

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Ines N. Nikolić

**Spontanoemulgujuće nanoemulzije
za primenu kurkumina na koži:
istraživanje uticaja međufaznih fenomena u
koloidnom sistemu
na efikasnost isporuke i biološku aktivnost**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Ines N. Nikolić

**Spontanoemulgujuće nanoemulzije
za primenu kurkumina na koži:
istraživanje uticaja međufaznih fenomena u
koloidnom sistemu
na efikasnost isporuke i biološku aktivnost**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Ines N. Nikolić

Nanoemulsions prepared via spontaneous emulsification for dermal application of curcumin: investigation of the interfacial phenomena in the colloidal system and their impact on delivery efficiency and biological activity

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Delovi eksperimentalnog rada urađeni su na Katedri za patobiologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, na Institutu za proučavanje lekovitog bilja *Dr Josif Pančić* u Beogradu, na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Univerziteta Eberhard–Karls u Tbingenu (Nemačka), i na Institutu za hemijsku biologiju Nacionalne helenske istraživačke fondacije u Atini (Grčka).

MENTOR

Dr sc. Snežana Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. _____
Dr sc. Danina Krajišnik, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr sc. Lada Živković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. _____
Dr sc. Ana Žugić, naučni saradnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja *Dr Josif Pančić*

4. _____
Dr sc. Dominique Jasmin Lunter, redovni profesor
Eberhard-Karls Univerzitet, Tbingen (Nemačka)

5. _____
Dr sc. Vassiliki Papadimitriou, stariji istraživač
Institut za hemijsku biologiju Nacionalne helenske istraživačke fondacije, Atina (Grčka);
gostujući profesor, Univerzitet Tesali, Larisa (Grčka)

Datum odbrane: _____

Spontanoemulgujuće nanoemulzije za primenu kurkumina na koži: istraživanje uticaja međufaznih fenomena u koloidnom sistemu na efikasnost isporuke i biološku aktivnost

SAŽETAK

U kontekstu biomedicinske primene, u poslednjih nekoliko decenija svedočimo svojevrsnoj renesansi koloidne nauke, što je verovatno posledica ekspanzije nanotehnologije i njene primene u domenu isporuke lekove, sa visoko postavljenim očekivanjima.

Oslanjajući se na aktuelni trend istraživanja različitih nanonosaa za isporuku aktivnih supstanci, cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je razvoj niskoenergetskih nanoemulzija za unapređenu dermalnu isporuku kurkumina (model aktivne supstance), uz razumevanje složenih interakcija koje su u osnovi nastanka ovih koloidnih sistema. Razmatrani su i određeni aspekti fizičkih i hemijskih modaliteta za poboljšanje isporuke aktivnih supstanci u/kroz kožu, sa idejom da se dizajnira prototip inovativnog adhezivnog flastera za dermalnu primenu koji će biti baziran na kombinaciji primene električne energije (kao fizičke metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti), i nanoemulzija (naprednih nosaa sa nanostrukturom).

Kao rezultat eksperimentalnog rada, razvijene su visokobezbedne niskoenergetske nanoemulzije stabilisane kombinacijom polisorbata 80 i lecitina soje, sa trigliceridima srednje dužine lanca kao masnom fazom, odnosno njihovom kombinacijom sa eukaliptolom ili pinenom (kao hemijskim pojačivačima penetracije). Primenom niza komplementarnih tehnika, detaljno su okarakterisane u domenu mikrostrukture, oblika, veličine i morfologije dispergovane faze, fizičke stabilnosti, bezbednosti primene i pogodnosti za očuvanje hemijske stabilnosti model aktivne supstance, što je bilo praćeno relevantnim biološkim i biofarmaceutskim ispitivanjima. Na samom kraju, pokazana je superiornost primene adhezivnog sistema za jontoforezu u kombinaciji sa nanoemulzijom kao inovativnog načina za dermalnu isporuku aktivnih supstanci.

Kao najveći fundamentalni naučni doprinos ove doktorske disertacije može se smatrati analiza fenomena na granici faza, otkrivanje doprinosa različitih ekscipijenasa koloidnoj stabilnosti, i proširenje savremene teorije o stabilizaciji nanoemulzija.

Ključne reči: nanoemulzije, niskoenergetska nanoemulzifikacija, spontanoemulgujući postupak, fenomeni na granici faza, kurkumin, antioksidans, dermalna primena lekova, jontoforeza, penetracioni enhanseri, nanotehnologija

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

Nanoemulsions prepared via spontaneous emulsification for dermal application of curcumin: investigation of the interfacial phenomena in the colloidal system and their impact on delivery efficiency and biological activity

ABSTRACT

In the context of biomedical application, in the last few decades there has been a kind of renaissance of colloidal science, which is probably a consequence of the expansion of nanotechnology and its application in the field of drug delivery, with highly posted expectations.

Relying on the current research trend focused on different nanocarriers for the delivery of active pharmaceutical ingredients, the aim of this doctoral dissertation was to develop low-energy nanoemulsions for improved dermal delivery of curcumin (a model active ingredient), with an understanding of the complex interactions that underlie the formation of these colloidal systems. Certain aspects of physical and chemical modalities for improvement of dermal drug delivery into/through the skin were considered, with the idea of designing a prototype of an innovative adhesive patch for dermal application that will be based on a combination of electricity (as a physical methods to improve dermal delivery), and nanoemulsions (advanced nanostructured carriers).

The research resulted in the formation of highly safe low-energy nanoemulsions stabilized by a combination of polysorbate 80 and soybean lecithin, with medium-chain triglycerides as the oil phase, or their combination with eucalyptol or pinene (as chemical penetration enhancers). Using a number of complementary techniques, they were thoroughly characterized in the context of microstructure, shape, size and morphology of the dispersed phase, physical stability, safety and suitability for maintaining chemical stability of the active ingredient, which was followed by relevant biological and biopharmaceutical studies. Finally, the superiority of the application of the adhesive system for iontophoresis in combination with nanoemulsion as an innovative way for dermal delivery of active molecules has been shown.

Extending the modern theory of nanoemulsion stabilization through the analysis of the interfacial phenomena, as well as the discovery of the contribution of various excipients to colloidal stability, could be considered as the most important scientific contributions of this doctoral dissertation.

Key words: nanoemulsions, low-energy nanoemulsification techniques, spontaneous emulsification, interfacial phenomena, curcumin, antioxidant, dermal application, iontophoresis, penetration enhancers, nanotechnology

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical Technology

Ma koliki i neosporan trud da ulažemo, doktorat nikada nije rad samo jednog čoveka. Više od naučnog napretka, to je proces u kome onaj ko je u glavnoj ulozi sazreva na profesionalnom i ličnom planu. I za to je potrebna pomoć mnogih – da nas nauče, usmere, kritikuju, ohrabre, da nam ukažu poverenje.

U svim ovim segmentima učestvovala je *Profesorka*, moj mentor - *prof. dr Snežana Savić*. Neizmerno joj hvala na pruženim mogućnostima i sveprisutnoj podršci, na tome što je bila sagovornik, što je analizirala i razumela, uvek nalazila način, što je umela da bude vetar u jedrima, *a nije sumnjala u pravac koji sam birala*.

Veliku zahvalnost dugujem *dr Ani Žugić*, koja je na mene nesebično prenosila znanja, i sa kojom sam mnogo i rado diskutovala, uvek u toploj atmosferi Instituta za proučavanje lekovitog bilja *Dr Josif Pančić*.

Veliku zahvalnost dugujem *prof. dr Ladi Živković* jer me je puna entuzijazma uvela u svet bioloških eksperimenata, dajući mi uvek konstruktivne smernice.

Svoje prve istraživačke korake u inostranstvu napravila sam na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Univerziteta Eberhard-Karls u Tübingenu, uz veliku pomoć i podršku *prof. dr Dominique Jasmin Lunter*. Veoma sam joj zahvalna na ukazanom poverenju.

Uvek ću pamtiti srdačne dobrodošlice i prijateljsku atmosferu koja je pratila moje eksperimente u sunčanoj Atini. Ne zaboravljajući ostale kolege, posebnu zahvalnost dugujem *dr Vassiliki Papadimitriou* i *dr Evgeniji Mitsou* na uloženom vremenu i ogromnom trudu da se dobiju i interpretiraju rezultati koji čine značajan deo ove doktorske disertacije.

Prof. dr Danina Krajišnik dala je veliki doprinos u poslednjim fazama izrade ove doktorske disertacije. Njena posvećenost, podrška i smernice bili su mi od velikog značaja.

Mojoj dragoj kolegici *vanr. prof. Ivani Pantelić* mnogo hvala što je na mene bez zadržke prenosila znanja (i nastavila je da to radi), učinivši me samostalnijim istraživačem. Svojom blagošću i razumevanjem bila je pravi oslonac.

Od samog početka, pa sve do poslednjih segmenata, moj eksperimentalni rad bio je praćen strpljenjem i velikim angažovanjem *prof. dr Bojana Markovića*, koji je pomogao da se dođe do pravih zaključaka.

Dr Danijela Randelović učinila je da „vidimo nevidljivo“. Njena vedrina i prijateljski razgovori posebno su obojili naše eksperimente, zbog kojih sam uvek rado dolazila u laboratoriju Centra za mikroelektronske tehnologije Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju.

Posebnu zahvalnost dugujem *prof. dr Jeleni Antić Stanković* koja je, produbljujući moja interesovanja i ne štedeći vreme koje mi je posvećivala, omogućila da uz nju mnogo naučim i savladam nove eksperimentalne veštine.

Prof. dr Goran Stojanović sa Fakulteta tehničkih nauka u Novom Sadu i *doc. dr Mitar Simić* sa Elektrotehničkog fakulteta u Banjaluci svojim inženjerskim znanjem su značajno doprineli poslednjem eksperimentalnom segmentu ove doktorske disertacije, dajući joj veći značaj. Iznad svega, zahvalna sam im na posvećenom vremenu, velikoj motivaciji i pozitivnom stavu koji su sa mnom delili u eksperimentalnom radu.

Hvala svim mojim kolegama sa Ketdre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, a posebno mojim profesorima, jer su mi dali dobre startne pozicije i u meni razvili interesovanje za našu lepu *farmaceutsku tehnologiju*.

U svim fazama uz mene su bili i moji *Prijatelji*. Neki su tu bili od početka, a neka sam na ovom putu stekla. Podržavali su me i bodrili čak i onda kada bih ja posustala. Neizmerno im hvala na tome.

Beskrajno hvala mojim *Roditeljima*. *Za svu pruženu toplinu, bezrezervnu ljubav i podršku nema adekvatnih reči*.

*...Jer prošao nisam kroz života huku
Sklopljenih očiju i skrštenih ruku...*

Milan Rakić, *Misao*

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Koloidni sistemi u kontekstu nanotehnologije	1
1.2.	Primena koloidnih sistema u nanomedicini	3
1.3.	Prednosti nanosistema u odnosu na konvencionalne nosače aktivnih supstanci	5
1.4.	Nanoemulzija – koloidne specifičnosti i mogućnosti promene	7
1.4.1.	Teorija (nano)emulzifikacije	7
1.4.2.	Stabilnost nanoemulzija	8
1.4.2.1.	Savremeni nalazi istraživanja međupovršinskog sloja u kontekstu stabilnosti nanoemulzija	10
1.4.3.	Metode izrade nanoemulzija	12
1.4.3.1.	Spontanoemulgujući postupak kao „niskoenergetski“ metod za dobijanje nanoemulzija	13
1.4.3.2.	Odabir ekscipijenasa za izradu nanoemulzija niskoenerskim metodama	14
1.4.4.	Optičke karakteristike nanoemulzija	16
1.4.5.	Reološka svojstva nanoemulzija	17
1.4.6.	Nanoemulzije kao formulacije za slaborastvorljive molekule: mogućnosti primene	17
1.5.	Odabrana svojstva značajna za karakterizaciju nanoemulzija	19
1.5.1.	Veličina i distribucija veličina kapi	19
1.5.2.	Karakteristike međupovršinskog sloja – granica faza ulje/voda	20
1.5.3.	Površinsko naelektrisanje kapi	20
1.5.4.	Morfologija kapi	21
1.5.5.	Kapacitet inkapsulacije i kinetika oslobađanja aktivne supstance	21
1.5.6.	Aspekti bezbednosti nanoemulzija	23
1.5.6.1.	Biološka karakterizacija nanomaterijala	25
1.6.	Nanoemulzija: pregled stanja na tržištu	26
1.7.	Primena lekova putem kože – teorijski aspekti	31
1.7.1.	Struktura kože i faktori od značaja za dermalnu isporuku aktivne supstance	31
1.7.2.	Metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti aktivnih supstanci	34
1.7.2.1.	Primena hemijskih pojačivača penetracije	35
1.7.2.2.	Jontoforeza kao fizička metoda za poboljšanje dermalne raspoloživosti aktivnih supstanci	36
1.8.	Kurkumin kao model aktivna supstanca	40
1.8.1.	Fizičkohemijska svojstva kurkumina	40
1.8.2.	Biološka svojstva kurkumina	40

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	42
2.1. Cilj prve faze eksperimentalnog rada	42
2.2. Cilj druge faze eksperimentalnog rada	42
2.3. Cilj treće faze eksperimentalnog rada	43
2.4. Cilj četvrte faze eksperimentalnog rada	43
3. EKSPERIMENTALNI DEO	44
3.1. Materijali	44
3.2. Metode	44
3.2.1. Ispitivanje rastvorljivosti kurkumina	44
3.2.2. Praćenje faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu	44
3.2.3. Izrada nanoemulzija odabranih za kasnije faze istraživanja	45
3.2.4. Određivanje kapaciteta placebo nanoemulzija za solubilizaciju kurkumina	45
3.2.5. Karakterizacija nanoemulzija	45
3.2.5.1. Fizičkohemijska karakterizacija	45
Određivanje veličine i distribucije veličina kapi	46
Određivanje površinskog naelektrisanja kapi	46
Polarizaciona mikroskopija	47
Mikroskopija atomskih sila	47
Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija	47
Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	49
Reološka karakterizacija	50
Određivanje gustine komponenata masne faze	50
Merenje električne provodljivosti	50
Merenje pH vrednosti	50
Procena fizičke stabilnosti nanoemulzija	50
3.2.5.2. Biološka karakterizacija	51
Procena antioksidativnog potencijala	51
Procena genotoksičnog i antigenotoksičnog efekta	53
<i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti	54
Analiza ćelijskog ciklusa	55
3.2.5.3. <i>In vivo</i> procena iritacionog potencijala nanoemulzija	56
3.2.5.4. Biofarmaceutska karakterizacija nanoemulzija	56
Ispitivanje brzine oslobađanja kurkumina iz nanoemulzija	56
<i>In vivo</i> studija penetracije kurkumina iz nanoemulzija	57
3.2.6. Jontoforeza	58
3.2.6.1. <i>In vivo</i> procena iritacionog potencijala jontoforeze	58
3.2.6.2. <i>In vivo</i> studija penetracije kurkumina iz nanoemulzija uz primenu jontoforeze	59

3.2.7. LC-MS/MS analiza	59
3.2.8. Statistička analiza	60
4. REZULTATI I DISKUSIJA	61
4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada	61
4.1.1. Studija rastvorljivosti kurkumina i odabir ekscipijenasa za izradu nanoemulzija	61
4.1.2. Ispitivanje faznog ponašanja u odabranom sistemu masna faza/emulgatori/vodena faza i odabir formulacije za inkorporiranje aktivne supstance	62
4.1.3. Određivanje kapaciteta za solubilizaciju kurkumina i fizičkohemijaska karakterizacija nanoemulzija sa kurkuminom	73
4.1.4. Određivanje lokalizacije kurkumina u nanoemulziji	78
4.2. Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada	80
4.2.1. Modifikacija osnovne formulacije – dodatak monoterpena kao hemijskih pojačivača penetracije: fizičkohemijaska karakterizacija ..	80
4.2.2. Ispitivanje efekta monoterpena kao kostabilizatora nanoemulzija („ <i>surfactant-like activity</i> “)	81
4.2.3. Procena uticaja solubilizacije kurkumina na karakteristike formulacija sa monoterpenima	86
4.2.4. Ispitivanje dugoročne stabilnosti odabranih nanoemulzija	88
4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada	93
4.3.1. Ispitivanje <i>in vitro</i> brzine oslobađanja kurkumina iz razvijenih nanoemulzija	93
4.3.2. Ispitivanje antioksidativnog potencijala nanoemulzija sa kurkuminom	96
4.3.3. <i>In vitro</i> procena bezbednosnog profila nanoemulzija i sposobnosti za ostvarivanja bioloških efekata	100
4.3.3.1. Ispitivanje genotoksičnog efekta	100
4.3.3.2. Ispitivanje antigenotoksičnog efekta	101
4.3.3.3. Ispitivanje citotoksičnosti	102
4.3.3.4. Analiza ćelijskog ciklusa	107
4.3.4. <i>In vivo</i> studija bezbednosti placebo nanoemulzija	110
4.4. Rezultati i diskusija četvrte faze eksperimentalnog rada	112
4.4.1. Odabir eksperimentalnih uslova za sprovođenje jontoforeze: <i>in vivo</i> studija bezbednosti	112
4.4.2. <i>In vivo</i> studija penetracije kurkumina kroz kožu nakon primene nanoemulzija: poređenje efekata hemijskih pojačivača penetracije i jontoforeze	114
4.4.2.1. Određivanje penetracionog profila kurkumina iz nanoemulzije uz primenu jontoforeze	114

4.4.2.2.	Određivanje penetracionog profila kurkumina iz nanoemulzija – procena efekata hemijskih pojačivača penetracije	116
4.4.2.3.	Hemijski pojačivači penetracije vs. fizičke metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti kurkumina: poređenje rezultata	117
5.	ZAKLJUČAK	119
5.1.	Zaključak prve faze eksperimentalno rada	119
5.2.	Zaključak druge faze eksperimentalnog rada	120
5.3.	Zaključak treće faze eksperimentalnog rada	121
5.4.	Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada	122
5.5.	Opšti zaključak i osvrt na buduća istraživanja	123
6.	LITERATURA	125
7.	PRILOZI	140
7.1.	Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije	
7.2.	Biografija autora	
7.3.	Izjava o autorstvu	
7.4.	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije	
7.5.	Izjava o korišćenju	

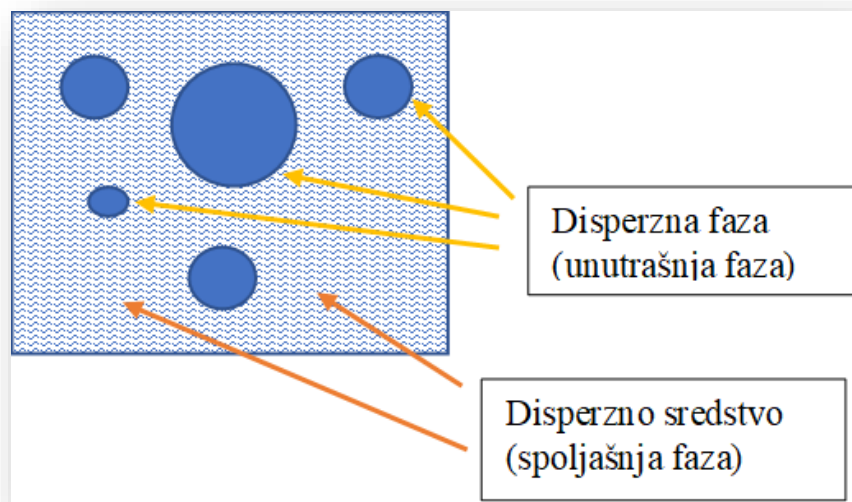
1. UVOD

1.1. Koloidni sistemi u kontekstu nanotehnologije

Nanonosači/nanosistemi, kao koloidni sistemi u svojim različitim pojavnim oblicima, nude brojne mogućnosti u domenu isporuke lekova (Mishra i sar, 2010). Iako ne odmah pod tim imenom, nanotehnologija, "nauka o malom", kao savremena istraživačka disciplina svoje početke ima u bazičnim postulatima koloidne hemije.

Još od početka 20. veka, kada je uspostavljena kao nezavisna naučna disciplina, koloidna hemija se kontinuirano razvijala, proširujući oblast izučavanja. Zavisno od naučne perspektive, predložene su različite definicije koloidne hemije. Zanimljivo je da ju je Wolfgang Ostwald (Wolfgang Ostwald) definisao 1914. godine kao *svet zanemarenih dimenzija* („the world of neglected dimensions“). Danas možemo reći da je koloidna hemija fizička hemija makromolekula, površinski aktivnih molekula, te disperznih i drugih sistema sačinjenih od elemenata čija je barem jedna dimenzija u opsegu od 1 nm do 100 nm. Iz tog razloga, koloidnu hemiju, barem jednim delom, možemo smatrati naukom o nanosistemima, a mnoge savremene tehnike fizičko-hemijske karakterizacije potpomažu njen razvoj (Đaković, 2012; Myers, 1999). Sam termin „nanotehnologija“ skovao je 1974. godine profesor Norio Taniguči (Norio Taniguchi), ali ideje o nanotehnologiji i koncepte važne za njeno uspostavljanje kao savremene nauke opisao je fizičar Ričard Fajnman (Richard Feynman) u svom govoru 1959. godine – *There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics* (Feynman, 1960).

Koloidi predstavljaju multikomponentne sisteme, kod kojih su čestice jedne faze raspodeljene (dispergovane) u drugoj fazi: disperzna (unutrašnja) faza i disperzno sredstvo (spoljašnja faza) dobro su definisani (Slika 1.1).



Slika 1.1 Shematski prikaz disperzne faze i disperznog sredstva

Iako su dimenzije dispergovanih čestica jedan od najčešćih kriterijuma za klasifikovanje koloida, značajne podele su i one koje se zasnivaju na obliku dispergovanih čestica i solvataciji (Tabela 1.1), te podele na osnovu agregatnog stanja disperzne faze i disperznog sredstva (Tabela 1.2) (Đaković, 2012).

Prikazane podele koloidnih sistema svakako ne predstavljaju konačan spisak kriterijuma po kojima ih možemo klasifikovati i objasniti. Kada je potrebno objasniti fenomene koji stoje u osnovi svih koloidnih sistema, možda je najpogodnija upravo ona klasifikacija koju je dao Štaudinger (Hermann Staudinger) – podela na osnovu unutrašnje građe koloidnih čestica, tj. na osnovu vrste veze između atoma/molekula koji izgrađuju koloidnu česticu. U tom kontekstu razlikuju se **disperzoide, micelarne koloide, makromolekularne koloide i makromolekularne asocijate** (Đaković, 2012):

- *Disperzoidi* predstavljaju polidisperzne liofobne koloidne sisteme – onakve koloidne sisteme kako ih je tumačio Ostvald. Ne nastaju spontano, već se dobijaju posebnim tehnikama (mlevenje u koloidnom mlinu, ultrazvučne vibracije, kristalizacija...). U zavisnosti od agregatnog stanja disperznog sredstva, disperzoidi mogu biti suspenzoidi (disperzna faza je u čvrstom agregatnom stanju) ili emulzoidi (disperzna faza je u tečnom agregatnom stanju).
- *Micelarni koloidi* predstavljaju rastvore (najčešće vodene) organskih materija koje imaju amfifilnu strukturu (površinski aktivne materije), zbog čega obrazuju molekularne agregate koloidnih dimenzija – micela. Pojedinačni molekuli unutar micela povezani su Van der Valsovima (Van der Waals) vezama. Micelarni (asocijacioni) koloidi su, u stvari, liofilni koloidni sistemi.
- *Makromolekularni koloidi* sadrže makromolekule koji, zbog svoje velike molekulske mase, predstavljaju koloidne čestice po sebi. Dobijaju se rastvaranjem makromolekula u rastvaraču – dakle, to su liofilni koloidi.
- *Makromolekularni asocijati* formiraju se povezivanjem više makromolekula sporednim valencama.

Tabela 1.1. Podele disperznih sistema prema veličini, obliku i solvataciji

Podela prema prečniku dispergovanih čestica (podela po Ostvaldu) - primenjivo prvenstveno na čestice sfernog oblika		
Grubo disperzni sistemi: čestice prečnika iznad 100 nm	Koloidno disperzni sistemi: čestice prečnika od 1 nm do 100 nm	Visokodisperzni sistemi (molekularno disperzni sistemi): Čestice prečnika manjeg od 1 nm
Podela prema obliku		
Globularni sistemi (čestice približno kuglastog oblika)	Lamelarni disperzni sistemi (čestice u obliku listića i lamela)	Fibrilarno disperzni sistemi (čestice u obliku štapića, vlakana, fibrila...)
Podela prema solvataciji		
Liofilni koloidi: veliki afinitet disperzne faze prema disperznom sredstvu	Liofobni koloidi: veoma mali afinitet disperzne faze prema disperznom sredstvu	

Tabela 1.2. Podela disperznih sistema prema agregatnom stanju faza

Disperzno sredstvo	Disperzna faza	Vrsta disperznog sistema	
		Grubo disperzni sistem	Koloidno disperzni sistem
Čvrsto	<ol style="list-style-type: none"> 1. Gasovita 2. Tečna 3. Čvrsta 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Čvrste pene 2. Čvrste pene 3. Čvrste suspenzije 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Čvrste pene 2. Čvrste pene 3. Čvrsti sol
Tečno	<ol style="list-style-type: none"> 1. Gasovita 2. Tečna 3. Čvrsta 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pene 2. Emulzije 3. Suspenzije 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pene 2. Mikroemulzije, nanoemulzije 3. Sol (nanosuspenzija)
Gasvito	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tečna 2. Čvrsta 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kiša, magla 2. Prašina 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aerosol 2. Aerosol

Specifične osobine i ponašanje disperznih sistema zavise od područja veličina u kojima se nalaze dispergovane čestice. U kontekstu farmaceutske primene, svoje mesto nalaze i grube disperzije (klasične farmaceutske emulzije i suspenzije), ali sve više i nanosistemi kao nosači sa unapređenim svojstvima (fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim) za aktivne supstance, koji po svojim karakteristikama pripadaju koloidno disperznim sistemima (Mishra i sar, 2010).

Svakako, na osnovu razlika između grubih i koloidnih disperzija, moguće je izdvojiti određene zajedničke osobine pravih koloida (Đaković, 2012):

- višefazni i heterogeni sistemi,
- liofobni su i najčešće polidisperzni,
- mala veličina dispergovanih čestica čini ih nevidljivim pod svetlosnim mikroskopom,
- pokazuju Braunovo kretanje,
- sporo difunduju,
- dijalizuju samo najmanje čestice, i to veoma sporo,
- bistri su ili blago zamućeni.

1.2. Primena koloidnih sistema u nanomedicini

U poslednjih nekoliko decenija došlo je do svojevrzne renesanse koloidne nauke, što je verovatno posledica sve veće ekspanzije nanotehnologije i njene primene u različitim sferama, uključujući i primenu u farmaciji – pre svega u formulaciji nosača za isporuku aktivnih supstanci, ali i u dijagnostici (Saraf, 2016).

Iako ne postoji jedinstvena međunarodno prihvaćena definicija nanomaterijala/nanosistema, trenutno važeća definicija koju je 2011. godine predložila i usvojila Evropska komisija, glasi (EU Commission, 2011):

Nanomaterijal je prirodno prisutan, slučajno nastali ili proizveden materijal kog čine slobodne čestice ili čestice u formi agregata ili aglomerata, i gde u ukupnoj distribuciji veličina čestica 50% ili više njih ima jednu ili više spoljašnjih dimenzija u opsegu od 1 nm do 100 nm.

Pod pojmom „čestica“ smatra se komad materije sa definisanim fizičkim granicama.

„Agregat“ se odnosi na skup slabo vezanih čestica gde je rezultujuća spoljna površina približna zbiru površina pojedinačnih komponenti, dok se „aglomerat“ sastoji iz snažno vezanih ili spojenih čestica.

U specifičnim slučajevima, kada to opravdava zabrinutost za životnu sredinu, zdravlje i sigurnost, prag od 50% i više u ukupnoj distribuciji veličina čestica može se zameniti pragom od 1% do 50%.

Dodatno, prema definiciji, fulerene, grafen i karbonske nanocevi sa jednom ili više spoljašnjih dimenzija koje su ispod 1 nm takođe treba smatrati nanomaterijalima.

Ističe se i da nanomaterijali sami po sebi ne predstavljaju opasnost, ali da postoji potreba da se u toku procene rizika uzmu u obzir posebna razmatranja kada je o njima reč. Svrha definicije upravo jeste da se pruže jasni i nedvosmisleni kriterijumi za identifikaciju materijala na koje se takva razmatranja primenjuju.

Treba napomenuti da se ova definicija odnosi na nanomaterijale koji su čvrsti, sa jasnim i nepromenljivim dimenzijama. Imajući na umu da su nanosistemi koji se koriste u medicini/farmaciji najčešće „mekani“ (*soft matter*), sa fluidnim ivicama, njihove dimenzije su promenjive u zavisnosti od kretanja ili pritiska koji se na njih vrši. Zvanični dokumenti evropskih regulatornih i naučnih tela, kada govore o nanomedicini i nanolekovima, upućuju na dimenzije koje su na nanoskali – ispod 1 mikrometra. U tom smislu, Evropska fondacija za nauku (*European Science Foundation - ESF*) i Evropski savet za istraživanje u medicini (*European Medicine Research Council - EMRC*) su u svom izveštaju 2005. godine dali sledeću definiciju nanomedicine (ESF, 2005):

Oblast nanomedicine podrazumeva nauku i tehnologiju dijagnostikovanja, lečenja i sprečavanja bolesti i povreda, olakšavanje bola, očuvanja i poboljšanja zdravlja ljudi primenom molekularnih alata i molekularnih saznanja o ljudskom telu.

U nastavku se definiše 5 glavnih subdisciplina kroz koje se nanomedicina sprovodi, a koje se na više nivoa preklapaju i međusobno podupiru:

- analitički alati,
- nanoimidžing,
- **nanomaterijali i nano-medicinska sredstva**
- **inovativni lekovi i sistemi za isporuku lekovitih supstanci,**
- klinička, regulatorna i toksikološka pitanja.

Evropska tehnološka platforma za nanomedicinu (*European Nanomedicine Technology Platform - ENTP*) u saradnji sa Evropskom laboratorijom za karakterizaciju nanolekova (*European Nanomedicine Characterization Laboratory - EUNCL*) definišu nanolekove kao *sisteme specifičnih fizičko-hemijskih svojstava koje poseduju zahvaljujući malim dimenzijama, čime ostvaraju nove perspektive u dijagnostici, lečenju i prevenciji bolesti* (Weltring i sar, 2016). Dalje, pojašnjavajući oblast nanoterapeutika, EMRC i ESF u svom izveštaju navode da je to oblast koja se bavi kompleksnim sistemima čije su dimenzije unutar opsega od 1 nm do 1000 nm (ESF, 2005).

Slično tome, Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. *International Standardization Organization – ISO*) navodi da su nanomaterijali *materijali sa bilo kojom spoljašnjom dimenzijom koja je u nanorazmerama (od 1 nm do 1000 nm), ili oni koji imaju površinsku strukturu u nanorazmerama* (ISO, 2015), dok Administracija za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih država (engl. *United States Food and Drug Administration – US FDA*), razmatrajući primenu nanotehnologije u medicini, opet daje užu definiciju, pozivajući se na opseg od 1 nm do 100 nm, ali uz napomenu da, ukoliko su dimenzije i do 1000 nm udružene sa ispoljavanjem fizičko-hemijskih osobina različitih u odnosu na strukture istog sastava, ali većih dimenzija, i te sisteme treba razmatrati kao nanosisteme (US FDA, 2014)

Upravo ovako intenzivan rad na definisanju domena nanomedicine i nanomaterijala govori o još intenzivnijem istraživačkom radu i trudu da se saznanja iz ovih oblasti prevedu u realnu kliničku primenu.

Konkretno, nanoterapeutici predstavljaju čitavu paletu struktura, koje su često vrlo kompleksne i multikomponentne. Mogu biti dizajnirani kao nanosistemi za isporuku aktivnih molekula, ili su u pitanju upravo čestice aktivne supstance – tzv. *carrier free* formulacije (suspencije aktivne supstance, formulacije bez nosača). Mogu se klasifikovati prema različitim kriterijumima (veličina, oblik, sastav, poreklo...). Možda je najčešća i najkorisnija podela upravo ona koja se zasniva na njihovom sastavu, i to u sledeće tri grupe (Bisso i Leroux, 2020; Jeevanandam i sar, 2018):

- *Organski nanosistemi*. Predstavnicima ove grupe izrađeni su od komponenata organskog porekla. Ovoj grupi pripadaju liposomi (i slični vezikularni sistemi), nanoemulzije, mikroemulzije, lipidne nanočestice i nanostrukturirani lipidni nosači, micele, dendrimeri, polimerne nanočestice (nanokapsule i nanosfere), konjugati polimera i aktivne supstance, ali i nanosuspencije aktivnih molekula (nanokristalne disperzije i amorfne nanosuspencije).
- *Neorganski nanosistemi*. Ovoj grupi pripadaju metalne nanočestice (Fe, Ag, Au), čestice oksida metala (ZnO, TiO₂), kao i nanostrukturirani sistemi na bazi silicijuma i keramike.
- *Naonomaterijali na bazi ugljenika*. Nanomaterijali na bazi ugljenika su, uprkos tome što se ugljenik povezuje sa organskim sistemima, svrstani u posebnu grupu. Tu su fuleren, karbonske nanocevi, nanovlakna i grafen.

U literaturi se može pronaći i jedna malo šira klasifikacija, koja pored navedenih grupa kao posebnu izdvaja i *nanokompozitne sisteme*, odnosno one koje se sastoje iz nanostrukture različitog porekla (Jeevanandam i sar, 2018).

Ipak, u domenu farmaceutske primene, trenutno su na tržištu mahom prisutni predstavnici organskih nanosistema, što je verovatno posledica jednostavnijih metoda izrade i veće biokompatibilnosti materijala, koji su u najvećem broju slučajeva i biorazgradivi.

1.3. Prednosti nanosistema u odnosu na konvencionalne nosače aktivnih supstanci

Kod velikog broja novosintetisanih/novootkrivenih aktivnih supstanci (uključujući i molekule prirodnog porekla), primetan je trend fizičko-hemijskih karakteristika koje zauzimaju ekstremne pozicije. Obično se to ogleda u veoma niskoj rastvorljivosti tih molekula kako u vodi, tako i u uljima i organskim rastvaračima, što posledično dovodi i do slabe penetracije kroz biološke membrane. Veoma često podležu brzom i intenzivnom metabolizmu u organizmu, poseduju nedovoljnu specifičnost (potencirajući time neželjene efekte), a neretko su podložni i hemijskoj degradaciji pod uticajem faktora sredine. Takva priroda umnogome otežava njihovu primenu, uprkos obećavajućim efektima. Kako je generalni cilj razvoja farmaceutskih oblika lekova da se pacijentima obezbedi odgovarajuća doza/koncentracija lekovite supstance, uz targetiranje željenih organa i tkiva, sa optimalnim odnosom očekivane koristi i bezbednosnog profila, neophodno je iskoristiti i značajno proširiti postojeća znanja u oblasti razvoja nosača/sistema za isporuku lekovitih supstanci. U tom smislu, ustanovljeno je mišljenje, zasnovano na dokazima i akumuliranom znanju, da se primenom nanotehnologije može uspostaviti terapijsko-dijagnostička (teranostička) platforma sa koje se, daljim razvojem, može obezbediti unapređena isporuka. To omogućuju jedinstvene karakteristike nanonosaa u pogledu veličine, oblika i površinskih funkcionalnosti (Mu i sar, 2018; Aboalnaja i sar, 2016; Boyd, 2008).

Navedena očekivanja skopčana su sa izraženim interesovanjem za nanotehnoški pristup u dizajniranju nosača za aktivne supstance, koje su praćene i značajnim ulaganjima (Bosetti i Jones, 2019). Ipak, neke inicijalno postavljene hipoteze, pre svega u kontekstu farmakokinetike i očekivanih terapijskih ishoda u onkologiji, nisu se u potpunosti potvrdile u realnoj kliničkoj primeni, uprkos intenzivnim istraživanjima (Mitragotri i sar, 2017; Dahnier, 2016; Wilhelm i sar,

2016). Međutim, neosporno je da nanosistemi doprinose stabilnosti, utiču na rastvorljivost i preuzimanje aktivnih supstanci od strane ćelija, efikasniji su u prevazilaženju bioloških barijera, povećavajući time biorasplošivost uz smanjenje sistemskih neželjenih efekata. Dodatno, nanosistemi nude značajne mogućnosti u dijagnostici i regenerativnoj medicini (Weltring i sar, 2016; Onoue i sar, 2014; Bamrungsap i sar, 2012). Takođe, smatra se da nanotehnologija pripada „ključnim tehnologijama“ (engl. *key enabling technologies* – KET) koje se se mogu prevesti u inovativne medicinske proizvode tako da odgovore brojnim zdravstvenim izazovima (Gouze i Bosseau, 2013).

Uprkos potencijalima, cena ostaje značajan izazov u proizvodnji nanoterapeutika. Troškovi njihovog razvoja i proizvodnje znatno su veći u poređenju sa ulaganjima koje zahtevaju konvencionalni farmaceutski oblici, što značajno povećava i cenu njihove nabavke. Međutim, malo je sveobuhvatnih studija koje analiziraju ukupne troškove (ne samo one koji se odnose na nabavku leka, već i troškove kupiranja neželjenih reakcija na lekove, komplikacija osnovne bolesti, troškove bolničkog lečenja) i efikasnost terapije. U tom kontekstu, kada se sprovedu kompleksnija socio-ekonomska razmatranja, nanosistemi su u prednosti (Bosetti i Jones, 2019). Na evropskom istraživačkom tlu prepoznat je potencijal koji nudi nanotehnologija u domenu zdravstvene zaštite (uključujući i druge inovativne pristupe, pored isporuke lekovitih supstanci, kao što su genska terapija i terapija matičnim ćelijama). Kao ilustracija može poslužiti podatak da je prema CORDIS bazi (*Community Research and Development Information Service*), počevši od 2008. godine, a zaključno sa majem 2020. godine, Evropska komisija finansirala ukupno 244 projekta koja kao jednu od ključnih reči imaju upravo *nanomedicine*, i to kroz različite projektne okvire FP6, FP7 i Horizont 2020. Samo kroz poslednji – H2020, finansirano je čak 142 projekta (CORDIS, 2020). Ono što se očekuje, jeste intenzivniji rad na transferu rezultata iz laboratorije u realnu primenu, uz konstantnu aktivnost na stvaranju relevantnih vodiča, standarda i propisa (Allan i sar, 2019).

U pogledu razvoja nanosistema koji se primenjuju u farmaciji, svedočimo postojanju i neprekidnom razvoju različitih struktura: liposomi, micle, nanočestice, nanoemulzije, mikroemulzije... (Wagner i sar, 2008). Upravo nanoemulzije predstavljaju sisteme koji su interesantni kako sa fundamentalnog, tako i sa aspekta njihove moguće iskoristljivosti kao multifunkcionalnih koloida (Solans i sar, 2005). U nastavku, više reči će biti upravo o nanoemulzionim sistemima kao nosačima za isporuku aktivnih supstanci.

1.4. Nanoemulzije - koloidne specifičnosti i mogućnosti primene

Istorijski gledano, o nanoemulzijama postoji mnogo akumuliranog znaja. Ipak, nauka o koloidima u ovom konkretnom segmentu ima još neistraženih polja. Brojne su naučne publikacije koji pokrivaju osnovne principe u vezi sa metodama izrade, stabilnošću, ključnim fizičko-hemijskim karakteristikama i mogućnostima primene nanoemulzija (Aboudzadeh, 2020; Gupta, 2020; Shah i sar, 2017; Aboalnaja i sar, 2016; Gupta i sar, 2016; McClements, 2016; Anton i Vandamme, 2011; Mason i sar, 2006; Solans, 2005; Tadros i sar, 2004; McClements, 2004). U nastavku će ukratko biti opisane specifičnosti i najrelevantniji aspekti koji se odnose na nanoemulzije, uz osvrt na nedovoljno razjašnjene segmente.

Nanoemulzije predstavljaju koloidne sisteme iz grupe disperzoida. Sastoje se iz dve tečnosti koje se razlikuju prema polarnosti (međusobno se ne mešaju) – najčešće su to ulje i voda, te odgovarajućih emulgatora/stabilizatora. Jedna tečnost dispergovana je u drugoj, uz formiranje kapljica dijametra najčešće ispod 300 nm – otuda i naziv *nanoemulzije*. Prema tome šta čini unutrašnju, a šta spoljašnju fazu, razlikuju se nanoemulzije tipa *ulje-u-vodi* (U/V) i *voda-u-ulju* (V/U) (Komaiko i McClements, 2016; Anton i Vandamme, 2011). U kontekstu farmaceutске primene (za isporuku lekova), ali i u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, poseban značaj imaju emulzije tipa U/V (Gupta i sar, 2016). Upravo tako mala veličina kapi, visok kapacitet solubilizacije lipofilnih sastojaka i zaštita aktivnih principa, dobra kinetička stabilnost, uz mogućnost izrade različim metodama od biokompatibilnih sirovina, prednosti su koje im se opravdano pripisuju. Kroz literaturu se retko može naići na sveobuhvatni pristup koji povezuje njihove fundamentalne aspekte sa osobinama koje iz toga proističu, čineći ih koloidnim nosačima od posebnog interesa (Gupta, 2020). U nastavku će navedena svojstva biti sistematično obrađena. Pregled osnovnih fizičkih svojstava nanoemulzija dat je u Tabeli 1.3.

Tabela 1.3. Osnovne fizičke karakteristike nanoemulzija (Komaiko i McClements, 2016; Klang i Valenta, 2011)

Izgled	Veličina kapi (dijametar)	Oblik kapi	Stabilnost
Blago zamućene, do beličaste, sa plavim odsjajem	Obično ispod 300 nm, uz relativno usku distribuciju veličina	Sferni	Metastabilne, podložne promenama tokom vremena

1.4.1. Teorija (nano)emulzifikacije

Nanoemulzije, kao disperzije dve tečnosti koje se spontano ne mešaju, predstavljaju termodinamički nestabilne sisteme, što je uslovljeno pozitivnom vrednošću razlike slobodne energije nanoemulzije i sistema koji je sastavljen od razdvojenih faza, i može se opisati sledećom jednačinom:

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad (\text{Jednačina 1.1})$$

ΔG_f – razlika energetske stanja nanoemulzije i stanja kada su uljana i vodena faza razdvojene,

γ – međupovršinski napon između ulja i vode,

ΔA – promena u dodirnoj površini između faza,

ΔS – promena entropije,

T – temperatura.

