLB can be either calculated using Grifin equation or by assessing the values provided by manufactures. For the lipids used in this study the required HLB is 10 for the solid lipid and 5 for the liquid lipid. Hence with an increasing amount of liquid lipid the HLB decreases. The surfactants used in this study possess different HLB values. The HLB of PS is 9–10 and the HLB of PL is 15–16 (cf. Table 1). Thus, from theory, best results (smallest size, highest stability) would be expected for the SLN and the NLC containing 20% oil stabilized with PS (HLB 9–10), respectively. Indeed, these formulations are physically stable, whereas the NLC containing more oil, e.g. 40–60% (required HLB of these formulations is 8–7) are less stable (cf. Fig. 4). However, the size of the SLN stabilized with PL is smaller than the size of the SLN stabilized with PS, even though the HLB of PL is much higher and thus not as close to the required HLB of the lipid phase as PS (cf. Figs. 3 and 4). Also for the NLC with high oil content the lower and more close HLB of PS was less sufficient in stabilizing the NLC, whereas the high HLB surfactant PL, could stabilize all lipid nanoparticle systems investigated sufficiently (cf. Figs. 3 and 4). Thus, in conclusion the “required HLB” theory cannot be used to explain the differences between the two stabilizers investigated. In fact, results prove that the development of a finely dispersed and physically stable lipid nanoparticle system is very complex, not yet fully understood, and cannot only be reached by simply using the “required HLB” method alone.

3.5. Differential scanning calorimetry investigations

Table 4 gives an overview of the DSC data of SLN and of NLC dispersions, which have been stored for a period of 90 days at controlled room temperature. After this time, an equilibrium condition can be assumed. The nanonized cetyl palmitate is distinctly below the melting temperature of the bulk material (melting point depression by about 4 °C). This phenomenon is described by the Gibbs–Thompson effect, i.e. the larger ratio of specific surface area to volume of particle with a smaller size when compared to bulk material (Perez, 2005). A shift of the melting point to lower temperatures with decreasing mean particle size was also observed for Dynasan® 116 dispersions stabilized with Tyloxapol® (Souto, 2005). Beside the small particle size, the potential influence of surfactants should not to be neglected. Depending on the lipophilicity, the sur-

factants partition between water phase, interface and the lipid phase. Surfactant in the lipid phase can distort crystallization and affect the melting temperature. Interestingly, the melting point is the same for SLN stabilized with PS or with PL, i.e. for nanoparticles made from solid lipid only. The same applies for the NLC regarding melting point, but also the onset temperature.

However, the situation is different for the recrystallisation index RI (cf. Section 2.2.5). For the SLN, the RI is reduced to about 60% when stabilized with PS, but reduced to only 32% in case of PL as stabilizer (Table 4). The same is valid for all NLC. The ones stabilized with PL possess much less crystallinity. PS stabilized NLC with 50% oil in the matrix (PS (50)) have a RI of 12%, the corresponding PL (50) dispersion shows no melting event any more, i.e. the dispersion is a supercooled nanoemulsion (Table 4 and Fig. 6). At 60% oil in the particle matrix, both formulations are not solid any more. This shows firstly the strong influence of the type of surfactant on the crystallinity, and secondly is a nice example for differences in re-crystallization between bulk and nanomaterial.

The decreasing of melting peak and melting enthalpy, i.e. distortion of the crystalline lattice in NLC after oil addition, is identical to the distortion of crystalline structure of lipid blends in the bulk state, but more pronounced in the nano dimension. This less ordered crystalline lipid matrix of NLC is favourable for encapsulating more active (higher loading).

The differences in the shapes of DSC curves in Fig. 6 (PS versus PL) show that the internal structure of lipid nanoparticles is influenced by the type of polyhydroxy surfactants used. It is known that the surfactants can have impact on the resulting structure of dispersed phases. In o/w emulsions containing emulsifiers with long saturated fatty acid chains, the increased crystallization tendency of the dispersed phase has been correlated with the formation of emulsifiers templates in the oil droplets. Investigations on tripalmitin nanoparticles indicated that rigid long saturated alkyl chains of surfactants (Polysorbate 80) are necessary to induce crystallization. PS (polyglycerol 6-distearate) the surfactant containing long saturated alkyl chain (solid surfactant!) might initiate crystallization of lipid matrix of nanoparticles, explaining the higher RI values. Due to the affinity of polyglycerol 6-distearate to cetyl palmitate, a small portion of the surfactant molecules localize in the lipid phase (partitioning coefficient) and thus promote re-crystallization of the lipid. A part of the stabilizer is included into the lipid matrix of nanoparticles, stabilizers are not only attached onto the surface. Similar results have been obtained for SLN containing tripalmitate as solid lipid and lecithin as emulsifier (Ahlin et al., 2000).

In contrast, PL (caprylyl/capryl glucoside) with short hydrophobic alkyl chains (liquid surfactant!) is less hydrophobic, and thus

Table 4

DSC parameters of the lipid nanoparticle dispersions produced with PlurolStearique® WL 1009 (PS) or produced with Plantacare® 810 (PL), composition and sample code cf. Table 3.

Formulation	Melting temperature [°C]	Onset temperature [°C]	Enthalpy [J/g]	RI [%]	Integral [mJ]
PS (SLN)	48.80	43.80	13.3	60.33	190.55
PS (20)	47.97	43.61	8.15	36.97	133.40
PS (30)	46.98	43.90	4.92	22.32	80.56
PS (40)	45.77	42.73	4.32	19.59	86.52
PS (50)	45.55	42.18	2.70	12.24	46.89
PS (60)	No melting event				
PL (SLN)	48.79	44.6	7.12	32.30	130.89
PL (20)	47.35	42.42	5.16	23.40	88.33
PL (30)	46.78	42.06	3.83	17.37	77.35
PL (40)	47.15	45.30	0.46	2.08	9.37
PL (50)	No melting event				
PL (60)	No melting event				

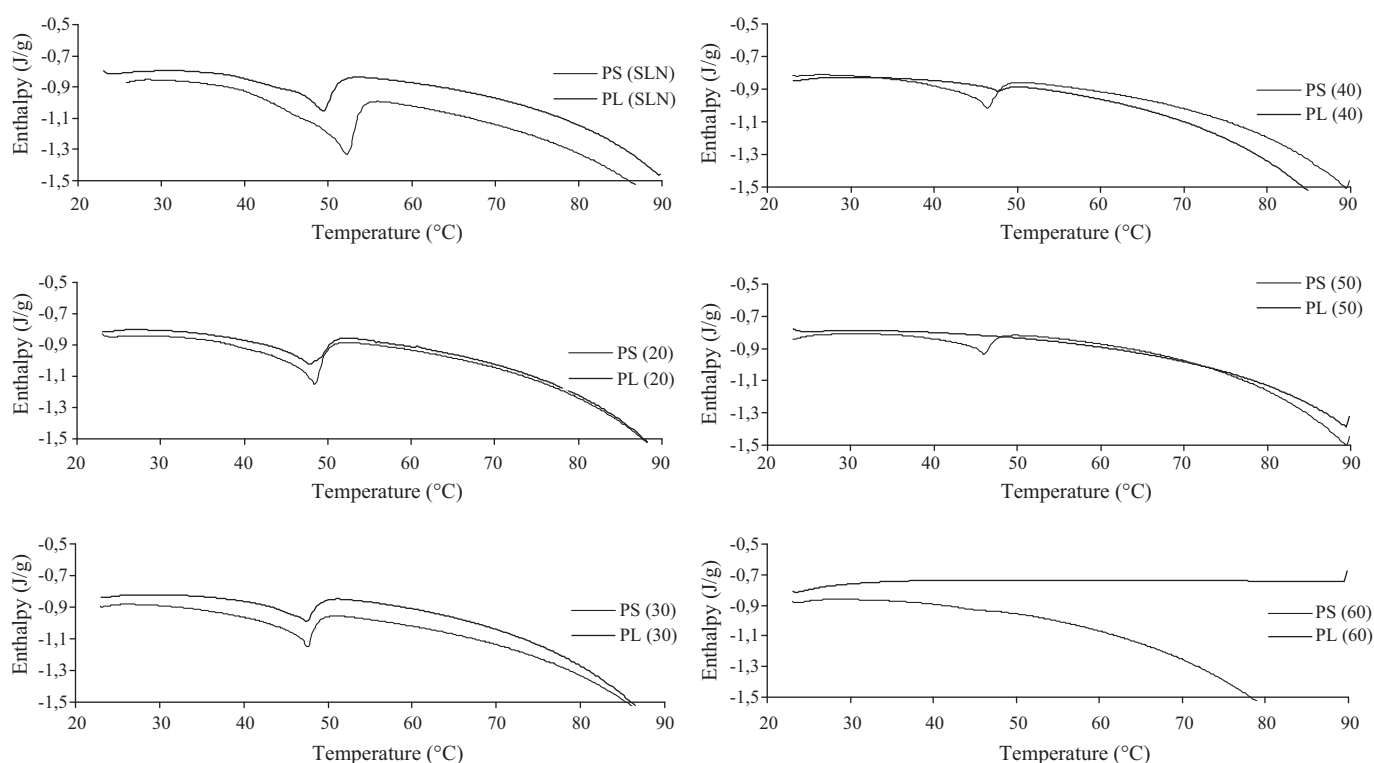


Fig. 6. DSC heating scans of the aqueous lipid nanoparticle dispersions at day 90 (scan from 20 to 90 °C, scan rate 10 K min⁻¹, formulation code cf. Table 3).

might locate less in the lipid phase, as it is too mobile in order to induce crystallization of lipid in NLC containing a high oil content. This surfactant probably forms rather a more “fluid”, less rigid membrane around nanodroplets with a low microviscosity. Therefore, polyglycerol 6-distearate with a “solid lipid tail” in the structure leads to a different interaction with lipid matrix molecules, than the “liquid lipid tail” surfactant (caprylyl/capryl glucoside).

The onset and the melting process of SLN and NLC occur at the temperature above 40 °C. This is especially important for lipid nanoparticles for dermal application of pharmaceutical and cosmetic actives. The particles should remain in the solid state when applied.

The PS stabilized NLC possess a higher crystallinity than the ones with PL, this can cause phase separation, e.g. drug expulsion but also potentially expulsion/separation of oil from solid lipid. Thus could lead to changes in the composition of the surface, and related changes in Nernst and zeta potential. The zeta potentials decreased during storage. Such phenomena might also promote bridging between particles.

4. Conclusions

Both polyhydroxy surfactants in the concentration of 1% (w/w) led to SLN and NLC with a mean diameter of about 200 nm. SLN and NLC with an oil content up to 30% (w/w) were physically stable over the investigated period of 90 days. However, increasing the oil content to 40% and higher led to a slight increase in larger particles ($d(v)_{0.99}$) in NLC stabilized with PS (polyglycerol 6-distearate). This effect was attributed to the higher crystallinity and related expulsion effects. The formulations stabilized with PL (caprylyl/capryl glucoside) were perfectly stable at each oil content. However, NLC with an oil content of 50% or higher and of 60% (PS and PL, respectively) were not solid anymore – in contrast to the bulk lipid blends. This shows the limitation in nanostructuring of NLC by oil addition, and the different re-crystallization properties in the nanodimension.

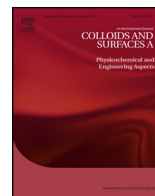
It can be concluded that the crystallization tendency of the particles increases with the length of the saturated hydrophobic chain of polyhydroxy surfactant. These observations suggest that the crystallization promoting effect of polyhydroxy surfactants is caused by

surfactant structure but also the interaction of the surfactant and lipid matrix molecules.

In overall conclusion polyhydroxy surfactants proved suitable for the stabilization of SLN and NLC dispersions, they are therefore an interesting newly applied class of stabilizers for future dermal products. They can influence the crystalline state of the lipid matrix in nanoparticles and for a successful formulation development, this parameter needs to be investigated. Furthermore, it might be a helpful tool to develop NLC with a “tailor-made” crystalline state, resulting loading capacity and release profile in the future.

References

- Ahlin, P., Kristl, J., Sentjurs, M., Strancar, J., Pecar, S., 2000. Influence of spin probe structure on its distribution in SLN dispersions. *Int. J. Pharm.* 196, 241–244.
- Attama, A.A., Schicke, B.C., Paepenmüller, T., Müller-Goymann, C.C., 2007. Solid lipid nanodispersions containing mixed lipid core and a polar heterolipid: characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 48–57.
- Blasi, P., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Ricci, M., Rossi, C., 2007. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 454–477.
- Bunjes, H., Koch, M.H., Westesen, K., 2002. Effects of surfactants on the crystallization and polymorphism of lipid nanoparticles. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 121, 7–10.
- Bunjes, H., Koch, M.H., Westesen, K., 2003. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 92, 1509–1520.
- Cosmetic Ingredient Reviews, 1999. Final report on the safety assessment of PEG-2, -3, -5, -10, -15, and -20 cocamine. *Int. J. Toxicol.* 18, 43–50.
- Freitas, C., Müller, R.H., 1999. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47, 125–132.
- Garti, N., Yano, J., 2001. The roles of emulsifiers in fat crystallization. In: Sato, K., Garti, S. (Eds.), *Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems*. Marcel Dekker, New York, pp. 211–250.
- Johnson Jr., W., 2001. Final report on the safety assessment of PEG-25 propylene glycol stearate, PEG-75 propylene glycol stearate, PEG-120 propylene glycol stearate, PEG-10 propylene glycol PEG-8 propylene glycol cocoate, and PEG-55 propylene glycol oleate. *Int. J. Toxicol.* 20 Suppl. 4, 13–26.
- Jores, K., Haberland, A., Wartewig, S., Mäder, K., Mehnert, W., 2005. Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorometry and Raman spectroscopy. *Pharm. Res.* 22, 1887–1897.
- Jores, K., Mehnert, W., Drechsler, M., Bunjes, H., Johann, C., Mäder, K., 2004. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J. Control. Rel.* 95, 217–227.
- Joshi, M.D., Müller, R.H., 2009. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 161–172.
- Keck, C.M., Müller, R.H., 2008. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry—90% of the published measurements are false. *Int. J. Pharm.* 355, 150–163.
- Lanigan, R.S., Yamarik, T.A., 2001. Final report on the safety assessment of PEG-6, -8, and -20 sorbitan beeswax. *Int. J. Toxicol.* 20, 27–38.
- Lin, X., Li, X., Zheng, L., Yu, L., Zhang, Q., Liu, W., 2007. Preparation and characterization of monolaurate nanostructured lipid carriers. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 311, 106–111.
- Liu, J., Gong, T., Fu, H., Wang, C., Wang, X., Chen, Q., Zhang, Q., He, Q., Zhang, Z., 2008. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *Int. J. Pharm.* 356, 333–344.
- Lombardi Borgia, S., Regehy, M., Sivaramakrishnan, R., Mehnert, W., Korting, H.C., Danker, K., Röder, B., Kramer, K.D., Schäfer-Korting, M., 2005. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and piezoelectric spectroscopy. *J. Control. Rel.* 110, 151–163.
- Lombardi Borgia, S., Schlupp, P., Mehnert, W., Schäfer-Korting, M., 2007. In vitro skin absorption and drug release—a comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*
- Lucks, J.S., Müller, R.H., 1996. Medication vehicles made of solid lipid particle (solid lipid Nanospheres—SLN), European Patent EP0000605497.
- Mehnert, W., Mäder, K., 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 165–196.
- Muchow, M., Mäincent, P., Müller, R.H., 2008. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC LDC) for oral drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34, 1394–1405.
- Müller, R.H., 1996. Zetapotential und Partikeladung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart.
- Müller, R.H., Jenning, V., Mäder, K., Lippacher, A., 2000a. Lipid Particles on the Basis of Mixtures of Liquid and Solid Lipids and the Method for Producing same, PCT/EP2000/004112. PharmaSol GmbH, Germany.
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., 2000b. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 161–177.
- Müller, R.H., Mehnert, W., Lucks, J.S., Schwarz, C., zur Mühlen, A., Weyhers, H., Freitas, C., Rühl, D., 1995. Solid lipid nanoparticles (SLN)—an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41, 62–69.
- Müller, R.H., Petersen, R.D., Hommos, A., Pardeike, J., 2007. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 522–530.
- Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002a. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.* 242, 121–128.
- Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002b. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, S131–155.
- Müller, R.H., Runge, S., Ravelli, V., Mehnert, W., Thünemann, A.F., Souto, E.B., 2006. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *Int. J. Pharm.* 317, 82–89.
- Pardeike, J., Hommos, A., Müller, R.H., 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.* 366, 170–184.
- Perez, M., 2005. Gibbs–Thomson effects in phase transformations. *Scripta Mater.* 52, 709–712.
- Rawle, A. Basic principles of particle size analysis. Online article, www.malvern.com.
- Riddick, T.M., 1968. Control of Colloid Stability through Zeta Potential. Zeta-Meter Inc. via Livingston Publishing Company, Wynnewood.
- Santos Maia, C., Mehnert, W., Schaller, M., Korting, H.C., Gysler, A., Haberland, A., Schäfer-Korting, M., 2002. Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use. *J. Drug Target.* 10, 489–495.
- Sarmiento, B., Martins, S., Ferreira, D., Souto, E.B., 2007. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 2, 743–749.
- Saupe, A., Wissing, S.A., Lenk, A., Schmidt, C., Müller, R.H., 2005. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC)—structural investigations on two different carrier systems. *Biomed. Mater. Eng.* 15, 393–402.
- Siekman, B., 1994. Untersuchungen zur Herstellung und zum Rekrystallisationsverhalten schmelzmulgierter intravenös applizierbarer Glyceridnanopartikel. Ph.D. Thesis, Technische Universität Carlo Wilhelmina Braunschweig.
- Siekman, B., Westesen, K., 1994a. Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. I. Preparation and particle size determination. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 3, 194–197.
- Siekman, B., Westesen, K., 1994b. Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. II. Physicochemical characterization and lyophilisation. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 3, 225–228.
- Söderman, O., Johansson, I., 1999. Polyhydroxyl-based surfactants and their physicochemical properties and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 4, 391–401.
- Souto, E.B., 2005. SLN and NLC for Topical Delivery of Antifungals. Ph.D. Thesis, Freie Universität Berlin.
- Souto, E.B., Wissing, S.A., Barbosa, C.M., Müller, R.H., 2004. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.* 278, 71–77.
- Stecova, J., Mehnert, W., Blaschke, T., Kleuser, B., Sivaramakrishnan, R., Zouboulis, C.C., Seltmann, H., Korting, H.C., Kramer, K.D., Schäfer-Korting, M., 2007. Cyproterone acetate loading to lipid nanoparticles for topical acne treatment: particle characterisation and skin uptake. *Pharm. Res.* 24, 991–1000.
- Tadros, T.F., 2005. *Applied Surfactants—Principles and Applications*. Wiley VHC, Weinheim.
- Ugazio, E., Cavalli, R., Gasco, M.R., 2002. Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.* 241, 341–344.
- Westesen, K., Siekman, B., Koch, M.H., 1993. Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchron X-ray diffraction. *Int. J. Pharm.* 93, 189–199.
- Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H., 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1257–1272.



Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation

Andjelka B. Kovačević^a, Rainer H. Müller^b, Snežana D. Savić^a, Gordana M. Vuleta^a, Cornelia M. Keck^{b,c,*}

^a University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, P.O. Box 146, 11221 Belgrade, Serbia

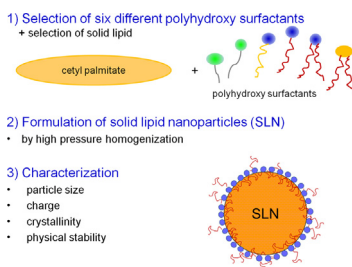
^b Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and NutriCosmetics, Free University of Berlin, Kelchstr. 31, 12169 Berlin, Germany

^c Applied Pharmacy Division, University of Applied Sciences Kaiserslautern, Campus Pirmasens, Carl-Schurz-Strasse 10-16, 66953 Pirmasens, Germany

HIGHLIGHTS

- Polyhydroxy surfactants are suitable surfactants for the stabilization of SLN.
- Their use leads to small sized and physically stable SLN.
- Their use enables the production of “skin-friendly” SLN for dermal drug delivery.
- Physico-chemical properties of surfactants strongly influence size/stability of SLN.
- Alkyl chain lengths of lipid matrix of SLN and stabilizer should be similar.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2013

Received in revised form

21 November 2013

Accepted 7 December 2013

Available online 21 December 2013

Keywords:

Polyhydroxy surfactants

Solid lipid nanoparticles

SLN

Physical stability

Crystallinity, High pressure

homogenization

ABSTRACT

Polyhydroxy surfactants are nonionic ethylene oxide free stabilizers known for their complimentary dermatological properties and favorable environmental profile. The aim of this study was to develop solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants varying in the chemical structure and to investigate the influence of the surfactants on the characteristics of the particles. Particles were produced by hot high pressure homogenization and the physico-chemical properties, e.g. contact angle, particle size, size distribution, zeta potential and crystallinity were determined. Results showed that the chemical structure of the surfactants influences the contact angle, particle size and crystallinity. Furthermore, the low surfactants concentration used (1% (w/w)) allowed the formation of the particles with a mean size below 200 nm, polydispersity index lower than 0.1 and sufficient physical stability for at least 6 months. As postulated by the zeta potential analysis stabilization ability of the surfactants was attributed to the superposition of electrostatic and steric effect which complement each other. All SLN formulations consisted of the same lipid matrix, but were found to possess different crystallinity indices. These differences are obviously created by the differences in the chemical structure of the surfactants. Therefore, the polyhydroxy surfactants investigated in this study can be judged to be novel suitable stabilizers for the formulation of well-skin tolerable SLN. The use of specific chemical structures of the surfactants can be used for the production of “tailor-made” SLN in the future.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: University Applied Sciences Kaiserslautern, Campus Pirmasens – Applied Pharmacy, Carl-Schurz-Str. 10-16, 66953 Pirmasens, Germany. Tel.: +49 63137247031; fax: +49 63137247044.

E-mail addresses: ck@ckc-berlin.de, cornelia.keck@fh-kl.de (C.M. Keck).

1. Introduction

Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) are colloidal drug delivery systems. They are composed of a solid lipophilic matrix in which active molecules can be incorporated. They can be derived from o/w nanoemulsions, where a liquid lipid of the oil droplets is replaced by a solid lipid (SLN) or by a blend of a solid and a liquid lipid (NLC); still the blend being solid at body temperature [1]. Lipid nanoparticles possess a whole set of unique advantages which make them attractive carriers for pharmaceutical and cosmetic applications but also they are described as a suitable delivery system for food bioactives. Considering the pharmaceutical application the most frequent administration route is the skin, as lipid nanoparticles at the skin, enable further exploitation of their positive properties. The latter include the re-enforcement of a damaged lipid film and the increase in skin hydration and elasticity that lead to an increased penetration of actives but also to a reduction in wrinkle depth [2].

The solid core of the lipid nanoparticles provides a better physical and, in particular, chemical stability than that of a liquid or liquid crystalline core of conventional emulsions [3]. Compared to emulsions, a solid core of the dispersed particles binds incorporated drug molecules more strongly and offer a higher potential for sustained release and targeting [1,4]. Therefore, depending on the lipid matrix structure the release profile of the incorporated drug from the lipid nanoparticles can be modulated from very fast to very slow [5]. In sunscreen formulations, SLN are more effective UV blockers than conventional emulsions. This is due to the particulate character of the crystalline nanoparticles. Consequently, they act as stronger scatters of UV radiation than the equally sized liquid emulsion droplets [6]. It was found that as compared to conventional oil-in-water cream, SLN improve penetration of actives into the skin which results in increased active concentrations from the horny layer down to superficial dermis. As result of that, lipid nanoparticles can be regarded as “invisible, penetration enhancing occlusive plastic foil” [1].

Despite the fact that SLN and NLC have been intensively investigated for dermal application [3,6,7], still there is enough research space. This is especially true in the domain of novel stabilizers/surfactants with preferable safety profiles. For dermal application surfactants should be preferentially nonionic. However, recent data indicate that nonionic PEG-containing surfactants should be avoided in dermal formulation as they may have negative effects on the skin barrier. An additional problem during the production of these stabilizers might be the formation of the toxic compound, dioxane, which is unacceptable even in small quantity due to its carcinogenicity [8]. Furthermore, with the increasing awareness of the environmental issues the cosmetic and pharmaceutical industry tends to use excipients made from renewable materials. In that sense, more “environmentally friendly” surfactants such as for example polyhydroxy surfactants have become a field of growing interest.

Polyhydroxy surfactants are nonionic PEG-free stabilizers derived from the condensation reaction of a polyhydroxy compound (sucrose, glucose, and glycerol) and fatty acids/fatty alcohols. The main categories of polyhydroxy surfactants include glycol esters, (poly)glycerol esters, alkyl (poly)glucosides, sucrose esters, sorbitane esters, N methyl glucamide. During their production no ethoxylation occurs, i.e. danger of dioxane contamination is absent and they are considered to be “skin friendly” [8]. Beside favorable dermatological and ecological properties, several additional features justify attention devoted to these molecules. The hydrophilic and lipophilic properties of polyhydroxy surfactants can be tuned by varying the alkyl- or polyol-chain length [9]. The phase behavior of the systems involving these surfactants is less influenced by temperature compared to systems based on

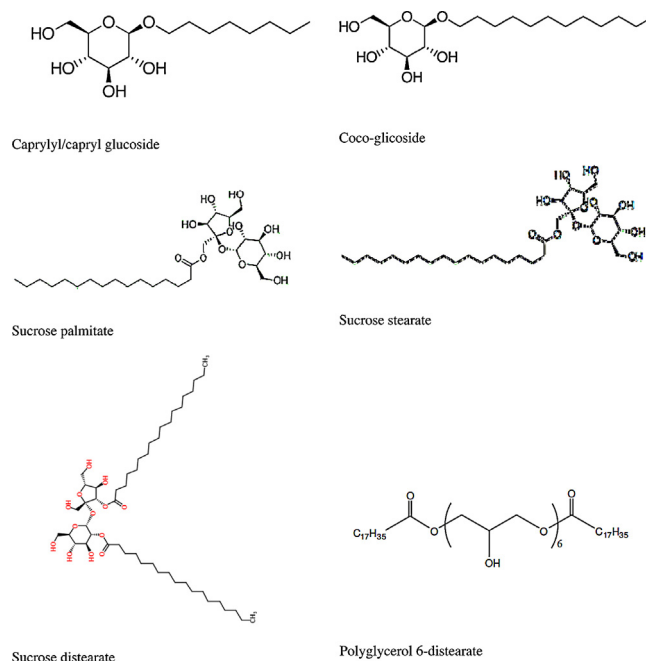


Fig. 1. Chemical structure of polyhydroxy surfactants used in the study.

PEG-containing surfactants [10]. This is explained by the presence of a large number of hydroxyl groups in the molecule which provide strong hydrogen bonds with water. Polyhydroxy surfactants are also less susceptible to pH changes and electrolyte presence than PEG-containing one [11]. Therefore, these stabilizers open the perspective for the production of different drug delivery systems that are more stable than the systems based on PEG-containing surfactants. Although the popularity of these stabilizers has increased substantially, to our knowledge their use in the formulation of SLN dispersions is still limited and more research is needed. In our previous study, polyhydroxy surfactant (Plantacare® 810) at low concentration (1% (w/w)) has been successfully used to stabilize SLN and NLC dispersions [12]. The same surfactant but in a concentration of 1.5% (w/w) has been employed for the stabilization of flufenamic acid and lutein loaded SLN and NLC [13,14].

The purpose of this paper was to evaluate further the functionality of polyhydroxy surfactants in the stabilization of placebo, i.e. drug free SLN. The study aimed at identifying the most suitable polyhydroxy surfactant for the production and stabilization of SLN. Important aim was also to systematically investigate the effect of different chemical structures of polyhydroxy surfactants on the physico-chemical properties of the particles, i.e. size, efficacy in size reduction during production, physical stability, crystallinity, charge and wettability in detail. For that, six surfactants differing in the alkyl chain length and the type of polyhydroxy head group (Table 1; Fig. 1) were investigated. To evaluate the wetting ability of Cutina® CP (solid lipid used as SLN matrix) with the surfactant solution the contact angle was initially determined. SLN were produced by hot high pressure homogenization and analyzed for particle size and size distribution over an observation period of 180 days. Zeta potential was measured in water (for determination of Stern potential) and in the original dispersion medium (to understand mechanism of stabilization). Differential scanning calorimetry was used for in-depth physicochemical characterization of the SLN, especially focusing on the crystallinity and melting behavior of the particles.

Table 1
Overview of the polyhydroxy surfactants used in this study and the contact angles obtained with water, aqueous solution of polyhydroxy surfactants on Cutina® CP film and with water on Cutina® CP-polyhydroxy surfactant films ($n=3$, mean $\pm$ SD).

Chemical name	Trade name	Supplier	Alkyl chain length	HLB value	Physical form	Solubility in water (25 °C)	Molar mass (g/mol)	Contact angle [°]
Caprylyl/capryl glucoside	Plantacare® 810	Cognis, Germany	C8–10	15–16	Light yellow liquid	Soluble	~320	36.0 $\pm$ 2.3
Coco-glucoside	Plantacare® 818	Cognis, Germany	C8–14	14	Light yellow liquid	Soluble	~390	23.0 $\pm$ 0.0
Sucrose palmitate	Sisterna® PS 750-C	Sisterna BV, Netherlands	C16	16	Powder (melting point: 44–46 °C)	Very slightly soluble	~580	45.0 $\pm$ 2.6
Sucrose stearate	Surfhope® C-1815	Mitsubishi Kagakoo, Japan	C18	15	Powder (melting point: 49–52 °C)	Very slightly soluble	~610	50.7 $\pm$ 1.1
Sucrose distearate	Surfhope® C-1805	Mitsubishi Kagakoo, Japan	2 $\times$ C18	5	Powder (melting point: 57–65 °C)	Practically insoluble	~875	56.9 $\pm$ 4.9
Polyglycerol-6 distearate	Plurol Stearique® WL 1009	Gattefosé, France	2 $\times$ C18	9	Wax (melting point: 48–53 °C)	Practically insoluble	994	65.7 $\pm$ 3.0

2. Materials and methods

2.1. Materials

Solid lipid, cetyl palmitate (Cutina® CP) was provided by Cognis (Germany). Table 1 lists the surfactants used in this study. 0.9% (w/w) NaCl solution was obtained from B. Braun Melsungen AG (Germany). Bidistilled water was obtained by reverse osmosis (Milli Q plus, Millipore system, Germany).

2.2. Methods

2.2.1. Contact angle measurements

The contact angle is a useful parameter to evaluate the wetting of the solid substrate with liquid. In this study, the wettability of Cutina® CP (the lipid matrix of the SLN) with aqueous surfactant solution was evaluated by contact angle measurements. For that, the lipid was melted on the glass and upon solidification, a flat surface was obtained. 1% (w/w) solutions of caprylyl/capryl glucoside, coco-glucoside, sucrose palmitate and sucrose stearate in water were prepared and the contact angles were measured 15 s after application of 15 μ l surfactant solution on the lipid film using a Contact Angle Meter G1 (Krüss, Germany). Due to the limited solubility of sucrose distearate and polyglycerol 6-distearate in water a binary mixture of lipid and surfactant in the mass ratio 10:1 was prepared, melted and let solidify on the glass slide. The contact angle was measured 15 s after application of 15 μ l bidistilled water on the lipid-surfactant film using again the Contact Angle Meter G1. It was important to perform measurements fast and in a constant manner, because gravitation forces cause drop contraction and a change in the contact angle.

2.2.2. Preparation of SLN dispersions

SLN dispersions containing 10% (w/w) Cutina® CP as a solid lipid, 1% (w/w) polyhydroxy surfactant as stabilizer (Table 1; Fig. 1) and 89% (w/w) bidistilled water, were obtained by hot high pressure homogenization (Micron LAB 40, APV Deutschland GmbH, Unna, Germany). The homogenizer was equipped with a water jacket for temperature control. The batch size was 40 ml. The machine was operated discontinuously. Briefly, Cutina® CP was melted at 75 °C and dispersed by high speed stirring (8000 rpm for 30 s) in 1% (w/w) surfactant solution which was previously heated to the same temperature. The dispersing was performed using an Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Germany). The pre-emulsion was passed five times through a heated homogenizer (75 °C) at a pressure of 500 bar. After homogenization, the obtained o/w nanoemulsion was filled in silanized transparent glass vials, which were immediately sealed. The vials were put into a water bath adjusted to 20 °C to control the cooling rate of the nanoemulsions and the velocity of crystallization. To investigate the influence of the number of the homogenization cycles on the particle size and size distribution the samples were taken after the 1st, 3rd and 5th cycle and analyzed using photon correlation spectroscopy and laser diffraction.

2.2.3. Physical stability of SLN dispersions

To assess the physical stability, the dispersions were stored at 25 $\pm$ 2 °C and analyzed after preparation (day 0), after 90 and 180 days using photon correlation spectroscopy and laser diffraction.

2.2.3.1. Photon correlation spectroscopy (PCS). The measurements were performed using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) at temperature of 25 °C. Prior to the measurements all samples were diluted with ultra-purified water to yield a suitable scattering intensity. PCS yields the hydrodynamic diameter (z-average, z-ave), which is an intensity weighted mean diameter

of the bulk population. As a measure of the width of the particle size distribution, polydispersity index (PI) was obtained. Z-average and PI were obtained by calculating the average of ten consecutive measurements for each sample in a 10 mm plastic cuvette at a fixed angle of 173° after external standardization with spherical polystyrene beads (63 nm). As analysis mode, the general purpose mode was selected.

2.2.3.2. Laser diffraction (LD). The measuring range of the Zetasizer is from approximately 6 nm to 6 µm. Therefore, to detect potential larger particles and oil droplets, LD with a measuring range up to 2000 µm was applied as additional characterization method using a Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK) equipped with a Hydro S dispersing unit. The results were analyzed using the Mie-theory with the optical parameters 1.456 (real refractive index) and 0.01 (imaginary refractive index). Mie theory assumes spherical particles. Five consecutive measurements were performed to ensure that no changes in the sample occurred during the measurements. The results were analyzed as volumetric distribution. The median diameter values ($d(v)$ 0.10, $d(v)$ 0.50, $d(v)$ 0.90, $d(v)$ 0.95, $d(v)$ 0.99) indicate the volume percentage of the particles possessing a diameter equal or lower than the given size [15].

2.2.3.3. Zeta potential. The zeta potential of the particles was determined using again Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). For determination of Stern potential measurements were performed in bidistilled water adjusted with 0.9% (w/v) sodium chloride solution to a conductivity of 50 µS/cm. Using a standard conductivity avoids fluctuations in the zeta potential due to variations in the conductivity of distilled water which can range from 1 to 10 µS/cm. pH of the water during the measurement was 5.5–6.0. The zeta potential is a function of both, particle surface charge and electrolytes present in the dispersion medium, which surrounds the particles during the storage. Because of that measurements were performed in water but also in the original dispersion medium. Original dispersion medium was obtained by dissolving 1% (w/w) surfactant (caprylyl/capryl glucoside, coco-glucoside, sucrose palmitate and sucrose stearate) in bidistilled water. Measurements in the original dispersion medium give information about the thickness of the diffuse layer [16]. Each sample was analyzed in triplicate. The mean value and standard deviation (SD) are given. As analysis mode, the auto mode option was selected. Sucrose distearate and polyglycerol 6-distearate are water insoluble surfactants and the zeta potential in the original dispersion medium was not measured.

2.2.4. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM was used to image SLN and to obtain direct information about the size, shape and morphology of the particles. Micrographs were taken with a Hitachi S-4000 microscope (Hitachi High-Technologies, Europe, Krefeld, Germany). Before measurements, SLN dispersions were spread on a sample holder and coated with gold under an argon atmosphere. The samples were dried before placing them in the microscope chamber for analysis.