Usled prisustva emulgatora/stabilizatora, međupovršinski napon se smanjuje (on uvek ima pozitivnu vrednost), ali zbog postojanja većeg broja nanokapi, dodirna međupovršina između dve

faze kod nanoemulzija je znatno povećana. Sa druge strane, formiranjem nanoemulzije, entropija sistema raste ($T\Delta S$ korespondira sa povećanjem broja mogućih uređenja/pozicija koje zauzimaju nanokapi u formiranoj nanoemulziji). Međutim, porast entropije je nedovoljan da bi se prevazišao porast međupovršinskog sloja, tako da ΔG_f ostaje veće od nule, čime nastanak nanoemulzija predstavlja termodinamički nepovoljan proces (za njihov nastanak potrebno je uložiti određenu energiju). Zbog toga su nanoemulzije podložne destabilizacionim mehanizmima koji teže da vremenom dovedu do razdvajanja ulja i vode. Ipak, ovi procesi su dovoljno spori, tako da se ističe da su nanoemulzije kinetički stabilni sistemi (McClements, 2016; Tadros i sar, 2004). U poređenju sa klasičnim emulzionim sistemima, za nastanak nanoemulzija potreban je veći energetski input. Ukoliko se razmatra razlika pritiska sa spoljašnje i unutrašnje strane dispergovane kapljice (Laplasov pritisak, p), uz pretpostavku da ona ima sferni oblik, onda se on može kvantifikovati sledećom jednačinom (Shah i sar, 2017):

$$p = \frac{2Y}{r} \quad (\text{Jednačina 1.2})$$

Y - međupovršinski napon na granici ulje-voda,

r – dijametar kapljice.

Pritisak sa unutrašnje strane zakrivljene površine kapljice je veći kod kapljica manjeg dijametra. Dakle, veća sila je potrebna za nastanak i deformaciju kapljica manjeg dijametra. Kako se za formiranje nanoemulzija, pored primene fizičkog rada, u sistem dodaju i surfaktanti i kosurfaktanti koji smanjuju međupovršinski napon, oni smanjuju potrebno ulaganje fizičkog rada u toku nanoemulzifikacije.

1.4.2. Stabilnost nanoemulzija

Uopšteno uzevši, stabilnost nanoemulzije može se opisati kao odolevanje nastanku promena tokom vremena. Narušavanje fizičke stabilnosti najčešće može biti posledica koalescencije, Ostvaldovog „sazrevanja“ (engl. *Ostwald ripening*) i, finalno, razdvajanja pod dejstvom gravitacione sile. Ipak, postojanje filma surfaktanata odgovarajuće debljine na površini kapljice prevenira koalescenciju, a mala veličina dispergovanih kapi čini da gravitaciona sila nema značajan uticaj na stabilnost nanoemulzija jer joj se Braunovo kretanje može efikasno odupreti (Mason, 2006; Tadros i sar, 2004). Međutim, budući da su nanoemulzije polidisperzni sistemi, osnovni izazov dugoročnoj fizičkoj stabilnosti predstavlja Ostvaldovo sazrevanje – povećanje prosečne veličine dispergovanih kapljica kao posledica difuzije molekula ulja sa manjih kapljica na veće (McClements, 2011). Ovaj proces zasniva se na različitoj rastvorljivosti malih uljanih kapi u odnosu na one veće. Razlika u rastvorljivosti kapi disperzne faze u zavisnosti od dijametra kvantifikovana je Kelvinovom jednacjom (Tadros, 2013):

$$S(r) = S(\infty) \frac{2\gamma V_m}{rRT} \quad (\text{Jednačina 1.3})$$

$S(r)$ - rastvorljivost uljane kapi dijametra r ,

$S(\infty)$ - rastvorljivost uljane kapi velikih dimenzija,

γ - međupovršinski napon ulje-voda,

V_m - molarni volumen ulja,

r – radijus kapljice,

R - univerzalna gasna konstanta,

T - apsolutna temperatura.

Ako se posmatra odnos rastvorljivosti dve kapljice čiji su radijusi r_1 i r_2 ($r_1 < r_2$), onda jednačina dobija sledeći oblik:

$$\frac{S(r_1)}{S(r_2)} = \frac{e^{\frac{2\gamma V_m}{r_1 RT}}}{e^{\frac{2\gamma V_m}{r_2 RT}}} \quad (\text{Jednačina 1.4})$$

Odnosno:

$$\ln \frac{S(r_1)}{S(r_2)} = \frac{2\gamma V_m}{RT} \cdot \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right) \quad (\text{Jednačina 1.5})$$

Kako funkcija $\ln \frac{S(r_1)}{S(r_2)}$ može imati samo pozitivne vrednosti, postaje jasno da je rastvorljivost kapi manjeg radijusa (r_1) značajno veća u odnosu na rastvorljivost kapi većeg radijusa (r_2). Povećanje rastvorljivosti ulja sa smanjenjem veličine kapljice znači da je veća koncentracija rastvorenih molekula ulja u vodenoj sredini oko malih kapljica, nego oko većih. Prateći koncentracioni gradijent, molekuli ulja imaju tendenciju da se kreću ka većim kapljicama, što bi, teorijski, dovelo do potpunog kondenzovanja uljanih kapi u jednu „veliku kap“, tj. faze nanoemulzije bi se razdvojile (Tadros i sar, 2004). Ipak, u realnosti je ovaj proces vrlo spor - fenomen „stapanja“ svih kapljica se ne sreće jer se brzina Ostvaldovog sazrevanja smanjuje sa povećanjem radijusa kapi, kao i smanjenjem međupovršinskog napona. Upravo ovaj poslednji faktor govori o važnosti pravilnog odabira ekscipijensa (pre svega stabilizatora – surfaktanata i polimera) i njihovog međusobnog odnosa (Tadros, 2013). Imajući u vidu i da je molarni volumen ulja direktno proporcionalan njegovoj rastvorljivosti u vodi, kako bi se obezbedila efikasna kinetička barijera Ostvaldovom sazrevanju, sastav masne faze takođe treba pažljivo razmotriti (Wooster i sar, 2008). Sama brzina Ostvaldovog sazrevanja se može kvantifikovati prateći promenu kubne vrednosti dijametra kapljice u funkciji vremena. Funkcija ima oblik $y = kx + n$, i koeficijent k predstavlja brzinu rasta kapljica (Tadros, 2013). Uzevši sve u obzir, nanoemulzije, iako su termodinamički nestabilne, smatraju se kinetički stabilnim disperznim sistemima (Anton and Vandamme, 2011). Dodatno, zbog tako dugoročne fizičke stabilnosti i odolevanju brzim promenama strukture, u literaturi se navodi i da su nanoemulzije sistemi koji se približavaju termodinamičkoj stabilnosti („approaching thermodynamic stability“, Tadros i sar, 2004).

Posmatrano sa fundamentalnog aspekta, 2 su tipa sila koja su uključena u interakcije kapi nanoemulzija i važne su za održavanje stabilnosti:

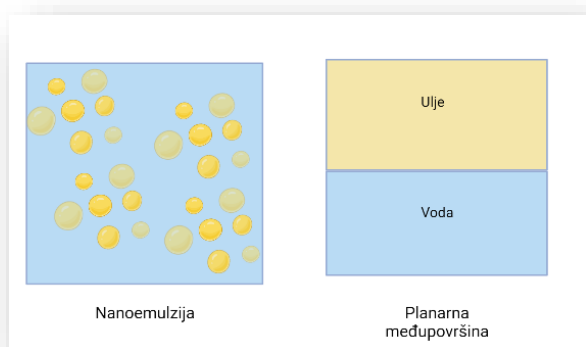
- privlačne interakcije dugog dometa (odgovorne za koalescenciju): Van der Waals-ove (Londonove) sile i
- odbojne sile (kratkog dometa), koje potiču od sloja stabilizatora na površini dispergovanih kapljica, i mogu poticati od sterne, elektrostatičke ili elektrosterne stabilizacije.

Ukoliko privlačne interakcije nadvladaju odbojne sile, dolazi do flokulacije. Sa druge strane, ukoliko film stabilizatora ne pokriva površinu kapi uniformno, dolazi do koalescencije (Klang i Valenta, 2011). Ipak, treba imati u vidu da nanoemulzije predstavljaju *soft matter* nanosisteme, te da, zbog mobilnosti međupovršinskog sloja, interakcije i kontakti među kapljicama pripadaju sferi tzv. „klizavih“ interakcija. Moguća je rekonfiguracija molekula adsorbovanih na površini kapi, što, uz mali broj dostupnih tehnika za karakterizaciju njihove pokretljivosti, značajno komplikuje proces istraživanja koloidnih interakcija kod nanoemulzija (Helgeson, 2016).

1.4.2.1. Savremeni nalazi istraživanja međupovršinskog sloja u kontekstu stabilnosti nanoemulzija

Prva empirijska razmatranja stabilnosti tečnih disperzija, značaja međupovršinskog sloja i ravnoteže interakcija koje se dešavaju na granici faza desila su se još na samom početku 20. veka, i veliki doprinos dali su naučnici Harkins i Langmuir (Harkins i sar, 1917; Langmuir, 1917). Međutim, do danas nije uspostavljena suštinska korelacija između informacija o strukturnim karakteristikama međupovršine kapi nanoemulzija i stabilnosti sistema, a još manje se zna o vezi strukture i funkcije pri odabiru surfaktanata za formulaciju određene nanoemulzije (Hensel i sar, 2017). Glavna prepreka se verovatno ogleda u kompleksnosti tečno-tečnog međupovršinskog sloja i relativne nedostupnosti tehnika kojima se na molekularnom nivou može izvršiti analiza. Zapravo, tek su istraživanja u poslednjih deset godina pokazala da se međupovršinski sloj nanokapi može sagledati sa molekularnom preciznošću (De Aguiar i sar, 2011). Iz tog razloga, vrlo je interesantno prokomentarisati i novije eksperimentalne rezultate u domenu karakterizacije međupovršinskog sloja nanoemulzija, koji su prilično oprečni trenutno prihvaćenim teorijama.

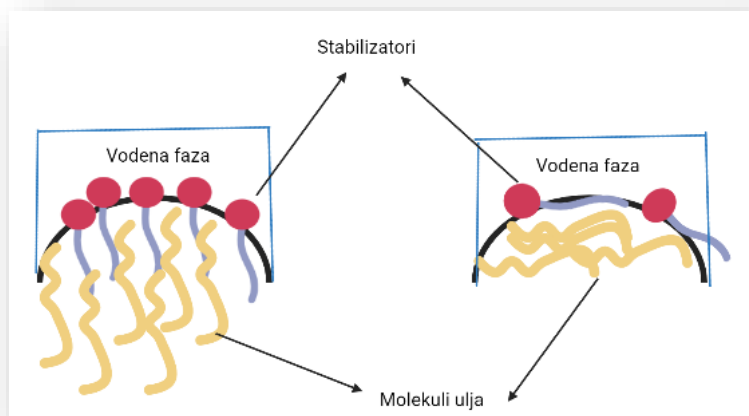
Tradicionalno shvatanje, koje se bazira na proučavanju interakcija na makro nivou i proširenim planarnim sistemima - međupovršinama dve kontinuirane tečnosti koji prevazilaze nano- i mikroskalu (Slika 1.2), te njihovim transponovanjem na nanosisteme, podrazumeva da je za adekvatnu stabilizaciju nanoemulzija potrebno obezbediti gusto geometrijsko pakovanje stabilizatora na međupovršini (Lyklema, 2005). Međutim, poslednje studije pokazuju da zakrivljena međupovršina nanometarskih dimenzija (kakva je kod nanoemulzija) eksplicira znatno drugačiju molekularnu organizaciju u odnosu na planarne međupovršine. Na primer, pokazano je da se na međupovršini nanoemulzija formiraju vrlo „razblaženi“ monoslojevi (ne gusto pakovani) surfaktanata, te da je i smanjenje međupovršinskog napona manje u poređenju sa planarnim sistemom istog hemijskog sastava. Upravo ova niža gustina posledica je drugačije molekularne organizacije na međupovršini u odnosu na ono što je tradicionalno razmatranje.



Slika 1.2. Prikaz različite organizacije međupovršin kod: nanoemulzija (zakrivljena nanopovršina na međufazi - levo); planarne međupovršine između ulja i vode (desno)

Naime, uvreženo je mišljenje da se molekuli surfaktanata na zakrivljenoj površini raspoređuju normalno u odnosu na međupovršinski sloj, tako što su polarni segmenti surfaktanata u kontaktu sa vodenom fazom, dok su nepolarni „repovi“ duboko u masnoj fazi. Međutim, primenom savremenih tehnika, kao što je spektroskopija rasejanja sume vibracionih frekvencija (engl. *vibrational sum-frequency scattering spectroscopy*), pokazano je da je molekularna orijentacija na međufazi zakrivljenih nanopovršina zapravo sasvim drugačija. Molekuli surfaktanata su orijentisani tako da su glave normalne na međupovršinu (isto kao kod planarnih sistema), dok su hidrofobni lanci orijentisani paralelno u odnosu na međupovršinski sloj, delom u kontaktu i sa vodenom fazom, kao i molekuli ulja u prvim redovima do međupovršinskog sloja. Takva orijentacija čini da jedan molekul amfifila zauzima veću površinu međufaze, odnosno da je gustina amfifila na međupovršini

niža u odnosu na očekivano (na osnovu poznavanja planarnih sistema) (Slika 1.3) (Hensel i sar, 2017; De Aguiar i sar, 2011).



Slika 1.3. Shematski prikaz tradicionalnog razmatranja molekularne orijentacije na međupovršinskom sloju nanoemulzija (levo) i savremenih nalaza o organizaciji molekula na međupovršini (desno)

Objašnjenje za ovakav fenomen može se dati praćenjem vremena potrebnog za formiranje međupovršinskog ravnotežnog stanja (sa minimumom slobodne energije). U slučaju planarne/statičke međupovršine, dinamičkim merenjem međupovršinskog napona, dobija se da je vreme potrebno za uspostavljanje ravnotežnog stanja reda veličine nekoliko sekundi. Sa druge strane, promena međupovršinskih karakteristika kod nanoemulzija, koja se dešava usled Braunovog kretanja i rotiranja kapljica, dešava se na vremenskoj skali sa jedinicama izraženim u milisekundama. Dakle, da bi se ostvarila termodinamička ravnoteža na međupovršini, potrebno je više vremena u odnosu na ono koje zahteva promene u međupovršinskoj strukturi nanoemulzija, te se to stanje onda ne može nikada postići. Zato međupovršina nanoemulzija ostaje sa niskom gustinom adsorbovanih amfifila, nije u termodinamički ravnotežnom stanju, ali jeste u konformaciji koja je entropijski i termodinamički najpovoljnija pri datim uslovima (De Aguiar i sar, 2011). Sugerisano je da upravo konformacija i dužina hidrofobnih lanaca surfaktanata i njihove interakcije sa susednim molekulima imaju važnu ulogu u stabilizaciji nanoemulzija, uključujući i efekat na oblik i veličinu nastalih kapljica (Hensel i sar, 2017).

Na osnovu poznavanja planarnih sistema, uvrežen je stav da sa povećanjem zakrivljenosti međupovršine (tj. smanjenjem poluprečinka kapi) dolazi do povećanja specifične površine, a time i površinske gustine stabilizatora. Međutim, istraživačka grupa dr Sylvie Roke je kroz niz radova koji su uključili molekularnu analizu međupovršinskih slojeva nanoemulzija primenom savremenih tehnika, u proteklih nekoliko godina pokazala da gustina surfaktanata na međupovršini nije presudna za stabilizaciju sistema, već je to kombinovani uticaj hemijske strukture stabilizatora i raznotežne interakcije između ulja, vode i surfaktanata (Smolentsev i Roke, 2020; Zdrali i sar, 2019; Zdrali i sar, 2017). Interesan je nalaz da je gustina stabilizatora na međupovršini nanoemulzija stabilisanih nenaelektrisanim amfifilima višestruko veća u poređenju sa jonskim stabilizatorima (verovatno kao posledica različitog stepena hidratacije polarnih glava i međusobnog odbijanja istoimenih naelektrisanja kod naelektrisanih stabilizatora), ali je, uprkos tome, stabilnost takvih nanoemulzija manja. Takođe, ukoliko masna faza ima mogućnost stvaranja vodoničnih veza sa vodom, doći će do formiranja slabo orijentisanog polarizovanog sloja vode na površini kapi, što će dodatno doprineti repulziji kapi i stabilnosti nanoemulzije. Navedeni eksperimentalni podaci upravo govore u prilog potrebi za revidiranjem klasičnog shvatanja međupovršinskog sloja kod nanosistema (Zdrali i sar, 2017).

Pored toga, u formulaciji emulzionih sistema, prilikom odabira surfaktanata, tradicionalno se sledi Bankroftovo pravilo (engl. *Bancroft rule*), prema kome se emulgator bira tako da bude „rastvorljiv“ u spoljašnjoj fazi emulzije. Međutim, poređenjem stabilnosti emulzionih sistema sa dispergovanim kapljicama mikrometarskih veličina sa nanoemulzijama, uočeno je da je ovo pravilo primenjivo samo na mikrometarske dimenzije, a ne i za međupovršinu nanoemulzija. Konkrento, na primeru lipofilnog emulgatora *Span 80* (sorbitan monooleat, HLB = 4,3), pokazano je da vrši stabilizaciju nanoemulzija i to tipa V/U (očekivano), ali i tipa U/V, ali da pri tome zauzima različite konformacije na međupovršini. Ovakva pojava verovatno je posledica promene u odnosu interakcija na međupovršini koja se dešava sa smanjenjem veličine kapi (Zdrali i sar, 2019).

Ova vrsta eksperimentalnog pristupa koja podrazumeva analizu međupovršinskog sloja na molekularnom nivou tek je od nedavno moguća. Radi donošenja univerzalnih zaključaka, svakako je neophodno upotpuniti eksperimentalne rezultate uz veći obuhvat komponenata masne faze, surfaktanata i kosurfaktanata, uz poređenje rezultata dobijenih kod nanoemulzija i mikroemulzija – kao nanosistema koji su, u termodinamičkom smislu, suštinski različiti (De Aguiar i sar, 2010).

1.4.3. Metode izrade nanoemulzija i mehanizmi uključeni u njihov nastanak

Priprema disperzija sa nanokapima sa sobom nosi i potrebu da se savlada velika dodirna međupovršina između 2 faze, a koja je značajno veća u odnosu na međupovršinu kod konvencionalnih emulzija. To zahteva veliki unos energije u sistem. Možda se na prvi pogled ne čini tako, ali energetski minimum potreban za formiranje nanoemulzije je isti, bez obzira na metodu njene izrade. Energija se može uložiti u vidu fizičkog rada ili termodinamički - promenom ravnotežnog stanja kroz promenu temperature ili sastava sistema. Minimum energije koji je potrebno uložiti kako bi se obezbedila nanoemulzija sa kapima unutrašnje faze radijusa r opisuje se sledećom jednačinom (Helgeson i sar, 2016):

$$E_{min} \sim 3\lambda(\phi_d)^3 r \quad (\text{Jednačina 1.6})$$

E_{min} – energetski minimum potreban za nastanak nanoemulzije sa kapima unutrašnje faze radijusa r ,

γ - međupovršinski napon ulje-voda,

ϕ_d – volumenska frakcija dispergovane faze.

Iako možda terminološki nije najbolje rešenje (upravo zbog činjenice da količina energije koja se unese u sistem ne ovisi o načinu njegove izrade), metode koje se koriste za dobijanje nanoemulzija dele se u 2 grupe – visokoenergetske (one koje se zasnivaju na mehaničkom radu) i niskoenergetske (one koje se baziraju na termodinamičkim promenama) (Helgeson i sar, 2016).

Najčešće korišćene viskokoenergetske metode su homogenizacija pod visokim pritiskom, mikrofluidizacija i ultrasonikacija. Priprema nanoemulzija ovim metodama je dvostepeni proces – prvo se vrši izrada grubih disperzija koje se potom propuštaju kroz uređaje koji obezbeđuju intenzivne disruptivne sile kako bi se kapi unutrašnje faze svele na nanometarske veličine. Sa druge strane, niskoenergetske metode zasnivaju se na fizičko-hemijskim osobinama samih komponenata nanoemulzija, obezbeđujući nastanak finih nanoemulzija unutar tačno definisanih granica međusobnih masenih odnosa ulja, vode i stabilizatora. Za izradu nisu potrebni sofisticirani uređaji, već je dovoljna mehanička energija koju obezbeđuju obične mešalice, dok se dodatna energija potrebna za nastanak nanokapi obezbeđuje kroz promenu ravnotežnog stanja sistema – uticajem na temperaturu ili sastav (Helgeson, 2016; McClements, 2011). Među niskoenergetskim metodama izrade, u literaturi se izdavaju nekoliko postupaka:

- spontanoemulgujući postupak (engl. *spontaneous emulsification*),
- metod inverzije faza (engl. *emulsion phase inversion*), i
- metod temperaturne inverzije faza (engl. *phase inversion temperature*).

Iako je ovo uobičajena podela, određeni literaturni izvori daju i nešto drugačiju klasifikaciju, smatrajući spontanoemulgujući postupak i metod inverzije faza kao jedan te isti, uz razlike samo u redosledu dodavanja. Zbog brojnih pogodnosti koje odlikuju niskoenergetske metode izrade (jednostavnost postupka, pogodnost za inkapsulaciju molekula osetljivih na ekstremnije uslove izrade (npr. povišena temperatura i mehanički stres), uz mogućnosti *scale-up-a*), značajan istraživački interes usmeren je na razumevanje i razjašnjavanje fundamentalnih aspekata niskoenergetske nanoemulzifikacije. Mnogi principi koji stoje u njihovoj osnovi još uvek su nedovoljno poznati, ali pokazano je da su sve navedene metode vođene jednim zajedničkim mehanizmom – brzim premeštanjem molekula surfaktanata iz jedne u drugu fazu isključivo na osnovu fizičko-hemijskih afiniteta. Dakle, diferencijacija na različite niskoenergetske postupke dobijanja nanoemulzija nije u vezi sa različitim bazičnim principima nanoemulzifikacije, već je zasnovana na redosledu dodavanja faza (Anton i Vandamme, 2009).

1.4.3.1. Spontanoemulgujući postupak kao „niskoenergetski” metod za dobijanje nanoemulzija

Spontanoemulgujući postupak u dobijanju nanoemulzija, kao i sve niskoenergetske metode, prevashodno se zasniva na fizičko-hemijskim karakteristikama ekscipijenasa. Pripada grupi izotermalnih metoda – emulzifikacija i odvija se na sobnoj temperaturi, bez zagrevanja. Postupak podrazumeva odvojenu pripremu dve faze:

1) smeše ulja i surfaktanata

i

2) vodene faze.

Vodena faza se najčešće sastoji samo iz prečišćene vode, ili predstavlja rastvor pufera. Smeša masne faze i surfaktanata se na sobnoj temperaturi, uz kontinuirano mešanje, postepeno dodaje vodenoj fazi (Slika 1.4).



Slika 1.4. Shematski prikaz izrade nanoemulzije primenom spontanoemulgujućeg postupka

Predloženi mehanizam koji vodi do nastanka nanoemulzije podrazumeva da tokom kontakta smeše ulja i surfaktanata sa vodenom fazom nastaje tranziciona faza (trokomponentni sistem) koji se brzo ruši uz „spontano” formiranje malih uljanih kapi oivičenih slojem stabilizatora (surfaktanta). Da bi zaista došlo do formiranja nanoemulzije, neophodno je primeniti hidrofilni surfaktant, i to u

odgovarajućem odnosu sa masnom fazom, jer je narušavanje trokomponentnog sistema zasnovano na većem afinitetu stabilizatora ka vodenoj fazi. Prelazeći u vodenu fazu, surfaktant sa sobom nosi i delove masne faze, i solubilizuje ih u vodenoj fazi. Iako je ovaj mehanizam prihvaćen, u literaturi još uvek nije u potpunosti razjašnjena sama struktura tog tranzicionog (trokomponentnog) sistema. Najčešće se navodi da kao tranziciona faza nastaje bikontinualna mikroemulzija. Međutim, eksperimentalni podaci pokazuju da to nije uvek slučaj (Komaiko i McClements, 2014; Anton i Vandamme, 2011). Svakako, ta prelazna faza se može formirati samo u tačno određenom i uskom opsegu odnosa ulje-surfaktant-voda.

1.4.3.2. Odabir ekscipijenasa za izradu nanoemulzija niskoenergetskim metodama

Uporedo sa odabirom adekvatnog postupka izrade/proizvodnje, i podešavanjem procesnih parametara, uspešnost formulacije nanoemulzije, neovisno o njenom putu primene, suštinski je u vezi sa odabranim ekscipijensima, a prevashodno emulgatorima i masnom fazom, te njihovom interakcijom sa ostalim aditivima (konzervansi, helatna sredstva, reološki modifikatori...), ali i aktivnom supstancom (Dasgupta i sar, 2019).

Emulgatori

Emulgatori imaju ključnu ulogu u formiranju i stabilizaciji nanoemulzija kroz niskoenergetske metode. Njihova amfifilna struktura omogućuje da se adsorbuju na međupovršini, uz formiranje omotača koji sprečava agregaciju formiranih kapi. Iako se možda na prvi pogled čini da je sloj stabilizatora oko nanokapi jedan uniformni „pokrivač“, u realnosti, on se sastoji iz različitih molekula (ne samo surfaktanata/stabilizatora, već i dela masne faze i drugih komponenata sistema) u odgovarajućoj organizaciji i kompleksnim interakcijama. Priroda i organizacija međupovršinskog sloja (debljina, naelektrisanje, fluidnost i mikrostrukturna organizacija, reološka svojstva, permeabilnost) umnogome određuju stabilnost nanoemulzije i mogućnosti njene primene (McClements, 2011).

Ponuđene su brojne klasifikacije surfaktanata kako bi se omogućio pravilan i racionalan odabir u stabilizaciji nanoemulzionih sistema. Karakteristike međusloja i mogućnost stabilizacije zavise od geometrije molekula surfaktanta i njegovog hidrofilno-lipofilnog balansa (HLB broja). Upravo jedan od najvažnijih faktora koji utiču na nanoemulzifikaciju kroz spontanoemulgujući postupak predstavlja pakovanje molekula surfaktanata na međusloju ulje-voda, što je definisano molekularnom geometrijom određenog surfaktanta, okarakterisanom kroz vrednosti kritičnog parametra pakovanja (engl. *critical packing parameter* - *CPP*), koji se može odrediti prema sledećoj jednačini (Komaiko i McClements, 2016):

$$CPP = \frac{V}{l_c \cdot a} \quad (\text{Jednačina 1.7})$$

V – volumen jednog alkil lanca,

l_c – dužina alkil lanca,

a – poprečni presek polarne glave.

Smatra se da za $CPP < 1$, surfaktanti imaju tendenciju da obrazuju sferne agregate, za $CPP \approx 1$ formiraju dvoslojeve, dok se kod onih sa $CPP > 1$ očekuje formiranje reverznih micela. Razlike u kritičnom parametru pakovanja utiču i na karakteristike međusloja i pokretljivost molekula surfaktanata, što ima direktne implikacije na mogućnosti formiranja finih nanokapi kroz spontanoemulgujući proces (Guttoff i sar, 2015).

Dosadašnji eksperimenti pokazuju da su surfaktanti tipa malih molekula (npr. polisorbati i estri sorbitana i masnih kiselina) i fosfolipidi efikasniji u stabilizaciji nanoemulzija (Tabela 1.4), verovatno zbog veće mobilnosti i bržeg pokrivanja novonastalih međupovršina (McClements,

2016). Fosfolipidi su od posebnog interesa zbog prirodnog porekla i veće biokompatibilnosti, i stoga podesni za stabilizaciju nanoemulzija za specifične puteve primene (npr. parenteralni) (Klang i Valenta, 2011).

Pored geometrije molekula, HLB vrednost primenjenog stabilizatora (ili njihove smeše) takođe je značajna za uspešnu nanoemulzifikaciju kroz niskoenergetski postupak. Kako su hidrofilne nanoemulzije najčešći izbor u kontekstu nosača lekovitih supstanci, potrebno je da odabir stabilizatora bude takav da oni budu hidrofilni, kako bi se favorizovao njihov prelazak iz masne u vodenu fazu, ali opet ne isuviše hidrofilni, kako se ne bi kompromitovala njihova rastvorljivost u ulju. Dodatno, vrlo visoka hidrofilnost mogla bi izazvati i desorpciju surfaktanta sa površine nanokapi, dovodeći u pitanje dugoročnu stabilnost formulacije. U praksi, obično se HLB vrednostima između 13 i 15 postiže željeni efekat. Ipak, to svakako ne može biti univerzalno pravilo, jer karakteristike masne faze u određenoj meri diktiraju tip i potreban udeo surfaktanta kako bi se dobila stabilna nanoemulzija (Komaiko i McClements, 2016; Chang i McClements, 2014).

U kontekstu niskoenergetske nanoemulzifikacije, vrlo važno mesto zauzima i koncept hidrofilno-lipofilne devijacije (engl. *hydrophilic-lipophilic deviation*, HLD), koji se može koristiti za određivanje tendencije surfaktanta da formira mikro- ili nanoemulzije, kako bi se, pri određenim uslovima, dobila optimalna formulacija sa fleksibilnim međupovršinskim filmom. Generalno, HLD govori o afinitetu surfaktanta prema jednoj od faza (masnoj ili vodenoj), ali pri datim uslovima sredine – zavisi od polarnosti ulja, koncentracije soli, temperature i karakteristika samog surfaktanta. Vrednost HLD se može odrediti prema sledećoj formuli (Komaiko i McClements, 2016):

$$\text{HLD} = f(S) - k \cdot \text{EACN} - \alpha(T-25) + C_c \quad (\text{Jednačina 1.8})$$

$f(S)$ – funkcija saliniteta (veće vrednosti su u slučaju jonskih surfaktanata),

k , α , C_c – konstante koje zavise od tipa surfaktanta,

EACN – efektivni alkalni karbonski broj (engl. *effective alkan carbone number*) – ukazuje na polarnost ulja,

T – temperatura u °C.

Kada je $\text{HLD} = 0$, smatra se da postoji balans, tj. surfaktant ima podjednaku tendenciju ka masnoj i vodenoj fazi (nema zakrivljenosti međupovršine). Očigledno, za dati surfaktant, HLD vrednost se može menjati promenom uslova sredine, ovisno o tome šta se želi postići. Na ovaj način, povezuju se različiti koncepti u opisivanju površinski aktivnih materija i interakcija u sistemima ulje-voda-surfaktant, što je značajan element formulacione strategije (Kunz i sar, 2009). Na primer, da bi HLD vrednost bila 0, u slučaju vrlo nepolarnog ulja (viša vrednost EACN), može se ili povećati salinitet (čime se smanjuje rastvorljivost surfaktanta u ulju), ili se može primeniti vrlo hidrofoban surfaktant (na osnovu C_c vrednosti). Međutim, treba imati u vidu da, ukoliko se želi formulirati U/V nanoemulzija, ciljna vrednost HLD treba biti manja od 0 (surfaktant ima veću tendenciju ka vodenoj fazi), odnosno, u slučaju V/U nanoemulzija, veća od 0 (surfaktant ima veću tendenciju ka masnoj fazi) (Komaiko i McClements, 2016).

Upravo dokazi o korespondentnosti između procenjene zakrivljenosti međupovršine, molekulskog pakovanja i hidrofilno-lipofilnog balansa i njihovog uticaja na stabilnost formulacije značajan su korak za suštinsko teorijsko potkrepljenje empirijskih pravila koja se široko koriste tokom osmišljavanja formulacija (Kunz i sar, 2009).

Tabela 1.4. Najčešće korišćeni tipovi emulgatora za stabilizaciju nanoemulzija izrađenih niskoenergetskim postupcima

Mali molekuli	Fosfolipidi
Polisorbati (Polisorbat 80, 60, 40, 20) Estri sorbitana u kombinaciji sa polisorbatima	Lecitin (soje, jajeta)

Masna faza

Odabir masne faze ima uticaj kako na mogućnost formiranja nanoemulzije primenom niskoenergetske metode, tako i na veličinu kapi, kao i na fizičku stabilnost finalne formulacije. Hemijska struktura, viskozitet, površinski napon i polarnost ulja faktori su koje treba promišljeno razmotriti (Azmi i sar, 2019; Komaiko i McClements, 2016). Ulja manje polarnosti (manje rastvorljivosti) generalno su pogodnija sa aspekta stabilnosti, jer su manje podložna Ostvaldovom sazrevanju, dok niži viskozitet masne faze (tj. manja razlika u viskozitetu masne i vodene faze) favorizuje nanoemulzifikaciju dajući stabilnije nanoemulzije sa manjom prosečnom veličinom kapi. Sa druge strane, međupovršinski napon na granici ulje-voda je niži kada se u formulaciji koristi ulje veće polarnosti (Tadros i sar, 2004; Chanamai i sar, 2002). U tom kontekstu, važno je razmotriti EACN, kao parametar koji ukazuje na stepen hidrofobnosti ulja – veće vrednosti EACN odnose se na ulja manje polarnosti (veće hidrofobnosti). Na primer, ulja kao što su maslinovo, kukuruzovo, sojino ili trigliceridi srednje dužine lanca imaju EACN u opsegu 16-20, dok terpenska ulja imaju znatno niže vrednosti EACN – oko 3. Vrednost EACN ovisi o broju ugljenikovih atoma (dužini lanca), te prisustvu polarnih grupa, ili nezasićenih veza (Bouton i sar, 2009; Do i sar, 2009; Acosta i sar, 2003). Poznavanje polarnosti ulja može značajno olakšati razumevanje potencijalnih interakcija na granici faza.

Ipak, iako postoji određen konsenzus, sve je potrebno razmatrati u kontekstu konkretne kombinacije sastojaka, odnosno praćenjem faznog ponašanja u ternarnim sistemima kroz konstrukciju ternarnih dijagrama (Komaiko i McClements, 2016). Takođe, sastav ulja može biti složen, pa je, u takvim situacijama, potrebno razmotriti i relativan doprinos svake od komponenti masne faze finalnim karakteristikama formulacije, što predstavlja zahtevan element preformulacionih istraživanja.

Aktivna supstanca

Na kraju, i prisustvo aktivne supstance i njeno particiono ponašanje moraju se uzeti u obzir. Lokalizacija aktivne molekule ovisi pre svega o njenoj lipofilnosti/hemijskoj strukturi, i može se odraziti na stabilnost nanoemulzije i na neke od njenih fizičko-hemijskih osobina (npr. veličina dispergovanih kapi, naelektrisanje, gustina filma emulgatora...). Kod U/V nanoemulzija, hidrofobne molekule se obično nalaze rastvorene u uljanim kapima, ili u regionu nepolarnih repova surfaktana. Aktivne supstance sa amfifilnim svojstvima biće predominantno raspoređene u međupovršinskom sloju. U prisustvu viška surfaktana koji formiraju micle u vodenoj fazi, aktivna supstanca može biti i na ovaj način solubilizovana (u micelama/vezikulama). Particiono ponašanje aktivne supstance je značajno analizirati, jer se odražava na kinetiku oslobađanja, ali i na hemijsku stabilnost (Klang i Valenta, 2011).

1.4.4. Optičke karakteristike nanoemulzija

Nanoemulzije se već golim okom (vizuelno) mogu prepoznati. Veličina dispergovanih kapljica unutrašnje faze značajno je manja u odnosu na talasnu dužinu svetlosti iz vidljivog dela spektra. To čini da rasipanje svetlosti nije intenzivno, uprkos razlikama u indeksu refrakcije između masne i vodene faze, pa nanoemulzije izgledaju skoro transparentno ili blago zamućeno (posebno kada je dijametar dispergovanih kapljica ispod 100 nm). Ova osobina se i praktično može izmeriti, određivanjem optičke transparentije primenom UV-Vis spektrofotometrije. Međutim, kada se

transparencija ispituje u UV delu spektra, vrednosti talasne dužine su bliske dijametru kapljica, pa je rasipanje svetlosti intenzivnije. Poznato je i da nanoemulzije imaju plavičasti odsjaj po ivicama, što je posledica Tindalovog efekta. Svetlost iz plavog dela spektra ima manje talasne dužine, bliska je UV delu spektra (kao i dijametru dispergovanih nanokapi), pa se intenzivnije rasipa, dovodeći do formiranja plavičastog odsjaja. Poznavanje ovih osobina je vrlo praktično sa aspekta praćenja stabilnosti nanoemulzija, odnosno procene polidisperziteti ili agregacije nanokapi. Naime, praćenjem transmisije svetlosti iz vidljivog dela spektra (pri konstantnoj talasnoj dužini) tokom vremena može ukazati na određene promene u fizičkoj stabilnosti. Dodatno, više zamućeni nanoemulzioni sistemi ukazuju na širi indeks polidisperznosti, tj. prisustvo kapi čiji je dijametar blizak 1 mikrometru (Mason i sar, 2006).

1.4.5. Reološka svojstva

Nanoemulzije su njutnovske tečnosti/sistemi, a njihov viskozitet uslovljen je udelom vode, odnosno udelom i tipom odabranih stabilizatora i masne faze. Viskozitet je svojstvo značajno za stabilnost nanoemulzije i brzinu oslobađanja aktivne supstance (Lovelyn i Attama, 2011). Ukoliko to put primene zahteva, može se podešavati i dodatkom reoloških modifikatora. Određena reološka svojstva nanoemulzija uslovljena su i malim dimenzijama dispergovanih kapljica, zavise od sastava, strukture kapi i karakteristika međufaze, odnosno tipa interakcija između kapljica. Interesantno je napomenuti da se viskozitet i elastičnost nanoemulzija mogu menjati i bez promene sastava, samo varijacijom u veličini dobijenih kapi (Gupta, 2020; Mason i sar, 1999). Takođe, treba istaći i da mikroviskozitet (viskozitet međupovršinskog sloja) umnogome utiče na fizičku stabilnost nanoemulzija, kao i na kinetiku oslobađanja inkapsuliranih aktivnih molekula (Klang i Valenta, 2011).

1.4.6. Nanoemulzije kao formulacije za slaborastvorljive molekule: mogućnosti primene

Najčešći vid primene nanoemulzija u biomedicinskoj sferi ogleda se u dizajniranju U/V formulacija, što omogućuje rastvaranje/solubilizaciju hidrofobnih/slaborastvorljivih molekula u dispergovanoj fazi. Na taj način, nanoemulzije ostvaruju ulogu sistema za transport i isporuku hidrofobnih aktivnih supstanci, uz visok nivo biokompatibilnosti sa fiziološkim okruženjem (*in vivo*). Hidrofobne molekule mogu biti rastvorene u uljanoj fazi, unutar nanoemulzionih kapljica, ili pak, ukoliko rastvorljivost u ulju nije značajna, mogu biti prisutne i na međupovršinskom sloju, solubilizovane zahvaljujući prisustvu surfaktanata. Usled dostupnosti u molekulskoj formi (a time i lakše permeacije), raspoloživost aktivnih supstanci značajno je unapređena. Dodatno, zahvaljujući maloj veličini dispergovanih kapi i postojanju površinski aktivnih materija na međufazi, nanokapi obezbeđuju unapređenu penetraciju aktivnih materija kroz biološke membrane. Adekvatnim odabirom masne faze i tipa stabilizatora, moguće je dizajnirati nanoemulzije namenjene različitim putevima primene: oralni, dermalni, okularni, parenteralni, idr. Neki autori ih smatraju „alatkom“ koja može omogućiti lakšu penetraciju aktivne supstance kroz tkiva, dopremanje do željenje ćelije, uz zaštitu od spoljašnjih faktora (Gupta, 2020; Helgeson, 2016; Komaiko i McClements, 2016; Klang i Valenta, 2011; Anton i Vandamme, 2009; Tadros i sar, 2004). Zaštita od hemijske degradacije je posebno važna kada se radi o izrazito fizičko-hemijski fragilnim molekulima. To se može postići ne samo solubilizacijom aktivne supstance u dispergovanim kapljicama, već i adekvatnim odabirom stabilizatora i drugih aditiva. Npr. pokazano je da lecitin prisutan u međusloju ispoljava značajan antioksidativni efekat i smanjuje permeaciju prooksidanasa kroz međufazni sloj U/V nanoemulzija, čime doprinosi zaštiti solubilizovanih supstanci osjetljivih na oksidativnu degradaciju (Pan i sar, 2013).

Kod **topikalne primene**, ističe se da visoka specifična površina nanokapi čini da lako adheriraju za mesto aplikacije, što doprinosi supstantivnosti formulacije. Penetracija kroz kožu može biti značajno stimulirana jer prisutne površinski aktivne supstance mogu solubilizovati lipide i proteine *stratum corneum*-a (ostvarujući efekat penetracionih inhensera), olakšavajući put aktivnoj supstanci

do željenog mesta dejstva (Isailović i sar, 2016; Lane, 2013). Primenom nanoemulzija na kožu mogu se ostvariti i lokalni, ali, u slučaju transdermalne isporuke, i sistemski efekti.

U domenu **parenteralne primene**, pored uobičajene primene u isporuci nutritivnih sastojaka (Klang i Valenta, 2011), nanoemulzije sa modifikovanom površinom kapi (npr. kroz PEGilaciju) predstavlja oportunu tehniku za produženje cirkulišućeg vremena nanoemulzionih kapi, smanjenje klirensa kroz mononuklearni fagocitni sistem, i posledično efikasnije dopremanje terapeutika u željena tkiva (npr. mozak ili tkivo tumora) (Ojha i sar, 2017; Devalapally i sar, 2015).

Zahvaljujući svojim karakteristikama, efikasnoj solubilizaciji i interakciji sa mukoznim membranama gastrointestinalnog trakta, pokazano je da nanoemulzije mogu poslužiti i za poboljšanje biološke raspoloživosti hidrofobnih aktivnih molekula ili nutrijenata nakon **oralne primene** (Shah i sar, 2017). Dodatno, sličan efekat je pokazan i za „prazne“ nanoemulzije kada se ingestiraju istovremeno sa aktivnim molekulama. U tim okolnostima nanoemulzije ne predstavljaju nosače aktivnih molekula (*nanoemulsion delivery system*), već su označene kao *nanoemulsion excipient system* (Aboalnaja i sar, 2016; Zou i sar, 2015a; Zou i sar, 2015b).

U zavisnosti od puta primene, pored osnovnih sastojaka masne i vodene faze, i stabilizatora kompatibilnih sa konkretnim vidom aplikacije, mogu se u formulaciju dodati i aditivi koji će olakšati primenu: npr. reološki modifikatori kod nanoemulzija namenjenih primeni na kožu ili mukozne membrane (priprema nanoemulzionog gela) (Sampathi i sar, 2015).

Na kraju, treba istaći da nanoemulzije zauzimaju sve veći značaj u farmaceutskoj primeni, jer obezbeđuju optimizaciju strategija u lečenju, prevenciji i dijagnostici bolesti, i to kroz efikasnu solubilizaciju, zaštitu osetljivih supstanci, pouzdanu isporuku aktivnih molekula, uz mogućnosti za targetiranje specifičnog tkiva/organa i kontrolisano oslobađanje (Shah i sar, 2017). Sa praktičnog aspekta, važno je napomenuti i da je mogućnost proizvodnje „na veliko“ moguća, i to uz odličnu reproducibilnost (Valenta i Klang, 2011). Dodatno, sa aspekta održivog razvoja, mogućnost njihove proizvodnje primenom tehnika koje štede energiju predstavlja poseban značaj.

1.5. Odabrana svojstva značajna za karakterizaciju nanoemulzija

Postoji nekoliko fizičkih svojstava nanoemulzija koja ih odvajaju od klasičnih emulzionih sistema (engl. *microscale emulsions*), čineći ih novom klasom u domenu *soft materials*. Budući da pripadaju grupi nanosistema, postoji čitav niz karakteristika koje je neophodno analizirati u cilju njihove sveobuhvatne karakterizacije i razumevanja, posebno u kontekstu savremenih težnji da se adekvatnom karakterizacijom na *in vitro* nivou (fizičko-hemijskom i biološkom) prevaziđu prepreke u translaciji nanosistema iz istraživanja u značajniju kliničku primenu. Tu se posebno izdvajaju: **veličina, oblik, morfološke karakteristike i površinsko naelektrisanje kapi, stabilnost formulacije, kao i interakcije nanoemulzije sa biološkim sistemima.** U slučaju nanoemulzija koje sadrže aktivnu supstancu, potrebno je ispitati i **kapacitet solubilizacije (engl. *drug loading*), raspodelu aktivne supstance unutar formulacije, efikasnost inkapsulacije, i kinetiku oslobađanja** (Caputo i sar, 2019; Coty i Vauthier, 2018).

Imajući u vidu kompleksnost nanosistema i izazove koji se sreću u njihovoj karakterizaciji, uz značajnu heterogenost u načinima sprovođenja merenja i interpretacije rezultata, Svetska organizacija za standardizaciju objavila je dokument *Nanotechnologies — Measurement technique matrix for the characterization of nano-objects* (ISO, 2016) koji sumira fizičko-hemijske parametre od interesa za nanomaterijale i predlaže tehnike za karakterizaciju datih parametara, dajući informacije o prednostima, ograničenjima i protokolima za sprovođenje merenja. Ipak, uprkos intenzivnom radu na ovom polju, evidentan je nedostatak standardizovanih protokola koji bi omogućili sigurniji uvid u fizičko-hemijska svojstva nanosistema i njihovu povezanost sa biološkim interakcijama, bezbednosnim profilom i biodistribucijom (Faria i sar, 2018; Rischitor i sar, 2016). Podstaknute ovim izazovima, EUNCL i *US National Cancer Institute - Nanotechnology Characterization Laboratory* (NCI-NCL) od 2015. zajednički intenzivno rade, u komunikaciji sa regulatornim telima EU i SAD, na stvaranju harmonizovanog seta ispitivanja koji bi obezbedio relevantna preklinička ispitivanja nanosistema – tzv. *assay cascade* (fizičkih, hemijskih, *in vitro* bioloških i *in vivo* testova), i koji bi bio od značajne pomoći onim koji rade u razvoju nanosistema/nanolekova. Kao rezultat, stvoren je niz standardnih operativnih procedura koji treba da omogućiti pouzdano određivanje i razumevanje imunoloških efekata, biodistribucije, farmakokinetike, metabolizma i bezbednosnog profila nanosistema (*Assay cascade protocols*: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>). Oslanjajući se na dosadašnja iskustva, dostupan je veći broj vrlo kvalitetnih naučnih članaka koji su adresirali ovu tematiku (Halamoda-Kenzaoui i sar, 2019; Bremer-Hoffmann i sar, 2018; Gioria i sar, 2018; Grossman i sar, 2017; Crist i sar, 2013).

1.5.1. Veličina i distribucija veličina kapi

Veličina i distribucija veličina kapi od suštinskog su značaja za dostizanje očekivanih performansi nanosistema (biodistribucija, targetiranje željenih tkiva/organa, eliminacija), za procenu fizičke stabilnosti, i, kod određenih puteva primene, bezbednosti. Paradoksalno, iako postoje brojne tehnike za procenu veličine čestica (kapi), ovu vrstu analize možda je najteže sprovesti na način da se dobiju pouzdani rezultati. Veličina, distribucija veličina kapi, kao i potencijal za agregaciju *per se* i u biološkom matriksu, predstavljaju neke od kritičnih atributa kvaliteta nanosistema (Bastogne, 2017; Muhlebach i sar, 2015). Brojne su tehnike koje se mogu koristiti za procenu veličine: elektronska mikroskopija (engl. *electron microscopy* - EM), mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy* – AFM), dinamičko rasipanje svetlosti (engl. *dynamic light scattering* – DLS), laserska difrakcija (engl. *laser diffraction* – LD), tehnike centrifugiranja (engl. *analytical ultracentrifugation* – AUC; *centrifugal particle sedimentation* – CPS), fracionisanje u protoku uz različite detektore (engl. *field-flow fractionation* – FFF), *tunable resistive pulse sensing* (TRPS), *particle tracking analysis* (PTA), i dr. Sve one se grubo mogu klasifikovati na *tehnike niske rezolucije* i *tehnike visoke rezolucije*. Iako ima određenih nedostataka, DLS se najčešće koristi. Međutim, uobičajeni vid primene (*batch mode*) nije adekvatan za polidisperzne uzorke, već je za

precizniju analizu potrebna preseparacija, odnosno razdvajanje čestica na klastere, i sledstveno određivanje veličine. U rutinskoj primeni, DLS je metoda koja može poslužiti za praćenje fizičke stabilnosti. Prednost ove metode predstavlja relativno ekonomična cena, jednostavnost izvođenja eksperimenta, brzo dobijanje rezultata i, najvažnije, postojanje standardizovanog protokola za pripremu uzorka i sprovođenje merenja (ISO, 2017; Hackley i sar, 2010). Ipak, aktuelne preporuke ističu da se merenja nikako ne mogu zaustaviti samo na jednoj metodi i predlaže se tzv. „stepeničasti pristup“ (*a three-step-approach*) u određivanju distribucije veličina, koji podrazumeva (Caputo i sar, 2019):

1. *Prescreening* (inicijalnu proveru koja treba da ukaže na eventualne nedostatke pre započinjanja drugih, zahtevnijih eksperimenata) tehnikom niske rezolucije (npr. DLS);
2. Detaljniju analizu kroz neku od tehnika visoke rezolucije i odgovarajuću mikroskopsku analizu koja obezbeđuje vizuelni pregled čestica/kapi;
3. Poslednji korak podrazumeva evaluaciju veličine i potencijala za agregaciju u biološkom medijumu.

Takođe, prilikom odabira tehnike za određivanje veličine i distribucije veličina, potrebno je voditi računa o njenoj pogodnosti konkretnom uzorku, mogućim interakcijama kao i opsegu veličina u kome se mogu dobiti validni rezultati. Posebnu pažnju potrebno je posvetiti adekvatnoj interpretaciji rezultata.

1.5.2. Karakteristike međupovršinskog sloja - granica faza ulje/voda

Konvencionalni pristup u karakterizaciji međupovršinskog sloja zasniva se na kombinaciji komplementarnih tehnika, ali dominantno analizom proširenih planarnih sistema – međupovršina dve kontinuirane tečnosti koji prevazilaze nano- i mikroskalu (Lyklema, 2005). Iako se ovakvi planarni sistemi koriste kao model, vrlo su pojednostavljeni i daleko su od realnog stanja, jer se, zbog različite površinske organizacije, interakcije na makro nivou ne mogu jednostavno transponovati na nanosisteme (Smolentsev i sar, 2017; De Aguiar i sar, 2011)

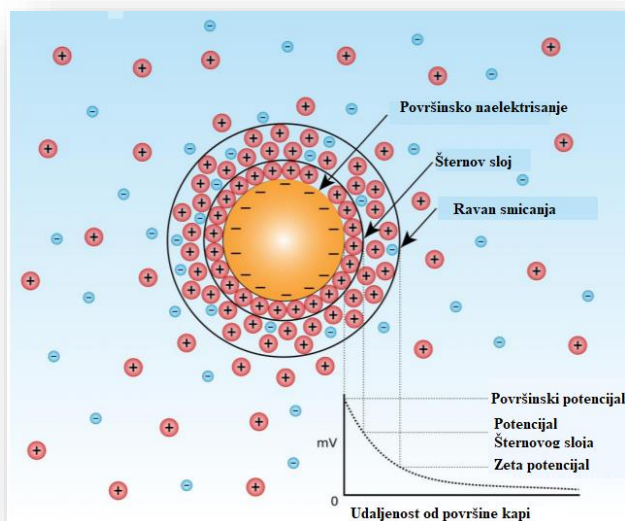
Pravo poznavanje molekularne orijentacije i mikrostrukturne organizacije međupovršinskog sloja je od značaja u predviđanju stabilnosti, ali i bioloških performansi nanoemulzija (interakcije sa ćelijskim membranama, sposobnost oslobađanja aktivne molekule). U tu svrhu, mogu se koristiti tehnike kao što su difrakcija X-zraka (eng. *X-ray diffraction*), elektron paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija (engl. *electron paramagnetic resonance spectroscopy*), a posebno spektroskopija rasejanja sume vibracionih frekvencija (engl. *vibrational sum-frequency scattering spectroscopy*), koja pruža pouzdane informacije u vezi sa konformacijom i uređenjem molekula na međupovršini (Hensel i sar, 2017).

1.5.3. Površinsko naelektrisanje kapi

Određivanje površinskog naelektrisanja (tj. zeta-potencijala kao vida njegove procene) uobičajena je metoda karakterizacije, i to najčešće sa ciljem da se proceni kinetička stabilnost nanodisperzije, ali takođe i sa aspekta procene bio-nano interakcija (Allen i sar, 2017; Klang i Valenta, 2011). Posedovanje istoimenog naelektrisanja na kapima nanoemulzija jedan je od načina odolevanja fizičkoj destabilizaciji.

Ukoliko je površina kapi naelektrisana, na nju će se adsorbovati sloj jona suprotno naelektrisanih od površine (Šternov sloj). Sa povećanjem udaljenosti od površine, gustina suprotnih jona opada (eksponencijalno). Kada se emulzija nađe u spoljašnjem električnom polju, naelektrisane kapi će se kretati, i to zajedno sa slojem adsorbovanih jona. U jednoj tački koja je više udaljena od površine kapi, trenje sa spoljašnjom fazom će nadjačati elektrostatičke interakcije, tako da sa daljim udaljavanjem od površine kontrajoni se više neće kretati zajedno sa kapljicom. Ravan pri kojoj se to

dešava se zove ravan smicanja, a odgovarajući potencijal zeta potencijal (Slika 1.5) (Israelachvili, 2011).



Slika 1.5. Shematski prikaz adsorbovanja jona na naelektrisanu nanočesticu/nanokap (preuzeto i prilagođeno prema referenci Israelachvili, 2011)

Zeta potencijal može se odrediti kroz praćenje elektroforetske mobilnosti nanomaterijala dispergovanog u vodenoj sredini, i to primenom nekoliko metoda opisanih u ISO standardima (ISO, 2012a; ISO, 2012b). U rutinskoj laboratorijskoj praksi, obično se primenjuje metoda koja se zasniva na praćenju elektroforetskog rasipanja svetlosti (engl. *electrophoretic light scattering – ELS*), koja se zatim konvertuje u zeta potencijal (Varenne i sar, 2015).

Uopšteno uzevši, veće apsolutne vrednosti zeta potencijala povezuju se sa boljom dugoročnom stabilnošću. Konkretno, ako je dominantni mehanizam stabilizacije elektrostatički, apsolutne vrednosti zeta potencijala koje su iznad 30 mV smatraju se indikatorom dobre dugoročne stabilnosti (Lin i sar, 2014; Muller i sar, 2012). Međutim, ove vrednosti se ne mogu uzeti striktno, posebno kada je stabilizacija obezbeđena primenom sternih stabilizatora ili kombinacijom električnih i sternih efekata. Zbog prisustva sternih stabilizatora, tokom merenja zeta potencijala, difuzni sloj se ne pomera tokom kretanja čestice u električnom polju, pa je ravan smicanja pomerena, i posledično se zeta potencijal meri na većoj udaljenosti od Sternovog sloja. Zbog eksponencijalnog pada potencijala sa povećanjem udaljenosti, izmerene vrednosti su značajno niže u poređenju sa sistemom koji ne sadrži sterne stabilizatore (Pardeike i Müller, 2010). Navodi se da su, u slučaju elektrosterne stabilizacije, apsolutne vrednosti zeta potencijala od oko 20 mV indikator dobre fizičke stabilnosti (Jacobs i Muller, 2002).

Naelektrisanje površine nanočestice/nanokapi može poticati od adsorbovanog sloja surfaktanata, ali može se obezbediti i funkcionalizacijom površine kapi, odnosno prisustvom određenih liganada na površini. U svakom slučaju, smatra se da je preuzimanje od strane ćelija efikasnije u slučaju pozitivno naelektrisane površine, jer ćelije, zbog negativnog naelektrisanja ćelijske membrane i potencijalnih elektrostatičkih interakcija, deluju katjon-selektivno. Međutim, treba imati u vidu da, kada se nanokapi/nanočestice nađu u realnoj biološkoj sredini, dolazi do adsorpcije endogenih molekula (jona i, dominantno, proteina), što može značajno promeniti površinske karakteristike čestica i vid interakcije sa ćelijama, ali i koloidnu stabilnost, a time i preuzimanje (Agrahari i sar, 2019; Albanese i sar, 2012). Svakako, merenje zeta potencijala u velikoj meri zavisi od

eksperimentalnih uslova, pa je mnogo truda uloženo u standardizaciju protokola (Clogston i Vermilya, 2020; Lin i sar, 2014; Varenne i sar, 2015).

1.5.4. Morfologija kapi

Morfološke karakteristike (oblik i struktura, površinske karakteristike) čestica/kapi prepoznate su kao važne sa aspekta interakcije nanosistema sa biološkim okruženjem, i predstavljaju neophodan segment u karakterizaciji. Navodi se da blago izduženi (štapićasti i elipsoidni) oblici mogu biti uspješniji u preuzimanju od strane ćelija posredstvom endocitoze, verovatno zbog veće dodirne površine sa ćelijskom membranom. Međutim, to nije presudna karakteristika ukoliko postoji funkcionalizacija površine ligandima specifičnim za određenu vrstu receptora. Takođe, rezultati određenih studija navode da „mekane“ nanočestice mogu imati bolju interakciju sa ćelijskom membranom i time biti uspješnije preuzete od strane ćelija (Kinnear i sar, 2017). Procena oblika i karakteristika površine moguće je sprovesti tehnikama mikroskopije (npr. EM ili AFM), koje uporedo daju i informacije o veličini čestica (Caputo i sar, 2019). Dodatno, primena ovih naprednih tehnika mikroskopije omogućuje da se razlikuju sferne nanokapi od drugih potencijalno koegzistirajućih struktura (npr. lamelarne strukture, miclele, ili, eventualno, nesolubilizovane čestice aktivne supstance), ili za detekciju agregata kapi, a za koje uobičajene tehnike za analizu veličina čestica nisu dovoljno diskriminatorne. Takođe, moguće je analizirati i fazne prelaze tokom nanoemulzifikacije (Klang i Valenta, 2011; Bali i sar, 2010).

1.5.5. Kapacitet inkapsulacije i kinetika oslobađanja aktivne supstance

Ukupna količina inkorporirane lekovite supstance (engl. *drug loading*), zajedno sa procenom stepena inkapsulacije i kinetikom oslobađanja predstavljaju važne parametre za procenu efikasnosti, ali i bezbednosti nanonosaa (Coty i Vauthier, 2018). Uprkos brojnim naporima da se preciznost i specifičnost nanonosaa poveća (npr. kroz funkcionalizaciju površine koja će smanjiti opsonizaciju i klirens nakon sistemske primene, ili povezivanjem antitela za površinu nanonosaa koja su specifična za određeni receptor), postoje problemi koji se odnose na inkorporiranje aktivne molekule u same nanostrukture. Upravo „uspešne priče“ već klinički etabliranih primera nanosistema (kao što su *AbraxaneTM* i *DoxilTM*) govore o važnosti poznavanja slobodne frakcije lekovite supstance i one inkapsulirane. Količina aktivne supstance koja je „slobodna“ može izazvati određene neželjene efekte, odnosno potpuno kompenzovati benefite koji se mogu dobiti nanonosaačem (Mehn i sar, 2017). Ovakve vrste ispitivanja važne su ne samo u ranim fazama razvoja nanonosaa, već i tokom *scale-up*-a i kontrole kvaliteta finalnih proizvoda (Ragelle i sar, 2017; Ambardekar i Stern, 2015).

Odabir aparature za određivanje kinetike oslobađanja ovisi o putu primene, ali ispitivanja se obično zasnivaju na praćenju difuzije aktivne supstance kroz membranu, primenom neoficinalnih ili oficinalnih aparatura uz određene modifikacije prilagođene vrsti ispitivanog uzorka. Važno je prilagoditi metodu tako da bude diskriminatorna, tj. da može obezbediti uočavanje razlika između konvencionalnih nosaa i nanosistema, kao i razlike među samim nanosistemima. Uprkos radu na razvoju biorelevantne metodologije, postoje izazovi u ispitivanjima „pametnih“ nanonosaa – onih od kojih se oslobađanje aktivne supstance očekuje nakon vezivanja za receptor ili kao posledica delovanja određenog stimulusa – engl. *on demand release* (Shen i Burgess, 2013).

Određivanje stepena inkapsulacije predstavlja teži zadatak. Upravo se od inkapsulirane lekovite supstance očekuje da ispolji drugačiju farmakokinetiku i biodistribuciju u poređenju sa slobodnom frakcijom. Uobičajeno se za ovu namenu primenju tzv. direktne (zasnivaju se na određivanju sadržaja lekovite supstance koja je inkapsulirana nakon ekstrakcije) i indirektne metode (zasnivaju se na određivanju slobodne frakcije lekovite supstance u supernatantu koji se odvaja nakon centrifugiranja). Zbog niza koraka koje zahtevaju, mogu biti prilično zametne, pa se kao alternativa u literaturi predlaže primena analitičkog ultracentrifugiranja – metode koja ne zahteva posebnu pripremu uzorka, a u jednom merenju je moguće sprovesti i analizu veličina čestica i određivanje

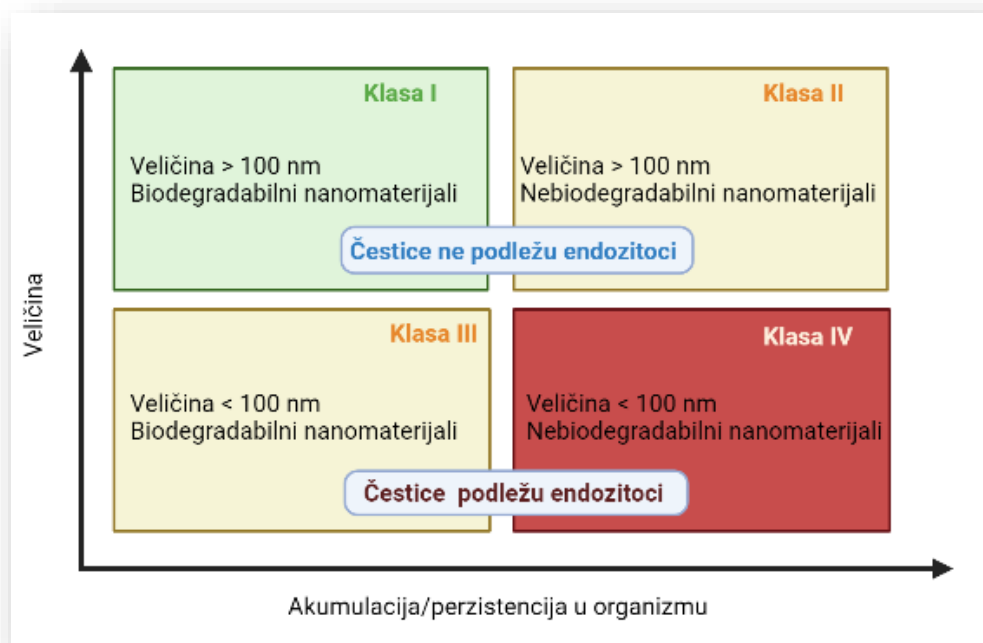
odnosa inkapsulirane i slobodne frakcije lekovite supstance (Daneshmand i sar, 2018; Gioria i sar, 2018; Mehn i sar, 2017).

Pored poznavanja sadržaja aktivne supstance u formulaciji i efikasnosti inkapsulacije, za sveobuhvatno razumevanje i tumačenje bioloških efekata i terapijske efikasnosti korisno je poznavati i raspodelu aktivne supstance unutar nanostrukture. U kontekstu U/V nanoemulzija kao nosača za hidrofobne aktivne supstance, inkapsulirana molekula može biti u potpunosti unutar uljane kapljice, ili pak na međupovršini, što zavisi od fizičko-hemijskih osobina supstance. Lokalizacija aktivne supstance odražava se na brzinu oslobađanja i na dostupnost za ostvarivanje terapijskih efekata, a može uticati i na hemijsku stabilnost molekula. Ova vrsta analize se uspešno može sprovesti primenom EPR spektroskopije, uz obeležavanje uzorka, a bez narušavanja njegove strukture (Mitsou i sar, 2018; Klan i Valenta, 2011; Ahlin i sar, 2003).

1.5.6. Aspekti bezbednosti nanomaterijala

U prethodnom periodu, u nenaučnoj zajednici, percepcija reči *nanotehnologija* skoro bezuslovno je asocirala na savremene aktivnosti, moderne tehnologije i stvaranje proizvoda boljih performansi u odnosu na uobičajene, i to neovisno od sfere primene – od proizvoda opšte namene do medicine. Međutim, kako nije redak slučaj da se javnost u svojim stavovima okreće sa jedne ekstremne pozicije na drugu, u poslednjih desetak godina odnos prema nanotehnologiji se promenio, i svedoci smo sve češćeg pozivanja na moguće neželjene efekte i rizik od bioakumulacije nanomaterijala, tj. fokus se prebacio na bezbednost (SCCS, 2019; Keck i Muller, 2013). Kao najsvežiji primer može se navesti i aktuelna diskusija koja se odnosi na primenu nanostrukture u vakcinama - kao adjuvanasa, odnosno sistema za isporuku antigena (Technov, 2021). Iako su briga o bezbednosti krajnjih korisnika i procena rizika po životnu sredinu, ne samo legitimne, već neizostavne i neophodne, čest je slučaj da, zbog aktuelnosti teme i uticaja medija i društvenih mreža, pitanja bezbednosti nanomaterijala budu precejena (Reuters Fact Check, 2021; Reuters Fact Check, 2020; The Guardian, 2011).

Ipak, s obzirom na brojne nepoznanice sa kojima se nauka susreće kada se radi o nanomaterijalima – počevši od same definicije, pa sve do relevantne karakterizacije, čini se da je sasvim razumno predložiti određeni sistem klasifikacije koji bi selektovao parametre na osnovu kojih bi se mogao proceniti potencijal za ispoljavanje toksičnosti. Logično je da se takva klasifikacija vrši prvenstveno na osnovu veličine, biodegradabilnosti i biokompatibilnosti, jer su to parametri koji određuju fizičko-hemijska svojstva, interakciju materijala sa ćelijama i, u slučaju apsorpcije, intracelularnu sudbinu. Na osnovu navedenih parametara, predložen je nanotoksikološki sistem klasifikacije (engl. *nanotoxicological classification system* – NCS, Slika 1.6), koji nanomaterijale deli u 4 klase prema riziku da ispolje toksične efekte po organizam, a na osnovu veličine čestica i biodegradabilnosti. Klasa I je ona kod koje je rizik mali ili ga nema, klase II i III odgovaraju srednjem riziku, dok klasa IV predstavlja čestice sa visokim rizikom za ispoljavanje toksičnih efekata (Keck i Muller, 2013).



Slika 1.6. Nanotoksikološki sistem klasifikacije nanomaterijala (prilagođeno prema Keck i Muller, 2013)

Upravo klasi I pripada većina farmaceutskih nanonosaa, kao što su nanoemulzije, liposomi, lipidne nanočestice, ali i nanokristalne disperzije. Uobičajeni opseg njihovih veličina je takav da ne podležu direktnom preuzimanju od strane ćelija, a zbog biodegradabilnosti se ne zadržavaju dugo u organizmu. Sa prelaskom na klasu II, usled nebiodegradabilnosti, čestice se duže zadržavaju u organizmu, pa otuda i potencijalno veći rizik. Slično tome, u klasi III su biodegradabilne čestice, ali zbog izrazito malih dimenzija, njihove interakcije sa ćelijama su intenzivnije i podležu fagocitozi, zbog čega pripadaju grupi sa srednjim rizikom. Na kraju, najveći rizik predstavljaju čestice koje imaju veličinu manju od 100 nm i uz to su nebiodegradabilne (npr. nanočestice titan-dioksida).

Ipak, ovo je vrlo uopštena podela i ne treba da bude podrazumevajuća jer se ne može *a priori* tvrditi, bez prethodne provere, da, na primer, određene čestice iz klase I NCS-a ne poseduju neku vrstu toksičnosti koja može biti posledica određenih hemijskih vrsta koje ulaze u njihov sastav ili potencijalnih interakcija sa imunim sistemom. Dodatno, sam put primene predstavlja poseban aspekt koji treba razmotriti. Na primer, rizik nakon dermalne, inhalacione ili intravenske primene nije identičan. Situacija se dodatno komplikuje kada se procenjuje stepen izloženosti (Warheit, 2018; Keck i Muller, 2013).

Biokompatibilnost je još jedno svojstvo značajno za procenu bezbednosti primene, koje nije uzeto u obzir u datoj klasifikaciji, a koje nije u vezi ni sa veličinom, ni sa biodegradabilnošću, već sa tim da li se na datu materiju adsorbuju opsonini (Williams, 2003). Ukoliko bi se to svojstvo uzelo u obzir, onda bi se svaka od klasa mogla podeliti na 2 podklase – u slučaju biokompatibilnih ili nebiokompatibilnih nanostrukture.

Kada se razmotre svi faktori, neosporno je da se otvara svojevrsna Pandorina kutija u domenu nanotoksikologije. Na primer, čak i ako je materijal dimenzija većih od 100 nm, biokompatibilan i biodegradabilan, ali tokom degradacije daje toksične proizvode, postavlja se pitanje kojoj klasi on pripada. Jasno je da procena bezbednosnog profila nanosistema predstavlja složenu aktivnost, i ne može se zasnivati isključivo na trenutno predloženom sistemu klasifikacije, iako on sigurno predstavlja dobru polaznu osnovu. Specifični vidovi bioloških eksperimenata – npr. procena cito-, geno- i imunotoksičnosti neophodan su element sveobuhvatne procene bezbednosti.

1.5.6.1. Biološka karakterizacija nanomaterijala

Biološka karakterizacija nanosistema podrazumeva *in vitro* ispitivanja prvenstveno bezbednosti, ali i efikasnosti (primenom odabranih ćelijskih linija), dovodeći u vezu fizičko-hemijske osobine sa bio-nano interakcijama.

U kontekstu procene bezbednosti, najčešći vid biološke karakterizacije vrši se kroz testove citotoksičnosti, kao što su test redukcije 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromida (MTT test) i test oslobađanja enzima laktat dehidrogenaze (LDH test). Odabir ćelijske linije za konkretno ispitivanje treba biti motivisan predviđenim putem primene, ciljnim mestom dejstva i procenjenom izloženošću (Aslantürk, 2018; Joris i sar, 2016). Kako se većina nanosistema nakon systemske (intravenske) primene izlučuje putem jetre i/ili bubrega, postoje protokoli za ispitivanje citotoksičnosti nanomaterijala na ćelijama bubrega svinje (LLC-PK1) i na ćelijama humanog karcinoma jetre (Hep G2) (ASTM, 2013; Potter i Stern, 2011). U laboratorijskoj praksi se veoma često primenjuju i ćelije drugih tkiva, dok matične ćelije sve više dobijaju na značaju kao perspektivna platforma za ispitivanje bezbednosti (Donowitz i sar, 2020; Liu i sar, 2013).

In vitro procene nanomaterijala su veoma važne jer mogu ukazati na moguće neželjene reakcije koje se mogu javiti nakon primene kod čoveka, a u kombinaciji sa drugim naprednim „omics“ (*genomics, proteomics, metabolomics*) i *imaging* tehnikama, mogu doprineti i razumevanju tačnog mehanizma potencijalnih neželjenih reakcija. Takođe, kombinacija *in vitro* bioloških ispitivanja može rasvetliti i mehanizam interakcije nanomaterijala sa ćelijom. Međutim, rutinske metode veoma često nisu primenjive na kompleksnije i inovativne sisteme, pa je prilagođavanje metodologije veoma često neophodno (Gioria *et al*, 2018). Iz tog razloga, nekoliko H2020 projekata (EUNCL, 2017; REFINE, 2015) imali su za cilj, između ostalog, pripremu unapređenih i validiranih protokola za *in vitro* ispitivanja „nanolekova“ u pretkliničkom razvoju, koji bi prevazišli neke od do sada uočenih ograničenja testova koji se rutinski primenjuju za ovu namenu).

Ipak, konvencionalni ćelijski modeli ne mogu uvek verno da reflektuju humanu fiziologiju, što, u kombinaciji sa poteškoćama u uspostavljanju protokola ispitivanja nanosistema, može dovesti do nedovoljno precizne interpretacije eksperimentalnih rezultata. Zato se sve više radi na uspostavljanju biorelevantnijih uslova, korošćenjem metodologije koja bi približnije oslikavala procese koji se dešavaju u ljudskom organizmu, npr. kroz primenu mikrofluidnih *organ-on-chip* sistema. Implementacijom organ-specifičnih humanih ćelija u mikročip i primenom mehaničkih sila i protoka fluida koji treba da reprezentuju uslove u humanom organizmu, očekuje se značajno bolja prediktivnost testova, uz smanjenje ispitivanja na životinjama (Jie i Lin, 2018; Perestrelo i sar, 2015; Trietsch i sar, 2013; ORCHID, 2017).

1.6. Nanoemulzije: pregled stanja na tržištu

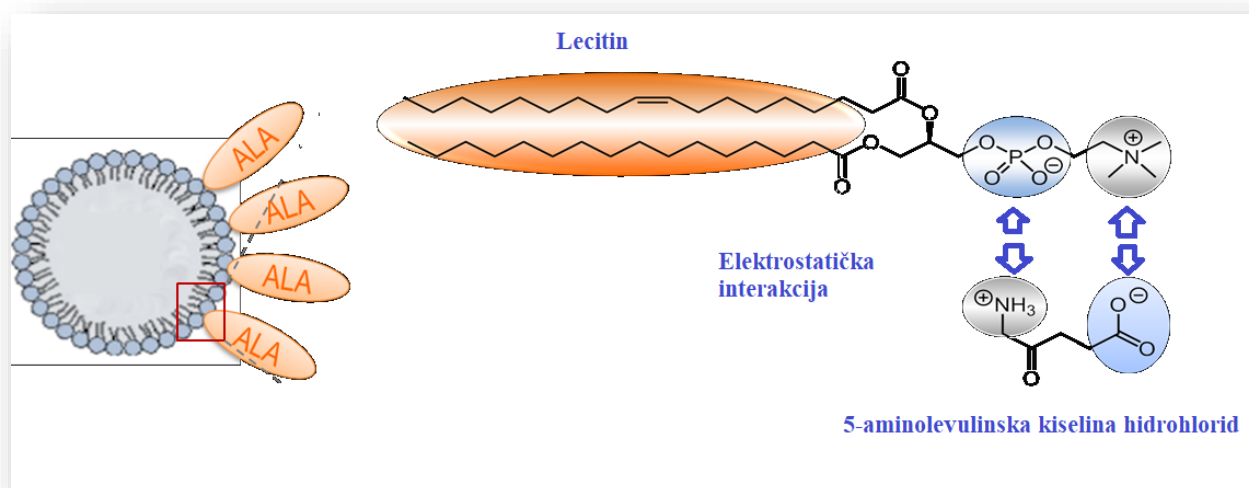
Iako literaturni izvori svedoče o brojnim prednostima nanoemulzionih sistema, oni još uvek nisu u potpunosti iskorišćeni. Ipak, dugu tradiciju primene imaju baš parenteralne nanoemulzije, i to prevashodno one namenjene parenteralnoj ishrani, ali i intravenske emulzije za isporuku slaborastvornih aktivnih supstanci (npr. diazepam, etomidat, propofol, liposolubilni vitamini...) (Rozentur i sar, 2010; Rossi i Leroux, 2007). Uprkos vrlo intenzivnoj istraživačkoj aktivnosti na polju topikalne primene nanoemulzija (na kožu ili sluzokožu), registrovanih primera je znatno manje. Pregled trenutno registrovanih lekova namenjenih lokalnoj primeni na bazi nanoemulzija dat je u Tabeli 1.5

Tabela 1.5. Primeri registrovanih lekova na bazi nanoemulzija za lokalnu primenu (dermalna i okularna)

Naziv proizvoda (proizvođač)	Farmaceutski oblik	Aktivna supstanca (sadržaj)	Ekscipijensi	Indikacija	Referenca
<i>Ameluz®</i> (Biofrontera, SAD)	Gel	5-aminolevulinska kiselina hidroklorid (10% m/m - ekvivalentno 7,8% m/m aminolevulinske kiseline)	ksantan guma, lecitin soje, polisorbitat 80, trigliceridi srednje dužine lanca, izopropil alkohol natrijum-fosfat dibazni dihidrat, natrijum-fosfat monobazni dihidrat, propilenglikol, natrijum-benzoat, prečišćena voda	Lečenje umerenih i srednje teških oblika aktinične keratoze, u kombinaciji sa fotodinamičkom terapijom; primena isključivo od strane zdravstvenog radnika	https://www.daily.med.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=650daa9f-aeec-49ce-95b9-5fa20b988afd http://www.biofrontera.us.com/nanoemulsion/
<i>Verkazia™</i> (Santen Oy, Irska, UK)	Kapi za oči	Ciklosporin (1 mg/ml)	trigliceridi srednje dužine lanca, cetalkonijum-hlorid, glicerol, tiloksapol, poloksamer 188, natrijum-hidroksid, voda za injekcije	Lečenje teških oblika sezonskog keratokonjunktivitisa kod dece i adolescenata	https://www.medicines.org.uk/emc/product/9491/smpc https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00048991.PDF
<i>Ikervis®</i> (Santen Oy, Finska)	Kapi za oči	Ciklosporin (1 mg/ml)	trigliceridi srednje dužine lanca, cetalkonijum-hlorid, glicerol, tiloksapol, poloksamer 188, natrijum-hidroksid, voda za injekcije	Lečenje teškog keratitisa kod odraslih pacijenata sa sindromom suvog oka koji se ne poboljšava bez obzira na primenu veštačkih suza	https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ikervis

<i>Voltaren® Emulgel® 2% (Novartis, Švajcarska)</i>	Gel	Diklofenak (2% m/m)	butilhidroksitoulen, dietilamin, izopropanol, karbomer, kokoilkaprilokapat, makrogolcetosteariletar, oleilalkohol, tečni parafin, propilenglikol, parfem eukalptusa, prečišćena voda	Ublažavanje bola, zapaljenja i otoka kod sportskih povreda (istegnuća tetiva i ligamenata, uganuće zglobova, bolovi u leđima) i lokalizovanih oblika reumatizma (burzitis, teniski lakat)	https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpc/515-01-01317-13-001.pdf
<i>Voltaren® Emulgel® 1% (Novartis, Nemačka)</i>	Gel	Diklofenak (1% m/m)	Karbomer, makrogolcetosteariletar, kokoilkaprilokapat, dietilamin, izopropilalkohol, tečni parafin, propilenglikol, parfem, prečišćena voda	Ublažavanje bola, zapaljenja i otoka kod sportskih povreda (istegnuća tetiva i ligamenata, uganuće zglobova, bolovi u leđima) i lokalizovanih oblika reumatizma (burzitis, teniski lakat)	https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/pil/515-01-00608-18-002.pdf

Za sve navedene lekove upravo se ističe bolja supstantivnost, te bolja penetracija u tkivo zahvaljujući nanoemulziji kao nosaču. Posebno je interesantan primer *Ameluz*[®] gela, koji predstavlja nanoemulziju stabilisanu kombinacijom polisorbata 80 i lecitina soje, geliranu ksantan gumom. Usled prisutnog lecitina (fosfolipida), površinski sloj kapi poseduje i pozitivno i negativno naelektrisane regione, koji stupaju u elektrostatičke interakcije sa solju aminolevulonske kiseline (aminolevulinskom kiselinom hidrohlorid) (Slika 1.7). Na taj način je stabilisana i drže adsorbovanu za površinu kapi. Nanoemulziona kapi stupaju u interakciju sa površinskim slojem kože, utičući na poboljšanje penetracije aktivne supstance (Reinhold i sar, 2016).



Slika 1.7. Shematski prikaz elektrostatičkih interakcija aminolevulonske kiseline sa lecitinom na međupovršinskom sloju nanoemulziona kapi (Preuzeto i prilagođeno prema referenci <http://www.biofrontera.us.com/nanoemulsion>)

Sa druge strane, kapi za oči (tipa nanoemulzije), kao što su *Verkazia*TM, koriste zaštićenu *Novasorb*[®] tehnologiju u cilju optimizacije vremena zadržavanja formulacije na oku i apsorpcije aktivne supstance. U pitanju je hidrofilna katjonska nanoemulzija (nanoemulziona kapi imaju pozitivno površinsko naelektrisanje), čime se poboljšava okularno zadržavanje usled elektrostatičkih interakcija sa negativno naelektrisanim slojem mucina koji prekriva kornealni i konjunktivalni epitel (Daull i sar, 2017). Na ovaj način, obezbeđeno je dvostruko povećanje okularne bioraspodivnosti ciklosporina u poređenju sa konvencionalnim kapima za oči (<https://www.medicines.org.uk/emc/product/9491/pil>)

Pored klinički odobrenih lekova, nanoemulzije kao nosači se intenzivno istražuju i u domenu kozmetologije. S tim u vezi, postoji značajan broj patentnih prijava velikih kozmetičkih kuća koje se upravo zasnivaju na primeni ovih nosača u isporuci kozmetički aktivnih sastojaka i ostvarivanju određenih efekata na koži (Rai i sar, 2018).

Trenutno možda najinovativnija oblast primene nanoemulzija upravo je imunologija. Nanoemulzije su tu svoje mesto našle kao sistemi za isporuku antigena, odnosno kao savremeni adjuvansi. Pregled trenutno odobrenih nanoemulzija kao adjuvanasa u formulacijama vakcina dat je u Tabeli 1.6.

Table 1.6. Pregled odobrenih adjuvanasa na bazi nanoemulzija
(Preuzeto i prilagođeno prema referenci Krajišnik i sar, 2020)

Naziv adjuvansa	Tip nanoemulzije	Komponente	Klinička primena	Proizvođač
<i>MF59</i>	U/V	skvalen, polisorbat 80, sorbitantrioleat, citratni pufer pH 6,5	Vakcine protiv influenza virusa (ptičiji grip, sezonski grip, pandemijski grip)	<i>Novartis</i>
<i>ASO3</i>	U/V	skvalen, α-tokoferol, polisorbat 80, PBS pH 6,8	Vakcine protiv influenza virusa (ptičiji grip, pandemijski grip)	<i>Glaxo Smith Kline</i>
<i>AFO3</i>	U/V	skvalen, polioksietilencetosteariletar, manitol, sorbitanoleat, manitol, PBS pH 7,1	Vakcina protiv influenza virusa (pandemijski grip)	<i>Sanofi</i>
<i>Montanide™ ISA51VG</i>	V/U	minearalno ulje, manidmonooleat; Pre upotrebe, meša se sa konjugovanim antigenom u PBS-u, uz formiranje V/U nanoemulzije	Terapijska vakcina protiv karcinoma pluća	<i>Seppic</i>

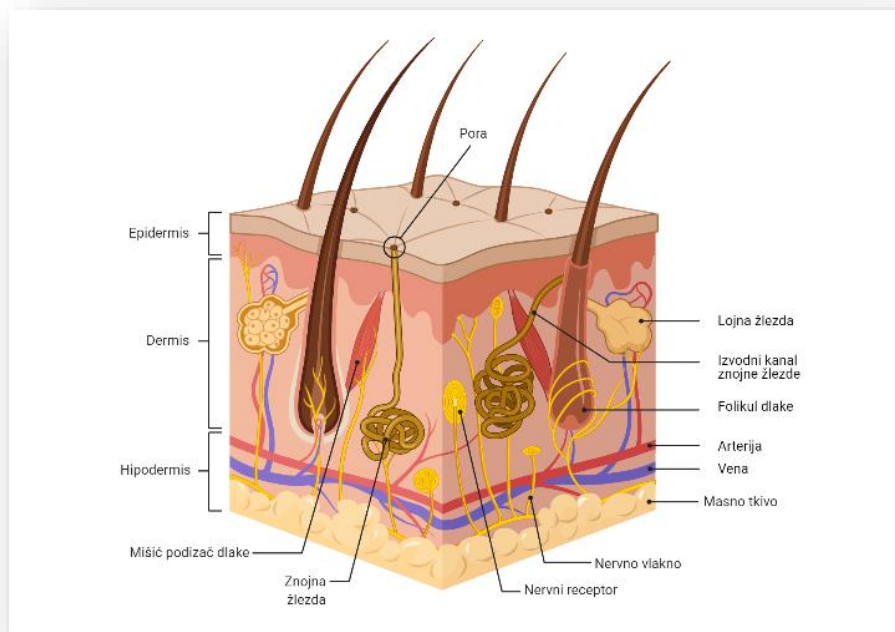
1.7. Primena lekova putem kože – teorijski aspekti

Koža, kao najveći organ ljudskog tela, ima brojne i veoma važne funkcije. Ne samo da predstavlja moćnu zaštitnu barijeru, već obezbeđuje komunikaciju sa spoljašnjom sredinom, učestvuje u termoregulaciji, ima hormonsku aktivnost i važna je za ostvarivanje adekvatnog imunog odgovora (Ng i Lau, 2015).