2.2.5. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC was employed to investigate the influence of the surfactant on the melting behavior of the SLN and to compare that with the melting behavior of bulk lipid (Cutina® CP). In order to mimic production conditions of the SLN, Cutina® CP was heated up to 75 °C kept at that temperature for 1 h and then cooled to room temperature. The accurately weighed samples of Cutina® CP (1–2 mg) were analyzed the next day using a Mettler DSC 821e apparatus (Mettler Toledo, Switzerland). DSC measurements of the SLN dispersions

were performed using again the Mettler DSC 821e apparatus. The amount of SLN dispersion was calculated that it contained approximately 1–2 mg of the lipid (accurately weighted). For 10% (w/w) dispersion this is approximately 10–20 µl, which were placed in 40 µl aluminium pans. An empty aluminium pan was used as reference. The heating runs were performed from 20–90 °C at a heating rate of 10 K min⁻¹ while flushing with nitrogen (80 ml/min). Onset, melting temperature and melting enthalpy were calculated using STAR^e Software (Mettler Toledo, Switzerland). Furthermore, the recrystallization index (RI) i.e. percentage of recrystallized solid lipid related to the initial solid lipid concentration was calculated using the following equation [17]:

$$RI(\%) = \left(\frac{\Delta H_{\text{aqueous SLN dispersion}}}{\Delta H_{\text{bulk material}} \times \text{concentration}_{\text{lipid phase}}} \right) \times 100$$

where $\Delta H_{\text{aqueous SLN dispersion}}$ and $\Delta H_{\text{bulk material}}$ are the melting enthalpy (J/g) of aqueous SLN dispersion and lipid in bulk state, respectively. The concentration of the lipid phase is given in the percentage of the solid lipid in the total dispersion (e.g. 10% (w/w) dispersion is 10/100 parts = 0.1). In case the RI of the tempered bulk material is calculated, the concentration is = 1. The calculation of the recrystallization index might involve some uncertainty. For example if the particles are 100% solid but had a different polymorph with a lower melting enthalpy than the bulk fat they would apparently have a lower crystallinity [18]. This fact cannot be circumvented. In practice the RI is calculated to obtain a measure of crystallinity compared to the bulk lipid and especially to obtain information about differences between the different formulations, i.e. to gain knowledge if a formulation is more or less crystalline than the other. Further, the RI can be used to investigate if the crystallinity changes over the time of storage, e.g. the more stable β -modification is obtained during storage [18]. For this, even though the results involve this uncertainty, the RI is a very valuable measure.

3. Results and discussion

3.1. Contact angle measurements

Despite a lot of knowledge about the behavior of the surfactants in the colloidal lipid systems even today it is very difficult to find an optimal stabilizer for SLN without previous experimental evaluation. On the other side, knowing the contact angle of the surfactant solution on the lipid film is often neglected at an early stage of the development of the SLN. The smaller contact angle improves the wettability of the solid lipid phase and promotes the formation of finely dispersed non-aggregating particles. Therefore, the contact angle can be used as a screening tool in the selection of the stabilizer for SLN.

The results of the contact angle measurements of this study are shown in Table 1. The wettability of Cutina® CP was improved in the presence of all investigated stabilizers. This is due to the fact that stabilizers exhibit a smaller surface tension than purified water. More specifically, the wettability of the solid lipid was strongly affected by coco-glucoside and caprylyl/capryl glucoside. Compared to purified water the contact angle was reduced by 56.2° and 43.2° respectively. Slightly higher values were obtained with sucrose palmitate and sucrose stearate, followed by sucrose distearate and polyglycerol 6-distearate. After obtaining a preliminary impression about the wettability of Cutina® CP by different surfactants, the further step was done by producing SLN and their evaluation through a long-term physical stability study.

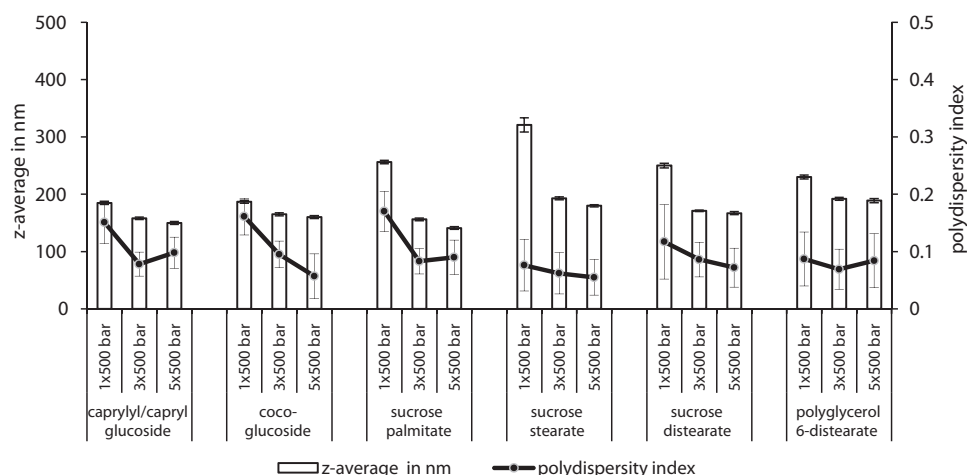


Fig. 2. Decrease in particle size (PCS-data presented as mean particle size (z-ave) and polydispersity index (PI)) as a function of homogenization cycles for the six differently stabilized SLN dispersions ($n = 10$), (pressure = 500 bar, temperature = 75 °C).

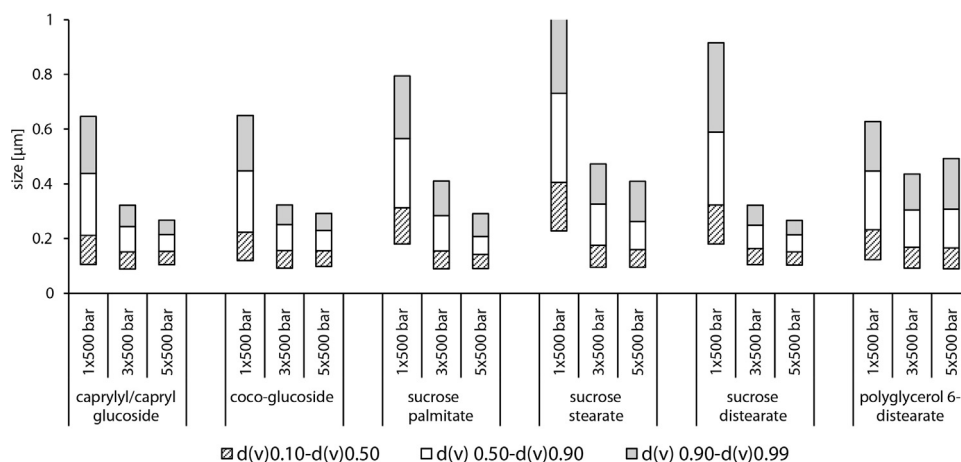


Fig. 3. Decrease in particle size (LD-data presented as volume diameters ($d(v)0.10 - d(v)0.99$)) as a function of homogenization cycles for the six differently stabilized SLN dispersions ($n = 5$), (pressure = 500 bar, temperature = 75 °C).

Table 2

Decrease in particle size (LD-data presented as volume diameters ($d(v)0.10 - d(v)0.99 \pm SD$)) as a function of homogenization cycles for the six differently stabilized SLN dispersions ($n = 5$), (pressure = 500 bar, temperature = 75 °C).

Sample	Number of cycles	$d(v)0.10$	$d(v)0.50$	$d(v)0.90$	$d(v)0.95$	$d(v)0.99$
Caprylyl/capryl glucoside	1	0.106 ± 0.001	0.212 ± 0.001	0.438 ± 0.002	0.517 ± 0.004	0.646 ± 0.007
	3	0.089 ± 0.001	0.152 ± 0.002	0.244 ± 0.002	0.274 ± 0.000	0.322 ± 0.011
	5	0.105 ± 0.000	0.153 ± 0.000	0.215 ± 0.000	0.236 ± 0.000	0.268 ± 0.000
Coco-glucoside	1	0.120 ± 0.001	0.223 ± 0.002	0.448 ± 0.001	0.523 ± 0.003	0.650 ± 0.004
	3	0.092 ± 0.000	0.157 ± 0.000	0.251 ± 0.000	0.280 ± 0.000	0.323 ± 0.000
	5	0.099 ± 0.001	0.156 ± 0.000	0.230 ± 0.000	0.253 ± 0.000	0.292 ± 0.000
Sucrose palmitate	1	0.180 ± 0.000	0.312 ± 0.000	0.566 ± 0.001	0.645 ± 0.001	0.795 ± 0.002
	3	0.090 ± 0.000	0.155 ± 0.000	0.284 ± 0.000	0.330 ± 0.000	0.410 ± 0.000
	5	0.091 ± 0.000	0.143 ± 0.000	0.237 ± 0.001	0.264 ± 0.001	0.321 ± 0.001
Sucrose stearate	1	0.228 ± 0.000	0.406 ± 0.002	0.731 ± 0.002	0.851 ± 0.001	1.098 ± 0.004
	3	0.095 ± 0.000	0.176 ± 0.000	0.326 ± 0.000	0.381 ± 0.000	0.473 ± 0.000
	5	0.095 ± 0.000	0.160 ± 0.000	0.262 ± 0.000	0.302 ± 0.000	0.409 ± 0.000
Sucrose distearate	1	0.180 ± 0.000	0.323 ± 0.000	0.590 ± 0.002	0.689 ± 0.002	0.916 ± 0.001
	3	0.105 ± 0.000	0.164 ± 0.000	0.249 ± 0.000	0.277 ± 0.000	0.322 ± 0.001
	5	0.103 ± 0.000	0.152 ± 0.000	0.214 ± 0.001	0.232 ± 0.000	0.267 ± 0.000
Polyglycerol-6 distearate	1	0.123 ± 0.002	0.232 ± 0.002	0.447 ± 0.003	0.518 ± 0.006	0.628 ± 0.013
	3	0.092 ± 0.004	0.169 ± 0.004	0.304 ± 0.002	0.354 ± 0.002	0.436 ± 0.002
	5	0.090 ± 0.001	0.166 ± 0.002	0.308 ± 0.002	0.371 ± 0.000	0.493 ± 0.011

3.2. Production of SLN dispersions

The composition of the SLN dispersions was chosen based on a previous good experience with Cutina® CP and polyhydroxy surfactants regarding the formation of small sized particles with good physical stability [12]. Dispersions contained 10% (w/w) Cutina® CP as solid lipid, 1% (w/w) polyhydroxy surfactant as stabilizer and 89% (w/w) bidistilled water. High pressure homogenization as the most effective approach for obtaining the particles with small size and a narrow size distribution (low PI) was used in this study [19–21]. Homogenization decreases mean particle size and narrows the width of the size distribution. A decrease in particle size with an increasing number of the homogenization cycles was observed in all dispersions by PCS and LD measurements (Figs. 2 and 3; Table 2). Furthermore, a continuous narrowing of the width of the particle size distribution for all stabilizers could be detected with a reduction in PI. After five homogenization cycles macroscopically homogenous milky like systems with mean particle size below 200 nm and PI ~ 0.1 were obtained.

However, while the maximum dispersibility of the bulk population (minimum $d(v)_{0.50}$) was already reached after three homogenization cycles, a decrease of the $d(v)_{0.90}$ and $d(v)_{0.99}$ values is still pronounced up to cycle five (Fig. 3; Table 2). After the fifth homogenization cycle $d(v)_{0.50}$, which is a measure for the mean size of the bulk population was below 0.2 μm . $d(v)_{0.99}$ which indicates the volume diameter of the larger particles was below 0.6 μm . This can be explained by a kind of two-step diminution process in the homogenizer. In the first step the majority of the particles (bulk population) reach their maximum dispersibility relatively fast. In the second homogenization step, a little effect on the mean diameter of the bulk population can be seen, but the width of the distribution by eliminating remaining few large particles is further reduced. Therefore, even the mean diameter of the bulk population has reached its minimum and stays constant additional homogenization cycles are recommended to improve the homogeneity of the final product. To summarize: by applying a pressure of 500 bar and five homogenization cycles, SLN stabilized with six different polyhydroxy surfactants were successfully produced.

3.3. Physical stability of SLN dispersions

3.3.1. Photon correlation spectroscopy

Aqueous SLN dispersions were stored at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) for 6 months and particle size and size distribution were determined. Fig. 4 shows the results obtained. During the observation period $z\text{-ave}$ and PI practically did not change. Dispersions also remained macroscopically homogenous and of liquid viscosity. However, as it is well known PCS can give misleading results because the large particle fractions are not “seen” by this technique [22]. Therefore, in order to prove the presence/absence of larger particles and to distinguish nano- from microparticles, LD was used to further characterize the dispersions.

3.3.2. Laser diffraction

The stability of the SLN dispersions as confirmed by LD measurements was not compromised after three months. The volume diameters also remained unchanged after six months for caprylyl/capryl glucoside, coco-glucoside, sucrose palmitate and sucrose distearate stabilized particles (Fig. 5; Table 3). For polyglycerol 6-distearate and sucrose stearate stabilized SLN, after six months $d(v)_{0.99}$ was in the micrometer range but more than 95% of the particles still possessed a size below 1 μm . The stability of these samples might be related to a higher crystallinity (DSC study) (Table 4). Higher crystallinity was shown to promote instability due to the solidification of the liquid suspension [17,23]. Furthermore, polyglycerol 6-distearate contains two fatty C18 acid chains and

therefore it is assumed that the higher number of fatty acid chains in the structure leads to a less sufficient stabilization effect. First, due to the promoted increased crystallization as explained above and second, due to steric reasons. The two fatty acid chains require more space than a single fatty acid chain (cf. Fig. 1). According to the “edge theory”, if the lipophilic part of the chemical structure is more “bulky”, the stabilizer tends to be a water in oil emulsifier. Thus, the ability to stabilize an oil in water system is less, when compared to stabilizers with a less bulky lipid part in the structure.

3.4. Zeta potential

As the particle charge is one of the factors determining the physical stability of the disperse systems, the zeta potential was measured in water (for determination of Stern potential) and in the original dispersion medium (to fully understand mechanism of stabilization). According to the literature data [16], absolute zeta potential values above 30 mV provide good and above 60 mV excellent physical stability. The value of about 20 mV provides only a short-term physical stability, whereas the values in the range of -5 mV to $+5\text{ mV}$ indicate fast aggregation. This is valid for low-molecular weight surfactants and pure electrostatic stabilization, but not for high-molecular weight stabilizers which act mainly by steric stabilization. In this case zeta potentials of only 20 mV or much lower can provide sufficient physical stability [16,24,25].

For all formulations, the values in water were above 30 mV, indicated a well-charged particle surface, thus in principle promoting good physical stability (Table 4). The highest values were obtained for caprylyl/capryl glucoside and coco-glucoside stabilized SLN. An explanation might be that, due to good solubility in water, these surfactants fully desorb from the particles, and the measured zeta potential reflect the correlation to the surface potential.

In the original dispersion medium smaller values were obtained than in water. The decrease in the zeta potential indicates that more surfactant molecules are adsorbed on the particle surface in the original medium than in water. Thicker surfactant layer shifts the shear plane from the surface of the particles, thus lower zeta potentials are obtained. At the same time, a thicker adsorbed surfactant layer on the particles promotes good steric stabilization in the original formulation. The decrease in the zeta potential when moving from water to the original medium was the most pronounced for caprylyl/capryl glucoside stabilized SLN (values dropped from -52.4 to -27.4 mV). For sucrose palmitate and coco-glucoside approximately similar decrease in the zeta potential was obtained, while in the case of sucrose stearate, the reduction in the zeta potential was only 8 mV. This might point out a certain interaction of sucrose stearate with the particles, which has a more pronounced effect than desorption of the surfactant from the particle surface during dilution of the samples with water for measurements. An additional explanation might be that changes in the Debye length alongside with ionic strength could lead to a change in the position of the shear plane or alterations in the charge/conformation of the corresponding ionic groups.

The experimental interpretation of the zeta potential is complex, particularly for very small and charged particles, such as SLN. Even when non-ionic stabilizers are used for the stabilization of the original dispersion medium (i.e. 1% surfactant solution) it may contain electrolytes. They can be responsible for changes in the thickness of a diffuse layer and hence the measured zeta potential. Furthermore, over time the conductivity of dispersion medium may change which can lead to changes in the zeta potential. Under these conditions, the physical stability of the aqueous SLN dispersions can be underestimated if the results are not interpreted correctly. For that, reason, in this study the results of the zeta potential

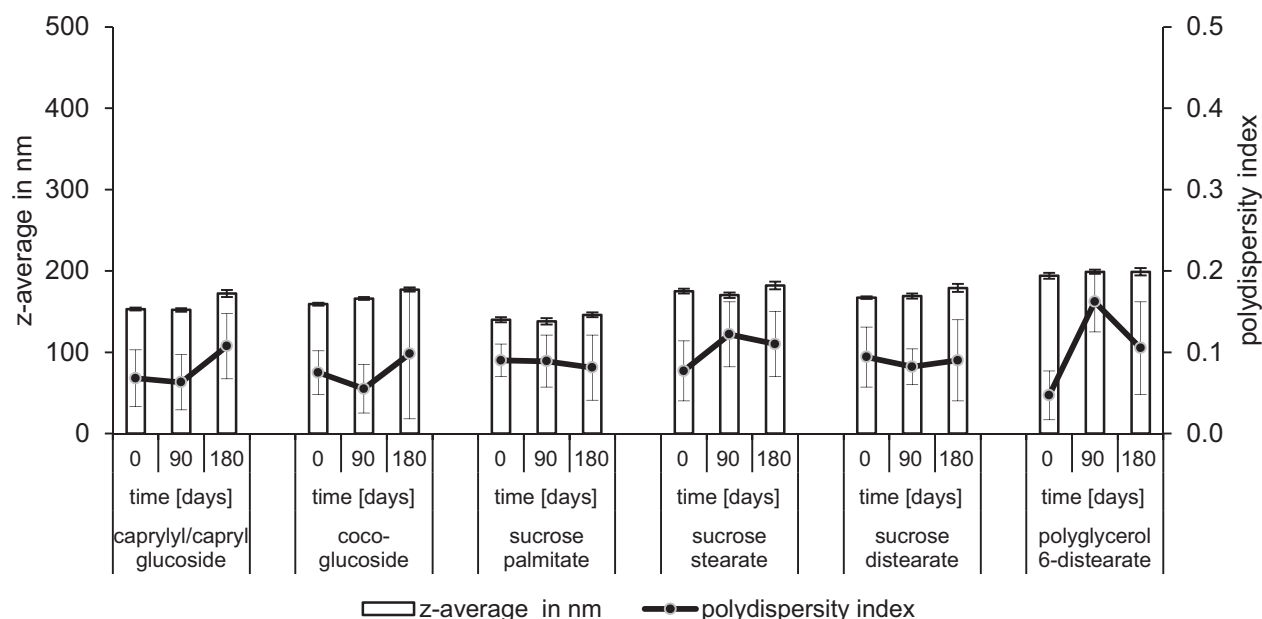


Fig. 4. Stability profile (PCS-data) for the six differently stabilized SLN dispersions as function of days ($n=10$), (storage temperature: $25 \pm 2^\circ\text{C}$).

measurements are published together with the results of the conductivity (Table 4). It was observed that the changes in the conductivity of the dispersion medium led to the changes in the zeta potential. For sucrose stearate “small” increase in the ionic strength of the dispersion medium was followed by “small” reduction in the zeta potential. On the other side, the conductivity of the dispersion medium in caprylyl/capryl glucoside, coco-glucoside and sucrose palmitate stabilized SLN significantly increased, which resulted in a pronounced drop in the zeta potential. It can be assumed that in this case the steric contribution for stabilization of the SLN becomes more important. Considering the obtained results, the stabilization ability of all surfactants can be explained as superposition of electrostatic and steric effects that complement each other. However, the steric contribution for stabilization becomes the most important in the formulations stabilized with caprylyl/capryl glucoside, coco-glucoside and sucrose palmitate.