Primena lekovitih supstanci na kožu poznata je još od davnina. Nekada se ovaj put primene koristio samo za tretman različitih dermatoloških stanja i promena. I u savremenoj farmakoterapiji ovaj vid lečenja je veoma složen i obiluje preparatima za najrazličitije indikacije. Međutim, brojna naučna saznanja omogućila su da se koža iskoristi ne samo za ostvarivanje lokalnih efekata (na površini), već i za neke značajnije efekte u dubljim slojevima kože, pa čak i za sistemsku isporuku lekovitih supstanci. Upravo u kontekstu savremenih tendencija u razvoju farmaceutskih oblika, koje imaju za cilj da se pacijentima obezbedi jednostavna, najmanje invazivna i, naravno, efikasna terapija, koža predstavlja atraktivno mesto aplikacije. Primenom leka na kožu mogu se obezbediti kako lokalni, tako i sistemski efekti, uz povećanu raspoloživost lekovite supstance na ciljnom mestu dejstva i smanjenje sistemskih neželjenih efekata. Sama aplikacija leka je jednostavna, što vodi boljoj adherenci i uspešnijim ishodima terapije. Međutim, neovisno o tome da li je potrebno ostvariti efekte na površini kože, u njenim dubljim slojevima (u vijabilnom epidermisu ili dermisu), ili je cilj aktivnu supstancu isporučiti u sistemsku cirkulaciju, primena leka na kožu predstavlja poseban izazov zbog njenih barijernih svojstava (Atkinson i sar, 2015).

1.7.1. Struktura kože i faktori od značaj za dermalnu raspoloživost aktivne supstance

Anatomski posmatrano, koža se sastoji iz 3 osnovna sloja: gledano od spoljašnjosti ka unutrašnjosti, to su epidermis, dermis i potkožno tkivo (hipodermis). Svaki od ovih slojeva je složene strukture i sastoji se od više različitih tipova ćelija i strukturnih elementa (Slika 1.8) (McGrath i Uitto, 2010).

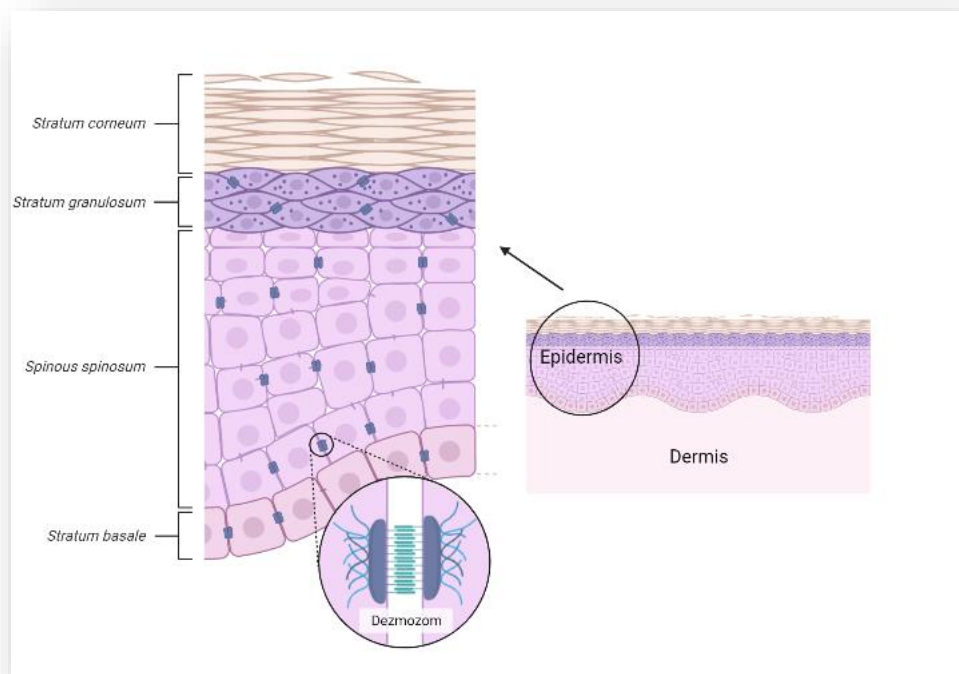


Slika 1.8. Shematski prikaz strukture kože

Hipodermis je sloj koji se dominantno sastoji iz rastresitog vezivnog tkiva i masnog tkiva, i važan je u ublažavanju mehaničkih trauma organizma.

Dermis predstavlja hidrofilni sloj kože, sačinjen od fibroblasta okruženih elastinom i kolagenom (kao strukturnim proteinima), uz prisutne glikozaminoglikane. Ovakva građa odgovorna je za elastičnost i rastegljivost kože i otpornost na pritisak. U dermisu se nalaze i krvni i limfni sudovi, znojne i lojne žlezde, folikuli dlake.

Epidermis je sačinjen od nekoliko slojeva keratinocita u različitim stupnjevima diferencijacije (Slika 1.9), uz prisustvo melanocita, Langerhansovih i Merkelovih ćelija. Keratinociti prolaze kroz proces keratinizacije, u kome ćelije diferenciraju, pomerajući se od sloja *stratum basale*, preko slojeva *stratum spinosum* i *stratum granulosum* (i *stratum lucidum* – gde je prisutan), sve do površinskog sloja – *stratum corneum*. U ćelijama bazalnog sloja započinje sinteza hidrofobnog proteina keratina, koja se nastavlja kroz naredne slojeve, uz formiranje keratinskih filamenata. *Stratum granulosum* je stadijum kada dolazi do formiranja sekretornih granula sa lamelarno organizovanim lipidima, čiji sadržaj se sa apikalne strane izbacuje u međućelijski prostor. Tada dolazi i do aktivacije lizozomalnih enzima i gubitka jedra i ostalih ćelijskih organela. Unutrašnja strana ćelijske membrane postaje zadebljana i dolazi do umrežavanja snopova keratina. Finalno, to čini da je površinski sloj epidermisa (*stratum corneum*) sačinjen od mrtvih, orožali keratinocita (korneocita), koji su ispunjeni keratinskim filamentima i uronjeni u gust lipidni matriks, koji se sastoji od ceramida, masnih kiselina, holesterola i njegovih estara. U literaturi se za ovaj sloj često koristi slikovit opis „cigle i maltera“. Ove ćelije nemaju nukleus, pa su lišene metaboličke aktivnosti, te podležu procesu deskvamacije kao posledica enzimske razgradnje međućelijskih veza korneocita, dok degradacijom njihovih proteina nastaju hidrofilni molekuli koji se nazivaju *prirodni vlažeći faktori* (engl. *natural moisturizing factors* – NMF), i koji imaju ulogu u vezivanju i zadržavanju vode (urea, mlečna kiselina, pirolidin-karbonska kiselina...). Dodatni zaštitni sloj na površini kože čini hidrolipidni film koji je produkt lučenja lojnih žlezda (Ng i Lau, 2015; McGrath i Uitto, 2010; Brown i sar, 2006).



Slika 1.9. Slojevi epidermisa

Upravo orožali keratinociti i intercelularni lipidni matriks, zbog svoje hidrofobnosti, imaju značajnu ulogu u barijernoj funkciji kože, otežavajući transport lekovitih supstanci. Dodatno, heterogena

struktura kože (prisustvo i lipofilnih i hidrofilnih segmenata) odražava se na mogućnost i dermalne i transdermalne isporuke aktivnih supstanci (Ng i Lau, 2015).

Neovisno o anticipiranom mestu dejstva, nakon primene na kožu, neophodno je da lekovita supstanca prevaziđe *stratum corneum*. Iako teorijski postoje tri različita moguća puta penetracije za aktivne molekule kroz *stratum corneum* (u zavisnosti od njihovih fizičko-hemijskih karakteristika) - intercelularni, transcelularni (najčešći put) i transfolikularni (Slika 1.10), mali je broj molekula koji pasivnom difuzijom zaista mogu ostvariti terapijske koncentracije na mestu dejstva nakon primene na koži (Marwah i sar, 2016). Brzina penetracije aktivne supstance kroz kožu izražava se kroz fluks (J) - masa supstance koja penetrira po jedinici površine kože u jedinici vremena ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$), i zavisi od koeficijenta permeabilnosti kože (Kp) i koncentracije aktivne supstance u nanetoj formulaciji (C), prema sledećoj jednačini (Ng i Lau, 2015):

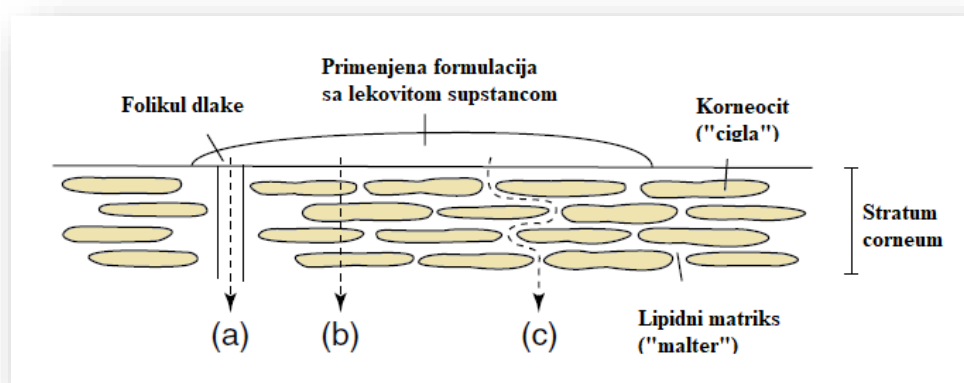
$$J = Kp * C = \frac{P * D * C}{h} \quad (\text{Jednačina 1.9})$$

P – formulacija-koža particioni koeficijent,

D – difuzioni koeficijent supstance,

h – dužina putanje koju supstanca prelazi tokom difuzije.

Dakle, može se sumirati da penetracija lekovite supstance kroz kožu zavisi od više faktora - **fizičko-hemijskih osobina same supstance, svojstava nosača i bioloških faktora** (Marwah i sar, 2016).



Slika 1.10. Mogući putevi penetracije aktivne supstance kroz *stratum corneum*:

a) transfolikularni, b) transcelularni, c) intercelularni

(Preuzeto i prilagođeno prema referenci Ng i Lau, 2015)

Da bi aktivna supstanca bila dobar kandidat za dermalnu isporuku, važno je razmotriti sledeće njene osobine:

- hidrolipidni particioni koeficijent,
- potencijal za stvaranje vodoničnih veza,
- molekulsku masu i veličinu molekula,
- potencijal za jonizaciju.

Na osnovu poznavanja strukture kože, pokazano je da najbolje penetriraju supstance koje su u nejonizovanom obliku, sa lipidno-vodnim particionim koeficijentom između 1 i 3, dok je, zbog heterogene strukture kože i dopremanja supstance do dermisa, važna i mogućnost za stvaranje vodoničnih veza. Takođe, poznato je da supstance veće molekulske mase teže i sporije difunduju, te je poželjno da molekulska masa bude manja od 500 Da.

Naravno, i sama formulacija (nosač aktivne supstance) značajno može uticati na penetraciju, pa je važno razmotriti karakteristike kao što su:

- hidrofilitnost/lipofilitnost nosača i particioni koeficijent podloga-*stratum corneum*,
- termodinamički efekat nosača,
- viskozitet nosača,
- pH vrednost nosača,
- uticaj nosača na samu kožu i njenu permeabilnost.

Viskozitet formulacije utiče na mogućnost njene pravilne i ravnomerne aplikacije, zadržavanja na koži, ali i brzinu oslobađanja aktivne supstance. Uzimajući u obzir fiziološku vrednost pH kože i stabilnost supstance, pH formulacije bi trebalo podesiti tako da se favorizuje nejonizovana forma aktivne supstance. Naravno, sam sastav formulacije (prisustvo ulja, rastvarača, površinski aktivnih materija...) može značajno uticati na karakteristike kože i njenu propustljivost (povećana hidratacija, fluidizacija lipida i proteina površinskog sloja, te povećanje permeabilnosti kože). Takođe, ukupna količina lekovite supstance koja može penetrirati zavisi i od njene koncentracije u nosaču.

Na kraju, treba imati u vidu i biološke faktore, inter- i intraindividualne varijabilnosti koje mogu značajno uticati na efekat lekova primenjenih na kožu, i to:

- varijacije anatomskog mesta primene (razlike u debljini kože različitih regiona tela),
- starost pacijenta,
- rasu,
- metabolizam kože,
- prokrvljenost na mestu aplikacije.

Uzevši sve u obzir, jasno je da brojni faktori utiču na efikasnost dopremanja aktivne supstance do ciljnog mesta dejstva nakon primene na kožu, pa se mnoga istraživanja fokusiraju na pronalaženje adekvatnih metoda za poboljšanje dermalne raspoloživosti.

1.7.2. Metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti

Brojne studije sprovedene su sa idejom da se prevaziđu problemi koji se sreću prilikom dermalne primene lekova, a koji se najvećim delom ogledaju u veoma niskoj penetraciji aktivne supstance kroz *stratum corneum*. Predloženi su različiti pristupi za poboljšanje dermalne raspoloživosti, i sve metode mogu se podeliti na pasivne i aktivne (Gupta i sar, 2019).

Pasivne metode oslanjaju se na formulaciju koja će omogućiti promenu barijernih svojstava *stratum corneum*-a. To podrazumeva dodatak supstanci koje će povećati hidrataciju površinskog sloja kože (uz posledičnu maceraciju korneocita, narušavanje organizacije lipidnog matriksa i raskidanje međucelijskih veza korneocita), dodatak hemijskih pojačivača penetracije (koji će izvršiti solubilizaciju lipida i proteina površinskog sloja i na taj način olakšati put aktivnoj supstanci), ili formulaciju savremenih nosača aktivne supstance (npr. nanososača kao što su nanoemulzije ili liposomi) koji svojim karakteristikama (bolja supstantivnost i rasprostiranje; efikasna integracija nanokapi/liposoma/nanočestica sa lamelarno organizovanim lipidima *stratum corneum*-a; mogućnost inkorporiranja nanokapi/liposoma među korneocite i posledično bolja penetracija; veći kapacitet solubilizacije aktivne supstance) mogu doprineti boljoj raspoloživosti aktivne supstance nakon dermalne primene. Neovisno o primenjenoj strategiji, sve pasivne metode podrazumevaju da aktivna supstanca prolazi kroz *stratum corneum* mehanizmom pasivne difuzije (Marwah i sar, 2016; Brown i sar, 2006).

Ipak, pasivne metode nisu u stanju da obezbede adekvatan nivo penetracije za molekule većih molekulskih masa, ili za molekule polarnije strukture. U tom domenu bi **aktivne metode** mogle dati

značajno bolje rezultate. One se zasnivaju na primeni eksterne energije koja direktno deluje na smanjenje barijernih svojstava kože i/ili kao pokretačka snaga koja „povlači“ molekule aktivne supstance kroz epidermis. Kao aktivne metode u poboljšanju dermalne raspoloživosti razmatraju se električne metode, mehaničke metode, primena ultrazvuka, radiotalasa, magnetoforeza i termoforeza... (Brown i sar, 2006).

U literaturi se sreća i druga vrsta klasifikacije, tj. metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti se grubo dele na *hemijske* i *fizičke* metode (Atkinson i sar, 2015). Međutim, iako se nazivi ovih klasa terminološki razlikuju, ova podela je suštinski ista kao prethodno navedena – hemijske metode podrazumevaju pasivne metode poboljšanja barijernih svojstava kože, dok su fizičke one koje se zasnivaju na primeni određene sile/eksterne energije, pa obuhvataju isti set metoda koje su prethodno klasifikovane kao *aktivne metode*.

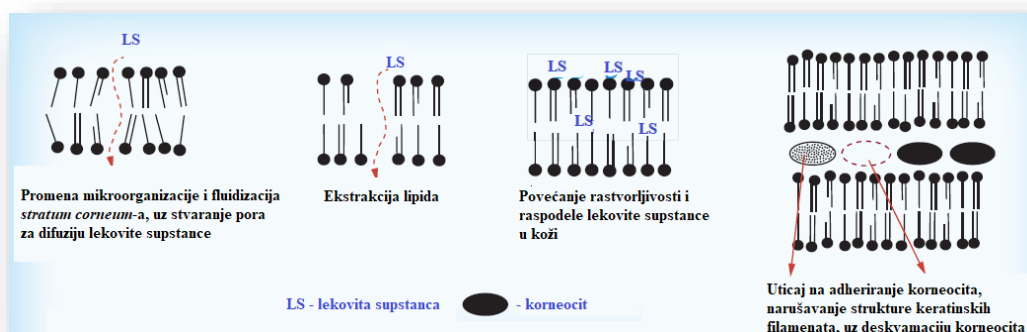
1.7.2.1. Primena hemijskih pojačivača penetracije

Među brojnim strategijama za poboljšanje dermalne raspoloživosti, primena hemijskih pojačivača penetracije verovatno predstavlja najčešći pristup, sa dugom istorijom primene (Lopes i sar, 2015). Do sada, pokazano je da više od 350 molekula može povećati permeabilnost kože preko nekoliko mehanizama (Gupta i sar, 2019).

Idealan hemijski pojačivač penetracije bi trebalo da ne iritira kožu, da nema potencijal da izazove alergijsku reakciju na koži, uz efikasnost i brzo ostvarivanje efekta, ali tako da je narušavanje barijernih svojstava kože reverzibilno, te da se koža brzo „oporavlja“. Nažalost, ne može se naći značajan broj supstanci koje zadovoljavaju sve ove kriterijume. Najčešće, povećanje permeabilnosti kože praćeno je i određenim stepenom iritacije (Gupta i sar, 2019).

Mehanizmi koji su u osnovi poboljšanja penetracije primenom hemijskih pojačivača penetracije nisu u potpunosti razjašnjeni i različiti su u zavisnosti od klase hemijskog pojačivača penetracije. Najčešća klasifikacija hemijskih pojačivača penetracije zasnovana je na njihovoj hemijskoj strukturi i prikazana je u Tabeli 1.7 (Lane, 2013). Kako je dominantan put prolaska aktivnih supstanci intercelularni, očekuje se da efekat poboljšanja penetracije prevashodno zavisi od mogućnosti hemijskih pojačivača penetracije da interaguju sa lipidima lipidnog matriksa, menjajući intercelularnu mikroorganizaciju, posledično olakšavajući difuziju lekovite supstance. Baš u ovom kontekstu, predloženo je nekoliko mehanizama (Slika 1.11):

- ekstrakcija lipida, koja dovodi do poremećaja u strukturi i fluidnosti lipidnog matriksa;
- povećanje rastvorljivosti aktivne supstance i njena bolja raspodela u lipidima površinskog sloja;
- uticaj na keratinske filamente i međukorneocitnu povezanost kroz promenu u strukturi proteina, što finalno dovodi do deskvamacije.



Slika 1.11. Mehanizmi interakcije hemijskih pojačivača penetracije sa lipidima i proteinima stratum corneum-a (Preuzeto i prilagođeno prema referenci Lopes i sar, 2015)

Iako je opšti stav da primena hemijskih pojačivača penetracije neminovno dovodi do većeg ili manjeg stepena iritacije kože, Karande i sar. (2005) pokazali su da iritacioni potencijal zavisi od mogućnosti stvaranja vodoničnih veza i od polarnih interakcija molekula. Konkretno, supstance koje u svom sastavu imaju visoko elektronegativne molekule (O, N, C), imaju sposobnost da ulaze u kompeticiju sa intermolekularnim vodoničnim vezama između lipida i proteina. To dovodi do strukturnih promena u organizaciji lamelarno uređenih lipidnih dvoslojeva, odnosno promene konformacija proteina. Sa druge strane, veća hidrofobnost molekula penetracionog inženjera (male polarne interakcije) omogućiti će njegovo lakše inkorporiranje u hidrofobno „jezgro“ proteina, narušavajući tako strukturnu organizaciju. Dakle, na osnovu hemijske strukture donekle je moguće predvideti potencijal za iritaciju.

Na kraju, pored efekta samog molekula, pokazano je i da nanoformulacije utiču na povećanje penetracije aktivne supstance kroz kožu (kroz već opisane mehanizme), pa se primenom hemijskih pojačivača penetracije u nekom kompleksnom sistemu (kao što je npr. nanoemulzija) mogu očekivati značajniji efekti (Lopes i sar, 2015).

Tabela 1.7. Klase hemijskih pojačivača penetracije i njihovi predstavnici (Lane, 2013)

Grupa hemijskih pojačivača penetracije	Neki predstavnici
Alkoholi	Kratkog lanca: etanol, propilenglikol Dugog lanca: oktanol, dodekanol, miristil alkohol, lauril alkohol, oleil alkohol
Glikoli	propilenglikol, butilenglikol
Masne kiseline	laurinska, linolna, linoleinska, miristinska, oleinska
Pirolidoni	N-metil-2-pirolidon, 2-pirolidon
Sulfoksidi	dimetilsulfoksid
Surfaktanti	Natriju-laurilsulfat, polisorbati...
Terpeni	Monoterpeni: eugenol, D-limonen, mentol, pinen, 1.8-cineol... Seskviterpeni: farnezol, neridol

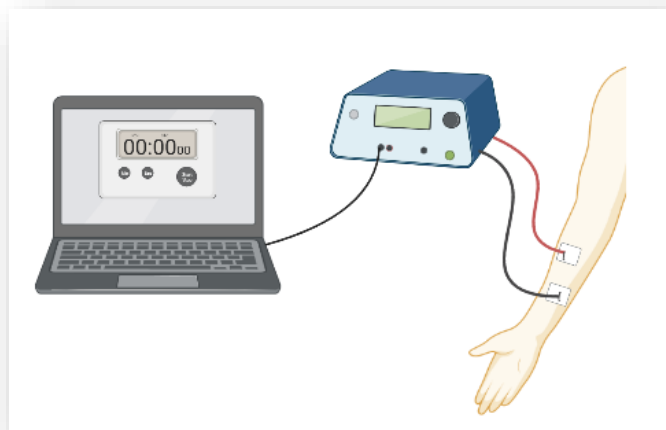
1.7.2.2. Jontoforeza kao fizička metoda za poboljšanje dermalne raspoloživosti aktivnih supstanci

Možda najčešće primenjivani načini za poboljšanje dermalne isporuke aktivnih supstanci u domenu fizičkih (aktivnih) metoda predstavljaju jontoforeza i elektroporacija - metode zasnovane na primeni električne energije. Zbog svoje efikasnosti, ove metode imaju dobro utemeljenu primenu kako u farmaceutskoj, tako i u kozmetičkoj industriji (Zorec i sar, 2013; Jadoul i sar, 1999).

Jontoforeza predstavlja topikalnu primenu jednosmerne električne energije niske gustine (manje od 0,5 mA/cm²) tokom nekoliko minuta ili nekoliko sati (kontinuirano ili diskontinuirano), u kombinaciji sa formulacijom lekovite supstance, čime se olakšava transport kroz kožu, ali i druga tkiva, odnosno biološke membrane. Iako se dominantno koristi za isporuku malih (molekulske mase do nekoliko kDa) polarnih/naelektrisanih molekula, velika prednost jontoforeze ogleda se u mogućnosti da obezbedi (trans)dermalnu isporuku peptida i oligonukleotida, što otvara nova polja u domenu isporuke bioloških lekova (Fukuta i sar, 2020; Zorec i sar, 2013; Gratieri i Kalia, 2011).

Uređaj za jontoforezu sastoji se iz izvora električne energije, mikroprocesora i 2 elektrode (katode i anode), koje treba da budu u kontaktu sa kožom (Slika 1.12). U zavisnosti od karakteristika aktivne supstance, formulacija se pozicionira ispod jedne od elektroda, i ta elektroda je *aktivna*, dok se strujno kolo zatvara pomoću druge, *povratne* elektrode. U slučaju aktivnih supstanci koje su u obliku jona (naelektrisane su, tj. nalaze se u jonizovanom obliku pri datim uslovima primene), aktivna elektroda je ona elektroda koja je istog naelektrisanja kao i supstanca. Kada se obezbedi

protok električne energije, aktivna supstanca će se kretati pod uticajem električnog polja ka suprotno naelektrisanjoj elektrodi, koja je postavljena na maloj udaljenosti od aktivne elektrode. Sa druge strane, pokretačka snaga za elektroneutralne supstance obezbeđena je elektroosmozom, koja je posledica konvektivnog protoka rastvarača, pa je u ovom slučaju aktivna elektroda uvek anoda (Gratieri i Kalia, 2017; Zorec i sar, 2013).



Slika 1.12. Shematski prikaz sistema za jontoforezu

Transport aktivne supstance primenom jontoforeze može se objasniti kroz zajedničko delovanje 3 mehanizma (Gratieri i Kalia, 2017; Guy i sar, 2000):

- elektromigracije,
- elektroosmoze,
- pasivne difuzije.

U električnom polju katjoni se kreću od anode ka dubljim slojevima kože. Analogno tome, anjoni se kreću u suprotnom smeru, od katode. Ovako uređeno kretanje jona od aktivne elektrode ka dubljim slojevima kože naziva se **elektromigracija** – glavni elektrotransportni mehanizam odgovoran za poboljšanje penetracije lekovite supstance koja je naelektrisana pri datim uslovima primene, odnosno poseduje odgovarajući dipolni moment.

Poznato je da koža ima izoelektričnu tačku (pI) 4-4,5, što je, pri fiziološkim uslovima, čini negativno naelektrisanom. Takvo okruženje favorizuje katjonski transport, tj. može se reći da koža deluje kao katjon-selektivna membrana. Ova selektivna permeabilnost indukuje elektroosmotski protok rastvarača u smeru od anode ka katodi, noseći sa sobom elektroneutralne molekule. Upravo ovaj vid kretanja pod uticajem električne energije predstavlja drugi elektrotransportni mehanizam – **elektroosmozu**.

Pasivna difuzija, kao treći transportni mehanizam, dešava se i neovisno o primenjenoj električnoj energiji. Zbog hidrofobne prirode *stratum corneum*-a, zanemarljiva je za polarne i naelektrisane molekule, ali nije bez značaja za nepolarne molekule.

Relativan doprinos svakog od navedenih transportnih mehanizama ukupnoj količini lekovite supstance koja penetrira kroz kožu prvenstveno zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika aktivne supstance, ali i od sastava primenjene formulacije.

Svakako, treba imati u vidu da primenjena električna energija ima uticaj i na samu strukturu površinskog sloja kože. U prisustvu električnog polja dolazi do privremene reorijentacije lipida i proteina *stratum corneum*-a. Narušava se laminarno uređenje lipidnog matriksa, što olakšava transport i molekula, ali i jona (Jadoul i sar, 1999). Razmatrajući ovaj efekat, predloženo je nekoliko mehanizama koji do toga dovode:

- Usled elektromobilnosti, dolazi do promene u koncentraciji strukturno važnih jona koji mogu uticati na permeabilnost i integritet epidermalne barijere (npr. Ca^{2+});
- Povećanje hidratacije kože koje je uočeno nakon jontoforeze smatra se uzrokom smanjenja laminarnog uređenja i povećanja fluidnosti alkil lanaca masnih kiselina *stratum corneum*-a;
- Zbog velike otpornosti površinskih slojeva kože, dolazi do oslobađanja toplote prilikom jontoforeze. Iako povećanje temperature nije toliko značajno, ni ovaj efekat se ne može zanemariti prilikom razmatranja uticaja na promene u strukturi *stratum corneum*-a;
- Svakako, direktan efekat jontoforeze prvenstveno se ogleda u polarizaciji endogenih struktura (pre svega lipida), dovodeći do promene u njihovoj organizaciji i stvaranju „putanja“ koje imaju manju otpornost.

Faktori koji utiču na stepen penetracije lekovite supstance pri primeni električne energije (jontoforeze) su (Gratieri i Kalia, 2017):

○ Jačina električne energije

Kako što je već navedeno, transport aktivne molekule, tj. ukupan fluks tokom jontoforeze (J_{tot}) predstavlja sumu doprinosa fluksu koji potiču od elektromigracije (J_{EM}), elektroosmoze (J_{EO}) i pasivne difzije (J_{PD}):

$$J_{tot} = J_{EM} + J_{EO} + J_{PD} \quad (\text{Jednačina 1.10})$$

Elektromigracija se odnosi na uređeno kretanje jona u prisustvu primenjenog električnog polja, kroz proces koji se može opisati Faradejevim zakonom:

$$J_{EM} = I \cdot t_D / A \cdot F \cdot z_D, \quad (\text{Jednačina 1.11})$$

I - intenzitet primenjene električne struje (u amperima),

t_D - transportni broj supstance/jona,

A - površina poprečnog preseka kroz koji se odvija transport,

F - Faradejeva konstanta,

z_D - valenca jona.

Evidentno je da je primenjena električna struja faktor koji direktno utiče na brzinu i stepen dopremanja naelektrisane aktivne supstance. Efikasnost dopremanja je u direktnoj korelaciji sa trajanjem, intenzitetom i profilom primenjene električne struje. Kroz brojne studije pokazano je da se fluks lekovite supstance može povećati sa povećanjem intenziteta, odnosno gustine primenjene struje (0,15-0,5 mA/cm²). Linearne korelacije između gustine primenjene električne energije i fluksa supstance pokazane su kako za male, tako i za velike molekule.

Doprinos fluksu supstance kroz elektroosmozu zavisi od brzine kretanja rastvarača/nosača (J_v) i koncentracije aktivne supstance (C_s), što se može opisati sledećom jednačinom:

$$J_{EO} = J_v \cdot C_s \quad (\text{Jednačina 1.11})$$

I ovaj vid doprinosa ukupnom fluksu supstance je u direktnoj korelaciji sa jačinom električne energije, jer ona utiče na brzinu protoka rastvarača/nosača aktivne supstance.

Sa druge strane, doprinos fluksu supstance kroz pasivnu difuziju ne zavisi od jačine primenjene električne struje, jer je ovaj proces determinisan isključivo koncentracionim gradijentom i afinitetom supstance za kožu (na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika).

○ Koncentracija aktivne supstance

Može se pretpostaviti da se sa povećanjem koncentracije aktivne supstance u formulaciji povećava i isporuka leka. Međutim, ne može se uvek uočiti linearna korelacija zbog interakcija koje se dešavaju sa kožom, a koje su različite i zavise od osobina same supstance. Za pojedine

supstance, povećanje koncentracije dovodi do povećanja fluksa do određenog momenta, nakon čega profil fluks-koncentracija dostiže plato, i dalje povećanje koncentracije ima neznatan uticaj na fluks.

- **pH vrednost formulacije**

Generalno, pH kože determiniše smer u kome će se odvijati elektroosmotski transport. Iako su postojali pokušaji da se kroz pH vrednost formulacije utiče na značajniju promenu pH vrednosti kože, takve manipulacije nisu efikasne s obzirom na postojanje puferskog kapaciteta kože. Ipak, podešavanjem pH vrednosti formulacije, u slučaju da sadrže supstancu koja ima sposobnost jonizacije, može se favorizovati naelektrisani (jonizovani) oblik supstance, što predstavlja pogodnu metodu za povećanje pokretljivosti molekule u električnom polju, i doprinosi elekromigracionom mehanizmu transporta. Svakako, u praksi treba izbegavati ekstremne vrednosti pH, jer to može izazvati iritaciju i hemijska oštećenja kože, pa su uobičajene pH vrednosti formulacija od blago kiselih do neutralnih (5 - 7,4).

- **Sistem za isporuku aktivne supstance (formulacija)**

Prospektivna formulacija koja bi se primenjivala na koži u kombinaciji sa jontoforezom bi trebalo da ima dobru adhezivnost i električnu provodljivost, da je kompatibilna sa elektrodama i uređajem, da obezbeđuje stabilnost aktivne supstance, ne iritira kožu i ne sadrži konkurentne jone. U tom smislu, hidrogelovi se najčešće koriste kao baza – biokompatibilni su, sadrže veliki udeo vode pa predstavljaju odlične provodnike, lako se nanose i zadržavaju se na koži.

Kako bi se predvidela efikasnost dermalne isporuke lekovite supstance primenom jontoforeze, potrebno je identifikovati sve potencijalne faktore od značaja, a pvenstveno izvršiti analizu aktivnog molekula i odrediti relativan doprinos elekromigracije i elektroosmoze ukupnom fluksu. Dodatno, u cilju uspostavljanja optimalnih uslova isporuke, potrebno je proceniti uticaj koncentracije lekovite supstance, trajanje primene električne energije, kao i gustini električne struje. Ukoliko je količina dopremljenog leka direktno proporcionalna primenjenoj struji i koncentraciji lekovite supstance, onda je moguće proceniti trajanje procesa i površinu kože koja se tretira (koja je u kontaktu sa odeljkom aktivne elektrode), kako bi se dopremila tačno određena doza. Na taj način, moguće je kontrolisati isporuku i individualizovati terapiju.

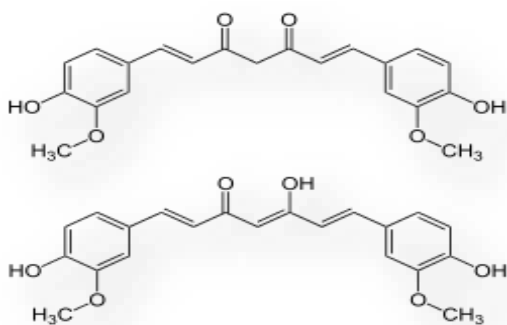
Naravno, efikasnost metode mora biti u ravnoteži sa potencijalnim neželjenim efektima. Kontinuirana istraživanja jontoforeze za topikalnu ili, sve češće, sistemsku isporuku lekovite supstance govore u prilog bezbednosti ove tehnologije. Ipak, zbog potencijalne iritacije kože, tokom uspostavljanja metode, neophodno je sprovesti i odgovarajuću procenu iritacionog potencijala.

1.8. Kurkumin kao model aktivna supstanca

Zbog svog prirodnog porekla i brojnih blagotvornih svojstava, pažnju istraživača već neko vreme privlači kurkumin – polifenol izolovan iz biljke *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*). U Aziji je od davnina poznat kao začin, ali i terapijski agens korišćen u tradicionalnoj ajurveda medicini. Istraživači azijskog kontinenta su ga preneli u Evropu u 14.veku (Sharma i sar, 2005). Jedan od prvih naučnih članaka koji se bavi kurkuminom objavljen je 1937. godine u časopisu *Lancet* (Oppenheimer, 1937). Uprkos dugoj tradiciji, tek tokom poslednje 2 decenije sprovedena su brojna istraživanja koja su potkrepila stavove o lekovitim svojstvima kurmina. Takođe, US FDA je kurkumin svrstala u grupu GRAS supstanci (engl. *generally recognized as safe*) (US FDA, 2019; US FDA, 2017). Ono što istraživačima predstavlja poseban izazov kada je u pitanju ova supstanca, jeste razvoj formulacije kojom bi se prevazišli nedostaci kurkumina u pogledu veoma niske biološke raspoloživosti, koja je osnovni ograničavajući faktor za njegovu primenu, a posledica je njegovih fizičko-hemijskih karakteristika.

1.8.1. Fizičko-hemijska svojstva kurkumina

Kurkumin se dobija iz rizoma biljke *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*), i glavni je predstavnik kurkuminoida – jedinjenja koja su dominantno zastupljena u ovoj biljnoj vrsti. To je kristalan prašak izrazito žute boje, molekulske mase 368,37 g/mol, i niske rastvorljivosti kako u vodi, tako i u uljima. Tačka topljenja kurkumina je oko 183 °C. Hemijski, to je bis- α,β -nezasićeni diketon - (1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion. Kao takav, on podleže keto-enolnoj tautomeriji (Slika 1.13). Pri pH između 3 i 7, dominira diketo oblik, dok je u baznoj sredini, iznad pH 8, dominantno prisutna enolna forma. Kurkumin je u baznoj sredini nestabilan i podleže brzom oksidativnoj degradaciji. Kurkumin pokazuje i fotonestabilnost. Spektralne osobine kurkumina su značajne za njegovo određivanje. Kako je žuto obojen, apsorbuje u vidljivom delu spektra, sa λ_{max} između 408 i 434 nm, u zavisnosti od upotrebljenog rastvarača (Sharma i sar, 2005).



Slika 1.13. Keto (gore) i enolni (dole) oblik kurkumina

1.8.2. Biološka svojstva kurkumina

Efekte kurkumina su brojni, i ispoljavaju se na više nivoa. Poznat je po svojoj antiinflamatornoj, antioksidativnoj, imunomodulatornoj, antikancerogenoj i hemopreventivnoj aktivnosti. Takođe, pokazuje i hipoglikemijske, hepato-, neuro-, nefro- i kardioprotektivne efekte (Yallapu i sar, 2015).

Antiinflamatorna aktivnost kurkumina posledica je inhibicije enzima lipooksigenaze i ciklooksigenaze i smanjenja produkcije proinflamatornih citokina. Uz to, u kiselj sredini, njegov diketo oblik se ponaša kao snažan proton akceptor, što rezultuje značajnom antioksidativnom aktivnošću. Posebno je važna njegova mogućnost modulacije brojnih signalnih puteva i faktora koji indukuju apoptozu i inhibiraju ćelijski rast, što mu daje značajan potencijal za tretman malignih

promena. Između ostalog, utiče na aktivnost NF- κ B, tumor-supresorskog proteina p53, protein kinaza, suprimira ekspresiju epidermalnog faktora rasta i proteina odgovornih za ćelijsku adheziju. Pokazuje i antimikrobnu aktivnost i sposobnost heliranja dvo- i trovalentnih metala (Sharma i sar, 2005).

U kontekstu dermalne primene, ističu se njegovi antiinflamatorni efekti kod psorijaze, pospešivanje zarastanja rana, ali i zaštita od UV zraka, antimikrobna aktivnost, a posebno povoljan efekat kod karcinoma kože – i preventivni i kurativni (Ahangari i sar, 2019; Choudhary i sar, 2019; Panahi i sar, 2019; Yallapu i sar, 2012).

Ipak, uprkos ovako brojnim pozitivnim svojstvima, faktori koji ograničavaju dostizanje njegovih punih kapaciteta ogledaju se u niskoj rastvorljivosti i permeabilnosti, hemijskoj nestabilnosti, uz intenzivan presistemski metabolizam nakon *per os* primene (Gupta i sar, 2013; Yallapu i sar, 2012). Na osnovu navedenih podataka jasno je da formulacija nosača za kurkumin nije nimalo lak zadatak i predstavlja istraživački izazov. Ne samo da je neophodno odabrati adekvatan sistem za isporuku kurkumina, već i uslove tokom izrade treba prilagoditi ovakvo zahtevnoj molekuli. Dodatno, kroz rad sa kurkuminom mogu se anticipirati i neki od potencijalnih problema na koje se nailazi u radu na formulacijama sa novim farmakološkim entitetima, koji najčešće imaju fizičko-hemijske osobine slične kurkuminu, pa kurkumin predstavlja i dobru model supstancu.

Imajući u vidu osobine i efekte kurkumina, nanosistemi predstavljaju jednu od mogućih, potencijalno uspešnih, formulacionih strategija.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Sveukupni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je razvoj niskoenergetskih nanoemulzija za unapređenu dermalnu isporuku kurkumina, uz razumevanje kompleksnih interakcija koji su u osnovi nastanka ovih koloidnih sistema, a koje do sada nisu u potpunosti istražene. Takođe, cilj je i da se performanse kurkumina, kao bioaktivne molekule sa nizom potencijalno povoljnih efekata, maksimizuju kroz njegovu inkorporiranje u pažljivo dizajniran nosač (nanoemulziju). Upravo sa tim, cilj je i razmatranje određenih aspekata fizičkih i hemijskih modaliteta za poboljšanje isporuke aktivnih supstanci u/kroz kožu, sa idejom da se dizajnira prototip inovativnog adhezivnog flastera za dermalnu primenu koji će biti baziran na kombinaciji primene električne energije, kao fizičke metode za poboljšanje dermalne isporuke, i nanoemulzija, kao unapređenih nosača sa nanostrukturom. Generalni cilj je da se na primeru kurkumina, kao model aktivne supstance, sinergističkim efektima dve strategije obezbedi značajno poboljšanje dermalne raspoloživosti aktivne supstance, te da se predloženi pristup potencijalno primeni i na druge slaborastvorne molekule, uz očekivano unapređenje komplijanse pacijenata u domenu dermalne primene lekova.

Aktivnosti usmerene ka ispunjenju ovih ciljeva organizovane su u četiri faze eksperimentalnog rada.

2.1. Cilj prve faze eksperimentalnog rada

Osnovni cilj prve faze eksperimentalnog rada bio je analiza mehanizama koji su u pozadini procesa nastanka niskoenergetskih nanoemulzija kroz spontanoemulgujući postupak – razumevanje prelaznih struktura u postupku nanoemulzifikacije. U toku eksperimentalnog rada, izvršena je analiza faznog ponašanja u sistemima sa različitim tipovima masne faze (odabrane na osnovu fizičkih karakteristika ulja i rezultata studije rastvorljivosti kurkumina kao model aktivne supstance), i smešom polisorbata 80 i sojinog lecitina kao stabilizatora. U nastavku je sproveden niz metoda fizičko-hemijske karakterizacije kako bi se identifikovale interakcije među ekspicijensima (DSC), procenile dinamičke karakteristike i mikrostrukturna organizacija međupovršinskog sloja nanoemulzija - u kontekstu doprinosa koloidnoj stabilnosti (EPR spektroskopija, AFM), te svojstva finalno izrađenih nanoemulzija: procena veličine i distribucije veličina (DLS, LD), morfologije i oblika dispergovanih kapljica (AFM), analiza termalnog ponašanja (DSC), određivanje površinskog naelektrisanja kapi, određivanje pH vrednosti, električne provodljivosti i viskoziteta nanoemulzija.

Ovaj segment istraživanja doprinosi proširivanju savremenih eksperimentalnih nalaza molekularnog uređenja međupovršinskog sloja nanoemulzija.

Nakon sprovedene opsežne karakterizacije, predložena je optimalna formulacija za inkorporiranje kurkumina, uz određivanje maksimalnog kapaciteta za solubilizaciju. Kao poslednji segment prve faze eksperimentalnog rada, formulacije sa kurkuminom podvrgnute su podjednako detaljnoj fizičko-hemijskoj karakterizaciji. Uz standardne metode analize, važan segment bio je usmeren na određivanje tačne lokalizacije kurkumina unutar formulacije, što bi doprinelo proceni njegove dostupnosti nakon primene dizajniranih nanoemulzija i razumevanju interakcija sa biloškim sistemima.

2.2. Cilj druge faze eksperimentalnog rada

Cilj druge faze eksperimentalnog rada bio je usmeren na razvoj formulacija sa monoterpenima (eukaliptolom i pinenom) kao hemijskim pojačivačima penetracije. Poseban segment istraživanja bio je posvećen rasvetljavanju uticaja monoterpena na karakteristike međufaze nanoemulzija. Odabrane formulacije (placebo i sa kurkuminom) podvrgnute su detaljnoj fizičko-hemijskoj karakterizaciji: procena veličine i distribucije veličina (DLS, LD), morfologije i oblika dispergovanih kapljica (AFM), analiza termalnog ponašanja (DSC), procena dinamičkih

karakteristika međupovršinskog sloja (EPR spektroskopija), određivanje površinskog naelektrisanja kapi, određivanje pH vrednosti, električne provodljivosti i viskoziteta naonemulzija.

Takođe, cilj ove faze eksperimentalnog rada je bio i procena dugoročne fizičke stabilnosti placebo nanoemulzija (sa hemijskim pojačivačima penetracije i bez njih) i odgovarajućih nanoemulzija sa kurkuminom, praćenjem promena odabranih svojstava nanoemulzija (veličina i distribucija veličina kapi, zeta potencijal, pH vrednost) u više vremenskih tačaka tokom godinu dana. Uz to, cilj je bio i određivanje hemijske stabilnosti kurkumina solubilizovanog u nanoemulzije.

2.3. Cilj treće faze eksperimentalnog rada

Cilj treće faze eksperimentalnog rada bio je posvećen preliminarnoj biofarmaceutskoj proceni formulacija sa kurkuminom (*in vitro* ispitivanje kinetike oslobađanja), i istraživanju bioloških efekata kurkumina *per se* i nakon solubilizacije u odabrane niskoenergetske nanoemulzije (antioksidativna aktivnost, genotoksični i antigenotoksični potencijal, citotoksična aktivnost prema odabranim ćelijskim kulturama). Proširujući ova saznanja, cilj je bio i da se odrede tačni biohemijski mehanizmi odgovorni za postizanje efekata. U nastavku treće faze eksperimentalnog rada, oslanjajući se na rezultate *in vitro* procene bezbednosti, cilj je bio i *in vivo* procena iritacionog potencijala odabranih formulacija, kao realniji vid procene bezbednosnog profila nanoemulzija.

2.4. Cilj četvrte faze eksperimentalnog rada

Cilj poslednjeg dela eksperimentalnog rada je bio da se dizajnira prototip adhezivnog sistema za dermalnu isporuku aktivne supstance primenom jontoforeze, unutar koga bi se našao rezervoar sa nanoemulzijom sa kurkuminom, uz izvor električne struje. Odabir uslova jontoforeze bazirao se na *in vivo* proceni bezbednosti i praćenju promena biofizičkih parametara kože nakon izlaganja protoku električne struje pri definisanim eksperimentalnim uslovima. U nastavku, cilj je bio da se sprovede *in vivo* procena dermalne raspoloživosti kurkumina iz nanoemulzija (sa hemijskim pojačivačima penetracije ili bez njih), i iz nanoemulzije koja je primenjena u kombinaciji sa jontoforezom (kao fizičkom metodom za poboljšanje penetracije). Sumiranje podataka o stabilnosti formulacija i rezultata *in vivo* procene dermalne raspoloživosti, krajnja ideja je bila da se formira efikasan i prihvatljiv sistem za isporuku kurkumina namenjen dermalnoj primeni.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

Za pripremu placebo i aktivnih uzoraka (nanoemulzija) korišćeni su sledeći ekscipijensi: trigliceridi srednje dužine lanca - Mygliol 812 (Fagron, Holandija), polisorbit 80 (Acros Organics, Belgija), lecitin soje sa 70% fosfatidilholina - Lipoid S 75 (Lipoid, Nemačka), 1,8-cineol (eukaliptol; Sigma Aldrich, SAD), pinen (Sigma Aldrich, SAD), visokoprečišćena voda (GenPure, TKA Wasseranfertigungssysteme GmbH, Nemačka). Kao model aktivna supstanca korišćen je kurkumin (Sigma Aldrich, SAD). Sve ostale supstance i reagensi koji su korišćeni u eksperimentalnom radu bili su farmakopejskog (Ph. Eur), odnosno HPLC kvaliteta, i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja.

3.2. Metode

3.2.1. Ispitivanje rastvorljivosti kurkumina

Ispitivanje rastvorljivosti kurkumina (model lekovite supstance) sprovedeno je u različitim uljima i njihovim smešama (ricinusovom ulju, trigliceridima srednje dužine lanca, izopropilmiristatu, 1,8-cineolu, pinenu), u visokoprečišćenoj vodi, kao i u korastvaračima/kostabilizatorima (etanolu, propilenglikolu, izopropil alkoholu, glicerolu). U ovu svrhu, sprovedeno je ispitivanje rastvorljivosti primenom *shake flask* metode: kurkumin je dodat u višku u 5 g medijuma u kome se ispituje rastvorljivost, a smeše su potom podvrgnute mešanju na orbitalnom šejkeru (IKA® KS 260 basic, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Nemačka) pri brzini od 350 obrtaja/min, na temperaturi od 25 ± 2 °C, tokom 24 h. Nakon toga, uzorci su ostavljeni 4 h bez mešanja, kako bi se uspostavila ravnoteža, a zatim su centrifugirani (Centrifuge MPW-56, MPW Med. Instruments, Poljska) 15 min, pri brzini od 5000 obrtaja/min, kako bi se nerastvoreni kristali kurkumina odvojili. Alikvot dobijenog supernatanta razblažen je metanolom, a koncentracija je određena spektrofotometrijski, primenom Varian Cary-100 UV-VIS spektrofotometra (Varian BV, Holandija) na 409 nm. Kalibraciona kriva u metanolu bila je linearna u opsegu 1–6 µg/ml ($y=0,1372x - 0,0011$; $R^2=0.999$).

3.2.2. Praćenje faznog ponašanja u pseudoternarnom sistemu

Kako bi se odredio region u kome je, sa odabranim ekscipijensima, primenom niskoenergetskih postupaka moguće formirati nanoemulzije, varirani su odnosi masne faze i emulgatora, i metodom titracije vodom konstruisan je (pseudo)ternarni fazni dijagram primenom programa *Sigma Plot*, verzija 12 (*Systat Software*, Čikago; SAD). Postupak kojim se formulacije dobijaju ovom metodom suštinski odgovara niskoenergetskom postupku izrade koji se u literaturi naziva *emulsion phase inversion*. Ali, s obzirom da u osnovi nanoemulzifikacije i ovog i spontanoemulgujućeg postupka leže isti mehanizmi, dobijena nanoemulziona oblast odgovara i spontanoemulgujućem postupku. Ipak, kako bi se dobijeni nalazi potvrdili, pripremljene su smeše masne faze i emulgatora u istim odnosima, a zatim su izrađeni sistemi sa rastućim udelom vode (od 10 do 90%), i to tako što je smeša surfaktanata i masne faze u određenom odnosu dodavana kap po kap u preračunatu količinu vodene faze, uz konstantno mešanje (1000 obrtaja/min) – što odgovara spontanoemulgujućem postupku. Notirana je svaka promena koja se mogla uočiti golim okom: geliranje, pojava zamućenosti ili transparentija. Nanoemulzioni sistemi prepoznati su kao zamućene, njutnovske tečnosti, sa plavičastim odsjajem i prosečnim hidrodinamičkim dijametrom kapi unutrašnje faze ispod 200 nm. Za dalju karakterizaciju, odabrane formulacije izrađivane su spontanoemulgujućim postupkom.

3.2.3. Izrada nanoemulzija odabranih za kasnije faze istraživanja

Nanoemulzije su pripremljene spontanoemulgirajućim postupkom. Prvo je pripremljena smeša masne faze i stabilizatora u odgovarajućem odnosu, uz mešanje na magnetnoj mešalici. Zatim je u vodenu fazu (visokoprešićena voda) kap po kap dodavana smeša masne faze i stabilizatora, uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici, pri brzini od 1000 obrtaja/min. Po dodatku celokupne količine masne faze i stabilizatora, mešanje je nastavljeno još 60 minuta. Izrađene nanoemulzije su prenesene u staklene bočice, hermetički zatvorene, i čuvane zaštićene od svetlosti.

U slučaju nanoemulzija sa kurkuminom, postupak izrade je bio isti, samo je definisana količina aktivne supstance prvo rastvorena u smeši masne faze i stabilizatora, koja je kasnije dodavana u vodenu fazu, na već opisani način.

Inicijalna karakterizacija i placebo i nanoemulzija sa kurkuminom sprovedena je 24 h nakon izrade.

3.2.4. Određivanje kapaciteta placebo nanoemulzija za solubilizaciju kurkumina

Kako bi se odredio kapacitet za solubilizaciju kurkumina (*maximal drug loading*), pripremljene su nanoemulzije sa rastućim udelom kurkumina u formulacijama – 0,5, 1, 2, 3, 4 mg/ml. Nakon izrade, nanoemulzije su ostavljene i praćena je eventualna pojava precipitacije aktivne supstance ili narušavanje strukture nanoemulzija. Dodatno, nanoemulzije su, u cilju detekcije prisustva nerastvorenih kristala aktivne supstance, posmatrane i pod polarizacionim mikroskopom, i podvrgnute su termalnoj analizi. Za maksimalni kapacitet za inkapsulaciju kurkumina određena je najviša koncentracija kurkumina pri kojoj nije došlo do vidljive precipitacije i narušavanja strukture nanoemulzije, i pri kojoj instrumentalnim metodama nisu detektovani nerastvoreni kristali.

3.2.5. Karakterizacija nanoemulzija

3.2.5.1. Fizičko-hemijska karakterizacija

Određivanje veličine i distribucije veličina kapi

Za analizu veličine kapi primenjena je *batch-mode* DLS metoda, prema operativnoj proceduri NCL-PCC-1 (Hackley i Clogston, 2010), korišćenjem uređaja *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija).

Nanočestice/nanokapi u vodenoj sredini karakteriše konstantno Braunovo kretanje. Pri dovoljno niskim koncentracijama dispezne faze, to kretanje zavisi od viskoziteta tečne faze, temperature i veličine čestica. Ova relacija se može predstaviti Stocks-Einstein jednačinom:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Jednačina 3.1})$$

d_H - hidrodinamički dijametar čestice/kapi,

k - Bolcmanova konstanta,

T - temperatura,

η - viskozitet tečnosti,

D - difuzioni koeficijent.

Instrument određuje autokorelacionu funkciju uzorka - G (koja prati brzinu fluktuacije intenziteta rasute svetlosti, *Jednačina 3.2*), na osnovu koje određuje difuzioni koeficijent čestica, nakon čega je moguće izračunati i prečnik. Za čestice koje nisu sfernog oblika, radi se o hidrodinamičkom prečniku – prečniku sfere koja bi imala isti difuzioni koeficijent kao i data čestica.

$$G = \int_0^\infty I(t)I(t + \tau)dt = B + Ae^{-2q^2 D\tau} \quad (\text{Jednačina 3.2})$$

q – modul talasnog vektora rasejanja: $q = \frac{4\pi\eta\sin(\frac{\theta}{2})}{\lambda}$

η - indeks refrakcije disperzanta

λ - talasna dužina svetlosti lasera

θ - ugao detekcije

B – bazna linija autokorelacione funkcije

A – odsečak na y-osi ($A \leq 1$)

Kada se autokorelaciona funkcija jednom generiše, mogu se koristiti različite metode analize podataka kako bi se iz “sirovih” rezultata dobile odgovarajuće informacije. Najčešći način podrazumeva analizu kumulanaata, i upravo je ona predstavljena i u međunarodnom ISO standardu 22412:2017 *Particle size analysis — Dynamic light scattering* (ISO; 2017). Rešavanjem ove funkcije dobijaju se dve vrednosti – hidrodinamički dijametar (*Z-average diameter; Z-ave*) i indeks polidisperznosti (PDI). Uz pretpostavku da veličine čestica slede Gausovu raspodelu, može se dobiti grafik distribucija veličina čestica u funkciji relativnog intenziteta rasute svetlosti (*intensity-based size distribution*). *Z-ave* predstavlja harmonijsku sredinu svih *intensity-based* pikova distribucije veličina. Iz tog razloga, ovaj parameter treba vrlo pažljivo tumačiti ukoliko uzorak nije monodisperzan. Indeks polidisperznosti govori o širini pika, tj. o varijansi pretpostavljene Gausove raspodele veličina čestica. Manje vrednosti indeksa polidisperznosti govore o uskoj distribuciji veličina, odnosno o monomodalnoj raspodeli. Kako bi se tokom merenja dobio optimalan signal i izbegle interferencije, potrebno je razblažiti uzorak tako da atenuacija bude između 7 i 9.

Ispitivani uzorci nanoemulzija su neposredno pre merenja razblaženi visokoprečišćenom vodom u odnosu 1:100 V/V i preneti u polistirensku kivetu za jednokratnu upotrebu. Merenje je sprovedeno na temperaturi od 25°C, primenom He–Ne lasera (talasna dužina svetlosti: 633 nm), uz detekciju rasute svetlosti pod uglom od 90°. Za analizu podataka korišćen je softver *Malvern Dispersion Technology Software – DTS (Nano)*, verzija 5.00.

Kako je merni opseg uređaja *Zetasizer Nano ZS90* 1 nm – 3 μm, kao dodatna metoda u analizi veličina kapi, a sa ciljem detekcije eventualno prisutnih većih kapi ili agregata, primenjena je i laserska difrakcija (statičko rasipanje svetlosti), korišćenjem uređaja *Malvern Mastersizer 2000* (Malvern Instruments Ltd). Primenom Mie teorije, na osnovu načina rasipanja svetlosti koje se dešava kada čestica prođe kroz snop laserske svetlosti, uz poznavanje indeksa refrakcije i apsorpcije materijala koji se ispituje, moguće je odrediti veličinu čestica. Analiza podataka izvršena je primenom softvera *Malvern 2000*, verzija 5.22, koji sirove podatke generisane tokom merenja konvertuje u zapeminsku raspodelu veličina čestica. Merenje je sprovedeno pri temperaturi od 25 °C, a kao parametri od interesa, korišćene su izračunate vrednosti volumenskih prečnika - $d(10)$, $d(50)$, $d(90)$ (vrednosti koje govore o procentu čestica/kapi u zadatoj zapremini čiji prečnik je ispod te izračunate vrednosti), i $D[4,3]$ (prosečna vrednost prečnika).

Određivanje površinskog naelektrisanja kapi

Zeta potencijal, kao indikator površinskog naelektrisanja, određen je primenom uređaja *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern Instruments Ltd), određivanjem elektroforetske pokretljivosti kapljica u električnom polju i primenom Henrijeve (Henry) jednačine. Brzina kretanja čestica/kapljica u električnom polju (elektroforetska mobilnost) zavisi od nekoliko faktora:

- jačine električnog polja,
- dielektrične konstante medijuma,
- viskoziteta medijuma,
- zeta potencijala (površinskog naelektrisanja).

Henrijeva jednačina opisuje njihove relacije:

$$U_e = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad (\text{Jednačina 3.3})$$

U_e – elektroforetska mobilnost,

z – zeta potencijal,

ε – dielektrična konstanta medijuma,

η – viskozitet medijuma,

$f(ka)$ – Henrijeva funkcija (za vodene medijume ima vrednost 1,5 – Smoluchowski aproksimacija).

Uređaj vrši merenje elektroforetske pokretljivosti primenom dopler laserske velosimetrije, na osnovu čega je moguće odrediti i vrednost zeta potencijala.

Kako bi se sprečile fluktuacije u električnoj provodljivosti vode, neposredno pre merenja, uzorci su razblaženi u odnosu 1:100 (V/V) visokoprečišćenom vodom čija provodljivost je podešena primenom 0,9% *m/m* rastvora NaCl na 50 $\mu\text{S/cm}$, a zatim su preneti u savijenu mernu ćeliju sa dve elektrode.

Polarizaciona mikroskopija

Polarizaciona svetlosna mikroskopija u domenu karakterizacije nanoemulzija značajna je za praćenje tranzicionih faza koje nastaju u toku procesa nanoemulzifikacije. Kako bi se pratile strukture koje nastaju na dodirnoj površini ulje-surfaktani-voda za odabrani odnos stabilizatora i masne faze (*surfactant-to-oil ratio* – SOR), 2 faze (smeša ulje/surfaktant i voda) dovedene su u kontakt na mikroskopskoj pločici: nanosena je jedna kap smeše ulja i surfaktanata, a zatim je na graničnu površinu pozicionirana jedna kap visokoprečišćene vode. Nastale strukture su zatim posmatrane pod uveličanjem od 100, 200 i 400 puta primenom mikroskopa *Carl Zeiss ApoTome Imager Z1* (Zeiss, Nemačka), uz dugitalnu kameru *AxioCam ICc1*, uz podršku programa *AxioVision 4.6*. Dodatno, kod izrađenih nanoemulzija, ova metoda je primenjena i u cilju detekcije eventualno prisutnih kapi čije dimenzije prevazilaze 1 μm , kao i za detekciju potencijalno prisutnih nesolubilizovanih kristala aktivne supstance.

Mikroskopija atomskih sila (AFM)

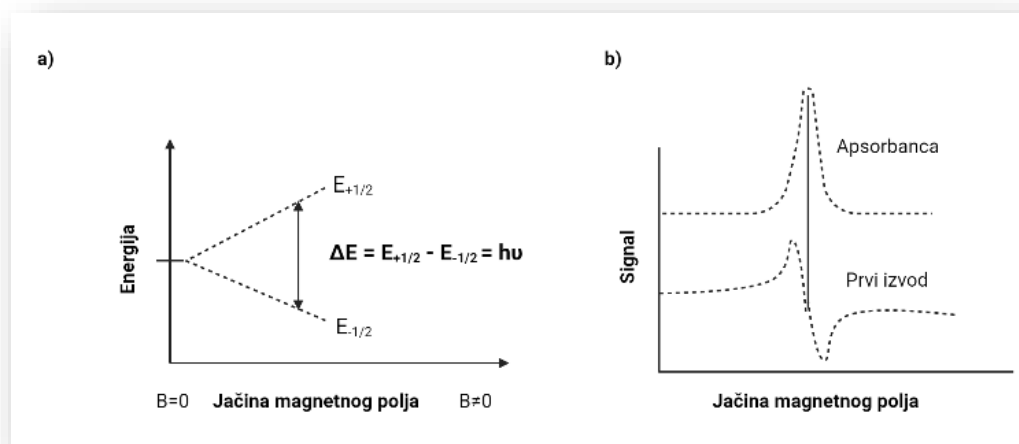
Mikroskopija atomskih sila primenjena je kao tehnika visoke rezolucije u cilju morfološke karakterizacije nanoemulzija (oblik i površinske karakteristike dispergovanih kapi), kao i za potvrdu rezultata koji se odnose na procenu veličine kapi. Ova metoda predstavlja skenirajuću mikroskopiju sa rezolucijom nanometarskog reda. Princip rada podrazumeva da sonda mikroskopa, pomoću iglice na vrhu, interaguje sa uzorkom. Na osnovu te interakcije, dolazi do savijanja sonde, na osnovu čega se može rekonstruisati topografija uzorka. U beskontaktnom režimu snimanja, iglica sonde ne dodiruje uzorak, već osciluje iznad njega, na rastojanju manjem od 10 nm. Vand der Valsove sile (ili bilo koje druge sile dugog dometa koje deluju iznad površine uzorka) dovode do smanjenja frekvencije oscilovanja sonde, a topografska slika uzorka se dobija na osnovu merenja rastojanja između iglice i uzorka (Jokanović, 2014a). Analiza je urađena primenom mikroskopa *AutoProbe CP-Research SPM* (TM Microscopes Bruker, Nemačka). Uzorci nanoemulzija su razblaženi visokoprečišćenom vodom u odnosu 1:100 V/V a zatim je 10 μl razblaženja nanoseno na silikatne pločice visokog kvaliteta (Highest Grade V1 Mica Discs, Ted Pella Inc., Kalifornija), dimenzija 15 mm x 0,21 mm. Uzorci su osušeni u vakuumu. Snimanje je sprovedeno na vazduhu, u beskontaktnom režimu, primenom sonde Bruker Phosphorous (n) doped silicon Tap300, model MPP-11123-10, sa omotačem od aluminijuma i simetričnim vrhom. Pokretačka frekvencija bila je 300 kHz. Prikupljeni su topografski snimci i snimci “signal-greška”, koji su potom analizirani primenom softverskih paketa *Image Processing and Data Analysis* (verzija 2.1.15) i *SPMLab Analysis, DI SPMLab NT* (verzija 6.0.2).

Ova metoda primenjena je i za dodatnu analizu tranzicionih struktura koje nastaju pri kontaktu ulje-surfaktant-voda. Kao i kod polarizacione mikroskopije, kap (10 μl) smeše ulja i surfaktanata nanoseno je na silikatnu pločicu, a zatim je na graničnu površinu nanoseno 10 μl visokoprečišćene vode. Dalja manipulacija uzorkom sprovedena je na prethodno opisan način.

Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR spektroskopija)

Kako bi se dobio detaljniji uvid u mikrostrukturu i karakteristike međupovršinskog sloja nanoemulzija (fluidnost interfaze), kao i sa ciljem procene lokalizacije aktivne supstance u formulaciji, sprovedena je EPR spektroskopija, uz obeležavanje uzorka. EPR, još poznata i kao elektron spin rezonantna spektroskopija (ESR), primenjuje se za analizu materijala sa

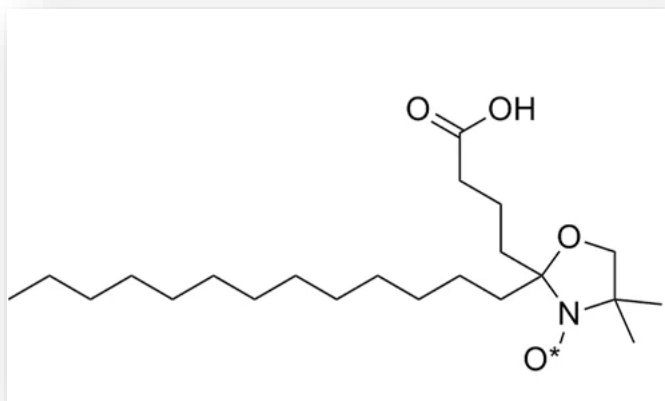
paramagnetnim osobinama. Ova metoda se zasniva na činjenici da se elektroni, kao naelektrisane čestice koje se okreću oko svoje ose, ponašaju kao mali magneti. Svaki elektron poseduje svoj magnetni moment i odgovarajući spinski kvantni broj ($1/2$ ili $-1/2$), i kada na njega deluje spoljašnje magnetno polje, doći će do usmerenog kretanja elektrona (precesije) u jednom od dva moguća smera: u smeru spoljašnjeg magnetnog polja (paralelna orijentacija), ili u suprotnom smeru (antiparalelna orijentacija). Delovanjem spoljašnjeg magnetnog polja dolazi do stvaranja novih energetske nivoa među kojima se mogu desiti prelazi elektrona koji su indukovani apsorpcijom, odnosno emisijom zračenja koje je jednako energetskej razlici između nivoa (Slika 3.1a) Elektroni koji su orijentisani u suprotnom smeru od spoljašnjeg magnetnog polja imaju i antiparalelni spin ($-1/2$) i nalaze se na nižem energetskej stanju u odnosu na one sa paralelnim spinom ($+1/2$). Ukoliko se na elektrone deluje mikrotalasnim zračenjem, može doći do apsorpcije zračenja i prelaska elektrona na viši nivo, odnosno do stimulisane emisije i prelaska elektrona na niži nivo. EPR spektar nastaje menjanjem jačine magnetnog polja uz konstantnu frekvenciju mikrotalasnog zračenja koje se upućuje ka uzorku. Kako se menja jačina magnetnog polja, povećava se energetska razlika između nivoa, sve do momenta kada ona ne dostigne energiju mikrotalasnog zračenja ($h\nu$), kada nastaje rezonancija. Prema Maksvel-Bolcmanovoj raspodeli, broj elektrona u nižem energetskej stanju prevazilazi populaciju u višem energetskej stanju. Stoga je prelazak elektrona u viši energetskej nivo statistički verovatnija promena, pa je neto efekat apsorpcija zračenja. Dakle, signal u EPR spektru predstavlja količinu apsorbovane energije mikrotalasnog zračenja u promenljivom magnetnom polju, ali najčešći način prikazivanja podrazumeva predstavljanje zavisnosti prvog izvoda apsorpcije od jačine magnetnog polja (Slika 3.1b). Treba napomenuti i da, usled interakcije između elektrona sa nesparenim spinom i bliskim nuklearnim spinom (hiperfino sprezanje), može doći do formiranja dodatnih energetskej stanja, što čini da EPR spektar bude višelinijiski. Širina i intenzitet spektralnih linija zavise i od interakcija u blizini molekula koji sadrži nespareni elektron, pa se njihovom analizom mogu dobiti podaci o molekularnom kretanju, odnosno o mikroorganizaciji u blizini molekula sa paramagnetnim svojstvima (Jokanović, 2014b; Marsh, 1989.)



Slika 3.1. a) Stvaranje energetskej nivoa pod delovanjem spoljašnjeg magnetnog polja
 b) Zavisnost apsorpcije energije od jačine magnetnog polja, pri fiksnoj frekvenciji mikrotalasnog zračenja (Prilagođeno prema referenci Jokanović, 2014b)

Kao obeleživač uzorka (*spin probe*) korišćena je 5-doksil stearinska kiselina (5-DSA) – paramagnetni molekul koji ima amfifilne karakteristike. Zbog takve strukture, 5-DSA se u kontaktu sa nanoemulzijom pozicionira upravo u međupovršinskom sloju, između molekula surfaktanata. Mikrookruženje utiće na dinamiku kretanja 5-DSA u međusloju, čijom analizom se može dobiti informacija o rigidnosti/fluidnosti njenog okruženja i organizaciji na mikro nivou. Doksil prsten

povezan je sa C-5 atomom (Slika 3.2) – bliže polarnoj glavi 5-DSA. Prema tome, nakon pozicioniranja obeleživača, paramagnetni deo molekula nalazi se bliže polarnim segmentima međupovršinskog sloja, te i podaci dobijeni o mikrororganizaciji međufaze više odražavaju karakteristike hidrofилnog dela sloja amfifila. Dodatno, poređenjem dinamike kretanja 5-DSA u placebo nanoemulzijama i nanoemulzijama sa aktivnom supstancom, moguće je steći uvid u lokalizaciju aktivne molekule i njene interakcije sa komponentama sistema. Posebna pogodnost ove metode leži u činjenici da pripada tzv. „nedestruktivnim” metodama, tj. ne dovodi do narušavanja strukture uzorka tokom analize, što dobijene rezultate čini realnijim.



Slika 3.2. Molekulska struktura 5-doksil stearinske kiseline

Za obeležavanje uzorka korišćen je etanolni rastvor 5-DSA koncentracije 7,8 mM. U plastične test tube za centrifugu preneto je 15 μ l ovog rastvora, koji je potom uparen (kako bi se etanol uklonio), a zatim je dodat 1 ml uzorka (nanoemulzije). Nakon intenzivnog mešanja tokom 15 minuta, uzorci su ostavljeni preko noći, kako bi se osigurala raspodela obeleživača u uzorku. Koncentracija 5-DSA u uzorku bila je 0,117 mM. Uzorci su analizirani nakon 24 h. U staklene kivete (WG-813-Q Wilmad, Buena, NJ, SAD) preneto je 200 μ l uzorka, a spektri su snimljeni priemenom *Bruker EMX EPR* spektrometra (Nemačka), na temperaturi od 25 °C. Uslovi merenja bili su: centralno polje – 0,349 T; opseg skeniranja – 0,01 T; pojačanje – $5 \cdot 10^3$; vremenska konstanta – 5,12 ms; amplitudna modulacija – 0,4 mT; frekvencija – 9,76 GHz. Analiza svakog uzorka ponovljena je 3 puta. EPR spektar 5-DSA analiziran je kako bi se prikupili podaci o molekulskom kretanju i mikroorganizaciji međupovršinskog sloja. U tom kontekstu, kao parametar koji reflektuje mobilnost obeleživača u međupovršinskom sloju i lokalni mikroviskozitet, određeno je rotaciono korelaciono vreme (τ_r , vreme potrebno da molekul obeleživača rotira za 1 radijan), primenom sledeće jednačine (ali i odgovarajućih kompjuterskih simulacija):

$$\tau_R = (6 \times 10^{-10}) * [(h_0/h_{+1})^{1/2} + (h_0/h_{-1})^{1/2} - 2] \Delta H_0 \quad (\text{Jednačina 3.3})$$

ΔH_0 – širina centralnog pika (na poluvisini),

h_0, h_{-1}, h_{+1} – visine 3 spektralne linije u EPR spektru obeleživača.

Za prikupljanje i analizu podataka korišćen je *Bruker WinEPR* program, a sve spektralne simulacije sprovedene su u programu *MTHLAB*, primenom *EasySpin Toolbox for EPR Spectroscopy*.

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry* - DSC), kao metoda termalne analize, primenjena je kako bi se potvrdila fizička forma aktivne supstance u uzorku i detektovale potencijalne interakcije između komponentata u uzorku. Mala količina uzorka

(oko 10 mg) nanosena je u standardne aluminijumske nosače, koji su potom hermetički zatvoreni. Uzorci su zatim podvrgnuti zagrevanju u opsegu od 25 °C do 200 °C, pri brzini zagrevanja od 2 °C/min, i protoku azota od 50 ml/min, primenom uređaja *Mettler DSC 820* (Mettler Toledo GmbH Analytical, Nemačka). Dodatno, u slučaju nanoemulzija, kako bi se uklonila mogućnost da intenzivan endotermni pik koji potiče od isparavanja vode utiče na detekciju drugih termalnih događaja u uzorku, pripremljeni su i osušeni uzorci nanoemulzija (sušeni tokom 24 h, na vazduhu, u otvorenom aluminijumskom nosaču), koji su podvrgnuti analizi pri istim uslovima.

Dodatno, kako bi se dobio siguran uvid u raspodelu masne i vodene faze u nanoemulzijama, uzorci smeše surfaktanata i ulja (SOR=1) sa rastućim udelom vode podvrgnuti su hlađenju u temperaturnom opsegu od 25 °C do – 50 °C, pri brzini hlađenja od 10 °C/min.

Analiza termalnih krivih i određivanje relevantnih termalnih parametara (entalpija, $T_{\text{topljenja}}$, $T_{\text{zamrzavanja}}$ vode), određeni su primenom *Mettler Toledo STAR_e* softvera.

Reološka karakterizacija

U cilju potvrde njutnovskog tipa proticanja odabranih nanoemulzija, kao i sa ciljem određivanja njihovog viskoziteta, sprovedena su merenja primenom reometra *DV-III ULTRA Programmable* (Brookfield Engineering Laboratories, Middlesboro, SAD), uz upotrebu mernog sistema tipa rotirajućeg cilindra. Reološka karakterizacija je sprovedena na temperaturi od 20 ± 1 °C, i opsegu brzina rotacije od 20 do 200 obrt/min. Analiza uzoraka podržana je softverom *Rheocalc software*, verzija 4.3.

Određivanje gustine komponenata masne faze emulzija

Merenje gustina komponenata masne faze nanoemulzija sprovedano je unacianje 1 ml ispitivanog uzorka kroz otvor denzitometra *DMA 4500* (Anton Paar, Austrija).

Merenje električne provodljivosti

Merenje električne provodljivosti poslužilo je kao jednostavan način za procenu tipa nanoemulzionog uzorka, odnosno raspodele uljane i vodene faze u toku analize faznog ponašanja pseudoternarnog sistema. Merenje je urađeno nakon direktnog uranjanja elektrode konduktometra *Sensio+EC 71 conductivity meter* (Hach Lange GmbH, Nemačka) u smeše ulja i surfaktanata sa rastućim udelom vode, kao i u finalne nanoemulzije, na temperaturi od 25 ± 2 °C.

Merenje pH vrednosti

pH vrednost formulacije važna je sa aspekta puta primene, ali i za održavanje hemijske stabilnosti i efikasnosti aktivne molekule - u slučaju aktivne molekule koja pokazuje pH-zavisnu hemijsku stabilnost (kao što je kurkumin). Merenja su sprovedena direktnim uranjanjem elektrode pH-metra *HI9321* (Hanna Instruments Inc, Ann Arbor, Michigan, SAD) u uzorke nanoemulzija, na temperaturi 25 ± 2 °C.

Procena fizičke stabilnosti nanoemulzija

Fizičke stabilnost izrađenih nanoemulzija tokom perioda ispitivanja sprovedena je merenjem prosečne veličine kapi i indeksa polidisperznosti, zeta potencijala, pH vrednosti i električne provodljivosti odabranih formulacija. Ispitivanja su sprovedena inicijalno (24 h nakon izrade), a zatim u definisanim vremenskim intervalima: nakon mesec dana, 6 meseci i godinu dana. U toku ovog perioda, formulacije su čuvane na sobnoj temperaturi (25 ± 2 °C i 55 ± 5% RV), zaštićene od svetlosti.

3.2.5.2. Biološka karakterizacija

Procena antioksidativnog potencijala

U cilju procene antioksidativnog potencijala kurkumina *per se*, a zatim i nanoemulzija sa kurkuminom, sprovedena su primenom DPPH testa, FRAP testa, kao i procena antioksidativnog potencijala primenom EPR spektroskopije.

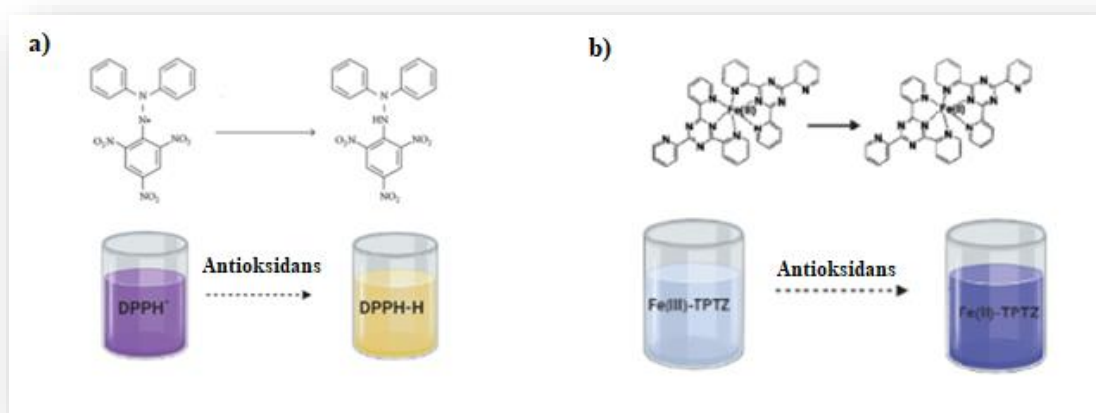
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) test

Ovaj test ima veoma široku primenu u proceni potencijala neke supstance za zaustavljanje aktivnosti slobodnih radikala. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, Slika 3.3) predstavlja stabilan slobodni radikal, rastvorljiv u organskim rastvaračima, dajući tamnoljubičasti rastvor, sa maksimumom apsorpcije svetlosti talasne dužine 515-520 nm. Antioksidans koji ima sposobnost da donira proton (H-radikal), može reagovati sa DPPH, uz formiranje molekula DPPH-H, i posledično smanjenje intenziteta ili gubitak ljubičaste boje rastvora. Stepenn smanjenja intenziteta boje ovisi o potentnosti antioksidansa, njegovoj koncentraciji, ali i dužini trajanja eksperimenta. Procenat inhibicije slobodnog radikala izračunava se na sledeći način:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_{\text{placebo uzorak}} - A_{\text{ispitivani uzorak}}}{A_{\text{placebo uzorak}}} * 100\% \quad (\text{Jednačina 3.4})$$

A – apsorbancija rastvora na talasnoj dužinu maksimuma apsorpcije DPPH radikala

Nakon prikazivanja zavisnosti procenta inhibicije od koncentracije antioksidansa, moguće je izračunati vrednost IC₅₀ – koncentracija antioksidansa pri kojoj dolazi do smanjenja apsorbancije DPPH za 50% (Nile i sar, 2012).



Slika 3.3. Pojednostavljen shematski prikaz antioksidativnih testova:
a) DPPH test; b) FRAP test

Kako bi se odredila antioksidativna aktivnost kurkumina, pripremljeni su rastvori kurkumina u metanolu različitih koncentracija (0,25; 0,1875; 0,125; 0,0625 i 0,03125 mg/ml). Pripremljen je rastvor DPPH radikala u metanolu (0,1mM), a zatim je po 3,6 ml ovog rastvora pomešano sa po 400 μ l svakog od rastvora kurkumina. Nakon opisane pripreme, finalne koncentracije kurkumina u reakcionim smešama bile su: 0,025; 0,01875; 0,0125; 0,00625; 0,003125 mg/ml. Na ovaj način, pokriven je opseg apsorbancija DPPH radikala od 0,1 do 0,9. Nakon mešanja u toku 30 minuta na orbitalnom šejkeru (IKA® KS 260 basic, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Nemačka) pri brzini od 350 obrtaja/min, na temperaturi od 25 \pm 2 °C, zaštićeno od svetlosti, izmerene su apsorbancije uzoraka na 517 nm primenom Varian Cary-100 UV-VIS spektrofotometra (Varian BV, Middelburg, Holandija). Kontrolni uzorak pripremljen je sa 400 μ l metanola umesto rastvora kurkumina.

Konstruisan je grafik zavisnosti procenta inhibicije od koncentracije kurkumina, nakon čega je linearnom regresionom analizom određena IC_{50} vrednost. Sa ciljem poređenja, isti eksperiment sproveden je i sa tokoferolom, takođe vrlo potentnim antioksidansom prirodnog porekla, koji poseduje i strukturnu sličnost sa kurkuminom.

Procena antioksidativnog potencijala kurkumina iz nanoemulzija procenjena je na isti način, ali su formulacije razblažene visokoprečišćenom vodom do prethodno odabranih koncentracija, a zatim dodate rastvoru DPPH. Kontrolni uzorak pripremljen je sa 400 μ l visokoprečišćene vode.

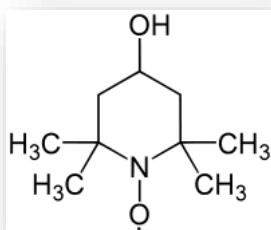
FRAP test (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power)

Ovaj test zasniva se na sposobnosti antioksidansa da izvrši redukciju Fe^{3+} do Fe^{2+} jona. Prednost ovog testa ogleda se u činjenici da se odigrava u vodenoj sredini, što pogoduje stabilnosti lipidnih formulacija (kao što su nanoemulzije), tj. ne dolazi do narušavanja njihove strukture tokom testa. Za sprovođenje testa potrebno je pripremiti FRAP reagens, koji se sastoji iz 300 mM acetatnog pufera (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-trispiridil-s-triazin) rastvora u 40 mM HCl i 20 mM rastvora $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ u prečišćenju vodi. Odnos komponentata je 1:1:10 (npr. 2,5 ml + 2,5 ml + 25 ml). U reakciji antioksidansa sa FRAP reagensom dolazi do formiranja Fe^{2+} jona i pojave plave boje rastvora (Slika 3.3), sa maksimumom apsorpcije na 595 nm. Rezultat testa predstavlja se kao FRAP vrednost – mmol Fe^{2+} koji nastaje po gramu antioksidansa.

Kako bi se odredila FRAP vrednost za kurkumin, 100 μ l metanoloznog rastvora koncentracije 0,1875 mg/ml pomešano je sa 3 ml sveže pripremljenog FRAP reagensa, a zatim je smeša inkubirana 30 minuta na 37 °C uz mešanje pri brzini od 50 obrtaja/min (*Orbital Shaker-Incubator ES-20*, Biosan, Litvanija), nakon čega je izmerena apsorpcija uzorka na 593 nm, na *Varian Cary-100 UV-VIS* spektrofotometru (Varian BV, Middelburg, Netherlands). Kontrolni uzorak pripremljen je sa 100 μ l metanola. Uzorci nanoemulzija ispitani su na isti način, uz razliku što su razblaženi visokoprečišćenom vodom do odabrane koncentracije, dok je kontrolni uzorak pripremljen sa odgovarajućim razblaženjem placebo formulacije. FRAP vrednost (mmol Fe^{2+} /g kurkumina) izračunata je na osnovu standardne krive dobijene od rastvora $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, koja pokriva koncentracije od 25 μ mol/l do 400 μ mol/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.