3.5. SEM analysis

Additional experiments including SEM were carried out to assess size, shape and morphology of SLN. Spherical particles with the size below $1\ \mu\text{m}$, and some particle aggregates above $1\ \mu\text{m}$ were obtained (Fig. 6). Agglomeration of the SLN might be caused by sample preparation for SEM analysis. Investigating the size of the single particles of the agglomerate, the picture confirms the size measured by PCS and LD.

3.6. DSC study

Formulation development of the SLN aims a physical stability in both, particle size and crystalline state of the lipid matrix. It is therefore necessary to prove the solid state of the lipid in SLN by appropriate analytical techniques and compared to Cutina® CP (solid lipid used as SLN matrix) in bulk. This was done via detection

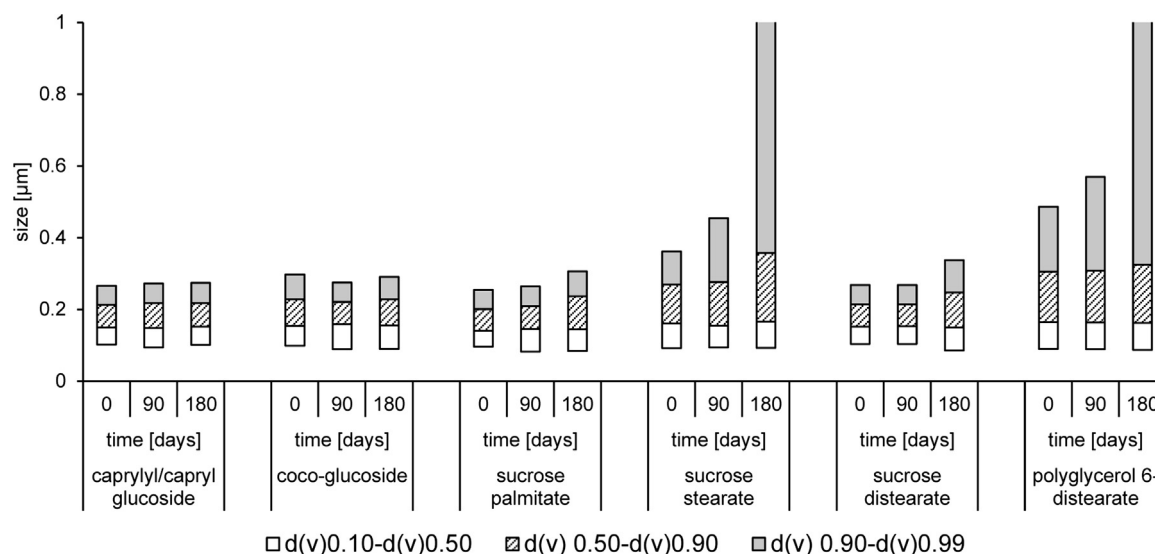


Fig. 5. Stability profile (LD-data) for the six differently stabilized SLN dispersions as function of days ($n=5$), (storage temperature: $25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Table 3
Stability profile (LD-data presented as volume diameters $(d(v)0.10 - d(v)0.99) \pm SD$) for the six differently stabilized SLN dispersions as function of days ($n=5$), (storage temperature: $25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Sample	Time (days)	$d(v)0.10$	$d(v)0.50$	$d(v)0.90$	$d(v)0.95$	$d(v)0.99$
Caprylyl/capryl glucoside	0	0.102 ± 0.000	0.150 ± 0.000	0.212 ± 0.000	0.231 ± 0.000	0.266 ± 0.001
	90	0.094 ± 0.001	0.148 ± 0.000	0.217 ± 0.000	0.237 ± 0.000	0.272 ± 0.000
	180	0.101 ± 0.002	0.152 ± 0.001	0.217 ± 0.003	0.273 ± 0.004	0.274 ± 0.005
Coco-glucoside	0	0.099 ± 0.000	0.154 ± 0.000	0.228 ± 0.000	0.251 ± 0.000	0.297 ± 0.000
	90	0.089 ± 0.000	0.159 ± 0.000	0.221 ± 0.000	0.241 ± 0.000	0.275 ± 0.001
	180	0.090 ± 0.003	0.156 ± 0.001	0.228 ± 0.002	0.251 ± 0.003	0.290 ± 0.004
Sucrose palmitate	0	0.096 ± 0.000	0.141 ± 0.001	0.201 ± 0.000	0.220 ± 0.000	0.254 ± 0.000
	90	0.082 ± 0.000	0.146 ± 0.000	0.209 ± 0.000	0.229 ± 0.001	0.264 ± 0.001
	180	0.084 ± 0.006	0.145 ± 0.003	0.236 ± 0.001	0.263 ± 0.001	0.306 ± 0.005
Sucrose stearate	0	0.092 ± 0.000	0.161 ± 0.000	0.269 ± 0.000	0.304 ± 0.000	0.361 ± 0.000
	90	0.094 ± 0.000	0.155 ± 0.000	0.276 ± 0.001	0.325 ± 0.001	0.454 ± 0.017
	180	0.093 ± 0.000	0.166 ± 0.001	0.357 ± 0.050	7.154 ± 4.122	31.446 ± 6.780
Sucrose distearate	0	0.104 ± 0.000	0.152 ± 0.000	0.214 ± 0.000	0.233 ± 0.000	0.268 ± 0.001
	90	0.104 ± 0.000	0.153 ± 0.000	0.214 ± 0.000	0.235 ± 0.000	0.268 ± 0.001
	180	0.086 ± 0.009	0.150 ± 0.005	0.247 ± 0.003	0.282 ± 0.000	0.337 ± 0.005
Polyglycerol-6 distearate	0	0.090 ± 0.001	0.165 ± 0.002	0.305 ± 0.002	0.365 ± 0.000	0.486 ± 0.011
	90	0.089 ± 0.000	0.164 ± 0.000	0.308 ± 0.001	0.381 ± 0.000	0.569 ± 0.003
	180	0.087 ± 0.000	0.163 ± 0.000	0.324 ± 0.002	0.435 ± 0.006	31.879 ± 2.029

Table 4
DSC parameters (scan $20-90^\circ\text{C}$, scan rate 10 K/min), zeta potential (mV) and conductivity ($\mu\text{S/cm}$) of SLN dispersions stabilized with six different polyhydroxy surfactants ($n=30$, mean $\pm$ SD) stored for 90 days at $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Sample	Melting temperature ($^\circ\text{C}$)	Onset temperature ($^\circ\text{C}$)	Melting enthalpy (J/g)	RI (%)	Zeta potential (mV) $\pm$ SD		Conductivity ($\mu\text{S/cm}$) $\pm$ SD	
					Bidistilled water	Original medium	Bidistilled water	Original medium
Caprylyl/capryl glucoside	48.79	44.60	7.12	32.20	-52.4 ± 0.9	-27.4 ± 0.8	58 ± 2	529 ± 3
Coco-glucoside	49.09	45.19	9.20	41.73	-48.3 ± 0.8	-30.1 ± 0.3	52 ± 0	456 ± 3
Sucrose palmitate	49.03	44.75	8.74	39.64	-39.3 ± 1.3	-23.5 ± 0.5	57 ± 2	406 ± 9
Sucrose stearate	49.18	44.28	12.05	54.66	-41.6 ± 1.8	-33.1 ± 0.4	56 ± 1	107 ± 1
Sucrose distearate	49.04	44.49	11.65	52.84	-38.6 ± 1.6	^a	54 ± 0	^a
Polyglycerol-6 distearate	48.80	43.80	13.30	60.33	-31.5 ± 1.3	^a	54 ± 1	^a

^a The surfactants are not water soluble and therefore zeta potential and conductivity were not measured.

of a melting transition upon heating and the amount of crystalline material quantified via determination of the melting enthalpy.

Thermal analysis of SLN indicates complete recrystallization of the homogenized lipid as shown in Fig. 7.

In contrast to the lipid in bulk state the phase transitions of the SLN are broader. This is the result of the smaller particle size and the decrease in the crystalline order [26]. An decrease in the onset temperature, melting temperature and melting enthalpy of the SLN compared to bulk lipid was also observed (Table 4). This is explained by a much larger surface-to-volume ratio of SLN compared to bulk lipid. This size related changes in thermal properties

were explained by Gibbs–Thomson equation. Additionally, the prevention of re-crystallization can be due to an interaction of the surfactant and the lipid matrix. The effect of the surfactants was explained by the surface tension generated near to the particle surface, which shifts the melting and onset temperatures of the lipid toward lower values compared to bulk lipid [4].

There are several reports that investigate the influence of the surfactants on the melting and crystallization behavior of the lipid nanoparticles [18,27–29].

It was shown that the crystallization behavior of the lipid nanoparticles can be modified by the type of surfactants used for the

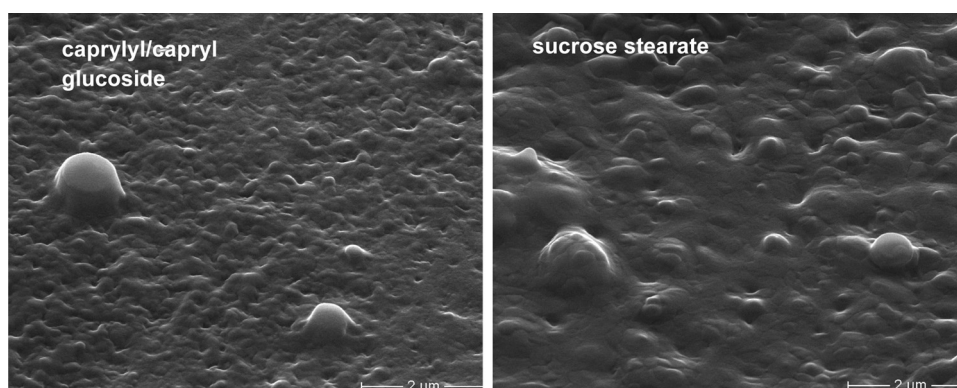


Fig. 6. Scanning electron micrographs of SLN dispersions stabilized with caprylyl/capryl glucoside (left) and sucrose stearate (right).

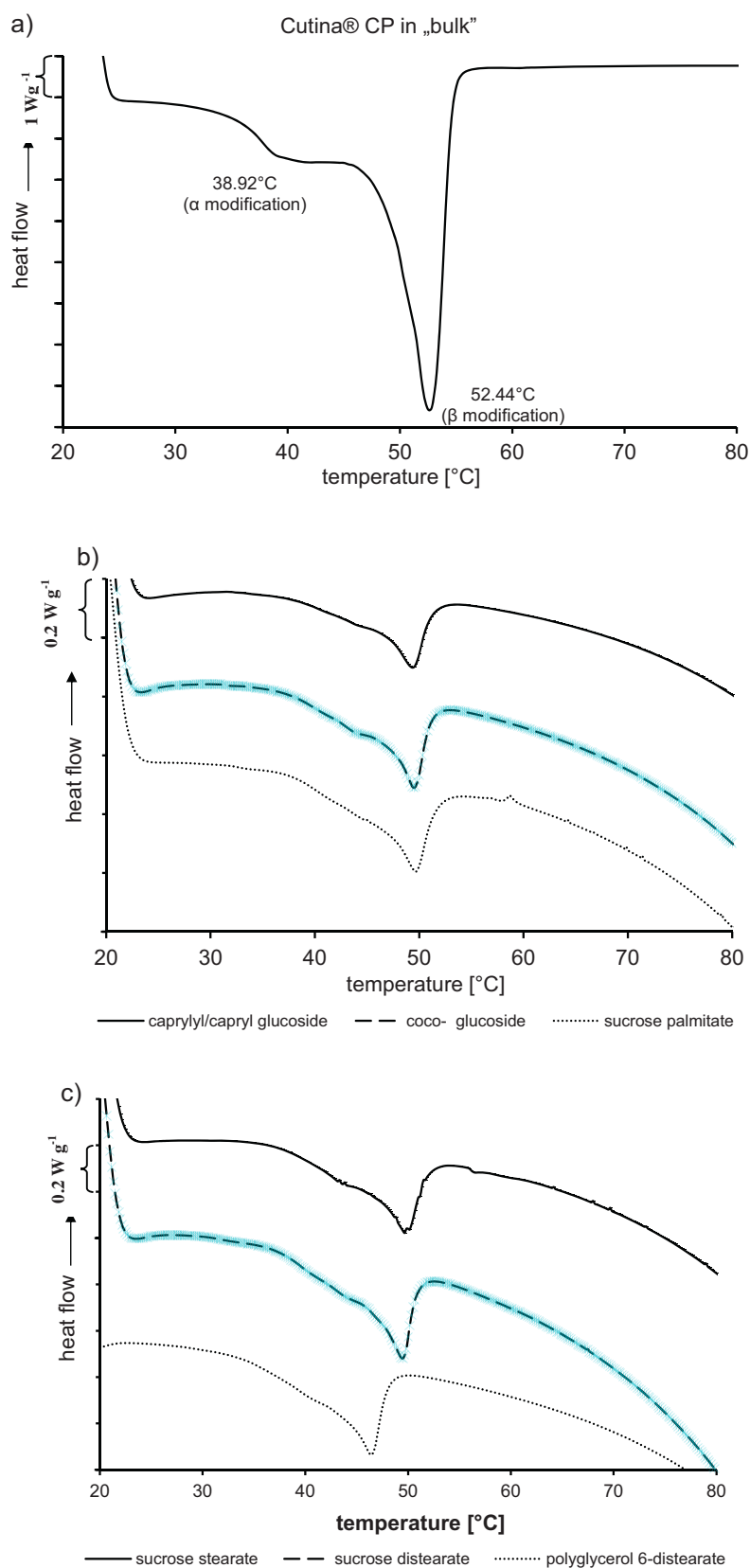


Fig. 7. DSC thermograms of Cutina® CP in bulk and SLN dispersions stabilized with polyhydroxy surfactants. The measurements were performed 90 days after preparation of dispersions and storage at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The curves have been displaced along the ordinate for better visualization.

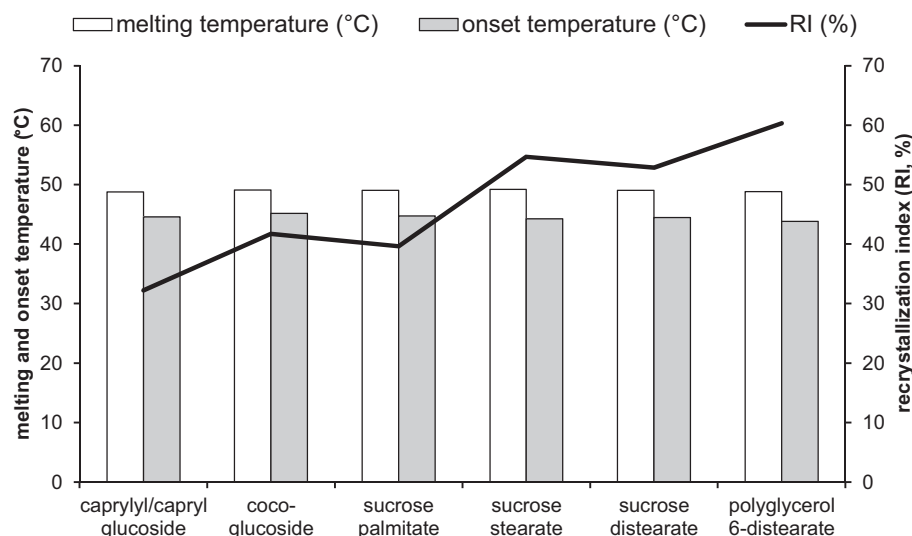


Fig. 8. Changes in the melting temperature, onset temperature and recrystallization index (RI) for six SLN dispersions stabilized with polyhydroxy surfactants, as determined by DSC (data from Table 2).

stabilization. For example, the stabilization of trilaurin, trimyristin, tripalmitin and tristearin nanoparticles with soybean lecithin lowered the crystallization temperature for triglycerides whereas the use of egg yolk lecithin or fully saturated phospholipids tended to increase the crystallization temperature for all triglycerides [30]. A similar phenomenon was observed in emulsions. In polysorbate stabilized hexadecane emulsions an increased crystallization temperature of the lipid phase was observed. It is supposed that the predominant mechanism contributing to that was the “crystallization” of the emulsifier molecules at the particle interface [31].

Beside that crystallization of the particles can be affected by incorporated drug, particle size, the type and amount of the lipid, storage temperature, thermal history of the sample or the physical treatment (e.g. homogenization, lyophilization, spray-drying) [21,32]. In this study, only the influence of the surfactants on the melting behavior and crystallinity of the particles was investigated. Results showed that the surfactants did not influence the melting temperature: the values were between 48.79 °C and 49.18 °C in all formulations (Table 4; Fig. 8). The effect of the surfactants is only seen in the crystallization behavior.

Stabilization of the SLN with caprylyl/capryl glucoside, coco-glucoside and sucrose palmitate resulted in RI of 32.2%, 41.73% and 39.64%, respectively (Table 4; Fig. 8). After the same storage time particles stabilized with sucrose distearate, sucrose stearate and polyglycerol 6-distearate revealed higher RI (Table 4). The reason is the differences in the structure and HLB values between the stabilizers. According to the literature depending on the HLB value, the surfactants partition differently between water phase, interface and lipid phase. If the surfactants are not water soluble, theoretically a certain portion of the molecule will be localized in the lipid phase. In contrast to this, water-soluble surfactants will be rather present in the water phase (in the form of monomers or micelles) than incorporated in the lipid phase, i.e. matrix of the particles. In this case, due to the absence of surfactant–lipid interaction, an influence on the crystallinity is not expected.

Caprylyl/capryl glucoside and coco-glucoside are hydrophilic surfactants which have one short fatty acid chain, bound to the hydrophilic tail composed of glucose molecules penetrating into the water phase. Therefore, it can be assumed that these so called “liquid lipid” tail surfactants probably form a more fluid and “loose” layer around SLN. On the other side, the surfactants inducing the crystallinity (polyglycerol 6-distearate, sucrose distearate and sucrose stearate) contain one or even two long (C18) fatty alkyl

chains. Additionally, the melting point of these surfactants is close to the melting point of Cutina® CP. Due to the similarity in the structure with Cutina® CP theoretically these so called “solid lipid” tail surfactants can be incorporated into the lipid and to a certain extent promote the crystallinity of the particles. The result of that is that SLN stabilized with polyglycerol 6-distearate, sucrose distearate and sucrose stearate possesses higher RI than those containing caprylyl/capryl glucoside and coco-glucoside as stabilizer (Table 4; Fig. 8).

For sucrose palmitate a different mechanism of lipid–surfactant interaction might take place. Sucrose palmitate is a solid compound with a melting point of about 44–46 °C (cf. Table 1), thus belonging to the “solid lipid” tail surfactants. However, RI is similar to RI of caprylyl/capryl and coco-glucoside (“liquid lipid” tail surfactants) stabilized SLN, i.e. sucrose palmitate does not promote the crystallinity of the SLN. The reason might be the length of the fatty acid chain of the stabilizer, which is similar to the fatty acid chain lengths of the lipid matrix of the SLN (i.e. cetyl palmitate). The similar fatty acid is probably incorporated into the lipid matrix of the particles, but due to the similarity, it does not change the inner structure of the matrix. Thus, in theory this type of stabilizer would lead to the most stable particles. Different to the “liquid lipid” tail stabilizers sucrose palmitate is tightly bound to the lipid particle matrix, thus promoting physical stability. On the other hand, it does not promote crystallinity, which can lead to the physical instability [17,23].

PCS data obtained during the six months storage of the particles confirm this theory. Practically no increase in PCS and PI was observed for sucrose palmitate stabilized SLN while a slight increase of about 20 nm was found for SLN stabilized with “liquid lipid” tail surfactants and those stabilized with the other “solid lipid” tail surfactants (cf. Fig. 4). However, LD data show that the least aggregation (i.e. lowest $d(v)_{90}$ and $d(v)_{99}$) was observed for the particles stabilized with the “liquid lipid” tail surfactants. These surfactants possess the highest HLB and zeta potential as well as the smallest contact angles on Cutina® CP film and as explained above are not expected to interfere with the lipid matrix of the particles.

Nevertheless, also sucrose distearate was found to be a suitable stabilizer, i.e. little changes in z_{ave} and PI and only very limited aggregation were observed over the storage (cf. Figs. 4 and 5). This stabilizer possesses a low HLB, and relatively high contact angle and was found to promote the crystallinity of the particles. Therefore, the parameters found in this study suggesting a good stabilization of SLN, e.g. high HLB value, low contact angle on the lipid film, high

zeta potential and no or little lipid matrix–stabilizer interaction are useful to predict the suitability of a stabilizer to form small sized SLN with high physical stability. However, as shown in this study, e.g. for the stabilizer sucrose distearate, these parameters are not useful to exclude stabilizers from the formulation development, which do not fulfill these properties.

4. Conclusions

Polyhydroxy surfactants investigated were proven to be suitable stabilizers for SLN. A mean particle size of around 200 nm with a narrow particle size distribution ($PI < 0.1$) was obtained in all formulations. All stabilizers preserved good physical stability of SLN for 180 days at room temperature. Particle size and physical stability were found to be related to the physico-chemical properties of the different stabilizers. High HLB values, low contact angles on the lipid film used as SLN matrix, high zeta potential and a lower molecular weight led to smaller particles after one homogenization cycle. After five cycles, the smallest particles were obtained with the stabilizer having a fatty acid with a similar chain length as the lipid matrix of the particles.

The stabilizers were also found to influence the crystalline state of the particles. A more crystalline matrix of the particles was obtained with the “solid lipid” tail surfactants with a relatively high contact angle on the solid lipid used as particle matrix, low HLB values and a melting point above the melting point of the SLN matrix. Due to the promoting effect on the crystallinity of the particles these so called “solid lipid” tail surfactants (e.g. polyglycerol 6-distearate, sucrose stearate, sucrose distearate) might be used for the development of the lipid nanoparticles with high oil content and thus improved loading capacity. On the other side, the “liquid lipid” tail stabilizers (e.g. caprylyl/capryl glucoside, coco-glucoside) and sucrose palmitate, with a fatty acid chain length similar to the lipid matrix and melting point below the melting point of the SLN did not influence the crystallinity. Least aggregation phenomena were found for the “liquid lipid” tail surfactants, with high zeta potential and good wettability. However, least particle growth was obtained for the “solid lipid” tail surfactants, especially for sucrose palmitate possessing the same fatty acid chain length as the lipid matrix of the SLN. Therefore, the combination of a “liquid lipid” and a “solid lipid” tail surfactant, e.g. caprylyl/capryl glucoside or coco-glucoside and sucrose palmitate might be the best stabilizing system to formulate SLN. Future experiments shall prove this expectation.

Acknowledgments

Andjelka Kovačević acknowledges financial support from the German Academic Exchange Service (*Deutscher Akademischer Austausch Dienst, DAAD*) and Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia [TR 34031 and OI 172041]. The authors also would like to thank Ms. Corinna Schmidt for her excellent technical assistance.

References

- [1] R.H. Müller, R. Shegokar, C.M. Keck, 20 Years of lipid nanoparticles (SLN, NLC): present state of development and industrial applications, *Curr. Drug Discov. Technol.* 8 (3) (2011) 207–227.
- [2] W.M. Obeidat, K. Schwabe, R.H. Müller, C.M. Keck, Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76 (1) (2010) 56–67.
- [3] J. Pardeike, A. Hommoss, R.H. Müller, Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *Int. J. Pharm.* 366 (1–2) (2009) 170–184.
- [4] H. Bunjes, B. Siekmann, Manufacture, characterization, and applications of solid lipid nanoparticles as drug delivery systems, in: S. Benita (Ed.), *Microencapsulation, Methods and Industrial Applications*, Taylor & Francis Group, New York/London, 2006, pp. 213–269.
- [5] K. Westesen, Novel lipid-based colloidal dispersions as potential drug administration systems – expectations and reality, *Colloid Polym. Sci.* 278 (2000) 608–618.
- [6] E.B. Souto, A.J. Almeida, R.H. Müller, Lipid nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects, *J. Biomed. Nanotechnol.* 3 (4) (2007) 317–331.
- [7] R.H. Müller, R.D. Petersen, A. Hommoss, J. Pardeike, Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (6) (2007) 522–530.
- [8] T.F. Tadros, *Applied Surfactants – Principles and Applications*, Wiley VCH, Weinheim, 2005.
- [9] K. Shinoda, A. Carlsson, B. Lindman, On the importance of hydroxyl groups in the polar head-group of nonionic surfactants and membrane lipids, *Adv. Colloid Interface Sci.* 64 (1996) 253–271.
- [10] J.-L. Chai, G.-Z. Li, G.-Y. Zhang, J.-J. Lu, Z.-N. Wang, Studies on the phase behavior of the system APC/alcohol/alkane/H₂O with fishlike diagrams, *Colloids Surf. A* 231 (1–3) (2003) 173–180.
- [11] O. Söderman, I. Johansson, Polyhydroxyl-based surfactants and their physico-chemical properties and applications, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 4 (6) (1999) 391–401.
- [12] A. Kovacevic, S. Savic, G. Vuleta, R.H. Müller, C.M. Keck, Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on the particle size, physical stability and particle matrix structure, *Int. J. Pharm.* 406 (1–2) (2011) 163–172.
- [13] J.C. Schwarz, A. Weixelbaum, E. Pagitsch, M. Löw, G.P. Resch, C. Valenta, Nanocarriers for dermal drug delivery: influence of preparation method, carrier type and rheological properties, *Int. J. Pharm.* 437 (1–2) (2012) 83–88.
- [14] 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 (1–2) (2011) 267–275.
- [15] A. Rawle, Basic principles of particle size analysis. Online article, <http://www.malvern.com>
- [16] R.H. Müller, Zetapotential und Partikeladung – Kurze Theorie, praktische Meßdurchführung, Dateninterpretation, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, Stuttgart, 1996.
- [17] C. Freitas, R.H. Müller, Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN™) and crystallinity of the lipid phase, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47 (2) (1999) 125–132.
- [18] B. Siekmann, K. Westesen, Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles, *Colloids Surf. B* 3 (3) (1994) 159–175.
- [19] A. Lippacher, R.H. Müller, K. Mäder, Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 214 (1–2) (2001) 9–12.
- [20] W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2–3) (2001) 165–196.
- [21] R.H. Müller, P. Maincent, M. Muchow, Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for oral drug delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34 (12) (2008) 1394–1405.
- [22] C.M. Keck, Particle size analysis of nanocrystals: improved analysis method, *Int. J. Pharm.* 390 (1) (2010) 3–12.
- [23] C. Freitas, R.H. Müller, Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions, *Int. J. Pharm.* 168 (2) (1998) 221–229.
- [24] T.M. Riddick, *Zeta-Meter Manual*, Zeta-Meter Inc., New York, 1968.
- [25] P. Ney, *Zetapotential und Flotierbarkeit von Mineralien*, Springer, Wien, NY, 1973.
- [26] H. Bunjes, K. Westesen, M.H. Koch, Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 129 (1–2) (1996) 159–173.
- [27] H. Bunjes, M.H. Koch, K. Westesen, Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles, *J. Pharm. Sci.* 92 (7) (2003) 1509–1520.
- [28] F. Han, S. Li, R. Yin, H. Liu, L. Xu, Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: nanostructured lipid carriers, *Colloids Surf. A* 315 (1–3) (2008) 210–216.
- [29] C. Qian, E.A. Decker, H. Xiao, D.J. McClements, Solid lipid nanoparticles: effect of carrier oil and emulsifier type on phase behaviour and physical stability, *J. AOAC Int.* 89 (1) (2012) 17–28.
- [30] H. Bunjes, M.H. Koch, Saturated phospholipids promote crystallization but slow down polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles, *J. Control. Release* 107 (2) (2005) 229–243.
- [31] E. Dickinson, D.J. McClements, in: E. Dickinson, D.J. McClements (Eds.), *Advances in Food Colloids*, Chapman and Hall, Glasgow, 1995, pp. 211–246.
- [32] E.B. Souto, PhD Thesis, Free University Berlin, Germany (2005).



Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): The value of different alkyl polyglucoside surfactants



Cornelia M. Keck^{a,c,*}, Andjelka Kovačević^b, Rainer H. Müller^c, Snežana Savić^b, Gordana Vuleta^b, Jela Milić^b

^a Applied Pharmacy Division, University of Applied Sciences Kaiserslautern, Campus Pirmasens, Carl-Schurz-Strasse 10-16, Pirmasens 66953, Germany

^b University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, P.O. Box 146, Belgrade 11221, Serbia

^c Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutics, Biopharmaceutics and NutriCosmetics, Free University of Berlin, Kelchstr. 31, Berlin 12169, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2013

Received in revised form 2 August 2014

Accepted 5 August 2014

Available online 7 August 2014

Keywords:

Solid lipid nanoparticles

SLN

Alkyl polyglucosides

Size

Crystallinity

Physical stability

ABSTRACT

Alkyl polyglycosides (APGs) represent a group of nonionic tensides with excellent skin compatibility. Thus they seem to be excellent stabilizers for lipid nanoparticles for dermal application. To investigate this, different APGs were selected to evaluate their influence on the formation and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLN). Contact angle analysis of the aqueous solutions/dispersions of the APGs on cetyl palmitate films revealed good wettability for all APG surfactants. Cetyl palmitate based SLN were prepared by hot high pressure homogenization and subjected to particle size, charge and inner structure analysis. 1% of each APG was sufficient to obtain SLN with a mean size between 150 nm and 175 nm and a narrow size distribution. The zeta potential in water was ~ -50 mV; the values in the original medium were distinctly lower, but still sufficient high to provide good physical stability. Physical stability at different temperatures (5 °C, 25 °C and 40 °C) was confirmed by a constant particle size over an observation period of 90 days in all dispersions. In comparison to SLN stabilized with classical surfactants, e.g., Polysorbate, APG stabilized SLN possess a smaller size, improved physical stability and contain less surfactant. Therefore, the use of APGs for the stabilization of lipid nanoparticles is superior in comparison to classical stabilizers. Further, the results indicate that the length of the alkyl chain of the APG influences the diminution efficacy, the final particle size and the crystallinity of the particles. APGs with short alkyl chain led to a faster reduction in size during high pressure homogenization, to a smaller particle size of the SLN and to a lower recrystallization index, i.e., to a lower crystallinity of the SLN. The crystallinity of the SLN increased with an increase in the alkyl chain length of APGs. Therefore, by using the tested APGs differing in the alkyl chain length, not only small sized and physically stable but also SLN with different sizes and crystallinity can be obtained. An optimized selection of these stabilizers might therefore enable the production of lipid nanoparticles with “tailor-made” properties.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lipid nanoparticles are spheres or platelets in submicron size range (mainly between 150 and 300 nm) made up from lipids, solid at room and body temperature, dispersed in an aqueous medium (Müller et al., 2011; Battaglia and Gallarate, 2012). The obtained nanodispersions are stabilized by the addition of suitable surfactants or polymeric steric stabilizers. At present, lipid

nanoparticles represent very attractive carriers, showing superior advantages over conventional carriers for dermal application (Müller and Dinger, 1998; Wissing and Müller, 2003; Pardeike et al., 2009). Upon dermal application lipid nanoparticles form an invisible film on the surface of the stratum corneum (SC). This film repairs and/or strengthens a distorted skin lipid film, reduces water loss, increases skin hydration and supports restoration of the protective function of the SC (Müller et al., 2011, 2014). In addition, particle adhesion to the skin, lipid exchange between the outermost layers of the SC and the carriers, as well as the occlusive properties lead to improved dermal penetration of actives (Schäfer-Korting et al., 2007).

A major point of interest in the formulation of these thermodynamically labile systems is the question of sufficient

* Corresponding author at: University of Applied Sciences Kaiserslautern, Campus Pirmasens - Applied Pharmacy, Carl-Schurz-Str. 10-16, Pirmasens, 66953, Germany. Tel.: +49 631 3724 7031; fax: +49 631 3724 7044.

E-mail address: cornelia.keck@fh-kl.de (C.M. Keck).

colloidal stability (Bunjes, 2005). Another important challenge is the aspect of skin tolerability. The achievement of uniform particle size distribution, physical long-term stability and good skin tolerability requires careful selection of the stabilizer/surfactant and its concentration. The surfactants involved in dermal lipid nanoparticles are mainly from the class of conventional nonionic polyethoxylated surfactants (e.g., Polysorbates). These molecules proved to exhibit good functionality in the stabilization of the lipid nanoparticles (Hou et al., 2003; Lim et al., 2004). Nevertheless, relatively high concentrations ($\geq 1\%$ (w/w)) are needed to prevent gelation, and particle aggregation may not be completely prevented, even at high surfactant concentrations (Helgason et al., 2009; Zhao et al., 2014). Furthermore, literature data document that Polysorbates are susceptible to oxidation by atmospheric oxygen during handling at room temperature (Bergh et al., 1997; Karlberg et al., 2003). The mechanism of oxidation is the formation of hydroperoxides as primary oxidation products and the formation of formaldehyde, alkylated aldehydes and other carbonyl compounds (Bergh et al., 1998). Predictive tests in guinea pigs showed that the oxidized products formed after air exposition of Polysorbate 80, act as skin sensitizers (Bergh et al., 1997, 1998; Karlberg et al., 2003). As a result of that, over the past ten years, researchers were putting great efforts in the research of novel and safer surfactants which can be used as an alternative to conventional polyethoxylated surfactants. One candidate is the group of nonionic polyethylene glycol (PEG) free surfactants, also known as polyhydroxy surfactants (von Rybinski and Hill, 1998). Among them, alkyl polyglucosides (APGs) have established themselves as stabilizers of choice in both conventional and advanced (colloidal) drug delivery systems.

In contrast to polyethoxylated surfactants, APGs are not susceptible to oxidation during normal handling at room temperature. From a dermatological point of view, APGs represent a class of very mild surfactants, which are eminently suitable for the formulation of cosmetic products (von Rybinski and Hill, 1998; Fiume et al., 2013). APGs revealed reduced penetration into lower epidermal and dermal layers and an altogether reduced skin irritation potential (Matthies et al., 1997). Furthermore, various statistical parameters which differentiate roughness of the skin showed a skin smoothing effect for APGs (Tessmann et al., 1997). Therefore, APGs can be considered as suitable stabilizers for the formulation of pharmaceutical dermal products that can also be applied at damaged and irritated skin.

In addition to favorable dermatological properties, APGs possess also very interesting physico-chemical properties. The hydroxyl groups of APGs are strongly lipophobic, whereas molecules with sufficiently long hydrocarbon chains are strongly

hydrophobic. Therefore, APGs have a high tendency to remain at the oil–water interface (Holmberg et al., 2003). This property coupled with a high surface activity (Sulek et al., 2013) might be an approach to reduce the overall content of the surfactant required for stabilization of the lipid nanoparticles. APGs have cloud points above 100 °C and do not show a pronounced inverse solubility vs. temperature relationship as normal polyethoxylated surfactants (Holmberg et al., 2003; Tadros, 2005). This is explained by the presence of a large number of hydroxyl groups in the molecule which provide strong hydrogen bonds with water. Hence, dehydration of hydroxyl groups in the molecule of APGs is far weaker than the dehydration of ether groups in the molecule of polyethoxylated surfactants (Schmidt and Tesmann, 2001). Therefore, APGs might be more suitable than polyethoxylated surfactants in the preparation of different drug delivery systems at high temperatures, such as lipid nanoparticles.

Previous studies were concerned with caprylyl/capryl glucoside (Plantacare® 810) which has been employed as stabilizer in SLN and NLC dispersions (Kovačević et al., 2011). Plantacare® 810 was found to be a highly effective stabilizer for all types of the lipid nanoparticles investigated.