Procena antioksidativne aktivnosti primenom EPR spektroskopije

Zahvaljujući tome što slobodni radikali poseduju paramagnetna svojstva, procena antioksidativnog potencijala uzorka može se sprovesti i primenom EPR spektroskopije. Za tu namenu, korišćen je 4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPOL, Slika 3.4), stabilan slobodni radikal. Ovaj molekul poseduje paramagnetna svojstva i može biti detektovan EPR spektroskopijom. U prisustvu uzorka sa antioksidativnom aktivnošću, dolazi do njegove neutralizacije i smanjenja EPR signala. Na ovom principu zasniva se određivanje antioksidativne aktivnosti primenom EPR spektroskopije.



Slika 3.4. 4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPOL)

Tipična reakciona smeša sastojala se iz 80% V/V vodenog rastvora slobodnog radikala (1mM), i 20% V/V ispitivanog uzorka (rastvor kurkumina; nanoemulzija sa kurkuminom; placebo nanoemulzija). Sveže pripremljen rastvor TEMPOL-a pomešan je sa uzorkom neposredno pre

merenja i prenet u EPR staklenu kivetu. EPR spektri tempola su snimljeni na sobnoj temperaturi, u definisanim vremenskim intervalima: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 i 60 minuta nakon mešanja sa uzorkom. EPR signal TEMPOL-a sastoji se iz 3 karakteristična pika. Intenzitet signala (površina ispod krive EPR signala) smanjuje se u prisustvu antioksidansa, a procenat inhibicije EPR signala može se izračunati primenom sledeće jednačine:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A}{A_0} \cdot 100 \quad (\text{Jednačina 3.5})$$

A_0 – signal bez ispitivanog uzorka,

A – signal u prisustvu ispitivanog uzorka

Spektri su snimljeni primenom *Bruker EMX EPR* spektrometra (Bruker, Nemačka), na temperaturi od 25 °C. Uslovi merenja bili su sledeći: centralno polje – 0,349 T; opseg skeniranja – 0,01 T; pojačanje – $4,48 \cdot 10^3$; vremenska konstanta – 1,28 ms; amplitudna modulacija – 0,4 mT; frekvencija – 9,78 GHz. Prikupljanje i obrada podataka sprovedena je primenom *BrukerWinEPR* softvera.

Procena genotoksičnog i antigenotoksičnog efekta: COMET test

Procena genotoksičnog efekta

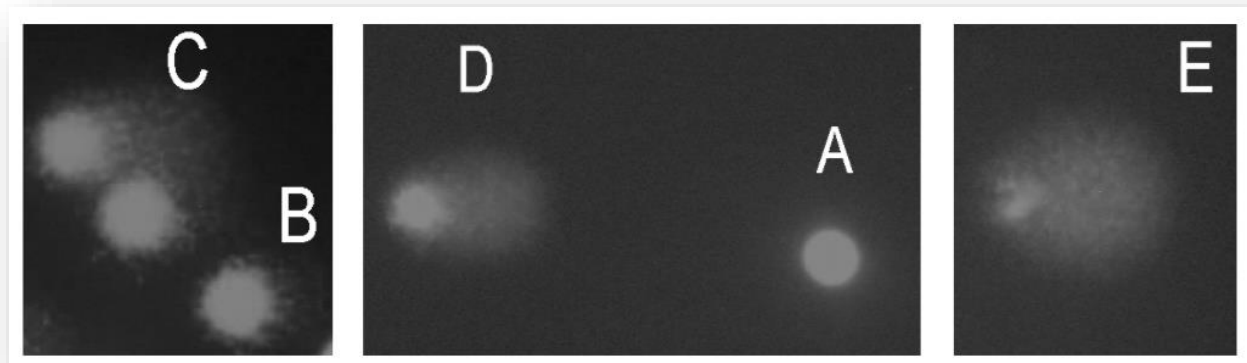
Kako bi se procenila bezbednost formulacija nanoemulzija, sprovedeno je ispitivanje genotoksičnosti (potencijala da izazovu oštećenje DNK) upotrebom COMET test. Protokol za sprovođenje ove studije odobren je od strane Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu odlukom 1580/2 od 28.11.2019. godine.

Uzorci periferne krvi iz prsta 3 dobrovoljca (ženskog pola, uzrasta od 25 do 39 godina, nepušači, nisu primenjivali medikamentoznu terapiju ili suplementaciju, a neposredno pre testa nisu konzumirali alkohol) prikupljeni su u kontejnere sa heparinom. Po 6 μ l svakog uzorka suspendovano je u agarozni niske tačke topljenja (konc. 0,67%), i naneto na mikroskopsku pločicu koja je prethodno prekrivena slojem 1% agaroze normalne tačke topljenja. Mikroskopske pločice su poklopljene pokrovnim staklom i ostavljene u frižideru (na 4°C), kako bi se agarozni omotač stegao. Nakon očvršćavanja, na ćelijske suspenzije dodato je po 50 μ l formulacija koje se testiraju, odnosno 50 μ l rastvora vodonik-peroksida koncentracije 50 mM (pozitivna kontrola) ili 50 μ l PBS-a (negativna kontrola). Tretirane ćelije su zatim prekrivene, i ostavljene da se inkubiraju na temperaturi od 37 °C, tokom 30 minuta. Nakon tretmana, preko uzoraka je ponovo nanesen sloj agaroze niske tačke topljenja, a pločice su prenete u frižider na 5 minuta, kako bi se novi agarozni sloj stegao. Po isteku predviđenog vremena, pločice su potopljene u hladan rastvor za liziranje ćelija (2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% TritonX 100 i 10% DMSO, pH 10) i tako ostavljene preko noći. To je omogućilo razaranje ćelijske membrane i oslobađanje DNK iz humanih ćelija cele periferne krvi, bez denaturacije genetičkog materijala. Sutradan, pločice su potopljene u hladan rastvor za elektroforezu (10 M NaOH, 200 mM EDTA) i ostavljene na temperaturi od 4 °C tokom 30 minuta, kako bi se obezbedila denaturacija DNK ćelija periferne krvi, nakon čega je izvršeno elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNK, pri naponu od 35 V i jačini struje od 300 mA, pod prigušenim svetlom. Na kraju, DNK je obojena dodatkom rastvora etidijum-bromida koncentracije 20 μ g/l, i 15 minuta nakon toga analizirani pri uveličanju od 100X, pod mikroskopom *Olympus X 50 microscope* (Olympus Optical Co, GmbH Hamburg, Nemačka), koji je opremljen živinom lampom (50 W, 516–560 nm, Zeiss, Nemačka).

Tokom elektroforeze, oštećena DNK migrira u električnom polju i formira strukture koje, kada se posmatraju pod mikroskopom, podsećaju na “rep komete“ (Slika 3.5) - otuda i naziv ovog testa. Broj uočenih “kometa” i veličina “repa” direktno su proporcionalni stepenu oštećenja DNK koje je izazvano ispitivanim uzorcima. Uočeni nukleoidi se razvrstavaju u 5 kalasa: A – bez oštećenja (manje od 5% oštećene DNK), B – nizak nivo oštećenja (5-20% oštećene DNK posmatranog nukleoida), C – srednji nivo oštećenja (20-40% oštećene DNK), D – visok nivo oštećenja (40-95%

oštećene DNK) i E – kompletno oštećenje (više od 95% DNK posmatranog nukleoida je oštećeno) (Žukovec Topalović i sar, 2015).

Rezultati su prikazani kao broj oštećenih nukleoida (iz grupa B, C, D i E zajedno), određeni na 100 nasumično odabranih nukleoida na mikroskopskoj pločici. Nekrotične ćelije i ćelije koje su ušle u apoptozu nisu uzete u obzir.



Slika 3.5. Kategorije „kometa“: A – manje od 5% oštećenja; B: 5-20% oštećenja; C: 20-40% oštećenja; D: 40-95% oštećenja; E: više od 95% oštećenja (Preuzeto i prilagođeno prema Žukovec Topalović i sar, 2015)

Procena antigenotoksičnog efekta

Antigenotoksični potencijal (sposobnost da se spreči oštećenje DNK indukovano oksidativnim agensom, odnosno da se izvrši reparacija oštećene DNK) takođe je procenjen kroz COMET test, ali u 2 različita protokola: protokol sa predtretmanom i protokl sa posttretmanom. Sprovođenje ove studije odobreno je od strane Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu odlukom 1580/2 od 28.11.2019. godine.

U protokolu sa predtretmanom, na ćelijske suspenzije na mikroskopskim pločicama (pripremljene na isti način kao i kod procene genotoksičnosti), nanoseno je po 50 μ l formulacija sa kurkuminom, i ostavljene su da se inkubiraju 30 minuta na 37 °C. Nakon isteka predviđenog vremena, ćelije su isprane PBS-om (kako bi se uklonio višak formulacija), a zatim tretirane rastvorom vodonik-peroksida (50 μ l, 50 mM rastvor), i ostavljene u frižideru tokom 20 minuta. U posttretmanu, redosled je bio obrnut – ćelije su prvo bile podvrgute oksidansu (vodonik-peroksidu) tokom 20 minuta u frižideru, zatim isprane PBS-om, a na kraju je nanoseno po 50 μ l ispitivanih formulacija. Inkubiranje je trajalo 30 minuta na 37 °C. Vodonik-peroksid je poslužio kao negativna kontrola u oba slučaja. Liziranje ćelija, elektroforeza, bojenje i mikroskopska analiza sprovedeni su na isti način kao i kod procene genotoksičnog potencijala.

Ispitivanje citotoksičnosti

Kako bi se procenio bezbednosni profil formulacija, sprovedeni su *in vitro* testovi citotoksičnosti na normalnim humanim keratinocitima (HaCat) i na normalnim humanim fibroblastima pluća (MRC-5). Dodatno, u cilju procene antikancerogenog potencijala kurkumina i formulacija sa kurkumiom, ispitana je citotoksičnost na ćelijama humanog melanoma (Fem-X), kao i na ćelijama humanog cervikalnog karcinoma (HeLa). Za ovu namenu, sproveden je MTT test – jedan od najčešće primenjivanih testova koji daju uvid u metaboličku aktivnost i vijabilnost ćelija u kulturi. MTT je žuta boja rastvorljiva u vodi koja, nakon redukcije posredstvom enzima prisutnih u metabolički

aktivnim ćelijama, prelazi u plavo-ljubičasti formazan, koji se može kolorimetrijski odrediti. Intenzitet plavo-ljubičaste boje korespondira sa metaboličkom aktivnošću ćelija, koja se može povezati sa njihovom vijabilnošću (Aslantürk, 2018; Stockert i sar, 2018)

Ćelijske linije

Sve ćelijske linije dobijene su iz *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, SAD). Ćelije su čuvane u kompletnom hranljivom medijumu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), na 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. Medjum je obogaćen L-glutaminom (3mM), streptomycinom (100 mg/ml), penicilinom (100 IU/ml), fetalnim goveđim serumom (10%; inaktivisan toplotom na 56 °C radi inaktivacije holin-esteraze i sistema komplementa) i HEPES-om (25 mM). pH vrednost medijuma podešena je na 7,2 primenom rastvora bikarbonata.

Priprema polaznih rastvora

Rastvor kurkumina je pripremljen u DMSO, a zatim razblažen hranljivim medijumom do koncentracije 1600 µg/ml, tako da finalna koncentracija DMSO u kontaktu sa ćelijama uvek bude manja od 0,1%. Sve nanoemulzije su takođe razblažene medijumom do početne koncentracije kurkumina (600 µg/ml). U istom odnosu razblažene su nanoemulzije bez kurkumina (placebo formulacije). Svi uzorci su zatim filtrirani kroz membranski filter promera 0,22 µm, i dalje razblaženi hranljivim medijumom u cilju pripreme ispitivanih koncentracija uzoraka (800, 400, 200, 100, 50, 25 i 12,5 µg/ml za HaCaT, odnosno 200, 100, 50, 25 i 12,5 µg/ml za MRC-5 i Fem-X ćelijske linije).

Tretiranje ćelija

HaCaT (2x10³ ćelija po bazenu), HeLa (2x10³ ćelija po bazenu), Fem-X (2x10³ ćelija po bazenu) i MRC-5 (5x10³ ćelija po bazenu) su zasejane u ploče sa 96 mesta (bazena). Nakon što su ćelije adherirale za dno bazena (nakon 20 h), dodati su uzorci u prethodno definisanim koncentracijama. U istom odnosu primenjene su u nanoemulzije bez kurkumina. U kontrolnim bazenima dodat je samo hranljivi medijum umesto uzorka.

Određivanje citotoksičnosti – preživljavanje ćelija

Procena ćelijskog preživljavanja urađena je 48 h nakon tretmana. MTT reagens je rastvoren u PBS-u (pH 7,2), u koncentraciji 5 mg/ml, i pre upotrebe filtriran kroz membranski filter promera 0,22 µm. U svaki bazenčić dodato je po 10 µl ovog rastvora, nakon čega su uzorci inkubirani još 4 h na 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. Nakon toga, kako bi se izvršilo liziranje svih ćelija, dodato je 100 µl rastvora natrijum-laurilsulfata. Narednog dana izmerena je apsorbancija ćelijskog medijuma u svim bazenčićima na 570 nm, pomoću *Multiskan™ FC Microplate Photometer* (Thermo Scientific, SAD). Za izračunavanja ćelijskog preživljavanja (u %), primenjena je sledeća jednačina:

$$\text{Preživljavanje ćelija (\%)} = \frac{A_{\text{ispitivani uzorak}} - A_{\text{slepa proba}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{slepa proba}}} * 100 \quad (\text{Jednačina 3.6})$$

IC₅₀ (koncentracija koja dovodi do smanjenja preživljavanja ćelija za 50%) određena je sa grafika zavisnosti procenta preživljavanja od koncentracije ispitivanog uzorka. Sprovedena su 3 nezavisna eksperimenta, svaki u triplikatu, a vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ±SD.

Analiza ćelijskog ciklusa

HeLa (2x10⁵ ćelija po bazenu) i Fem-X (2x10⁵ ćelija po bazenu) su zasejane u ploče sa 6 mesta (bazena) i ostavljene da se inkubiraju preko noći. Sutradan, ćelije se tretirane koncentracijama uzoraka koje odgovaraju vrednostima IC₅₀ i 2IC₅₀ (rastvor kurkumina i nanoemulzija sa kurkuminom 3mg/ml). Nakon 2h ćelije su prikupljene i fiksirane etanolom 70% v/v i čuvane tokom

sedam dana u zamrzivaču, na temperaturi od -20 °C. Čelije su potom isprane i tretirane ribonukleazom A (RNKazom A, 100 µg/ml) tokom 30 minuta na temperaturi od 37 °C, a zatim obojenu propidijum-jodidom (40 µg/ml). Analiza ćelijskog ciklusa sprovedena je primenom protočnog citometra *FACSCalibur* (BD Biosciences, Franklin Lakes, SAD). Prikupljanje i analiza podataka urađena je primenom softverskog paketa *CELLQuest* (BD Biosciences).

3.2.5.3. *In vivo* procena iritacionog potencijala nanoemulzija

Relativno visoka koncentracija surfaktanata u formulacijama nanoemulzija, a posebno dodatak terpena kao hemijskih pojačivača penetracije, mogu biti razlozi za eventualnu pojavu iritacije kože na mestu primene. Iz tog razloga, sprovedena je *in vivo* studija sa ciljem procene iritacionog potencijala (bezbednosti) izrađenih formulacija primenom tehnika bioinženjeringa kože.

Studija je sprovedena na 8 dobrovoljaca (starosti od 23 do 29 godina), koji su detaljno informisani o ispitivanju i dali su svoj pisani pristanak za učešće u studiji. Ispitanici nisu koristili kozmetičke proizvode na volarnim stranama podlaktica 24 h pre eksperimenta, dok 3 h pre studije i tokom same studije nisu unosili napitke sa kofeinom.

Svaki ispitanik je na dan ispitivanja proveo 30 minuta u laboratoriji pre početka eksperimenta, u cilju aklimatizacije. Definisana su test mesta volarnih strana podlaktica (površine 4 cm²) na koja će se naneti placebo formulacije (po 250 µl):

- formulacija bez monoterpena (F1),
- formulacija sa pinenom kao hemijskim pojačivačem penetracije (F1_PIN) i
- formulacija sa eukaliptolom kao hemijskim pojačivačem penetracije (F_EUC).

Jedno mesto bilo je kontrolno mesto i na njega nije naneta nijedna formulacija. Na test mestima i na kontrolnom mestu izmerene su vrednosti sledećih parametara:

- transepidermalnog gubitka vode (engl. *transepidermal water loss* – *TEWL*),
- eritema indeksa (engl. *erythema index* - *EI*) i
- stepena hidratisanosti *stratum corneum*-a (vlažnost *stratum corneum*-a, engl. *stratum corneum hydration* - *SCH*).

Nakon inicijalnih merenja, formulacije su nanese na predviđena mesta, a isti parametri su izmereni i nakon 60 i 120 minuta, uz vizuelnu kontrolu tretirane kože, u cilju detekcije eventualnih promena.

TEWL predstavlja tradicionalno korišćeni indikator integriteta kožne barijere. Zasniva se na merenju isparavanja vode sa površine kože (izraženo u g/m²/h). Povećanje vrednosti *TEWL* upućuje na oštećenje integriteta površinskog sloja kože. Ovaj parametar određen je primenom uređaja *Tewameter*[®] 210 (Courage+Khazaka, Nemačka).

EI je parametar koji upućuje na pojavu crvenila kože, koji se određuje spektrofotometrijski, na talasnoj dužini hemoglobina. Za određivanje ovog parametra korišćen je uređaj *Mexameter*[®] MX 18 (Courage+Khazaka, Nemačka).

SCH je parametar koji se može odrediti merenjem električne provodljivosti kože. Izmeren je pomoću uređaja *Cutometer*[®] MPA 580 (Courage+Khazaka, Nemačka).

Sva merenja sprovedena su prema relevantnim vodičima (Berardesca i sar, 2018; Rogiers, 2001; Fullerton i sar, 1996). Vrednosti parametara u definisanim vremenskim tačkama su upoređene sa bazalnim vrednostima, kao i sa netretiranom kontrolom.

Protokol za sprovođenje ove studije odobren je od strane Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu odlukom 1579/2 od 28.11.2019. godine.

3.2.5.4. Biofarmaceutska karakterizacija nanoemulzija

Ispitivanje brzine oslobađanja kurkumina iz formulacija

Ispitivanje brzine oslobađanja kurkumina iz nanoemulzija sprovedeno je primenom Franz-ovih difuzionih ćelija (*Gauer Glas, D-Püttlingen*, Nemačka). Prijemna komora svake ćelije napunjena je

pripremljenim akceptorskim medijumom (kako bi se obezbedili *sink* uslovi, odabrana je smeša etanol:prečišćena voda u odnosu 1:1 V/V), prethodno deaerizovanim i zagrejanim na 32 °C (zapremina: 12 ml; efektivna površina dostupna za difuziju aktivne supstance: 2,01 cm²), na čije vrhove su pažljivo pozicionirane sintetske polikarbonatne membrane (Nuclepore™, Whatman, Maidstone, UK) veličine pora 0,1 μm, a zatim je naslonjen i pričvršćen donorski deo. Kako bi se “aktivirale”, membrane su potopljene u akceptorski medijum 24 h pre eksperimenta. U donorski deo, na membrane, nanesen je po 1 g ispitivanog uzorka, a zatim je površina prekrivena silikonskom folijom (Parafilm™, SAD), kako bi se sprečilo isparavanje tokom izvođenja eksperimenta. Uklonjeni su eventualno prisutni mehurići vazduha, kako ne bi ometali difuziju. Čelije su smeštene u vodeno kupatilo u kome je voda zagrejana na 32 °C i tako održavana tokom čitavog eksperimenta. Akceptorska faza je bila podvrgnuta konstantnom mešanju, na magnetnoj ploči, pri brzini od 500 obrtaja/min. Ispitivanje je trajalo 6 sati. U definisanim vremenskim tačkama (0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h) uzorkovano je po 0,6 ml iz akceptorske komore, koji su zamenjeni istom zapreminom svežeg termostatiranog akceptorskog medijuma. Sadržaj kurkumina u uzorkovanoj akceptorskoj fazi određen je LC-MS/MS tehnikom. Kako bi se profil oslobađanja najbolje opisao, kumulativna količina kurkumina koja se oslobodila po jedinici površine u funkciji vremena procenjena je kroz nekoliko kinetičkih modela.

***In vivo* studija penetracije kurkumina iz nanoemulzija**

Kako bi se procenila efikasnost penetracije kurkumina iz razvijenih formulacija (bez dodatka hemijskih pojačivača penetracije i iz formulacija sa pinenom i eukaliptolom), sprovedena je *in vivo* studija na 4 dobrovoljca (starosti od 23 do 29 godina). Penetracija kurkumina kroz površinske slojeve kože određena je metodom sa adhezivnim trakama (engl. *tape stripping*), koju je Evropska agencija za lekove nedavno uvrstila u nacrt Vodiča za procenu bioekvivalencije lekova za primenu na koži (EMA/CHMP/QWP/708282/2018). Metoda se zasniva na postepenom uklanjanju slojeva *stratum corneum*-a upotrebom adhezivnih traka nakon što je primenjena formulacija odstajala prethodno definisani vremenski period na koži, zatim ekstrakciji aktivne supstance sa traka pogodnim rastvaračem, te određivanjem koncentracije aktivne supstance u uklonjenim slojevima *stratum corneum*-a. Iako je u samoj osnovi metode uklanjanje slojeva *stratum corneum*-a, metoda je generalno neinvazivna – bezbolna je, a već nakon 3 dana regeneriše se 80-90% barijernih svojstava kože. Kvantifikacija aktivne supstance u uklonjenim klasterima *stratum corneum*-a može se, između ostalog, izvršiti gravimetrijski – merenjem mase trake neposredno pre, a zatim odmah nakon uklanjanja *stratum corneum*-a. Na osnovu podataka o masi uklonjenog sloja i njegovoj gustini (10⁻⁶ μg/μm³), može se dobiti uvid u volumen uklonjenog *stratum corneum*-a. Kada je površina tretirane kože poznata i kontrolisana, na osnovu vrednosti *TEWL*, moguće je odrediti debljinu uklonjenog *stratum corneum*-a po svakoj traci (x) primenom sledeće jednačine:

$$TEWL = B + DK\Delta C / (H-x) \quad (\text{Jednačina 3.7})$$

B – konstanta,

D – difuznost vode u *stratum corneum*-u,

K – particioni koeficijent između *stratum corneum*-a i vijabilnog tkiva,

ΔC – koncentracioni gradijent vode *stratum corneum*-a,

H – ukupna debljina *stratum corneum*-a.

Sukcesivnim uklanjanjem traka dolazi do porasta u vrednost *TEWL*, koja je u linearnoj korelaciji sa debljinom uklonjenog sloja. Kada se registruje povećanje *TEWL* za 4-5 puta u odnosu na inicijalnu vrednost, smatra se da postoji dovoljno informacija za izračunavanje ukupne debljine *stratum corneum*-a (Pantelić, 2014).

Protokol za sprovođenje ove studije odobrio je Etički komitet Farmaceutskog fakulteta u Beogradu odlukom 1579/2 od 28.11.2019. godine. Ispitanicu su detaljno informisani o protokolu ispitivanja i dali su svoj pisani pristanak za učešće u studiji. Ispitanici nisu koristili kozmetičke proizvode na

volarnim stranama podlaktica 24 h pre eksperimenta, dok 3 h pre studije i tokom same studije nisu unosili napitke sa kofeinom.

Svaki ispitanik je na dan ispitivanja proveo 30 minuta u laboratoriji pre početka eksperimenta, u cilju aklimatizacije.

Na unutrašnjim stranama podlaktica, primenom kartonskog šablona, definisana su test mesta za aplikaciju nanoemulzija sa kurkuminom (u koncentraciji 3 mg/ml) – 3 različite formulacije:

- formulacija sa pinenom (F1_PIN_CU_3),
- formulacija sa eukaliptolom (F1_EUC_CU_3),
- formulacija bez monoterpena (F1_CU_3).

Izmerene su inicijalne vrednosti *TEWL*, a zatim su ispitanicima pažljivo nanete formulacije na definisanim test mestima (po 250 μ l svake formulacije naneto je na površinu od 4 cm^2). Nakon 2 h započeto je sukcesivno uklanjanje 12 adhezivnih traka (*D-Squame*, *Monaderm*, Monako; površina trake: 3,8 cm^2). Svaka adhezivna traka pojedinačno je postavljena na tretirano mesto na koži, nakon čega je na nju izvršen konstantan pritisak od 140 g/cm^2 (primenom uređaja na bazi opruge), u trajanju od 10 sekundi, nakon čega je traka uklonjena. Na ovaj način primenjeno je 12 adhezivnih traka, tj. uklonjeno je 12 „slojeva“ *stratum corneum*-a sa svakog test mesta. Masa pojedinačnih traka je pre i posle primene izmerena na analitičkoj vagi *Sartorius BP210D* (*Sartorius*, Nemačka), kako bi se dobili podaci o masi uklonjenih korneocita (gravimetrijski pristup). Adhezivnim trakama se rukovalo pažljivo, primenom pincete, kako se tokom odmeravanja i primene ne bi kontaminirale korneocitima istraživača. Merenje *TEWL* je ponovljeno nakon uklanjanja 4, 8. i 12. trake, u cilju procene ukupne debljine *stratum corneum*-a ispitanika.

Nakon merenja mase, svaka adhezivna traka je pažljivo prenetu u kivete u kojima je prethodno odmereno po 4 ml etanola 50% V/V, koji je korišćen kao rastvarač za ekstrakciju kurkumina. Kivete su zatim podvrgnute sonikaciji na ultrazvučnom kupatilu *Sonorex RH102H* (*Bandelin*, Nemačka) tokom 15 minuta, nakon čega su uzorci centrifugirani 5 minuta pri brzini od 4000 obrtaja/min (*Centrifuge MPW-56*, *MPW Instruments*, Poljska). Mala količina supernatanta prenetu je u epruvete sa zatvaračem, a sadržaj kurkumina je određen LC-MS/MS metodom.

3.2.6. Jontoforeza

Kako bi se predložio adekvatan protokol za sprovođenje jontoforeze kao fizičke metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti supstanci, a koji bi bio pogodan za primenu u obliku odgovarajućeg prilagodljivog adhezivnog sistema (flastera), na osnovu literaturne pretrage, predložena su 3 različita seta uslova (1 sa kontinuiranim protokom struje, i 2 sa diskontinuiranim protokom), koji su zatim prvo podvrgnuti *in vivo* ispitivanju bezbednosti, a zatim i proceni efikasnosti u isporuci kurkumina iz prethodno formulisane nanoemulzije.

3.2.6.1. *In vivo* procena iritacionog potencijala jontoforeze

Nakon dobijanja dozvole Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (odluka 1579/2 od 28.11.2019. godine), sprovedena je *in vivo* studija na 8 dobrovoljaca (starosti od 23 do 29 godina) koji su detaljno informisani o ispitivanju i dali su svoj pisani pristanak za učešće u studiji. Kao i u prethodnoj studiji procene bezbednosti, i ovde ispitanici nisu nanosili kozmetičke proizvode na volarne strane podlaktica 24 h pre ispitivanje, dok 3 h pre početka studije i tokom njenog trajanja nisu unosili napitke sa kofeinom.

Na volarnim stranama podlaktica, pomoću kartonskog šablona, označene su pozicije za postavljanje elektroda (*Skintact F-55*), koje su priključene na mikroprocesor i izvor napajanja od 9 V. Protok električne energije kontrolisan je programom napisanim u *Arduino 1.18.11* razvojnom okruženju. Ukupno vreme protoka električne energije kroz kožu bilo je 15 minuta, ali u 3 različite kombinacije:

- kontinuirani protok tokom 15 minuta (15-0),

- 3 minuta kontinuiranog protoka i 2 minuta pauze (3-2; 5 ciklusa) i
- 5 minuta kontinuiranog protoka i 1 minut pauze (5-1; 3 ciklusa).

Kako je eksperiment podrazumevao ispitivanje pri 3 različite kombinacije eksperimentalnih uslova, definisano je 7 mesta: 4 na levoj ruci (za 2 protokola), 2 na desnoj (za 3. protokol), i još jedno - kontrolno (netretirano) mesto na desnoj ruci.

Parametri od interesa (*TEWL*, *EI*, *SCH*) izmereni su inicijalno, a zatim u još 3 vremenske tačke: nakon 15, 60 i 120 minuta po završetku jontoforeze. Uz vizuelnu kontrolu, dobijene vrednosti upoređene su sa inicijalnim, kao i sa netretiranom kontrolom, na isti način koji je opisan u sekciji *In vivo procena iritacionog potencijala nanoemulzija*.

3.2.6.2. *In vivo* studija penetracije kurkumina iz nanoemulzije uz primenu jontoforeze

Nakon dobijanja dozvole Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu (odluka 1579/2 od 28.11.2019. godine), *in vivo* procena penetracije kurkumina kroz površinske slojeve kože uz primenu jontoforeze kao fizičke metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti sprovedena je metodom sa adhezivnim trakama, na 4 dobrovoljca starosti od 23 do 29 godina. Svi ispitanici su detaljno informisani o studiji i dali su pisani pristanak za svoje učešće.

I u ovom slučaju, u cilju aklimatizacije, svaki ispitanik je proveo 30 minuta u laboratoriji pre samog početka eksperimenta. Nanošenje kozmetičkih proizvoda na volarne strane podlaktica 24h pre studije, kao i konzumiranje pića sa kofeinom 3h pre i tokom same studije nisu bili mogući.

Na unutrašnjim stranama podlaktica, primenom kartonskog šablona, definisana su mesta za pozicioniranje elektroda (posebno za katodu i posebno za anodu). Pošto je kurkumin u molekulskom obliku u formulacijama, eksperimentalni protokol je podrazumevao nanošenje nanoemulzije sa kurkuminom (F1_CU_3) na mesto koje odgovara anodi. Na tim mestima izmerene su inicijalne vrednosti *TEWL*, nakon čega je naneto 250 µl formulacije sa kurkuminom (3 mg/ml) na površinu od 4 cm². Kada se uzorak osušio, anoda i katoda su pričvršćene i podešen je protok struje. Po isteku 2 h od nanošenja formulacije, započeto je sukcesivno uklanjanje 12 adhezivnih traka, ekstrakcija i određivanje sadržaja kurkumina na prethodno opisan način u sekciji *In vivo studija penetracije kurkumina iz nanoemulzija*. Na ovaj način sukcesivno su ispitana sva 3 protokola jontoforeze na svakom ispitaniku.

3.2.7. LC-MS/MS

Određivanje sadržaja kurkumina u formulacijama, zatim tokom *in vitro* studije oslobađanja, kao i u *in vivo* studijama penetracije kurkumina urađeno je primenom tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Korišćen je uređaj za tečnu hromatografiju *ACCELA* sa autosemplerom i pumpom (Thermo Fisher Scientific, SAD). Za razdvajanje je primenjena kolona *Xterra*[®] MS C18 (3,5µm 2,1x150mm; Waters Corporation, Irska). Mobilna faza se sastojala od acetonitrila i 0,1% rastvora mravlje kiseline u odnosu 70:30 V/V. Primenjeno je izokratsko eluiranje pri brzini protoka mobilne faze od 0,3 ml/min i temperaturi kolone od 25 °C. Trajanje analize (*run time*) bilo je 5 minuta. Masena analiza urađena je na uređaju *TSQ Quantum Access MAX triple quadrupole mass analyzer*, sa elektrosprej izvorom jonizacije (engl. *electrospray ionization* – ESI). Parametri ESI izvora i MS parametri bili su sledeći: napon izvora – 5000 V; temperature isparavanja – 400 °C; azot kao nebulizacioni gas; pritisak gasa u omotaču – 30 jedinica; pritisak gasa za uklanjanje jona – 0 jedinica; pritisak pomoćnog gasa – 15 jedinica; temperature kapilare za transfer jona – 250 °C; koliziona energija – 22V; vreme skeniranja – 200 ms. Prikupljanje i kvantifikacija podataka su bili u pozitivnom modu, a praćen je sledeći jonski prelaz: m/z 369,2→177,0. Analiza podataka sprovedena je primenom programskog paketa *Xcalibur software*, verzija 2.1.0.1139 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, Kalifornija).

3.2.8. Statistička analiza

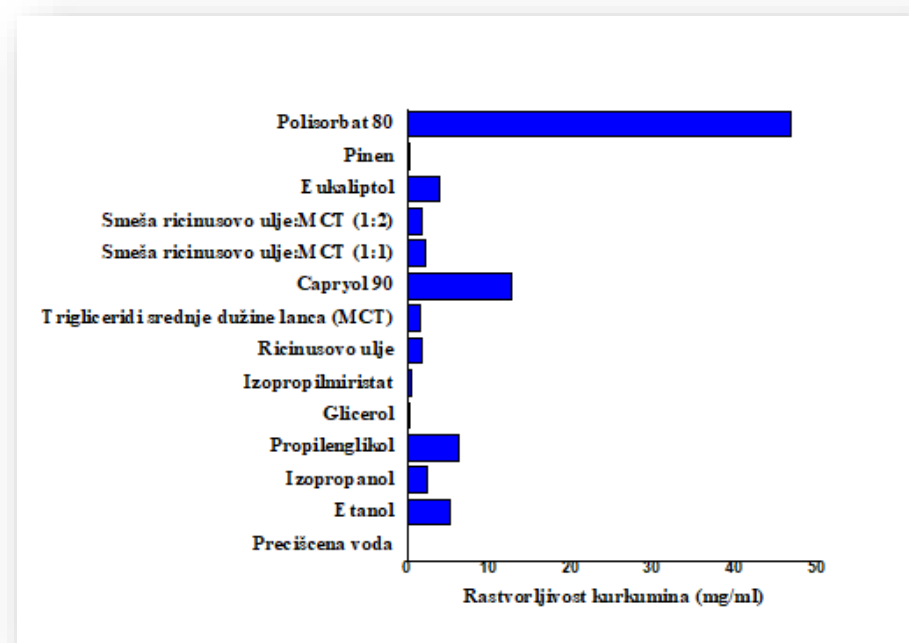
Osim *in vivo* studija, koje su podrazumevala učešće većeg broja ispitanika, sva ostala merenja su sprovedena kroz najmanje tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Statistička analiza je urađena primenom programa *OriginPro 8 Data Analysis and Graphing Software* (OriginLab, SAD). Nakon provere da li podaci prate normalnu raspodelu, analiza je izvršena kroz Studentov t-test (za 2 grupe podataka) ili analizu varijanse (ANOVA) i *post hoc* analizu primenom *Tuckey HSD* testa (za 3 i više grupa podataka). Statistički značajnim smatrane su razlike kod kojih je p-vrednost bila manja od 0,05.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada

4.1.1. Studija rastvorljivosti kurkumina i odabir ekscipijenasa za izradu nanoemulzija

Imajući u vidu molekulsku strukturu kurkumina, rezultati studije rastvorljivosti su bili očekivani (Slika 4.1), i ukazali su na vrlo nisku rastvorljivost kurkumina u prečišćenoj vodi (<0,002 mg/ml), dok je rastvorljivost u organskim rastvaračima bila značajno veća. Takođe, rastvorljivost u uljima, kao neophodnim komponentama emulzionih sistema, iako veća u odnosu na rastvorljivost u vodi, ukazala je upravo na činjenicu da kurkumin pripada grupi supstanci koja se u literaturi naziva *brick dust* (Lipinski, 2005) – odlikuje se i niskom rastvorljivošću u vodi, ali i u lipofilnim rastvaračima, nudeći jedan sveden broj formulacionih rešenja. Dodatak surfaktanata/solubilizatora u neki od rastvarača u značajnoj meri obezbeđuje bolju rastvorljivost kurkumina.



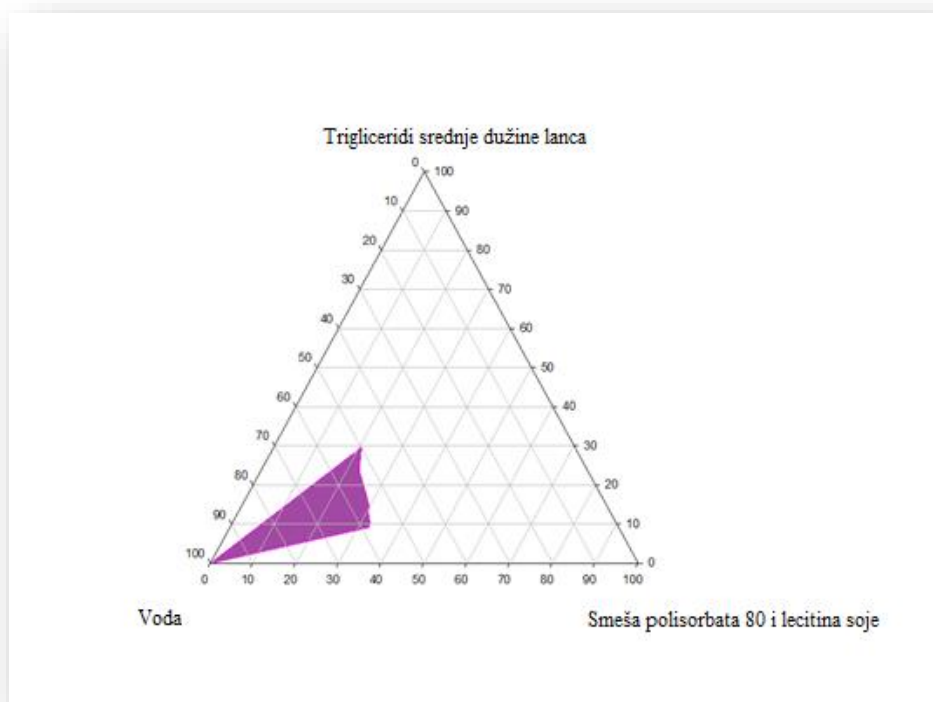
Slika 4.1. Rezultati studije rastvorljivosti kurkumina u različitim rastvaračima (n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Rezultati ispitivanja rastvorljivosti, uz dodatno razmotrene fizičko-hemijske osobine masne faze i surfaktanata, uzeti su u obzir kao važan faktor pri dizajniranju nanoemulziona formulacije. Poznato je da je, uz procesne parametre, odabir masne faze i stabilizatora ključan za stabilnost nanoemulzije sa jedne strane, ali i održavanje aktivne molekule solubilizovane u unutrašnjoj fazi nanoemulzije, sa druge strane. Imajući to u vidu, kao masna faza odabrani su trigliceridi srednje dužine lanca (engl. *medium-chain triglyceride* – MCT). Iako je rastvorljivost u ricinusovom ulju, odnosno njegovim smešama sa MCT nešto veća, veći viskozitet ricinusovog ulja, i posledično veća rezilijentnost prema disruptivnim silama u procesu nanoemulzifikacije, čine ga nepovoljnim kandidatom za formiranje masne faze nanoemulzija koje se pripremaju niskoenergetskim postupcima (Komaiko and McClements, 2016; Wooster i sar, 2008). Takođe, MCT predstavljaju ulje koje se vrlo slabo meša sa vodom, pa se time smanjuje i stepen Ostvaldovog sazrevanja potencijalne nanoemulzije. Sa druge strane, odabir stabilizatora zasnivao se na činjenici da mali molekuli brže difunduju i efikasnije formiraju monosloj na površini dispergovanih kapi, čineći nastale formulacije stabilnijim.

Iz tog razloga je kao primarni surfaktant razmatran polisorbata 80. Lecitin je inkorporiran kao sekundarni stabilizator, sa željom da se, dodatkom ovog prirodnog surfaktanta, smanji koncentracija etoksilovanog tenzida, uz značajan doprinos stabilnosti formulacije - ne samo kroz elektrosterni efekat, već i kroz potencijalni efekat blokiranja oksidabilnih vrsta (Pan i sar, 2013), što je vrlo važno ukoliko se ima u vidu odabrana model aktivna supstanca. Odnos polisorbata 80 i lecitina određen je tako da nastala emulgatorska smeša pogoduje nastanku hidrofilnih nanoemulzija. Pri odnosu 9:1 dominira polisorbata 80, a smeša emulgatora ima HLB oko 14.

4.1.2. Ispitivanje faznog ponašanja u odabranom sistemu masna faza/emulgatori/vodena faza i odabir formulacije za inkorporiranje aktivne supstance

Kroz praćenje faznog ponašanja odabranog pseudoternarnog sistema, uočeno je da nanoemulzije mogu nastati u vrlo uskom regionu (Slika 4.2). Na dijagramu je uočljivo da su se niskoenergetske nanoemulzije mogle dobiti isključivo kada je sadržaj vode bio iznad 50%, i to pri SOR vrednostima 0,7 ili više. Ispod SOR 0,7 dobijaju se grube disperzije koje, nakon mućkanja, pokazuju vidljivo „zaostajanje“ na staklu, i koje su sklone vrlo brzom razdvajanju masne i vodene faze. Pri manjim udelima vodene faze, odnosno pri vrlo visokim udelima smeše surfaktanata, nastaju vrlo ugušćeni sistemi - tečni kristali ili sistemi kod kojih koegzistira više različitih struktura.



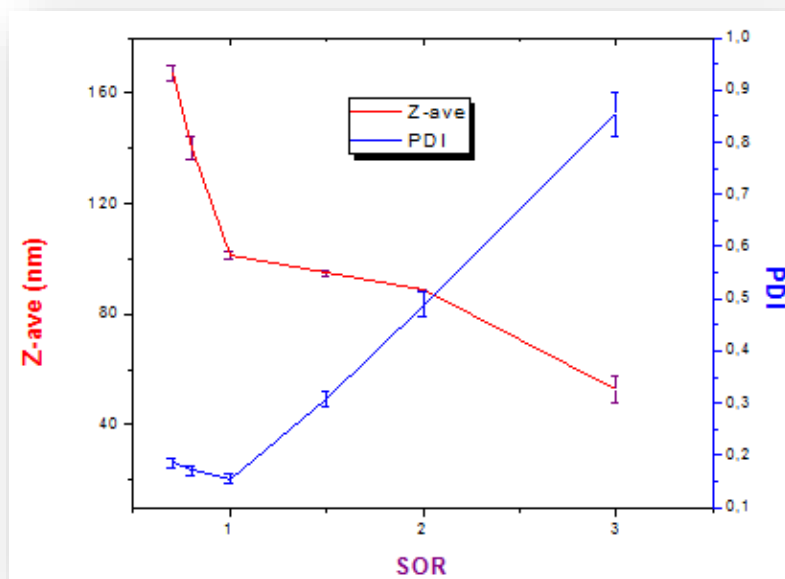
Slika 4.2. Pseudoternarni fazni dijagram sa označenom niskoenergetskom nanoemulzionom oblašću za sistem koji se sastoji od trigliceridi srednje dužine lanca (masne faza), smeše polisorbata 80 i lecitina soje (stabilizatori) i visokoprečišćene vode

Kako bi se detaljnije ispitaio uticaj koncentracije surfaktanta na veličinu i distribuciju veličina dispergovanih kapi, kao osnov za dalje eksperimente, odabrane su formulacije sa 10% *m/m* masne faze. Duž ove linije moguće je pripremiti i najveći broj formulacija za dalju analizu. Dodatno, s obzirom na to da je u pitanju niskoenergetski postupak izrade, udeo masne faze iznad 10% *m/m* bi se značajno odrazio na veličinu dobijenih kapljica i dugoročnu stabilnost formulacija, a bez značajne dobiti u kontekstu kapaciteta za solubilizaciju.

Formulacije sa 10% *m/m* masne faze i SOR vrednostima 0,7; 0,8; 1; 1,5; 2 i 3 su pripremljene spontanoemulgujućim postupkom i sprovedena je osnovna fizičko-hemijska karakterizacija. Sa porastom SOR vrednosti, beličaste formulacije plavičastog odsjaja transformišu se dajući sve transparentnije formulacije (Slika 4.3), što ukazuje na smanjenje veličine dispergovanih kapi sa porastom koncentracije surfaktanata. Ovakav zaključak potvrđen je i određivanjem hidrodinamičkog dijametra dispergovanih kapi (Slika 4.4). U početku, sa porastom SOR od 0,7 do 1, dolazi do značajnog smanjenja veličina - od $167,5 \pm 1,4$ nm (za SOR 0,7) do $105,4 \pm 1,4$ nm (za SOR 1). Takođe, isti trend prati i PDI, koji opada sa povećanjem SOR i ostaje uvek ispod 0,2, ukazujući na usku distribuciju veličina. Dalje povećanje SOR dovodi do smanjenja veličina (čak do $52,83 \pm 4,84$ nm za SOR 3), ali uz istovremeni značajan porast PDI. Može se pretpostaviti da je to posledica formiranja više frakcija kapi malih dimenzija usled značajno većeg udela surfaktanata u odnosu na sadržaj masne faze, što rezultuje nehomogenom distribucijom veličina. Uz to, povećanje vrednosti PDI može biti i posledica viška surfaktanata koji dovode do stvaranja agregata surfaktanata/micela (Tadros i sar, 2004). Uprkos izrazito velikim vrednostima za PDI kada je SOR 1,5 ili veći, takav širok raspon veličina možda ne bi trebalo dovesti u vezu sa nestabilnošću i podložnošću Ostvaldovom sazrevanju. Naime, ove formulacije su upravo one „granične“, koje se, usled visoke koncentracije surfaktanata (npr. 30% *m/m* za formulaciju gde je SOR 3), verovatno približavaju minimalnim vrednostima međupovršinskog napona (Lawrence and Rees, 2000). U prilog tome govori i već spomenuta Kelvinova jednačina (Jednačina 1.3), koja jasno ukazuje da rastvorljivost ulja, a samim tim i podložnost Ostvaldovom sazrevanju, opada sa smanjenjem međupovršinskog napona (Tadros i sar, 2004).



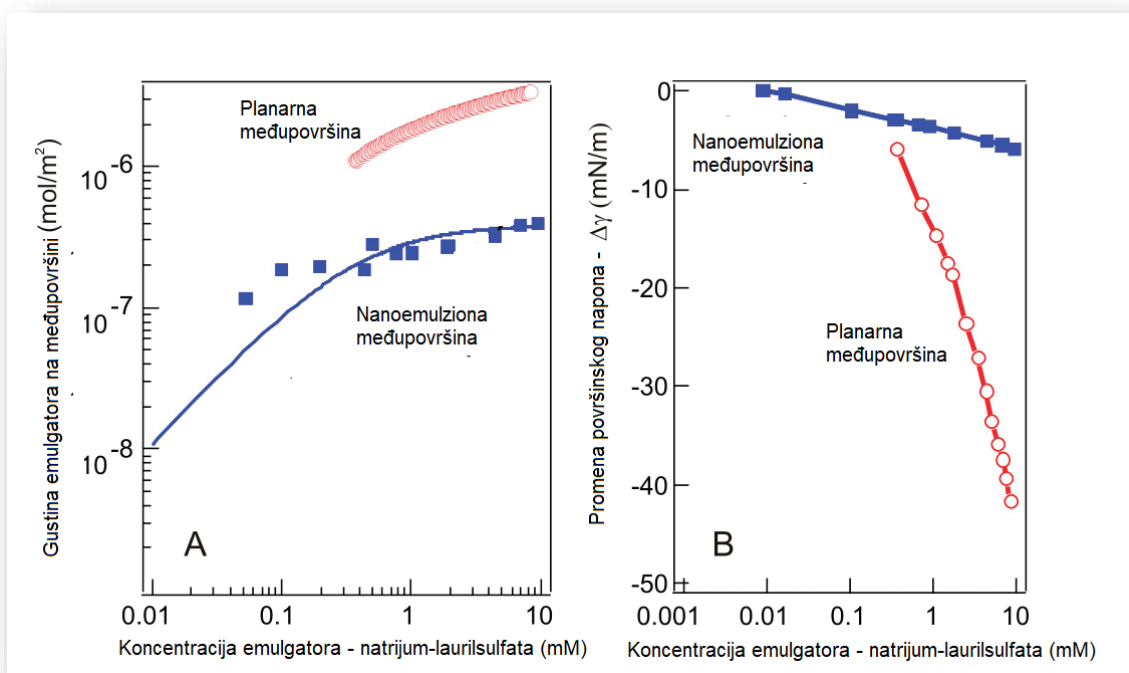
Slika 4.3. Prikaz nanoemulzija izrađenih spontanoemulgujućim postupkom sa rastućim SOR vrednostima



Slika 4.4. Zavisnost Z-ave i PDI nanoemulzionih kapi od SOR vrednosti

SOR – surfactant-to-oil ratio; PDI – indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*); Z-ave – prosečan hidrodinamički dijametar (n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Ipak, sa Slike 4.4. jasno se vidi da je sa povećanjem SOR vrednosti za svaku jedinicu preko jedan smanjenje veličine kapi manje u odnosu na slučajeve kada su koncentracije smeše surfaktanata niže (porast SOR u opsegu 0,7-1). Ovakvi rezultati predstavljaju osnovu za pozivanje na već spomenute savremene nalaze proučavanja molekularnih aspekata međupovršinskog sloja nanoemulzija. Naime, De Aguiar i sar. (2010) pokazali su da sa povećanjem udela surfaktanta kod nanoemulzionog sistema stabilisanog natrijum-laurilsulfatom dolazi do adsorpcije molekula amfifila na međupovršinu, te da njihova gustina na međupovršini raste sa povećanjem njihove koncentracije, ali samo do određenog trenutka, i to značajno ispod kritične micelarne koncentracije, dok je ukupna gustina adsorbovanih molekula značajno manja nego kod planarnih sistema pri istoj koncentraciji surfaktanta. Sličan nalaz je dobijen i tokom praćenja vrednosti međupovršinskog napona u istom sistemu, koji ima vrlo blagi pad pri porastu koncentracije surfaktanta kod nanoemulzija (iako bi se očekivalo suprotno), dok je promena vrlo intenzivna kod planarnih sistema (Slika 4.5). Kako je već opisano, ovakvi rezultati posledica su različitog molekularnog uređenja na zakrivljenim međupovršinama nanokapi. Upravo ovaj argument može biti pogodan za objašnjenje uočenog trenda smanjenja veličine kapi u funkciji SOR (tj. koncentracije surfaktanta). Dakle, može se zaključiti da se, usled zasićenja međupovršine, daljim povećanjem koncentracije smeše surfaktanata (iznad SOR 1) ne dobija podjednako značajan efekat na smanjenje veličine kapi kao pri nižim SOR vrednostima, čime su zaključci o značajnim razlikama u uređenju međupovršinskog sloja planarnih sistema i zakrivljenih nanopovršina prošireni i na situaciju kada se stabilizacija ostvaruje kroz kombinaciju nejonskog i jonskog surfaktanta.



Slika 4.5. Gustina natrijum-laurilsulfata na međupovršinskom sloju (levo) i vrednosti međupovršinskog napona (desno) u funkciji koncentracije amfifila za planarne i nanoemulzione sisteme (Preuzeto i prilagođeno prema referenci De Aguiar i sar, 2010).

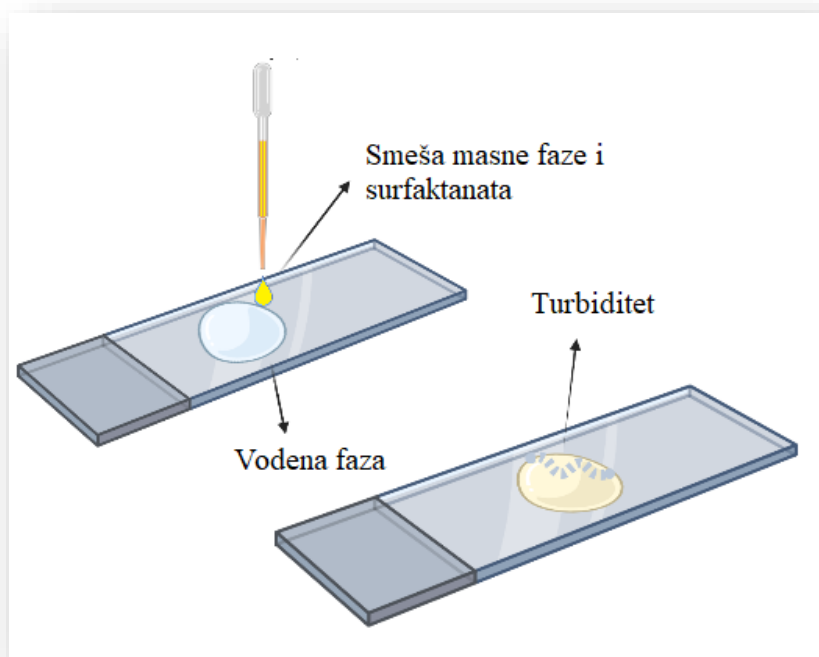
Tokom izrade formulacija primenom spontanoemulgujućeg postupka, razmatrajući kontakt smeše surfaktanata i masne faze sa vodom, uočeno je da trenutno dolazi do stvaranja vrlo viskozne „granične“ strukture, koja egzistira određeno (kraće) vreme, ali se tokom mešanja disperguje i finalno „rastvori“ u masnoj fazi. Određeni literaturni izvori predlažu da pri ovom kontaktu mogu nastati bikontinualne mikroemulzije, ili, alternativno, tečnokristalne strukture (Komaiko i McClements, 2016; Komaiko i McClements, 2014). Ove tranzicione strukture vrlo su štuoro opisane u literaturi, a njihova analiza može biti od velikog značaja u proceni i tumačenju dinamike međupovršinskog sloja nanoemulzija, što se u velikoj meri odražava i na koloidnu stabilnost, ali i na kasniju isporuku solubilizovane aktivne molekule. Moguće interakcije na dodirnoj površini (koje su odgovorne za sam proces emulzifikacije) i dalje su, barem u nekim segmentima, predmet diskusije. U tom kontekstu, predloženo je nekoliko mehanizama (Lopez-Montilla i sar, 2002):

1. turbulencije na granici faza,
2. negativan međupovršinski napon,
3. difuzija i „nasukavanje“.

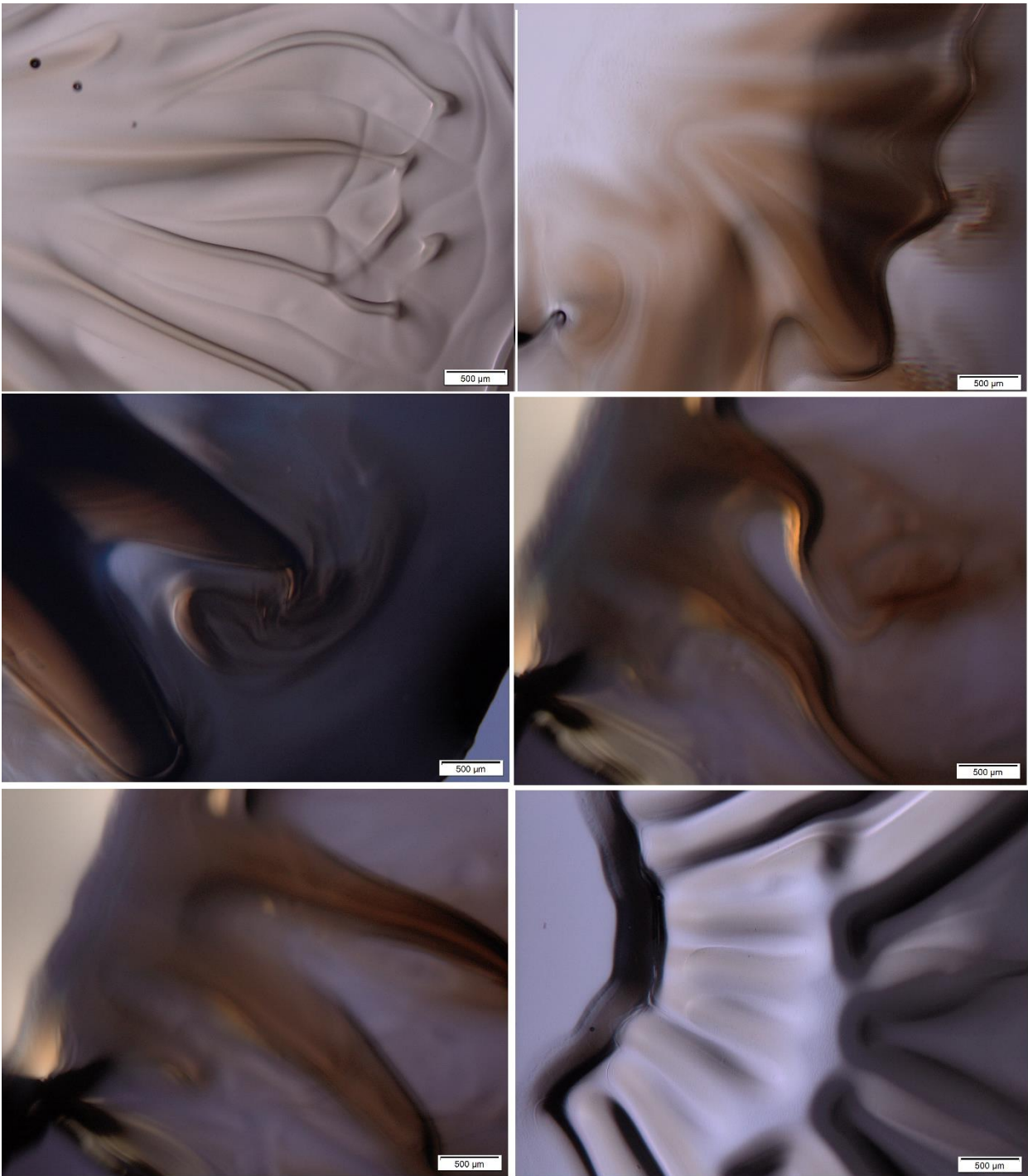
Prva dva mehanizma u vezi su sa mehaničkom nestabilnošću na granici faza, dok je treći predloženi mehanizam emulzifikacije „hemijskog“ porekla, i može rukovoditi proces emulgovanja u situacijama kada je prisutna komponenta koja se meša i sa masnom i sa vodenom fazom (npr. korastvarač ili neka amfifilna molekula rastvorljiva i u masnoj i u vodenoj fazi). Slična situacija je i u ovom konkretnom slučaju, kada je prisutan polisorbit 80 – hidrofilni amfifil koji se dobro meša i sa masnom fazom. U predloženom protokolu za izradu nanoemulzija, polisorbit 80 se prvo meša sa masnom fazom, a zatim se pripremljena smeša dodaje kap po kap vodenoj fazi, kada, zbog svog hidrofilnijeg karaktera, difunduje u vodenu fazu noseći sa sobom male porcije ulja. Pri samom kontaktu smeše ulje-surfaktanti sa vodenom fazom, prvo dolazi do formiranja tranzicionog (pseudo)trokomponentnog sistema, nakon čega amfifil difunduje u vodenu fazu. Čim voda postane zasićena uljem, ove porcije ulja bivaju „nasukane“ u vidu malih kapi u vodenoj fazi oivičene

stabilizatorom (Saber i sar, 2013; Lopez-Montilla i sar, 2002). Upravo ovaj proces difundovanja surfaktanta iz masne u vodenu fazu predstavlja fundamentalni osnov niskoenergetske nanoemulzifikacije, bez obzira na primenjenu metodu (Anton i Vandamme, 2009).

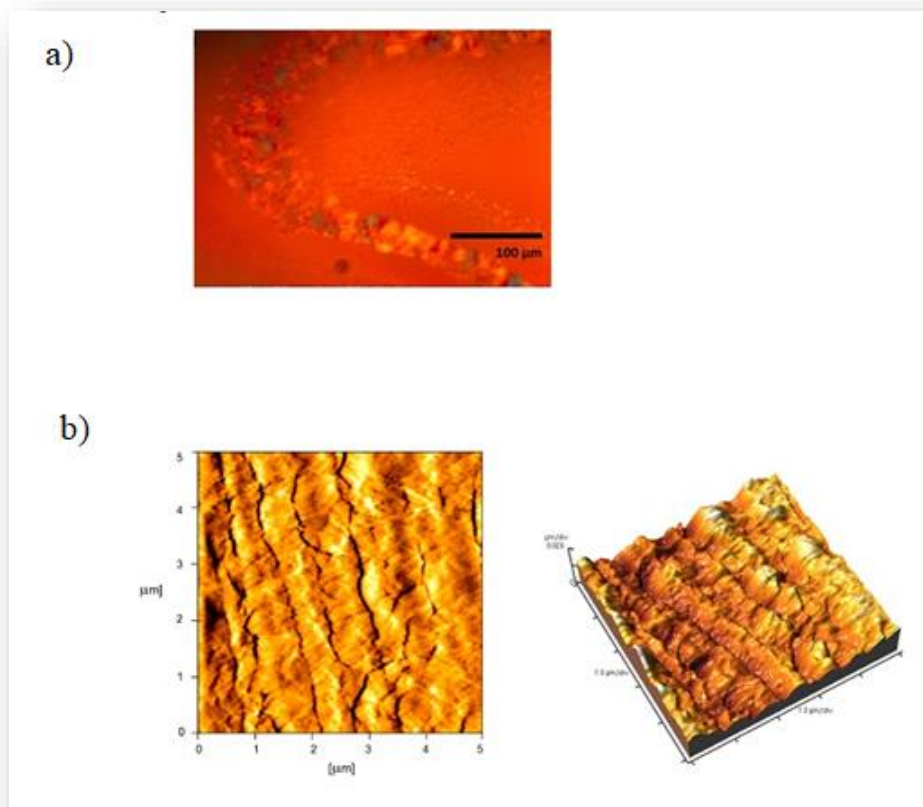
Kako bi se stekao uvid u konkretne interakcije između smeše surfaktanti-masna faza i vodene faze, analiza njihovog kontakta sprovedena je na mikroskopskoj pločici (Slika 4.6). Na samoj dodirnoj površini voda-ulje-surfaktant(i) vrlo brzo dolazi do stvaranja turbiditeta, što ukazuje na početak procesa emulzifikacije. Kada se ova dodirna površina pogleda pod polarizacionim mikroskopom, lako se mogu uočiti anizotropne formacije (Slika 4.7), koje ukazuju na stvaranje tečnokristalne strukture (Slika 4.8a), koja se brzo širi, a zatim gubi nakon nekog vremena. Detaljniji uvid može se steći kada se ova tranziciona faza posmatra AFM-om (Slika 4.8b). Jasno se mogu videti „cevaste“ strukture koje su posledica infiltracije smeše masne faze i surfaktanata u vodenu fazu. Ovi nalazi u skladu su sa predloženim mehanizmom spontanoemulgujućeg postupka, koji navodi da se na kontaktnoj površini surfaktanti-ulje-voda formiraju prolazne mijeloidne strukture, koje, u stvari, predstavljaju dugačke „cevi“ lamelarnih tečnih kristala. Nakon bubrenja u vodi, oni na kraju „eksplodiraju“ u uljane kapljice oivičene slojem surfaktanata (Lopez-Montilla i sar, 2002; Buchanan i sar, 2000). Prisustvo anizotropije nije detektovano kada su izrađene nanoemulzije bile podvrgnute polarizacionoj mikroskopiji, što potvrđuje da je tečnokristalna struktura zaista samo prolazna faza u postupku nanoemulzifikacije kroz spontanoemulgujući postupak. Jasno je da je spontanoemulgujući postupak prilično kompleksan i vođen različitim mehanizmima koji ovise o tipu i fizičko-hemijskim svojstvima odabranih komponenata.



Slika 4.6. Shematski prikaz nastanka tranzitorne faze nakon kontakta masna faze, smeše surfaktanata i vodene faze na mikroskopskoj pločici



Slika 4.7 Različite tranzitorne strukture koje nastaju pri inicijalnom kontaktu smeše masne faze i surfaktanata sa vodenom fazom za SOR 1, snimljene polarizacionim mikroskopom



Slika 4.8. Mikrografije tranzitorne strukture nastale pri kontaktu masne faze, smeše surfaktanata i vodene faze – a) polarizaciona mikroskopija; b) AFM mikroskopija (2D i 3D topografije)

Kada se razmatra aspekt bezbednosti, jasno je da su niže koncentracije surfaktanata u formulaciji poželjnije. Uz to, imajući u vidu podatke o veličini i distribuciji veličina dispergovanih kapi u funkciji SOR, za dalju analizu su uzete u obzir isključivo formulacije sa SOR vrednostima 0,7; 0,8 i 1, a sve sa ciljem odabira najpogodnije nanoemulzije za solubilizaciju kurkumina.

Dakle, nanoemulzije sa SOR 0,7; 0,8 i 1 i 10% masne faze su izrađene, a zatim su čuvane na sobnoj temperaturi tokom mesec dana. Inicijalno (24 h nakon izrade) i posle mesec dana, uz vizuelnu inspekciju, praćeni su fizičko-hemijski parametri od interesa koji bi ukazali na eventualnu pojavu nestabilnosti tokom ovog kraćeg perioda čuvanja. Rezultati ispitivanja su prikazani u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Rezultati ispitivanja odabranih fizičko-hemijskih parametara izrađenih nanoemulzija sa 10% masne faze i SOR vrednostima 0,7, 0,8 i 1

Parametar	SOR	Separacija faza +/-	Z-ave (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)	pH
Vreme						
24 h nakon izrade	0,7	-	167,0±2,7	0,185±0,024	-37,8±1,7	4,35±0,01
	0,8		140,0±4,2	0,191±0,011	-32,4±1,1	4,40±0,01
	1		105,4±1,4	0,197±0,011	-31,97±3,75	4,86±0,01
1 mesec nakon izrade	0,7	-	163,5±1,419	0,168±0,016	-38,0±1,86	4,37±0,01
	0,8		138±1,026	0,171±0,005	-32,7±0,6	4,42±0,01
	1		110,4±1,5	0,172±0,006	-26,1±3,1	4,78±0,01

SOR – surfactant-to-oil ratio; Z-ave – prosečan hidrodinamički dijаметar kapi (n=6, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Kako je i očekivano, uticaj koncentracije surfaktanta pri konstantnom udelu masne faze značajno utiče na veličinu dispergovanih kapljica – najniže vrednosti dobijene su kod formulacije sa SOR 1 (sa najvećim udelom smeše stabilizatora), a nakon mesec dana nije došlo do značajnih promena ni kod jedne ispitivane formulacije. Poznato je da i formulacioni i procesni parametri imaju efekat na fizičko-hemijska svojstva nanoemulzija i njihovu stabilnost (Borrin i sar, 2016). Ovde je potvrđeno da se, tokom niskoenergetskog procesa nanoemulzifikacije, sa višom koncentracijom surfaktanata, a pri konstantnom udelu masne faze, generišu nanoemulzije kapi manjih dimenzija. Kada se posmatra PDI, sve formulacije su imale vrednosti ispod 0,2, što ukazuje na relativno usku distribuciju veličina kapi. Takođe, kod svake nanoemulzije uočen je trend smanjenja ovog parametra tokom vremena, što se može dovesti u vezu sa konsolidacijom disperznog sistema.

Kao parametar od značaja u praćenju stabilnosti nanoemulzija, može se razmotriti i vrednost zeta potencijala. Uopšteno posmatrano, kada se govori o površinskom naelektrisanju i zeta potencijalu kao njegovoj meri, smatra se da apsolutne vrednosti iznad 30 mV ukazuju na dobru kinetičku stabilnost (Müller i sar, 2012), što pokazuju i odabrane formulacije. Međutim, ova vrednost se ne može posmatrati striktno, posebno kada se stabilizacija nanoemulzionih sistema ne zasniva isključivo na elektrostatičkim interakcijama, kao što je to ovde slučaj. U situacijama kada je uključen i sterni stabilizator, zbog njegove adsorpcije na površini kapi, potencijal Šternovog sloja meri se na većoj udaljenosti od površine kapljice. Zbog eksponencijalnog pada potencijala u difuznom sloju, izmerena vrednost zeta potencijala je niža u odnosu na situaciju bez sternog stabilizatora (Pardeike and Müller, 1996). Uočeno je da su, u slučaju elektrosterne stabilizacije, apsolutne vrednosti zeta potencijala od oko 20 mV u vezi sa dobrom fizičkom stabilnošću (Jacobs and Müller, 2002).

Vrlo važna karakteristika formulacije je i njena pH vrednost, koja treba da odgovara predviđenom putu primene, ali i da obezbedi hemijsku stabilnost aktivne supstance koja će biti inkorporirana. Kako se kurkumin degradira u alkalnoj sredini (Sharma i sar, 2005), potrebno je da potencijalni nosači imaju podešenu pH vrednost tako da ona ne favorizuje degradacione procese. Pošto sve ispitivane formulacije imaju pH koji se kreće između 4 i 5, može se zaključiti da su pogodne za inkorporiranje kurkumina bez potrebe za korekcijom pH, uz pogodnost za dermalni put primene.

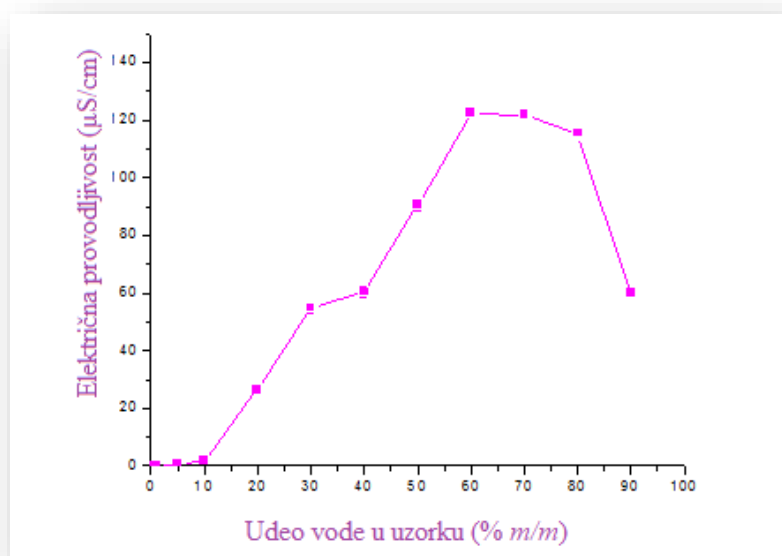
Iako sve tri odabrane formulacije pokazuju dobre preliminarne fizičko-hemijske karakteristike, pri odabiru nosača za kurkumin potrebno je pristupiti racionalnom razmatranju koje će uzeti u obzir aspekte bezbednosti, efikasnost inkapsulacije i isporuke aktivne supstance, kao i fizička svojstva formulacije i njenu stabilnost. Imajući sve to u vidu, za dalju analizu i inkorporiranje kurkumina, odabrana je formulacija sa SOR 1 i 10% masne faze (F1, **Tabela** 4.2) – uz procenu da će veći udeo surfaktanata u odnosu na druge formulacije biti povoljan sa aspekta efikasnije solubilizacije, i zaključak da, posmatrajući relevantne fizičko-hemijske karakteristike, kod ove formulacije postoji optimalan odnos masne faze i surfaktanata sa jedne strane, te veličine i distribucije veličina dispergovanih kapi sa druge strane.

Tabela 4.2. Kvalitativni i kvantitativni sastav nanoemulzije F1

Komponenta	MCT	Polisorbat 80	Lecitin soje	Visokoprečišćena voda
Sadržaj (% m/m)	10	9	1	80

U nastavku, kako bi se dobila definitivna potvrda o raspodeli faza odabrane nanoemulzije, sprovedena su merenja električne provodljivosti i praćenje termalnog ponašanja sistema sa SOR 1 i rastućim udelom vode.

Uzorci sa malim udelom vode, očekivano, pokazali su zanemarljivu električnu provodljivost, sa značajnijim povećanjem kada je udeo vode prešao 10% m/m (Slika 4.9)

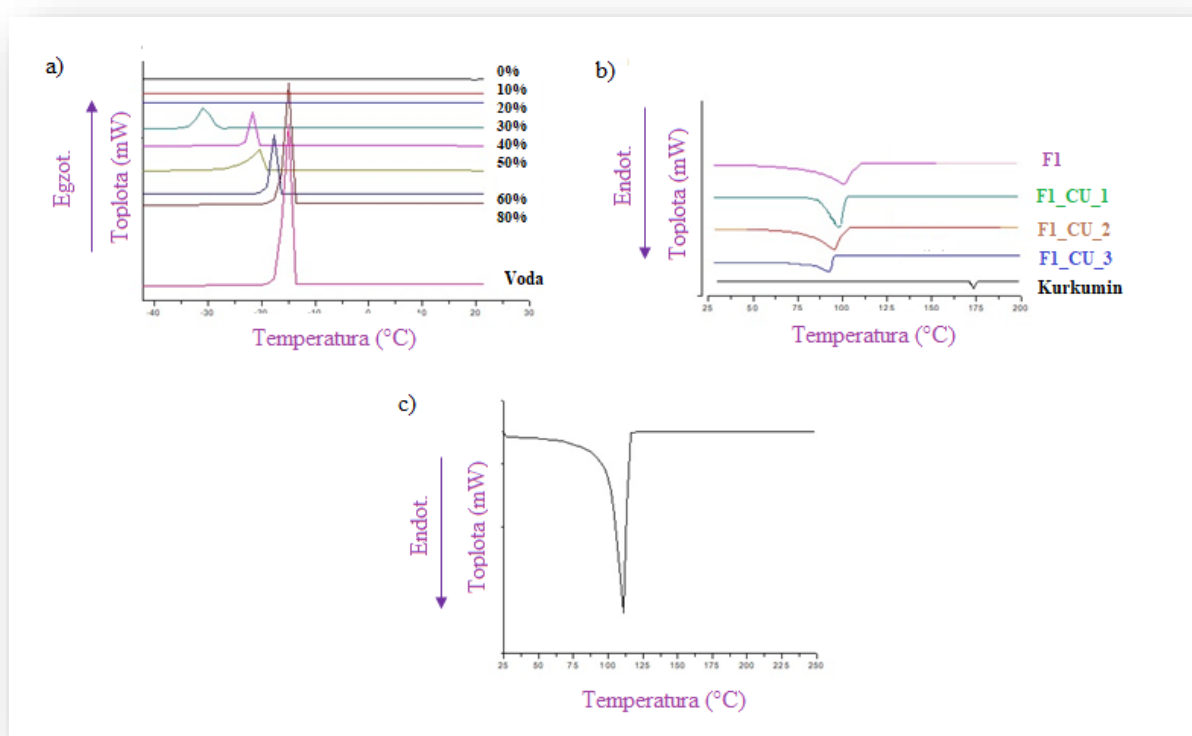


Slika 4.9. Promena električne provodljivosti sa porastom sadržaja vode u uzorku - SOR 1

Niske vrednosti električne provodljivosti u početnim tačkama u vezi su sa formiranjem polučvrstih, tečnokristalnih struktura, kod kojih su kapljice vode „zarobljene“ u unutrašnjosti, sa međusobno slabim interakcijama. Dalje povećanje udela vode praćeno je naglim porastom električne provodljivosti, verovatno zbog stvaranja vodenih kanala. Najstrmija promena (povećanje) električne provodljivosti uočava se kada udeo vode pređe 40% m/m, implicirajući da sistem prolazi kroz strukturnu promenu. Najviša vrednost dostignuta je sa 60% m/m vodene faze, što ukazuje na to da je voda sada postala kontinuirana, spoljašnja faza, odnosno da je došlo do nastanka U/V nanoemulzije. I upravo od ovog trenutka, uzorci imaju vidljivi pad u viskozitetu, ponašajući se kao tečnosti koje lako protiču (njutnovske tečnosti), za razliku od sistema sa manjim udelom vode. Uzorci sa više od 70% m/m vode pokazuju određeni pad u vrednosti električne provodljivosti, što je verovatno

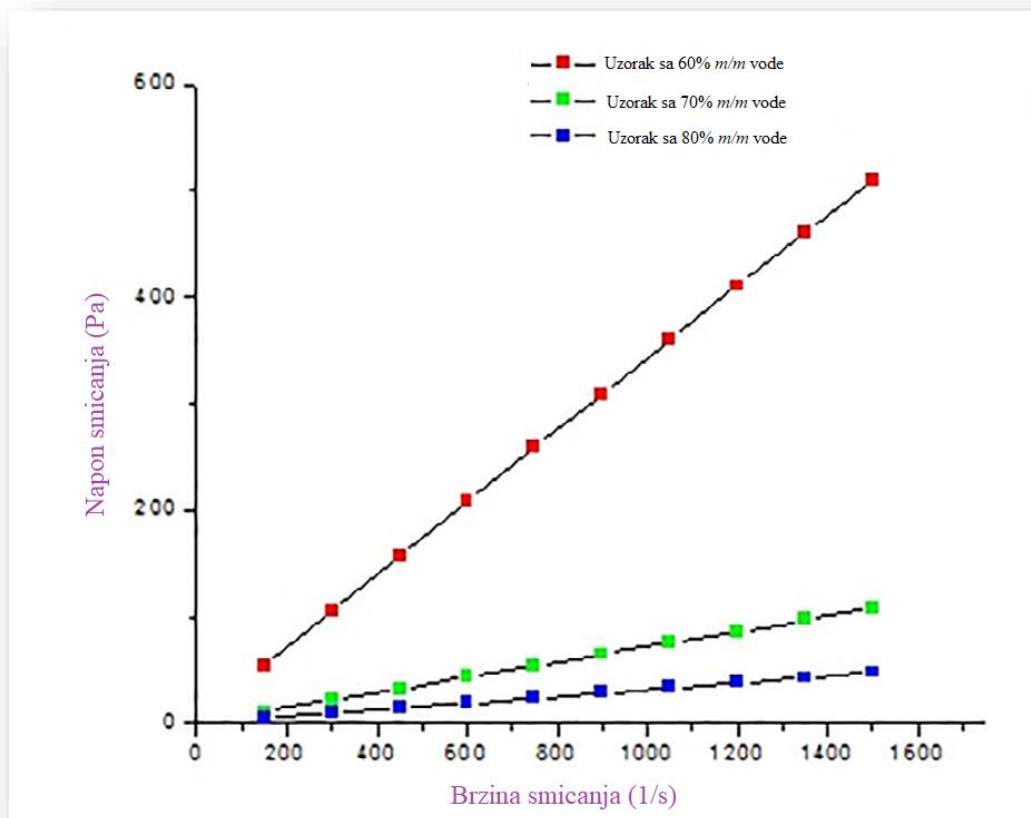
posledica razblaženja dispergovane faze – kapljica ulja koje nose određeno naelektrisanje na površini usled prisutnog lecitina (Santana i sar, 2012). U svakom slučaju, jasno je da je formulacija sa 10% *m/m* masne faze i SOR1 (F1) upravo U/V nanoemulzija.

Ove nalaze podržali su i rezultati dobijeni praćenjem termalnog ponašanja uzoraka sa rastućim udelom vode pri SOR 1, hlađenjem sa 25 °C na -50 °C. Naime, sama visokoprečišćena voda pokazuje snažan egzotermni pik na -15 °C. Evidentno je da u ispitivanim uzorcima dolazi do određene interakcije vode sa hidrofilnim komponentama surfaktanata, što dovodi i do promene temperature mržnjenja vode (Slika 4.10a). U početnim tačkama (uzorci sa 10 i 20% *m/m* vode), pik vode se čak ne može ni detektovati, dok je u uzorku sa 30% *m/m* vode tačka mržnjenja na vrlo niskoj temperaturi (-30 °C), što nedvosmisleno ukazuje da je ona vezana u unutrašnjosti (Todosijević i sar, 2014). Sa porastom udela vode, pik postaje intenzivniji i pomera se ka višim temperaturama, dok se u uzorku sa 80% *m/m* vode (što odgovara formulaciji F1) pik poklapa sa onim koji potiče od same vode, upućujući na činjenicu da je voda sada „dostupnija“, tj. da je došlo do reorganizacije u strukturi i da je sada ona spoljašnja faza emulzionog sistema.



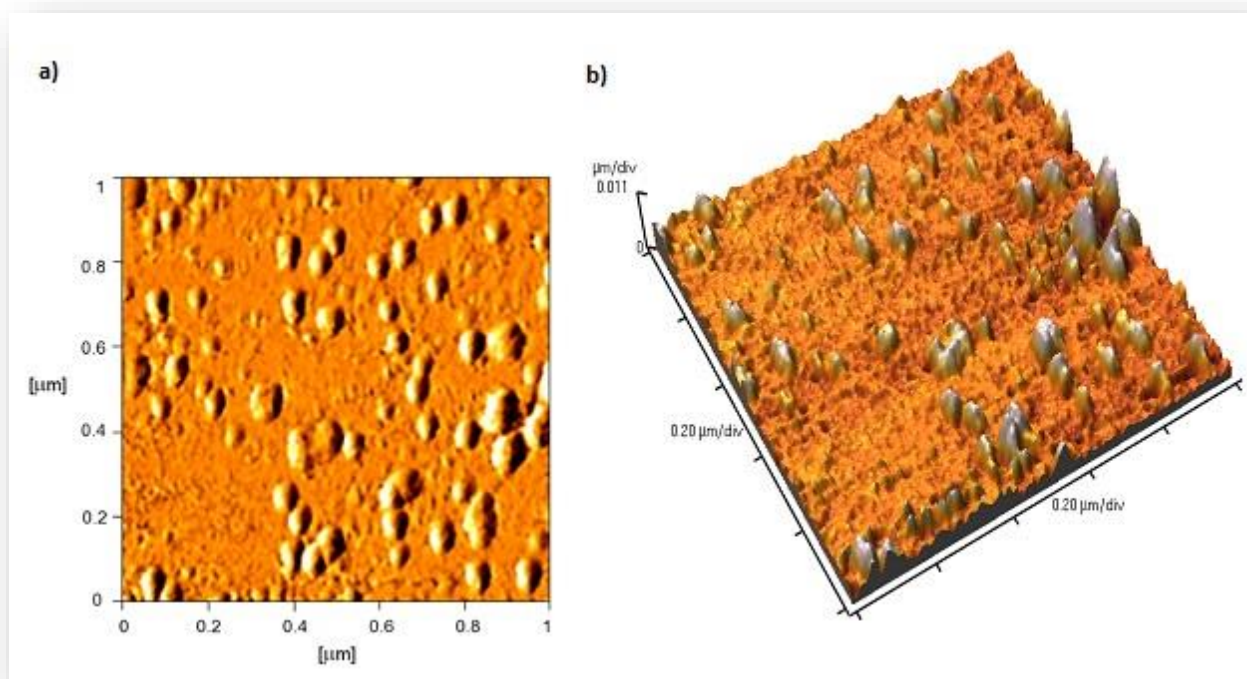
Slika 4.10. a) DSC termogrami za SOR 1 pri rasućem udelu vode; b) DSC termogrami nanoemulzija sa 1, 2 i 3 mg/ml kurkumina i odgovarajuće placebo nanoemulzije; c) DSC termogram kurkumina

Golim okom primetna promena u viskozitetu i reološkom ponašanju uzoraka sa porastom sadržaja vode potvrđena je i instrumentalno. Uzorci sa SOR 1 i 60, 70 i 80% *m/m* vode pokazali su linearan odnos između napona i brzine smicanja, potvrđujući da je u pitanju njutnovski tip proticanja (Slika 4.11). Dodatno, uočava se i značajan pad (čak 10 puta) u viskozitetu kod formulacije sa 80% *m/m* vode (3,2 mPa·s) u odnosu na onu sa 60% *m/m* vodene faze (33,81 mPa·s).



Slika 4.11. Krive proticanja nanoemulzija sa SOR 1 i rastućim udelom vodene faze (60, 70 i 80 % m/m vode)

Finalno, za direktan uvid u mikrostrukturu i morfologiju dispergovanih kapi odabrane nanoemulzije, uzorak je podvrgnut AFM analizi. Uočene sferoidne kapljice neravnih površina bile su dimenzija koje su u skladu sa vrednostima procenjenim primenom DLS (Slika 4.12). Nakon uvida u mikrografije kontaktnog sloja, ovakav izgled dispergovane faze upravo ide u prilog teoriji da se tokom nanoemulzifikacije kroz spontanoemulgujući postupak dešava „otkidanje“ porcija masne faze vođenim molekulima amfifila. S obzirom na tip odabranih stabilizatora i formiranje nanokristala na kontaktnoj površini, može se pretpostaviti da je međupovršinski sloj rigidan, što je u saglasju sa nalazima da dispergovane kapljice nemaju oblik idealne sfere. Ipak, ovakva tumačenja treba potvrditi relevantnim tehnikama, čiji rezultati će biti prikazani u nastavku.