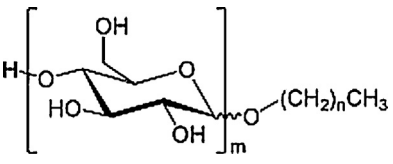
Therefore, the aim of this study was to obtain more detailed knowledge about the value of different APGs to be used as stabilizers for the formulation of SLN. For this four different APGs with varying alkyl chain length and different properties were selected (Table 1). As wettability of the surfactant is a pre-requisite for good physical stability, in the first step contact angle measurements were performed. In the next step SLN stabilized with the different APGs were produced by hot high pressure homogenization and the influence of the surfactant on size, size distribution, physical stability and charge of the particles was studied. As surfactants may affect not only the physical stability of the dispersions but might also change the crystallinity of the particles (Bunjes et al., 2003), in the last step the influence of APGs on the crystallization and polymorphic behavior of the SLN was investigated by differential scanning calorimetry and X-ray analysis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Cetyl palmitate 15 (Ph. Eur. 7.0) (Cutina® CP) was kindly provided from Cognis (Düsseldorf, Germany) (now part of BASF, Ludwigshafen, Germany). APG surfactants: C8-10 fatty alcohol glucoside (Plantacare® 810 UP), C8-14 fatty alcohol glucoside (Glucopon® 425 NH/H), C10-16 fatty alcohol glucoside (Glucopon®

Table 1
Overview of APGs used in the study.

Code	Chemical description	Trade name	Supplier	General chemical structure	Alkyl chain length	Solubility in water (25 °C)	HLB value	Physical form
A1	C8-10 fatty alcohol glucoside	Plantacare® 810 UP	Cognis, Germany		8–10	Complete soluble in all proportions	15–16	Yellowish, slightly cloudy and viscous liquid
A2	Aqueous solution of alkyl polyglucosides based on natural fatty alcohol C8-14	Glucopo® 425 N/HH	Cognis, Germany		8–14	Complete soluble in all proportions	12–13	Yellowish and clear liquid
A3	Aqueous dispersion of alkyl polyglucosides based on natural fatty alcohol C10-16	Glucopon® 600 CS UP	Cognis, Germany		10–16	Dispersible (partially soluble)	11–12	Yellowish, lightly cloudy and viscous liquid which tends to recrystallize below 30 °C
A4	C12-16 fatty alcohol glucoside	Plantacare® 1200 UP	Cognis, Germany		12–16	Sparingly soluble	16–17	Cloudy, viscous, aqueous solution

600 CS UP) and C12-16 fatty alcohol glucoside (Plantacare® 1200 UP), were also supplied by Cognis. An overview of the physicochemical properties of the surfactants is given in Table 1. As dispersion medium, purified water obtained by reverse osmosis from a Milli Q Plus, Millipore system (Schwalbach, Germany) was used. 0.9% (w/v) sodium chloride solution was purchased from B. Braun Melsungen AG (Germany).

2.2. Methods

2.2.1. Contact angle measurements

For the contact angle measurements 1% (w/w) solution of C8-10 fatty alcohol glucoside (Plantacare® 810) and C8-14 fatty alcohol glucoside (Glucopon® 425) in water was prepared. C10-16 fatty alcohol glucoside (Glucopon® 600) and C12-16 fatty alcohol glucoside (Plantacare® 1200) are partially/sparingly soluble in water (Table 1), and therefore a dispersion of these surfactants in water was obtained. Solid lipid (cetyl palmitate) was melted onto a glass slide and allowed to recrystallize to produce a smooth surface. The contact angle was assessed directly by measuring the angle formed between the solid lipid and the tangent to the drop by using a Contact Angle Meter G1 (Krüss, Hamburg, Germany). As the contact angle decreases with time, in this work the measurements were performed immediately after droplet positioning and 60 s afterwards to observe any changes. All measurements were performed at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in triplicate. The mean values and standard deviations (S.D.) are given.

2.2.2. Preparation of SLN dispersions

SLN dispersions composed of 10% (w/w) solid lipid and 1% (w/w) surfactant were prepared according to Kovačević et al. (2011). In brief, aqueous and lipid phase were separately prepared. The solid lipid was melted at 75°C and equilibrated for avoiding solidification during the emulsification step. Hydrophilic surfactants and water were heated to the same temperature and added to the melted lipid. The mixture was dispersed with a high-shear mixer (Ultra Turrax, IKA Staufen, Germany) for 30 s at 8,000 rpm and subjected to high pressure homogenization applying a pressure of 500 bar at 75°C . The homogenizer (Micron LAB 40, APV Deutschland GmbH, Unna, Germany) was equipped with a water jacket for temperature control. After homogenization the obtained hot oil/water (o/w) nanoemulsions were filled in silanized glass vials which were immediately sealed. The vials were silanized to minimize electrolyte influence on the SLN and the adsorption of SLN on the walls. This adsorption is known to promote aggregation by fusion of adsorbed particles (Freitas and Müller, 1998). SLN dispersions were used for further tests after cooling down into a water bath equilibrated at 20°C . To investigate the physical stability dispersions were stored at $5 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, and $40 \pm 2^\circ\text{C}$ for 90 days. Samples were analyzed with regard to the particle size and size distribution using photon correlation spectroscopy (PCS) and laser diffraction (LD) at the day of production (day 0) and after three months of storage (day 90).

2.2.3. Particle size analysis and physical stability

2.2.3.1. Photon correlation spectroscopy (PCS). The mean particle size (z-average, z-ave) and the polydispersity index (PI) were obtained by using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). PCS yields the hydrodynamic diameter which is an intensity-weighted mean diameter of the bulk population. PI stands for the width of the particle size distribution. Samples were diluted with water, before analysis to yield a suitable scattering intensity. For this 10 μl of sample were added to about 10 ml of water. The z-average and PI were obtained by calculating the average of ten measurements at an angle of 173° and a temperature

of 25°C in 10 mm diameter disposable plastic cells. As analysis mode the general purpose mode was used. The mean values and standard deviations (S.D.) are presented.

2.2.3.2. Laser diffraction (LD). Samples were analyzed using a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a Hydro S dispersing unit. Sonification prior and during the measurement was not performed to avoid the disintegration of possible aggregates. Such aggregates are a potential marker for insufficient stabilization, and will mainly affect the diameter values 90%, 95% and 99% (Acar Kübart and Keck, 2013). The results were analyzed using the Mie theory with the optical parameters 1.456 (real refractive index) and 0.01 (imaginary refractive index). LD yields a volume distribution expressed as median volume diameter values. The diameter values $d(v)$ 0.10, $d(v)$ 0.50, $d(v)$ 0.90, $d(v)$ 0.95, $d(v)$ 0.99 indicate the volume percentage of the particles possessing a diameter equal or lower than the given size (Jillavenkates et al., 2001). Five consecutive measurements were performed to ensure that no change in the sample occurred during the measurements. The mean values and standard deviations (S.D.) are presented.

2.2.4. Light microscopy

Light microscopy was performed by using an Orthoplan microscope (Leitz, Wetzlar, Germany), equipped with a CMEX 3200 digital camera (Euromex microscopes, Arnheim, Netherlands) and connected to the Image Focus software version 1.3.1.4. Microscopic pictures were taken from the undiluted dispersions to increase the probability of detecting even a few large aggregates (Müller and Heinemann, 1993). Magnifications applied were 160 and 1,000 fold.

2.2.5. Zeta potential

The zeta potential was determined by the measurement of the electrophoretic mobility using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). The field strength applied was 20 V/cm. The conversion into the zeta potential was performed using the Helmholtz–Smoluchowski equation. To avoid fluctuations in the zeta potential due to day to day variations in the conductivity of purified water, which can range from 1 to 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, the conductivity of the water was adjusted to 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ using 0.9% NaCl solution (added drop wise). The pH of purified water during the measurements was in the range of 5.5–6.0. Since the zeta potential is a function of the particle surface and the dispersant, measurements were performed in water and in 1% (w/w) surfactant solution/dispersion (i.e., original dispersion medium). Each sample was analyzed in triplicate and the mean values and standard deviations (S.D.) are given. As analysis mode the auto mode option was selected.

2.2.6. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC was employed to elucidate the structure of lipid in “bulk” state and in the SLN dispersions. In order to mimic the production conditions of SLN solid lipid in “bulk” was heated up to 75°C , kept at that temperature for 1 h and then cooled down to 25°C . This imitates the temperature profile during the preparation process of the SLN by high pressure homogenization in melted condition and the subsequent cooling and recrystallization. The DSC study was performed using a Mettler DSC 821e apparatus (Mettler Toledo, Gießen, Switzerland). A heating rate of 10 K/min was employed in the temperature range of 20°C – 90°C . Samples were analyzed in standard aluminum sample pans (40 μl) under a nitrogen purge (80 ml/min). About 1–2 mg of the tempered “bulk” solid lipid was taken for analysis. The amounts of 10% (w/w) aqueous SLN dispersion were calculated this way, that it contained approximately 1–2 mg lipid. An empty aluminum pan was used as a

reference. The onset melting temperature, the minimum peak temperature and the melting enthalpies were calculated using STARE Software. The recrystallization index (RI), i.e., the percentage of recrystallized solid lipid related to the initial solid lipid concentration, was calculated using the following equation (Freitas and Müller, 1999):

$$RI(\%) = \frac{\Delta H_{\text{aqueous lipid nanoparticle dispersion}}}{\Delta H_{\text{bulk material}} \times \text{Concentration}_{\text{solid lipid phase}}} \times 100$$

where $\Delta H_{\text{aqueous SLN dispersion}}$ and $\Delta H_{\text{bulk material}}$ are the melting enthalpy (J/g) of aqueous SLN dispersions and bulk material, respectively. The concentration of the lipid phase is given in the percentage as actual amount of the solid lipid in the total dispersion (e.g., 10% (w/w) dispersion is 10/100 parts = 0.1).

2.2.7. Wide angle X-ray diffraction (WAXD)

Additional investigations on the physical state of the bulk lipid and the SLN were performed by WAXD. WAXD was performed on a Philips PW 1830 X-ray generator (Philips, Amedo, The Netherlands) with a copper anode (Cu-K α radiation, $\lambda = 0.15418$ nm). Data of the scattered radiation were detected with a blend local-sensitive detector (Goniometer PW18120) using an anode voltage of 40 kV, a current of 25 mA and a scan rate of 0.5° per min. The diffraction patterns were measured at diffraction angles $2\theta = 4\text{--}40^\circ$ with a step width of 0.04° and a count time of 5 s. The X-ray diffractometer is a powder diffractometer. It can only analyze particles in suspensions if the viscosity of the medium is sufficiently enhanced. For analysis of fluid samples such as SLN dispersions a viscosity enhancer needs to be added. Therefore, prior to the measurement, SLN dispersions were transformed into a paste using locust bean gum as thickening agent, i.e., 1 ml of dispersion was mixed with approximately 1 mg of gum.

3. Results and discussion

3.1. Contact angle measurements

The contact angle quantifies the wettability of a solid surface by a liquid and a reduction of the contact angle is correlated with an increased dispersibility of the solid in aqueous medium (Parfitt, 1973). Therefore, measurements of the contact angles with different surfactant solutions provide useful information for an efficient selection of the surfactant. The results of the contact angle measurements with the different APGs are shown in Table 2. In comparison to purified water, APGs in water show a significantly better wettability. With purified water the contact angle was 79°. The addition of 1% (w/w) APG led to a pronounced reduction in contact angles, e.g., a contact angle of 36° was obtained for the C8-10 APG and an angle of 40° was obtained for the C12-16 APG. The pronounced decrease in the contact angles confirms a high surface activity for all APGs (Sulek et al., 2013). Thus, it can be assumed that all APGs investigated would contribute to an improved dispersibility of cetyl palmitate in water.

The data also revealed a slight increase in contact angle with increasing alkyl chain length of the APG. However, the differences are small and thus data obtained are in accordance with those

reported by Sulek et al. (2013). This study revealed that APGs at concentrations of 1% (w/w) reach a thermodynamic equilibrium between monomers and micelles. As a result of that, APGs varying in the alkyl chain length are considered to possess approximately the same surface tension i.e., the contact angle, when they are used at a concentration of 1% (w/w) (Sulek et al., 2013).

3.2. Preparation of SLN dispersions

SLN for dermal application should possess no skin irritating potential, thus the amount of surfactant used for the stabilization should be kept as low as possible. Therefore and also by taking into consideration the good wettability of cetyl palmitate with all APGs tested, a low concentration of 1% (w/w) of APG was selected for the preparation of the SLN dispersions. Particles contained 10% (w/w) cetyl palmitate (Cutina® CP) as solid lipid and 1% (w/w) APG as surfactant. Similarly to previous studies (Lippacher et al., 2001; Mehnert and Mäder, 2012; Muchow et al., 2008), hot high pressure homogenization as the most effective method to prepare stable SLN dispersions was employed. The effect of the energy input provided by the homogenizer on particle size and size distribution is presented in Fig. 1. A single homogenization cycle resulted in the formation of particles in the colloidal size range. The C8-10 APG exerted the best diminution efficacy, whereas C12-16 APG was the

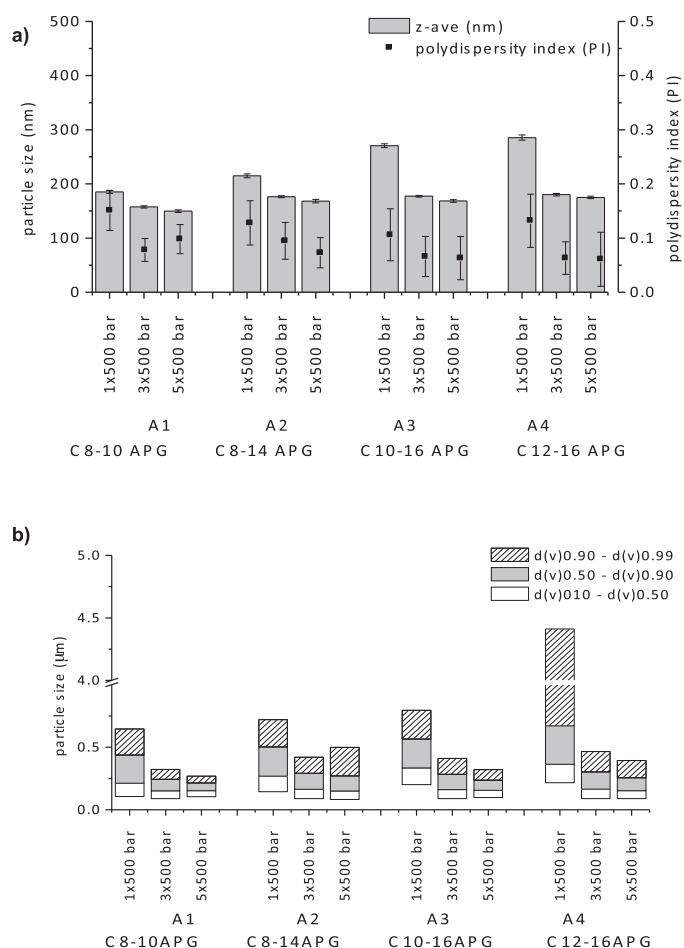


Figure 1

Fig. 1. Decrease in particle size as a function of number of homogenization cycles for SLN dispersions stabilised by APG (pressure: 500 bar, temperature: 75°C) (a) PCS-data presented as mean particle size (z-average in nm) and polydispersity index (PI) ($n = 10$) (b) LD-data presented as volume diameters ($d(v)_{0.10}$ – $d(v)_{0.99}$) ($n = 5$).

Table 2
Contact angles obtained with aqueous solution of APG on cetyl palmitate (Cutina® CP) film ($n = 3$, mean $\pm$ S.D.).

Surfactant	Contact angle (°)
C8-10 APG	36.0 $\pm$ 2.3
C8-14 APG	36.0 $\pm$ 1.0
C10-16 APG	39.5 $\pm$ 1.5
C12-16 APG	40.0 $\pm$ 0.0

least efficient. An increase in the mean particle size with an increase in the alkyl chain length might not only be attributed to an increase in the contact angles, because the differences in the contact angles are small (c.f. Table 2). Thus, other properties of the surfactant, e.g., diffusion velocity seem to play a role. The diffusion velocity of a surfactant is a function of the molecular weight and of the colloidal structures formed in the dispersion medium (Jacobs and Müller, 2002; Westesen and Siekmann, 1997). Low molecular weight surfactants diffuse faster to the newly created surfaces than high molecular weight ones.

The molecular weight of C12-16 APG is ~ 420 g/mol and its critical micelle concentration (CMC) is relatively low (0.13 mM) (Aungst, 1994). Hence, at a concentration of 1% (w/w), which corresponds to 23.8 mM, the monomer concentration of the surfactant in the lipid dispersion is relatively low. Since the surfactants monomers adsorb to hydrophobic surfaces rather than the micelles, the low number of monomers may explain why it was not possible to stabilize the SLN against aggregation sufficiently with C12-16 APG. In contrast, the C8-10 APG has a high CMC (20–25 mM) (Aungst, 1994; Iglaue et al., 2010) and the molecular weight is lower (320 g/mol). Therefore, in contrast to the C12-16 APG, at a concentration of 1% (w/w), corresponding to 32.4 mM APG C8-10, there was a high amount of APG 8–10 monomers in the water phase. The higher number of monomers can rapidly diffuse to the newly formed surfaces during homogenization, thus providing a sufficient interfacial coverage of the particles and an efficient decrease in particle size.

A further increase in the number of the homogenization cycles resulted in an almost continuous decrease in the size of the formulations A1, A3 and A4 (Fig. 1). The constant reduction was observed until cycle three. Only little changes in size were obtained between cycle three and five. The reduction in $d(v)$ 0.50 was limited until cycle three, whereas a small further decrease in $d(v)$ 0.99 was noticed when moving from cycle three to five (Fig. 1b). Hence, the maximum dispersivity of the bulk population was already reached after cycle three, whereas the additional energy input of cycle four and five was used for the elimination of remaining few larger particles.

In contrast to the other formulations, after cycle three an increase in the diameters $d(v)$ 0.90– $d(v)$ 0.99, i.e., agglomeration, was noticed for the formulation A2. However, the agglomerates formed during the homogenization were very loose and disappeared during the first hours of storage. This was evidenced by a reduction in diameter $d(v)$ 0.99 from $0.499 \mu\text{m}$ to $0.372 \mu\text{m}$ one day after production. The agglomeration can be explained by an increase in Brownian motion of the particles resulting from a too high energy input during the homogenization (Jafari et al., 2008; Jahnke, 1998).

After the fifth cycle, among all tested APGs, again C8-10 APG was the most effective in the particle size decrease. Nevertheless, the increase in the number of the homogenization cycles decreased the differences between the stabilizers. Thus, less efficiency of APGs with long alkyl chain, as shown after the first homogenization cycle, was partially compensated with higher energy input.

3.3. Particle size analysis

The comparison of the different formulations directly after the production revealed z-averages from 150 nm (C8-10 APG) to 175 nm (C12-16 APG) (Fig. 2a). The particle size distribution in all formulations was narrow and monomodal (PI was below 0.1). These results are in line with a previous study (Das et al., 2014), showing that a shorter chain length of a sugar surfactant contributes to a better packing on the nanoparticle surface and will therefore lead to a smaller particle size.

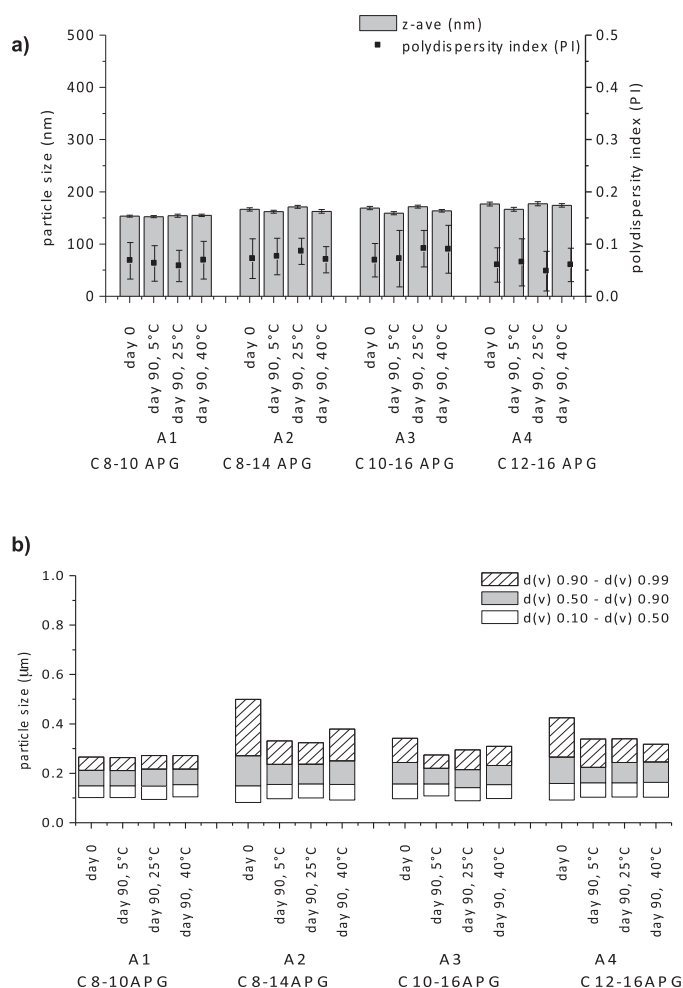


Figure 2

Fig. 2. Stability profile of SLN dispersions stabilised by APG (a) PCS-data ($n = 10$) (b) LD-data ($n = 5$).

The functionality of APGs in the formation and stabilization of SLN was further compared with conventional polyethoxylated surfactants (Polysorbate 20, 40, 60, 80). The mean PCS diameter of cetyl palmitate SLN stabilized with 1.2% (w/w) Polysorbates was approximately 230 nm (Göppert and Müller, 2005). With regard to this previous study, stabilization with APGs led to smaller particles. Reasons for this might be the special properties of the APGs, e.g., high surface activity, a high tendency to remain at the oil–water interface, and the good wetting of cetyl palmitate. Furthermore, as described above, the diffusion velocity of a surfactant and thus the ability to cover newly created surfaces in a shorter time, is a function of the molecular weight. Hence, low molecular weight surfactants are expected to be more efficient than high molecular weight ones (Mehnert and Mäder, 2012). This was confirmed in the current study. All SLN stabilized with APGs, which possess molecular weights between ~ 320 g/mol (C8-10 APG) and 420 g/mol (C12-16 APG), led to z-averages well below 200 nm. SLN stabilized with Polysorbates, which possess molecular weights of ~ 1230 g/mol–1340 g/mol, led to sizes well above 200 nm (Göppert and Müller, 2003). In addition, due to the slower diffusion of the high molecular weight Polysorbates, the surfactant might reach the new surfaces only after crystallization of the lipid, thus the lipid tails of the surfactant may be hindered to insert properly into the solid lipid to stabilize the SLN, leading to a larger size of the SLN

(Graca et al., 2007). The latter may be explained by findings of Helgason et al. (2009). In this study it was found that an increase in the particle size of SLN stabilized with Polysorbates is especially pronounced at low surfactant concentrations, because in this case, the particle surface is less covered with the surfactants and the probability of particle-particle interaction increases.

3.4. Zeta potential measurements

The zeta potentials were measured in water adjusted to a conductivity of 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and in the original dispersion medium (water with the respective surfactant). The results are shown in Table 3. The values, especially in water, were surprisingly high for nonionic surfactants. An explanation for this is the high hydrophilicity of the APG surfactants. The hydrophilic part of the APGs is composed of glucose molecules. These glucose molecules interact with water, e.g., they attract potentially negatively charged hydroxyl ions and thus form, similar to ionic surfactants, an electric double layer (Han et al., 2008), which in turn leads to high zeta potentials. Nevertheless, APG surfactants are non-ionic surfactants, thus their main mechanism of stabilization is steric stabilization. This means, due to the adsorption of a surfactant layer around the particle, a steric barrier is created. This barrier hinders particle attraction and aggregation and consequently, increases the stability of the dispersions (Rosen, 2004). In fact, APGs represent both steric and electrostatic stabilization. Therefore, an excellent stabilization efficacy for SLN can be expected (Loh, 2002; Porter, 1994).

For a full characterization the zeta potential should be analyzed not only in water but also in the original dispersion medium. Measurements in water lead to desorption of the surfactant and thus represent the potential at the stern layer. If the sample is analyzed in its original dispersion medium no desorption of stabilizer occurs, thus zeta potentials analyzed in the original dispersion medium are a measure of the thickness of the diffuse layer, i.e. a measure of the thickness of the surfactant layer around the particle (Müller, 1996). Consequently, the difference between the zeta potential measured in water and in the original dispersion medium is a measure for the amount of desorbed surfactant upon dilution. Hence, large changes indicate strong desorption and thus indicate a more loose binding of the surfactant to the particle.

In the original dispersion medium all samples revealed almost similar zeta potentials in the range between -24 mV and -30 mV . Measurements in water revealed much larger values, being in the range between -43 mV and -57 mV . The large changes in zeta potential indicate a strong desorption of the stabilizers upon dilution with water. The changes were slightly higher for the APGs with longer chain length, indicating less tight interaction of these surfactants with the lipid particles. This observation is in

agreement with the data obtained from contact angle measurements and with the data obtained from size analysis.

According to the literature, storage conditions, e.g., different temperatures, can influence the crystalline structure of the lipid (Freitas and Müller, 1998). As different crystalline structures may possess different charge densities, changes in the surface charges of the particle (Nernst potential) and thus in the measured zeta potential might occur with different storage conditions. Therefore, the developed formulations were analyzed after they were stored at different temperatures ($5 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $40 \pm 2^\circ\text{C}$) over 90 days. The results revealed slight changes in both media (water and original medium). However, all values still stayed above -20 mV , which is considered as sufficiently high to preserve the physical stability (Müller, 1996; Riddick, 1968). Hence, it can be concluded that the storage temperature has no influence on the physical stability of lipid particles stabilized with APGs.

3.5. Physical stability

The particle size of the SLN dispersions stored at $5 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $40 \pm 2^\circ\text{C}$ was observed over a period of 90 days. According to the Stokes–Einstein equation an increase in the temperature and a decrease in dynamic viscosity result in an increase of the diffusion constant. A higher diffusion constant leads to a faster diffusion of the particles, this means the repulsion between the particles can be overcome more easily, which can result in particle aggregation.

The z-averages of the APG stabilized SLN after production ranged from 150 nm to 175 nm. At day 90 at all storage temperatures, the z-averages ranged from 152 nm to 177 nm (Fig. 2a). Hence, no increase in particle size was detected over time. These results correlated to the volume diameters $d(v)_{0.95}$ and $d(v)_{0.99}$ which are more sensitive to larger particles (Fig. 2b). One day after production the $d(v)_{0.95}$ was between $0.231\text{ }\mu\text{m}$ (C8–10 APG) and $0.288\text{ }\mu\text{m}$ (C12–16 APG). After 90 days at all storage temperatures, the $d(v)_{0.95}$ ranged from $0.235\text{ }\mu\text{m}$ to $0.273\text{ }\mu\text{m}$. The $d(v)_{0.99}$ in the four differently stabilized SLN stayed unchanged over 90 days (Fig. 2b). Data from the particle size analysis were also confirmed by light microscopy. No larger particles or particle agglomerates were observed for all formulations when stored at different storage temperatures (Fig. 3).

3.6. Thermal and wide angle X-ray diffraction analysis

The data obtained from DSC analysis are shown in Table 3 and Fig. 4. In contrast to cetyl palmitate in bulk, for SLN only a single melting event, which corresponds to the melting of the β -modification of cetyl palmitate, was observed. For all SLN formulations the melting maxima appear at $3\text{--}4^\circ\text{C}$ lower temperatures when

Table 3
Zeta potential of SLN dispersions stabilised by APG stored for 90 days at different temperatures ($n = 30$, mean $\pm$ S.D.).

Formulation	Storage temperature ($^\circ\text{C}$)	Water	Original dispersion medium
A1 (C8–10 APG)	5 ± 3	-51.8 ± 3.2	-26.3 ± 0.5
	25 ± 2	-49.6 ± 0.7	-27.4 ± 0.8
	40 ± 2	-43.4 ± 1.9	-24.6 ± 0.2
A2 (C8–14 APG)	5 ± 3	-52.4 ± 0.4	-31.2 ± 0.6
	25 ± 2	-47.5 ± 1.7	-35.3 ± 0.8
	40 ± 2	-49.9 ± 1.2	-31.0 ± 0.8
A3 (C10–16 APG)	5 ± 3	-55.1 ± 2.1	-26.0 ± 0.9
	25 ± 2	-52.2 ± 0.9	-30.1 ± 0.3
	40 ± 2	-48.6 ± 2.4	-26.8 ± 0.1
A4 (C12–16 APG)	5 ± 3	-57.7 ± 1.2	-23.8 ± 0.3
	25 ± 2	-46.3 ± 0.6	-28.5 ± 1.1
	40 ± 2	-52.0 ± 0.7	-25.1 ± 0.7

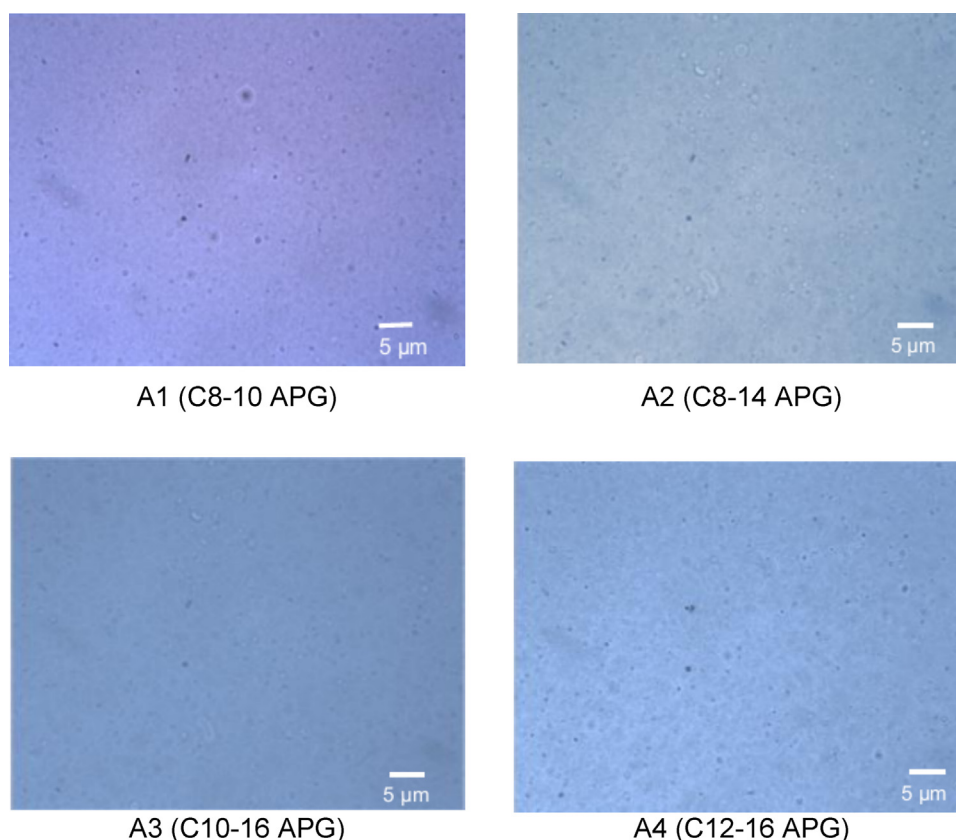


Fig. 3. Light microscopy of SLN dispersions stabilised by APG 90 days after preparation (storage temperature: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) (magnification 1000 $\times$).

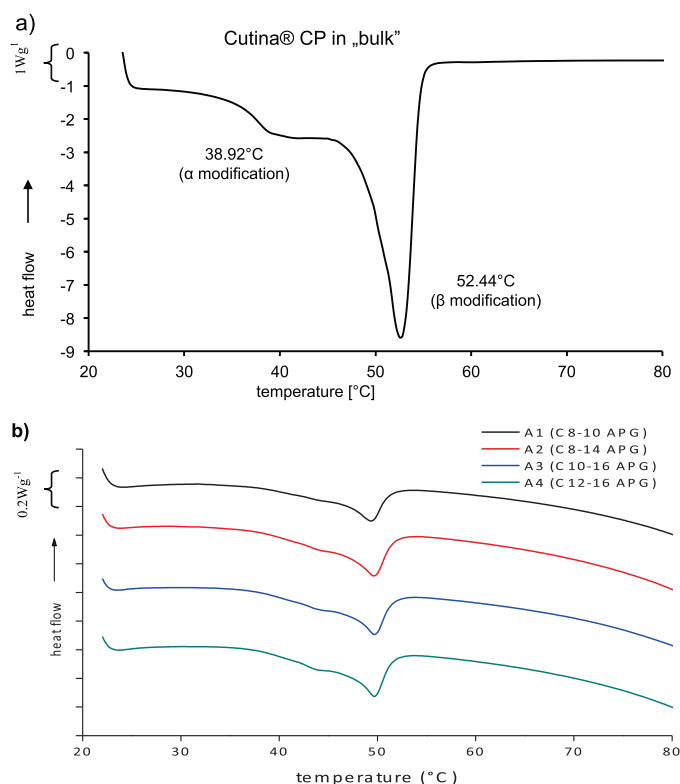


Figure 4

Fig. 4. DSC thermograms of SLN dispersions stabilised by APG. The measurements were performed 90 days after preparation of dispersions (storage temperature: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Curves are shifted for better overview.

compared to the bulk lipid (Fig. 4b; Table 4). This is in agreement with other studies (Teeranachaideekul et al., 2007, 2008).

The thermal analysis of SLN further indicates partial recrystallization of cetyl palmitate when it is formulated as SLN. The degree of recrystallization, expressed as RI, was found to be influenced by the type of APG used for stabilization, i.e., a shorter alkyl chain led to lower RI values (Table 3). An explanation for this might be the interaction of the alkyl chains with the lipid matrix of the particles. Assuming that the APGs are located in the interface between the lipid matrix of the SLN and the water phase, it can be assumed that the glucose molecules are located in the water phase, whereas the alkyl chains are located within the lipid matrix of the particles. Thus, the crystalline state of the alkyl chain of the APG might influence the crystalline state of the lipid matrix (Kovačević et al., 2011, 2014). While APGs with short alkyl chains (C8–10) are in liquid state, APGs with longer alkyl chains tend to crystallize over time. For example, the C12–16 APG is known to crystallize when it is stored at temperatures below 38°C (product information). As SLN dispersions were stored at 25°C in this study, at least the C12–16 APG had most likely partly solidified. Hence, it promoted nucleation and an increase in the crystallinity of the particles. In contrast, the C8–10 APG remained liquid during storage, thus re-crystallization was not promoted and maybe was even prevented.

Besides the influence of the length of the alkyl chain, the melting enthalpy and the corresponding RI are also known to decrease with decreasing particle size (Bunjjes et al., 2000). As the particle size increased with increasing alkyl chain length of the APG, the increase in RI is probably a superposition of both the particle size and the crystallinity of the alkyl chain of the APG.

The results obtained from DSC analysis, i.e., the influence of the alkyl chain length of the APG surfactant on the crystallinity of the lipid matrix of the SLN, as well as the presence of the

Table 4

DSC parameters of the tempered cetyl palmitate (Cutina® CP) and SLN stabilized by APG stored for 90 days at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (scan $20\text{--}90^{\circ}\text{C}$, scan rate 10K/min) (RI = recrystallization index).

Sample	Minimum peak temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Onset melting temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Melting enthalpy (J/g)	RI (%)
Cetyl palmitate (Cutina® CP (2nd peak))	52.44	48.48	220.46	100.00
A1 (C8–10 APG)	48.79	44.60	7.12	32.30
A2 (C8–14 APG)	49.20	44.50	8.87	40.23
A3 (C10–16 APG)	49.15	45.01	9.33	42.32
A4 (C12–16 APG)	49.15	45.00	10.23	46.40

β -modification were also confirmed by WAXD analysis (Fig. 5). The diffraction patterns of the bulk lipid after tempering at 75°C for 1 h and subsequent cooling at 25°C as well as those of SLN after storage for 90 days at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ are displayed in Fig. 5. The intensity of all peaks in SLN decreased compared to cetyl palmitate in bulk, mainly due to the lower amount of the lipid in dispersions, but also due to a lower crystallinity of the lipids in the submicron range. The reflections in the wide angle X-ray diffractograms had a lower intensity in the SLN stabilized with short alkyl chain APGs. With increasing chain length the intensity of wide angle X-ray reflections, i.e., the peak height increased, thus confirming the increase in crystallinity. The diffractograms of cetyl palmitate (Cutina® CP) in bulk exhibited sharp peaks at 2θ scattered angles of 6.1° (small intensity), 21.3° (strong intensity) and 23.3° (medium intensity) (Fig. 5a). When cetyl palmitate was formulated as SLN the reflection at 6.1° disappeared in all formulations and only maxima at the angles 2θ of 21.2° and 23.3° remained (Fig. 5b). The patterns observed for the SLN correspond to short spacings of the alkyl chains at 0.42 and 0.38 nm, which are attributed to the β -modification of the solid lipid (Hernqvist, 1988). These results

indicate that the lipid matrix of the SLN, which typically crystallizes in the higher energy and metastable α -modification, was fully transformed into the more stable β -modification. The transformation into the more stable polymorph occurs more rapidly in colloidal particles (Freitas, 1998). However, in addition to this, the surfactants that are liquid at room temperature, e.g., the short-chain APGs used in this study, might further promote the rapid transformation into the more stable β -modification. The reason is that they create a more liquid interface at the particle surface. This interface is flexible and induces polymorphic transitions of the crystallized lipids from α to β subcell crystals (Salminen et al., 2014). The data obtained here are in good agreement with data from the literature (Teeranachaideekul et al., 2007).

4. Conclusion

Short to medium alkyl chain length APGs have optimal structures and properties to act as functional surfactants in the preparation of SLN dispersions. Four tested APGs in the concentration of 1% (w/w) enabled the formation of SLN with a lower mean particle size than those obtained with polyethoxylated surfactants. The most effective reduction in particle size was obtained with APGs possessing the shortest alkyl chain, the highest CMC, the lowest molecular weight and the best wetting ability on the lipid used as SLN matrix. Different storage temperatures (5°C , 25°C , 40°C) had no influence on the physical stability of the SLN. This was attributed to the high affinity of the surfactant to the lipid particle matrix in combination with an electrostatic and steric stabilization effect. The lipid matrix of the APG stabilized SLN crystallizes predominantly in β -modification, where the degree of crystallinity was found to be affected by the length of the alkyl chain of the APG, i.e., longer alkyl chains increase the crystallinity of the SLN.

Therefore, by varying the type of APG used for stabilization, different particle sizes and different degrees of crystallinity, all being physically stable, can be obtained. This might enable the development of lipid nanoparticles with “tailor-made” properties, e.g., optimized size, charge and crystallinity in the future. These physico-chemical properties of SLN strongly influence the release profile of actives and thus the in vivo performance of lipid nanoparticles, e.g., the penetration of active. Therefore, it can be assumed that different APGs will lead to different in vivo properties of the lipid nanoparticles. Thus, the use of APGs for the formulation of lipid nanoparticles is not only of great value due to their excellent stabilizing properties, but also because of the possibility to formulate particles with individual in vivo properties. APGs are environmentally friendly and possess superior skin tolerability. Therefore, if possible, instead of classical surfactants, APGs should be selected for the formulation of lipid nanoparticles, especially if dermal application is favored.

Acknowledgments

Andjelka Kovačević acknowledges financial support from the German Academic Exchange Service (Deutscher Akademischer

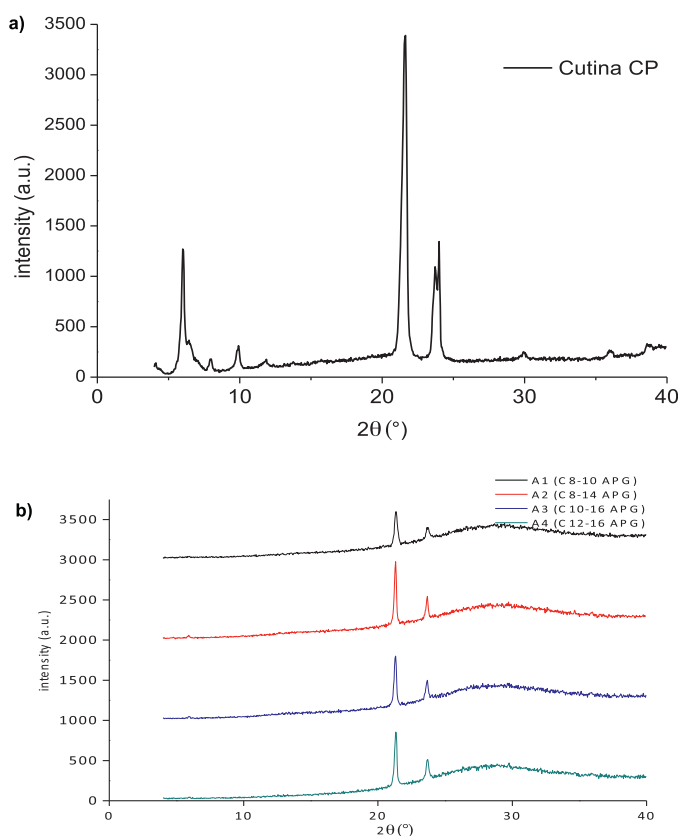


Fig. 5. WAXD diffractograms of cetyl palmitate (Cutina® CP) and SLN dispersions stabilised with APG. The measurements were performed 90 days after preparation of dispersions (storage temperature: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). The curves have been displaced along the ordinate for better visualization.

Austausch Dienst, DAAD) and Ministry of Education and Science, Republic of Serbia [TR 34031 and OI 172041]. The authors also would like to thank Ms. Corinna Schmidt for her excellent technical assistance.

References

- Aungst, B.J., 1994. Site-dependence and structure-effect relationships for alkylglycosides as transmucosal absorption promoters for insulin. *Int. J. Pharm.* 105, 219–225.
- Battaglia, L., Gallarate, M., 2012. Lipid nanoparticles: state of the art new preparation methods and challenges in drug delivery. *Exp. Opin. Drug Deliv.* 9, 497–508.
- Bergh, M., Magnusson, M., Nilsson, J.L.G., Karlberg, A.-T., 1997. Contact allergenic activity of Tween 80 before and after air exposure. *Contact Dermat.* 37, 9–18.
- Bergh, M., Magnusson, K., Nilsson, J.L.G., Karlberg, A.-T., 1998. Formation of formaldehyde and peroxides by air oxidation of high purity polyoxyethylene surfactants. *Contact Dermat.* 39, 14–20.
- Bunjes, H., Koch, M.H.J., Westesen, K., 2000. Effect of particle size on colloidal solid triglycerides. *Langmuir* 16, 5234–5241.
- Bunjes, H., Koch, M.H.J., Westesen, K., 2003. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 92, 1509–1520.
- Bunjes, H., 2005. Characterization of solid lipid nano- and microparticles. In: Nastruzzi, C. (Ed.), *Lipospheres in Drug Targets and Delivery: Approaches, Methods and Applications*. CRC Press LLC, Boca Raton, USA, pp. 43–70.
- Das, S., Ng, W.K., Tan, R.B.H., 2014. Sucrose ester stabilised solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: I. Effect of formulation variables on the physicochemical properties, drug release and stability of clotrimazole-loaded nanoparticles. *Nanotechnology* 25, 105101.
- Fiume, M.M., Heldreth, B., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D., Marks Jr., J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Andersen, F.A., 2013. Safety assessment of decyl glucoside and other alkyl glucosides as used in cosmetics. *Int. J. Toxicol.* 32 (5), 225–485.
- Freitas, C., 1998. Feste Lipid-Nanopartikel (SLN): Mechanismen der physikalischen Destabilisierung und Stabilisierung Ph.D. Thesis. Free University of Berlin, Germany.
- Freitas, C., Müller, R.H., 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. *Int. J. Pharm.* 168 (2), 221–229.
- Freitas, C., Müller, R.H., 1999. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47 (2), 125–132.
- Graca, M., Bongaerts, J.H.H., Stokes, J.R., Granick, S., 2007. Friction and adsorption of aqueous polyoxyethylene (Tween) surfactants on hydrophobic surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 315, 662–670.
- Göppert, T.M., Müller, R.H., 2005. Polysorbate-stabilised solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns. *J. Drug Target.* 13 (3), 179–187.
- Helgason, T., Awad, T.S., Kristbergsson, K., McClements, D.J., Weiss, J., 2009. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *J. Colloid Interface Sci.* 334 (1), 75–81.
- Hernqvist, L., 1988. Crystal structures of fats and fatty acids. In: Garti, N., Sato, K. (Eds.), *Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids*. Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 97–137.
- Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B., Lindman, B., 2003. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, England pp. 34.
- Hou, D., Xie, C., Huang, K., Zhuc, C., 2003. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials* 24, 1781–1785.
- Han, F., Li, S., Yin, R., Liu, H., Xu, L., 2008. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: nanostructured lipid carriers. *Colloid Surf. A* 315, 210–216.
- Iglauer, S., Wu, Y., Shuler, P., Tang, Y., Goddard, W.A., 2010. Analysis of the influence of alkyl polyglucoside surfactant and cosolvent structure on interfacial tension in aqueous formulations versus n-octane. *Tenside Surf. Det.* 47, 87–97.
- Jacobs, C., Müller, R.H., 2002. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. *Pharm. Res.* 19 (2), 189–194.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B., 2008. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocoll.* 22, 1191–1202.
- Jahnke, S., 1998. The theory of high pressure homogenization. In: Müller, R.H., Benita, S., Böhm, B. (Eds.), *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs*. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 177–200.
- Jillavenkates, A., Dapkunas, S.J., Lum, L.-S.H., 2001. *Particle Size Characterization*. National Institute of Standards and Technology, Washington.
- Karlberg, A.-T., Bodin, A., Matura, M., 2003. Allergenic activity of an air-oxidized ethoxylated surfactant. *Contact Dermat.* 49, 241–247.
- Kovačević, A., Savić, S., Vuleta, G., Müller, R.H., Keck, C.M., 2011. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure. *Int. J. Pharm.* 406 (1–2), 163–172.
- Kovačević, A., Müller, R.H., Savić, S., Vuleta, G., Keck, C.M., 2014. Solid lipid nanoparticles stabilized with polyhydroxy surfactants: preparation characterization and physical stability investigation. *Colloid Surf. A* 444, 15–25.
- Lim, S.-J., Lee, M.-K., Kim, C.-K., 2004. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. *J. Control Release* 100, 53–61.
- Lippacher, A., Müller, R.H., Mäder, K., 2001. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 214 (1–2), 9–12.
- Loh, W., 2002. Block and copolymer micelles. In: Somasundaran, P. (Ed.), *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, pp. 1014–1025.
- Matthies, W., Jackwerth, B., Krachter, H.-U., 1997. Dermatological properties of alkyl polyglycosides. In: Hill, K., von Rybinski, W., Stoll, G. (Eds.), *Alkyl Polyglycosides: Technology, Properties and Applications*. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim and VCH Publishers Inc., New York, pp. 169–177.
- Mehnert, W., Mäder, K., 2012. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and application. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2–3), 165–196.
- Muchow, M., Maincent, P., Müller, R.H., 2008. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN[®], NLC[®], LDC[®]) for oral drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34 (12), 1394–1405.
- Müller, R.H., 1996. Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis—Einführung in die Theorie, praktische Meßdurchführung, Dateninterpretation. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, Stuttgart.
- Müller, R.H., Dingler, A., 1998. The next generation after the liposomes: solid lipid nanoparticles (SLN, Lipopearls) as dermal carrier in cosmetics. *Eurocosmetics* 8, 19–26.
- Müller, R.H., Heinemann, S., 1993. Fat emulsions for parenteral nutrition II: Characterisation and physical long-term stability of Lipofundin MCT LCT. *Clin Nutr.* 12 (5), 298–309.
- Müller, R.H., Shegokar, R., Keck, C.M., 2011. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Curr. Drug Discovery Technol.* 8 (3), 207–227.
- Müller, R.H., Staufenbiel, S., Keck, C.M., 2014. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) for innovative consumer care and household products. *H&PC Today* 9 (2), 18–24.
- Pardeike, J., Hommoss, A., Müller, R.H., 2009. Lipid nanoparticles (SLN NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.* 366, 170–184.
- Parfitt, G.D., 1973. *Dispersion of Powders Liquids*, 2nd ed. Wiley, New York.
- Porter, M.R., 1994. *Handbook of Surfactants*, 2nd ed. Chapman & Hall, Torquay, UK.
- Riddick, T.M., 1968. *Zeta-Meter Manual*. Zeta-Meter Inc, New York.
- Rosen, M.J., 2004. Emulsification by surfactants. In: Rosen, M.J. (Ed.), *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 3rd ed. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 303–332.
- Salminen, H., Helgason, T., Aulbach, S., Kristinsson, B., Kristbergsson, K., Weiss, J., 2014. Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 42, 256–263.
- Schmidt, K., Tesmann, H., 2001. Alkyl polyglycosides. In: Friedli, F.E. (Ed.), *Detergency of Specialty Surfactants*. Marcel Dekker, Inc, Basel, Switzerland, pp. 1–71.
- Schäfer-Korting, M., Mehnert, W., Korting, H.-C., 2007. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv. Drug Delivery Rev.* 59 (6), 427–443.
- Sulek, M.W., Ogorzałek, M., Wasilewski, T., Klimasewska, E., 2013. Alkyl polyglucosides as components of water based lubricants. *J. Surfact. Deterg.* 16, 369–375.
- Tadros, T.F., 2005. *Applied Surfactants – Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Teeranachaideekul, V., Boonme, P., Souto, E., Müller, R.H., Junyaprasert, V.B., 2008. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution on Nile red-loaded NLC. *J. Controlled Release* 128, 134–141.
- Teeranachaideekul, V., Souto, E.B., Junyaprasert, V.B., Müller, R.H., 2007. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q₁₀ – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 340, 198–206.
- Tesmann, H., Kahre, J., Hensen, H., Salka, A.B., 1997. Alkyl polyglycosides in personal care products. In: Hill, K., von Rybinski, W., Stoll, G. (Eds.), *Alkyl Polyglycosides: Technology, Properties and Applications*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, pp. 71–99.
- von Rybinski, W., Hill, K., 1998. Alkyl polyglycosides – properties and applications of a new class of surfactants. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37 (10), 1328–1345.
- Westesen, K., Siekmann, B., 1997. Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 151, 35–45.
- Wissing, S.A., Müller, R.H., 2003. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.* 254, 65–68.
- Zhao, S., Yang, X., Garamus, V.M., Handge, U.A., Bérengère, L., Zhao, L., Salamon, G., Willumeit, R., Zou, A., Fan, S., 2014. Mixture of nonionic/ionic surfactants for the formulation of nanostructured lipid carriers: effects on physical properties. *Langmuir* 30, 6920–6928.

8.2. Biografija autora

Anđelka Kovačević rođena je 18. marta 1979. godine u Loznici. Osnovnu školu „14. oktobar” završila je u Dragincu (opština Loznica), a gimnaziju „Vuk Karadžić” u Loznici. Studije farmacije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 1997/98 godine, a diplomirala 25. februara 2005. Diplomski rad pod nazivom „Čvrste lipidne nanočestice - osobine i primena”, odbranila je na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Obavezan farmaceutski pripravnički staž obavila je u apoteci „Sveti Sava” u Beogradu, nakon čega je položila stručni ispit.

Doktorske akademske studije - modul Farmaceutska tehnologija na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 2006/2007. godine. Tokom doktorskih studija Anđelka Kovačević je boravila osam meseci na *Department of Pharmaceutics, Biopharmaceutics & NutriCosmetics, Institute of Pharmacy, Free University of Berlin*.

Anđelka Kovačević je dobitnik 3. nagrade na takmičenju za godišnju nagradu Farmaceutskog fakulteta za naučnoistraživački rad 2007. godine. Šestomesečnu stipendiju Nemačke službe za akademsku razmenu (engl. *German Academic Exchange Service*) za studijski boravak u Nemačkoj u okviru programa *Research grant for doctoral candidates and young academics and scientists* dobila je 2009. godine. Rezultati iz doktorske disertacije Anđelke Kovačević, saopšteni kao poster prezentacija, nagrađeni su prvom nagradom na 7th *Polish-German Symposium on Pharmaceutical sciences Interdisciplinary Research for Pharmacy*, održanom u Poljskoj 2013. godine.

Od novembra 2005. do oktobra 2014. Anđelka Kovačević bila je angažovana na poslovima saradnika u nastavi i asistenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. U sklopu nastavnih aktivnosti učestvovala je u izvođenju praktične nastave na predmetima Farmaceutska tehnologija I i Farmaceutska tehnologija II (obavezni predmeti) i predmetu Veterinarski lekovi (izborni predmet) na integrisanim akademskim studijama. Učestvovala je i u izvođenju praktične nastave na predmetima Farmaceutska tehnologija sa biofarmacijom i Osnovi industrijske farmacije i kozmetologije u periodu od 2005. do 2008. godine.

Od 2005. do 2014. godine bila je angažovana na četiri nacionalna projekta, iz oblasti osnovnih istraživanja i tehnološkog razvoja, koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

Naučnoistraživački rad Anđelke Kovačević pripada oblasti farmacija, uža naučna oblast farmaceutska tehnologija. Poslednjih godina oblast njenog naučnoistraživačkog rada je formulacija i karakterizacija koloidnih nosača lekovitih i kozmetički aktivnih supstanci za primenu na koži.

Anđelka Kovačević je autor ili koautor 45 radova i saopštenja od toga 4 rada štampana u časopisima međunarodnog značaja (3 rada čine deo doktorske disertacije), 3 rada u časopisu nacionalnog značaja, 26 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova (22 iz doktorske disertacije) i 11 saopštenja sa skupova nacionalnog značaja (6 iz doktorske disertacije).

Prilog 8.3.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Anđelka Kovačević

Broj indeksa 32/06

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima: postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 1. 11. 2014

Anđelka Kovačević

Prilog 8.4.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora	Anđelka Kovačević
Broj indeksa	32/06
Studijski program	Doktorske akademske studije iz Farmaceutске tehnologije
Naslov rada	Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima: postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance
Mentor	prof. dr Snežana Savić
Potpisani/a	Anđelka Kovačević

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 1.11.2014.

Anđelka Kovačević

Prilog 8.5.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković” da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima: postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
- ☒ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 1. 11. 2014.

Brigita Kobanović