Slika 4.12. AFM mikrofografije: a) 2D topografija i b) 3D topografija nanoemulzije F1

4.1.3. Određivanje kapaciteta za solubilizaciju kurkumina u nanoemulziji i fizičko-hemijska karakterizacija formulacija sa kurkuminom

Nakon prvog seta karakterizacija i odabira placebo nanoemulzije, bilo je potrebno odrediti kapacitet za solubilizaciju, odnosno maksimalnu koncentraciju u kojoj će kurkumin biti solubilizovan/inkorporiran u formulaciji. Ovaj zadatak je dodatno bio motivisan činjenicom da, s obzirom na tradicionalnu primenu i još uvek nedefinisan status, preporuke o doziranju kurkumina nisu uspostavljene, pa je svaki doprinos u kontekstu procene efekata u funkciji primenjene koncentracije/doze od značaja (Olotu i sar, 2020).

Sa ovim ciljem, pripremljene su nanoemulzije sa rastućim udelom kurkumina – 1, 2, 3, 4 i 5 mg/ml. Nakon ekvibracije tokom 24 h, izrađene formulacije podvrgnute su vizuelnoj inspekciji. Kod formulacija sa 4 mg/ml i 5 mg/ml kurkumina, evidentna je bila precipitacija već nakon 24 h. Ostale formulacije su odavale homogen izgled, bez precipitacije. Kako bi se potvrdilo odsustvo kristala aktivne supstance, ove 3 formulacije (Tabela 4.3) su podvrgnute termalnoj analizi, a dobijeni termogrami upoređeni sa onim koji potiče od kurkumina.

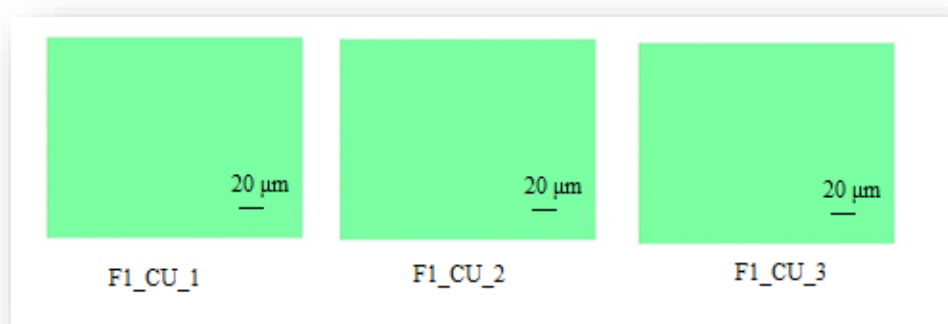
Tabela 4.3. Kvalitativni i kvantitativni sastav nanoemulzija sa kurkuminom

Formulacija	MCT	Polisorbat 80	Lecitin soje	Kurkumin	Visokoprečišćena voda
F1_CU_1				0,1	79,9
F1_CU_2	10	9	1	0,2	79,8
F1_CU_3				0,3	79,7

Kao što se može videti na Slici 4.9c, kurkumin pokazuje oštar endotermni pik na oko 175 °C, koji odgovara tački topljenja, dok se taj termalni događaj nije mogao detektovati kod formulacija sa

kurkuminom (Slika 4.9b). Ono što je kod njih bilo jasno uočljivo, jeste intenzivan endotermni pik koji se dovodi u vezu sa isparavanjem vode iz formulacija. Interesantno je istaći da je tokom DSC analize bilo evidentno da dolazi do blagog pomeranja pika isparavanja vode ka nižim temperaturama sa povećanjem koncentracije kurkumina. Ova pojava može biti u vezi sa interakcijom kurkumina sa hidrofilnim delovima stabilizatora na međupovršini, dovodeći do određenih promena u organizaciji koje smanjuju interakciju vodene faze sa surfaktantima. Slične zaključke izneli su Li i sar. (2017), Sreekanth i Bajaj (2013) i Chen i sar. (2012), analizirajući druge vrste nanodisperzija sa kurkuminom.

Imajući u vidu da je voda prisutna u značajnom udelu u svakoj od formulacija, da bi se izbegla mogućnost da ovaj intenzivni pik „sakrije“ pik koji potiče od topljenja nesolubilizovanog kurkumina, uzorci nanoemulzija su ponovo analizirani, ali sada nakon uparavanja vode (sušenjem na sobnoj temperaturi). Ni tada nije detektovano prisustvo nesolubilizovanog kurkumina. Ovi nalazi podržani su i posmatranjem uzoraka pod polarizacionim mikroskopom, gde nisu uočeni nerastvoreni kristali aktivne supstance (Slika 4.13).



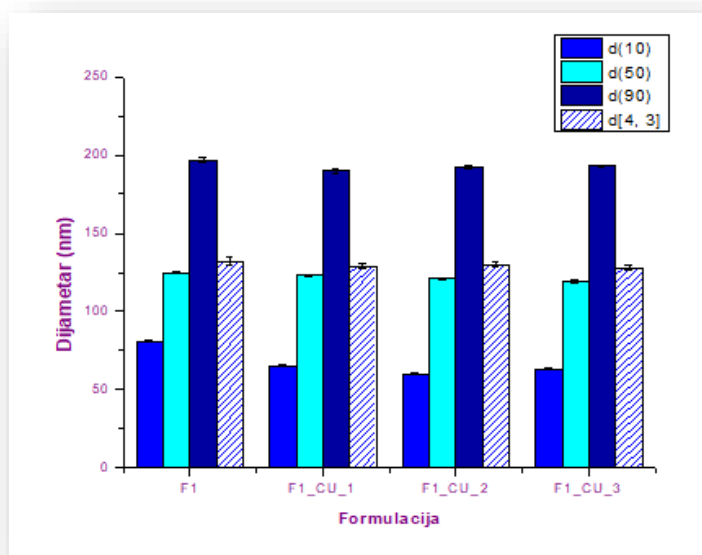
Slika 4.13. Mikrografije (polarizaciona mikroskopija) nanoemulzija sa 1 mg/ml (F1_CU_1), 2 mg/ml (F1_CU_2) i 3 mg/ml kurkumina (F1_CU_3)

Kako bi se procenio uticaj solubilizovanog kurkumina na fizičko-hemijska svojstva nanoemulzija, ponovo su sprovedena osnovna merenja – određivanje veličine i distribucije veličina dispergovanih kapljica, određivanje zeta potencijala, pH vrednosti, električne provodljivosti i viskoziteta formulacija. Komparativni pregled rezultata navedenih ispitivanja dat je u Tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Rezultati ispitivanja odabranih fizičko-hemijskih parametara nanoemulzija sa kurkuminom i odgovarajuće placebo nanoemulzije

Parametar Oznaka uzorka	Z-ave(nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)	pH	Električna provodljivost (µS/cm)	Viskozitet (mPa*s)
F1	101,13±0,59	0,165±0,018	-31,97±3,75	4,78±0,05	116,9±0,9	3,12±0,12
F1_CU_1	121,4±2,4*	0,176±0,016	-25,2±1,5*	5,6±0,1*	93,1±0,02*	3,12±0,13,
F1_CU_2	129,3±0,9*	0,172±0,01	-28,8±4,1*	5,7±0,1*	93,2±0,5*	3,12±0,30
F1_CU_3	127,47±0,95*	0,187±0,012	-30,33±1,81	5,7±0,05*	94,43±2,31*	2,93±0,09

ANOVA: *p<0,05 u poređenju sa F1 (n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)



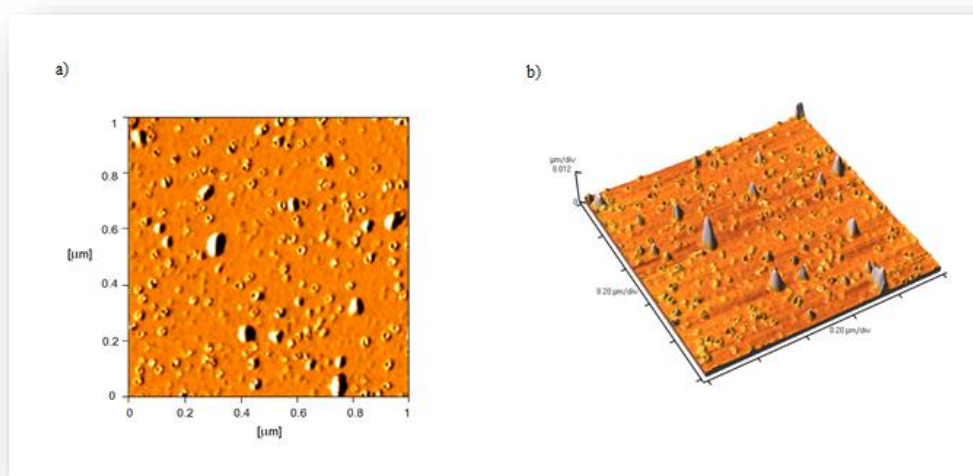
Slika 4.14. Volumenska distribucija veličina dispergovanih kapi nanoemulzija sa kurkuminom i odgovarajuće placebo nanoemulzije određene primenom laserske difrakcije (n=8, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Prisustvo kurkumina u formulaciji dovelo je do statistički značajnog povećanja procenjenog hidrodinamičkog prečnika kapljica dispergovane faze, i to povećanje je bilo koncentraciono zavisno. Kako bi se isključilo postojanje određenih agregata većih dimenzija koji su ispod granice vidljivosti za foton korelacionu spektroskopiju, uzorci su analizirani i primenom laserske difrakcije. Ni kod jednog uzorka nisu detektovane kapljice dimenzija većih od 200 nm (Slika 4.14). Solubilizacija kurkumina dovela je do porasta pH vrednosti, ali i dalje su vrednosti bile u opsegu koji pogoduje hemijskoj stabilnosti kurkumina, kao i namenjenom putu primene formulacija. Takođe, sve formulacije sa kurkuminom imale su statistički značajno niže vrednosti zeta potencijala i električne provodljivosti u poređenju sa placebo nanoemulzijom. Ovakvi nalazi mogu se dovesti u vezu sa tim da kurkumin u pH opsegu 3-7 deluje kao snažan proton donor (Sharma i sar, 2005), umanjujući time jonizaciju fosfolipida prisutnih na površini kapljica, što se direktno odražava na vrednosti ovih fizičko-hemijskih parametara. Ipak, kao što je već napomenuto, elektrostatički mehanizam nije jedini odgovoran za stabilizaciju ovih nanoemulzija, te se u ovom slučaju apsolutne vrednosti zeta potencijala ispod 30 mV mogu smatrati adekvatnim (Jacobs i Müller, 2002). Kao što je bilo i očekivano, na osnovu procene reološkog ponašanja, jasno je da dodatak kurkumina nije doveo do promene u tipu proticanja ispitivanih formulacija, i nije bilo promena u vrednostima njihovih viskoziteta.

U cilju sveobuhvatne fizičko-hemijske karakterizacije nanoemulzija sa kurkuminom, u nastavku su formulacije podvrgnute AFM analizi, kako bi se stekao uvid u unutrašnju strukturu. Takođe, sprovedena je i EPR analiza nanoemulzija, kako bi se procenila mikrostrukturalna organizacija površinskog sloja, procenile interakcije između aktivne supstance i ekscipijenasa, odnosno odredila tačna lokalizacija kurkumina unutar formulacije.

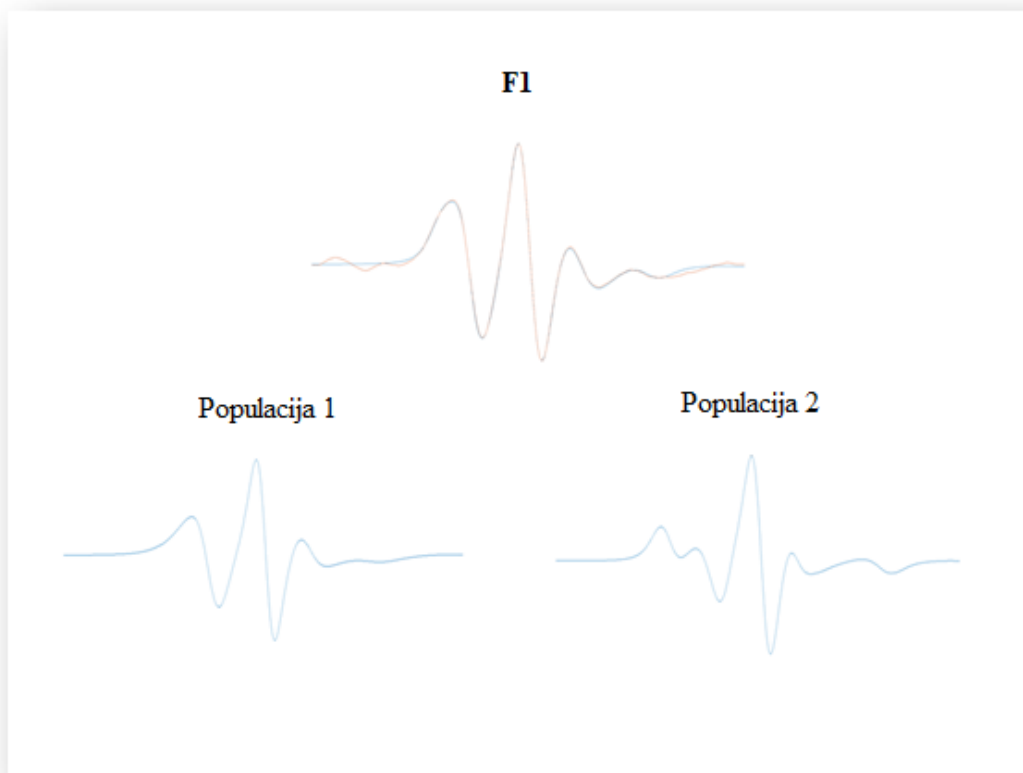
Na Slici 4.15 prikazane su 2D i 3D mikrografije formulacije F1_CU_3. I ovde se mogu uočiti kapljice sferoidnog (ali ne idealno sfernog) oblika. Ono što je karakteristično za mikrografije i placebo i formulacija sa kurkuminom jeste činjenica da se može uočiti značajan udeo malih kapi, čak i ispod 100 nm, uz poneku veću kap prečnika između 100 i 200 nm. Sa druge strane, kada se pogleda Z-ave (Tabela 4.4), vrednost za npr. F1_CU_3 je $135,5 \pm 2,3$ nm. Na ovom primeru se upravo može sagledati sva nesavršenost procene veličine primenom *batch mode* DLS o kojoj je bilo

reči u uvodu – iako su veće kapljice procentualno manje zastupljene (što se jasno vidi na mikrografijama), zbog metodologije procene veličina, ali i pretpostavke od koje se u ovom merenju polazi - da su čestice/kapi idealne sfere, dolazi se do diskrepance između realnih vrednosti i onih koje se dobijaju merenjem. Dodatno, prisutan sloj sternih stabilizatora, kao i jonska jačina medijuma u kojem se meri značajno utiču na dobijene rezultate. Sa druge strane, direktan uvid kroz mikrografije daje realniju sliku. Upravo ovakva situacija pokazuje nedvosmislenu potrebu za primenom više od jedne metode karakterizacije u domenu procene veličine. Ukoliko nam je potreban tačan rezultat, posebno kada uzorci nisu monodisperzni, neophodne su metode visoke rezolucije (kao što je AFM). U velikom broju naučnih publikacija se često sreće deklarisanje isključivo Z-ave vrednosti, koja, posmatrana samostalno, suštinski ne daje sasvim realnu informaciju o uzorku. Ipak, DLS (i u *batch mode* sistemu) je neosporno korisna tehnika (brza i precizna) za poređenje formulacija, odnosno procenu stabilnosti i detekciju trenda u promeni veličine tokom vremena, za šta je u ovom radu i korišćena.



Slika 4.15. AFM mikrografije: a) 2D topografija i b) 3D topografija uzorka F1_CU_3

U nastavku, dinamika međupovršinskog sloja i njegova mikrostrukturalna organizacija rasvetljeni su primenom EPR spektroskopije uz primenu 5-DSA kao amfifilnog obeleživača sa paramagnetnim svojstvima. Zahvaljujući amfifilnoj strukturi, 5-DSA ima sposobnost inkorporiranja u međupovršinski sloj, a praćenjem dinamike ovog molekula, moguće je sagledati molekularnu organizaciju u mikrokruženju.



Slika 4.16. EPR spektar nanoemulzije F1: Uočavaju se 2 populacije 5-DSA – „brža“ (populacija 1, sa procentualnom zastupljenošću od $87,4 \pm 2,1\%$) i „sporija“ (populacija 2, sa procentualnom zastupljenošću od $12,8 \pm 0,4\%$)

U datoj analizi i nakon primene EPR simulacija, snimljeni su standardni trolinijski spektri 5-DSA, i uočene su 2 populacije obeleživača – jedna izrazito imobilisana („rigidna“, „sporija“) i jedna fleksibilnija („brža“) (Slika 4.16). Kao logično objašnjenje nameće se činjenica da je međupovršina nanoemulzija heterogene strukture – sastoji se iz polisorbata 80 i lecitina soje u odnosu 9:1. S tim uvezi je i nalaz da je relativan odnos ove dve populacije upravo približno jednak masenom odnosu ova dva stabilizatora u međusloju. Vrlo je verovatno da je jedan deo molekula 5-DSA lociran isključivo između molekula polisorbata (oko 90%), dok se jedan deo nalazi u regionima gde je prisutan i lecitin (oko 10%). Ako se pogledaju vrednosti za τ_R (Tabela 4.5), jasno je da se vrednosti značajno razlikuju, što ukazuje na postojanje 2 različite mikrosredine oko 5-DSA. Tzv. „populacija 1“ je više zastupljena i odgovara fleksibilnijem okruženju (niže τ_R vrednosti), dok je „populacija 2“ zastupljena manje, i odgovara rigidnijoj mikrosredini (više τ_R vrednosti) - verovatno regionima gde je prisutan lecitin. Dakle, čak iako je prisutan u koncentraciji od 1%, lecitin uzrokuje poteškoće i smetnje u rotiranju obeleživača, što je verovatno posledica njegove kompleksnije strukture, pa kretanje u međupovršinskom sloju postaje teže (Avramiotis i sar, 2000).

Tabela 4.5. Parametri EPR spektra 5-DSA kod nanoemulzija sa kurkuminom i odgovarajuće placebo nanoemulzije

5-DSA				
Formulacija	τ_{R1} (ns)	Volumenska distribucija 5-DSA – populacija 1 (%)	τ_{R2} (ns)	Volumenska distribucija 5-DSA – populacija 2 (%)
F1	4,9±0,2	87,4±2,1	12,8±0,4	12,6±2,7
F1_CU_1	6,3±0,1	91,2±3,2	8,04±0,6	8,8±2,3
F1_CU_2	4,6±0,3	87,6±1,6	7,1±0,2	12,7±1,8
F1_CU_3	5,5±0,2	90,2±2,4	6,5±0,1	9,8±0,9

(n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Ipak, treba napomenuti da su odrednice „brža“/„fleksibilnija“ odnosno „sporija“ populacija relativni. Na osnovu vrednosti τ_R (>2 ns), jasno je da obe populacije pripadaju regionu sporog kretanja, što govori o vrlo „gustom“ pakovanju na međupovršini i rigidnosti međupovršinske membrane, samo što je njena struktura heterogena i stepen rigidnosti nije podjednak u svim delovima međupovršine. Slabofleksibilna međupovršina može se dovesti u vezu upravo sa već diskutovanim rezultatom da ove nanoemulzije nastaju transformacijom tečnokristalne strukture, koja se svakako odlikuje manjom molekularnom mobilnošću u poređenju sa npr. bikontinualnom mikroemulzionom strukturom (koja se navodi kao alternativni tranzicioni sistem u toku formiranja nanoemulzija niskoenergetskim postupcima). U radu Nash i Erk (2017) upravo je pokazano da međupovršinski sloj nanoemulzija sa lecitinom poseduje viskoelastična svojstva, verovatno zbog stvaranja gelastih struktura i gustog filma sa susednim molekulima (Shchipunov, 2001).

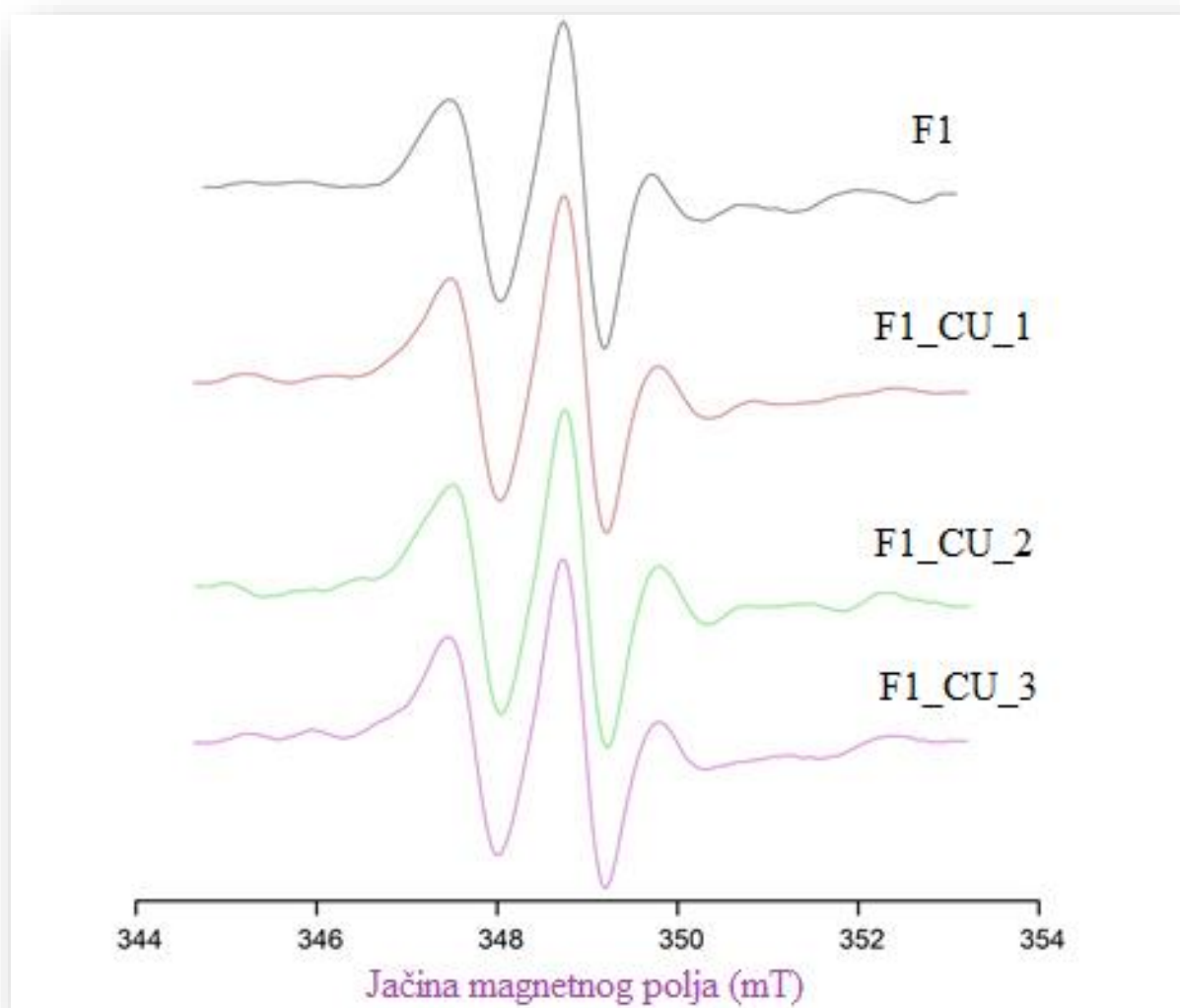
Ovakva vrsta strukturnih informacija o emulzionim sistemima veoma je važna sa aspekta tumačenja biofarmaceutskih performansi i isporuke solubilizovanih molekula (Teochari i sar, 2017).

4.1.4. Određivanje lokalizacije kurkumina u nanoemulziji

Za dalje tumačenje eksperimentalnih podataka u domenu bioloških i biofarmaceutskih analiza, pored poznavanja fluidnosti međupovršinske membrane, vrlo je važno poznavati i raspodelu aktivne molekule u formulaciji, tj. njenu lokalizaciju.

Analizom EPR spektara nanoemulzija sa kurkuminom (Tabel 4.5, Slika 4.17), opet su uočene 2 populacije obeleživača istih karakteristika kao i kod placebo formulacije. Vidi se da dodatak aktivne supstance ima efekat na obe populacije. U slučaju one „sporije“, dodatak kurkumina doveo je do smanjenja τ_R vrednosti koncentraciono zavisno – sa većim koncentracijama kurkumina, dobijaju se niže τ_R vrednosti. Iako bi se možda moglo očekivati drugačije, čini se kao da je dodatak kurkumina doveo do stvaranja dodatnog prostora u gustom rasporedu molekula surfaktanata, obezbeđujući time bolju mobilnost obeleživača. Pri najvišoj koncentraciji kurkumina (formulacija F1_CU_3), u „rigidnijem“ regionu, došlo je do dvostrukog smanjenja τ_R u poređenju sa placebo formulacijom. Sa druge strane, u „fleksibilnijoj“ populaciji su takođe uočene promene, ali one nisu pratile neki specifičan trend. Dodatno, kada se uporede formulacije sa kurkuminom u odnosu na placebo formulaciju, uočava se da dodatak kurkumina utiče na smanjenje razlike između τ_{R2} i τ_{R1} . Kako bi se ovaj nalaz objasnio, važno je razmotriti i pH formulacija. Naime, pKa vrednost za 5-DSA iznosi 6,55. Kako je izmerena pH placebo nanoemulzija 4,78±0,05, što je skoro 2 pH jedinice ispod pKa obeleživača, može se zaključiti da je 5-DSA tokom interakcije sa placebo nanoemulzijom skoro u potpunosti u svojoj nejonizovanoj formi, a time bliže i nepolarnim regionima surfaktanata u

monosloju. Solubilizacijom kurkumina dolazi do povećanja pH vrednosti (na 5,7-5,8), što za posledicu ima i povećanje jonizovane frakcije 5-DSA, indukujući pomeranje glomazne paramagnetne „glave“ obeleživača ka polarnim delovima surfaktanata. Na taj način delimično dolazi do rasterećenja regiona u kome se nalaze i lecitin i polisorbat 80, i pomeranja 5-DSA ka regionima sa „fleksibilnijim pakovanjem“ molekula (polarni regioni, okrenuti ka vodenoj fazi) (Ching-San, 1982). Međutim, neosporno je da su uočene promene dominantno posledica molekularnog preuređenja u nepolarnim slojevima surfaktanata, jer čak i u datim okolnostima, 5-DSA je i dalje dominantno u nejonizovanoj formi, jer povećanje pH vrednosti, koje je i dalje za 1 pH jedinicu ispod pKa spin probe, nije dovoljno da dovede do njene značajnije jonizacije.



Slika 4.17. Komparativni prikaz EPR spektara 5-DSA za nanoemulzije sa kurkuminom (sa rastućom koncentracijom kurkumina) i odgovarajuću placebo nanoemulziju

Dobijeni ukazuju da kurkumin participira u međupovršinskom sloju, i to verovatno bliže lipofilnim regionima surfaktanata. U suprotnom, da je u potpunosti rastvoren u masnoj fazi nanoemulzije, ne bi se mogle uočiti dinamičke promene u rotaciji 5-DSA (Mitsou i sar, 2018). Ovakav zaključak bi se mogao naslutiti i na osnovu već diskutovanih podataka o rastvorljivosti kurkumina (Slika 4.1).

4.2. Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada

4.2.1. Modifikovanje osnovne formulacije – dodatak monoterpena kao hemijskih pojačivača penetracije: fizičko-hemijska karakterizacija

Kako je već napomenuto u uvodu, brojne su strategije koje se mogu primeniti u cilju poboljšanja dermalne raspoloživosti aktivnih molekula. Pored dizajniranja nanoformulacija, kao inovativnog pristupa, primena hemijskih pojačivača penetracije već ima dugogodišnju primenu. U tom kontekstu, u nastavku istraživanja razmotren je dodatak monoterpena (eukaliptola i pinena) u postojeću osnovnu formulaciju, i to tako što je jedan deo masne faze zamenjen odgovarajućim monoterpenom. Sastav formulacija prikazan je u Tabeli 4.6. Svaka formulacija pripremljena je na isti način, sponatnoemulgujućim postupkom. Kurkumin je solubilizovan u najvećoj koncentraciji – 3 mg/ml.

Tabela 4.6. Kvalitativni i kvantitativni (% m/m) sastav placebo i formulacija sa kurkuminom (sa hemijskim pojačivačima penetracije ili bez njih)

Formulacija	MCT	Eukaliptol	Pinen	Kurkumin	Lecitin soje	Polisorbat 80	Voda
F1	10	/	/				
F1_EUC	5	5	/	/			80
F1_PIN	5	/	5		1	9	
F1_CU_3	10	/	/				
F1_EUC_CU_3	5	5	/	0,3			79,7
F1_PIN_CU_3	5	/	5				

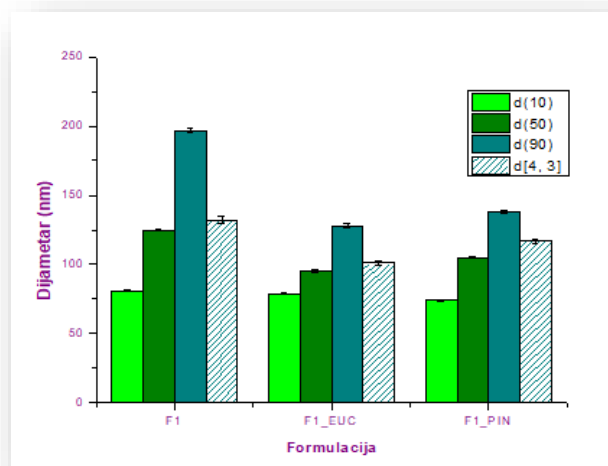
Svaka formulacija prvo je posmatrana vizuelno, a zatim je podvrgnuta daljoj karakterizaciji.

Nanoemulzije su bile lako protočne, njutnovske tečnosti, zamućene, sa plavičastim odsjajem prilikom posmatranja prema izvoru svetlosti. Formulacije kod kojih je deo masne faze zamenjen monoterpenom bile su vizuelno transparentnije, što je moglo da ukaže na određene fizičko-hemijske interakcije i rearanžiranje u međupovršinskom sloju. Određivanjem hidrodinamičkog dijametra, pokazano je da je došlo do značajnog smanjenja veličine kod formulacija sa monoterpenima u odnosu na F1 (Tabela 4.7). Uporedivi rezultati dobijeni su i primenom laserske difrakcije, koja je sprovedena sa ciljem da se uoče kapljice većih veličina, odnosno agregati koji su ispod granice vidljivosti za foton korelacionu spektroskopiju (Slika 4.18). Ovaj efekat smanjenja veličine kapi unutrašnje faze nedvosmisleno potiče od primenjenih monoterpena, budući da je to jedina razlika u odnosu na F1. Takvi rezultati navode na pretpostavku da monoterpeni ispoljavaju efekte kostabilizatora.

Tabela 4.7. Rezultati ispitivanja odabranih fizičko-hemijskih parametara placebo nanoemulzija sa hemijskim pojačivačima penetracije i nanoemulzije koja ih ne sadrži

Formulacija	Z-ave (nm)	pH	Električna provodljivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Zeta potencijal (mV)
F1	101,13 \pm 0,59	4,78 \pm 0,04	97,1 \pm 5,1	-33,07 \pm 0,95
F1_EUC	41,25 \pm 0,25*	6,25 \pm 0,03*	104,7 \pm 0,3	-21,17 \pm 1,17*
F1_PIN	65,24 \pm 0,24*#	4,65 \pm 0,01*#	100,3 \pm 0,7	-39,5 \pm 1,3*#

Z-ave – prosečni hidrodinamički dijametar; ANOVA: * $p < 0,05$ u odnosu na F1, # $p < 0,05$ u odnosu na F1_EUC (n=3, srednja vrednost \pm standardna devijacija)



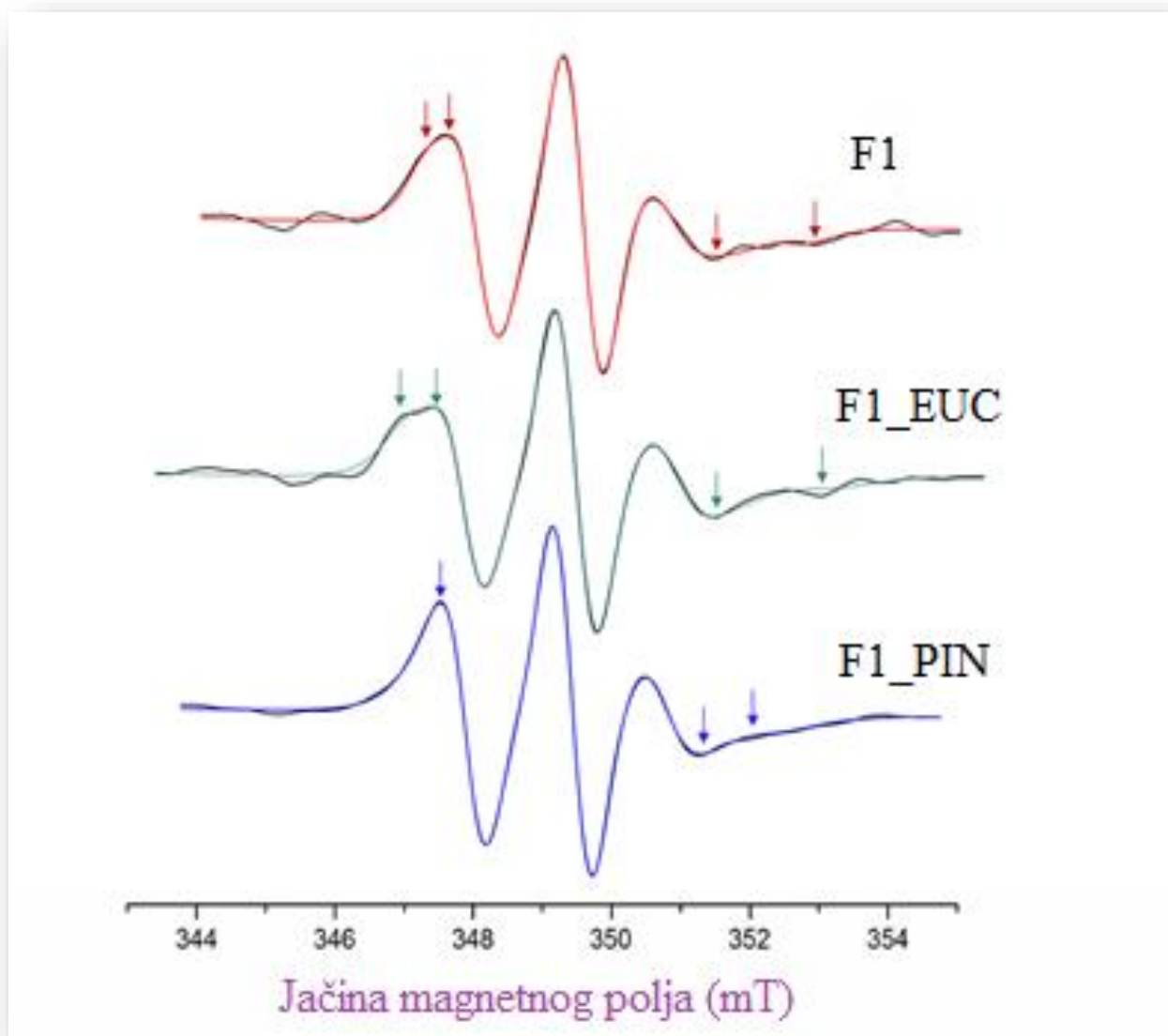
Slika 4.18. Volumenska distribucija veličina (određena primenom laserske difrakcije) dispergovanih kapi placebo nanoemulzija sa hemijskim pojačivačima penetracije i nanoemulzije bez hemijskih pojačivača penetracije (n=6, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Vrednosti električne provodljivosti su u očekivanom opsegu, karakterističnom za hidrofilne formulacije, ali pH vrednost formulacije sa eukaliptolom beleži statistički značajan porast u odnosu na F1. Ipak, i dalje su vrednosti u kiselom opsegu pH, što svakako ne bi kompromitovalo hemijsku stabilnost kurkumina.

4.2.2. Ispitivanje efekta monoterpena kao kostabilizatora nanoemulzija („surfactan-like activity“)

Kako bi se potvrdile pretpostavke o efektu monoterpena kao kostabilizatora, i kako bi se detektovale eventualne promene u dinamici međupovršinskog sloja (u poređenju sa F1) u prisustvu monoterpena, ponovo je sprovedena EPR spektroskopija (Slika 4.19)..

Očekivano, i u ovom slučaju, dobijene τ_R vrednosti ukazuju na postojanje 2 populacije 5-DSA – „rigidnije“ i „fleksibilnije“, koje su posledica heterogene strukture međupovršinskog sloja (Tabela 4.8). Dodatni parametar koji se može dobiti analizom EPR spektra, a značajan za tumačenje međupovršinske organizacije, jeste izotropna konstanta hiperfinog cepanja (α^0), koja govori o mikropolarnosti sredine u blizini paramagnetnog jezgra obeleživača (Papadimitriou i sar, 2008).



Slika 4.19. EPR spektri 5-DSA u izrađenim placebo nanoemulzijama (sa hemijskim pojačivačima penetracije ili bez njih)

Tabela 4.8. Parametri EPR spektra 5-DSA kod placebo nanoemulzija sa hemijskim pojačivačima penetracije ili bez njih

Formulacija	α'_{01}	τ_{R1} (ns)	Volumenska distribucija 5- DSA – populacija 1 (%)	α'_{02}	τ_{R2} (ns)	Volumenska distribucija 5- DSA – populacija 2 (%)
F1	13,30±0,07	4,9±0.2	87,4±2,1	14,93±0,16	12,8±0,4	12,6±2,7
F1_EUC	13,35±0,19	5,7±0.3	88,6±2,4	14,77±0,37	14,4±0,3	11,4±2,4
F1_PIN	13,42±0,06	4,3±0.5	87,9±2,1	14,61±0,07	13,8±0,3	12,1±1,90

α' - konstanta hiperfinog cepanja; τ_R – rotaciono korelaciono vreme (n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Izmerene vrednosti $\alpha'o$ (Tabela 4.8) su više za spin probu koja pripada „rigidnijoj“ populaciji, sugerišući da se nalazi u polarnijem okruženju. Može se pretpostaviti da kompleksna struktura lecitina sprečava spin probu da uđe dublje u međupovršinski sloj (Avramiotis i sar, 2000), pa je paramagnetno jezgro pomerenom ka polarnijim strukturama sloja stabilizatora.

Dodatak eukaliptola i pinena uticao je na τ_R vrednosti obe populacije, što ukazuje na promenu u mikrokruženju oko obeleživača, koja je verovatno posledica prisustva većeg broja molekularnih vrsta na međupovršini, utičući na mogućnost rotacije spin probe. Kada se zaključci o njihovoj lokalizaciji u formulaciji razmotre u svetlu poznavanja vrednosti prosečnog hidrodinamičkog dijametara dispergovanih kapi, opravdano je pretpostaviti da eukaliptol i pinen imaju efekte kostabilizatora, utičući na zakrivljenost međupovršine niskoenergetskih nanoemulzija. Do sličnih zapažanja došli su Zänker i sar. (1980) nakon tenziometrijskih merenja.

Poznato je da viskozitet i gustina masne faze utiču na osobine nanoemulzija, i da su ova svojstva posebno važna kod niskoenergetskih metoda izrade (Tadros i sar, 2004). Iz tog razloga, izmereni su viskozitet i gustina svake od komponenata masne faze, kao i njihovh smeša (Tabela 4.9). Evidentno je da smeše eukaliptola ili pinena i MCT imaju značajno niži viskozitet u poređenju sa MCT. Kako su manje viskozna ulja mobilnija i manje rezilijentna u postupku nanoemulzifikacije, sastav masne faze kod koje je 50% MCT zamenjeno nekim od terpenskih jedinjenja, ne može se isključiti ni mogućnost da je ta fizičko-hemijska osobina uticala na dobijanje kapi manjih dimenzija.

Tabela 4.9. Izmerene vrednosti viskoziteta i gustine komponenata masnih faza izrađenih nanoemulzija

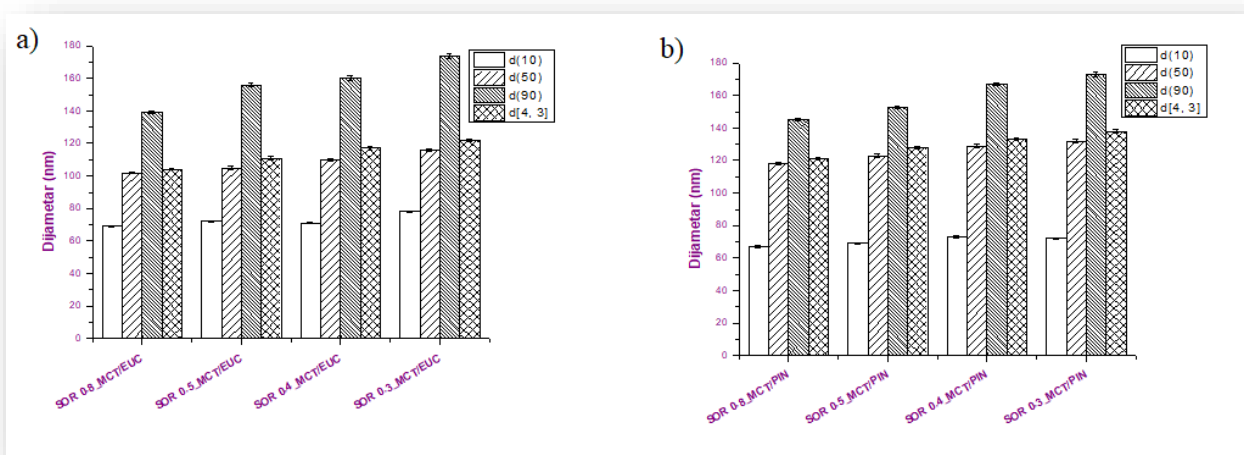
Vrsta ulja/masne faze	Viskozitet (mPa*s)	Gustina (g/cm ³)
MCT	23,58±0,19	0,94289±0,00010
Eukaliptol (EUC)	2,58±0,01	0,92229±0,00008
Pinen (PIN)	1,32±0,01	0,85674±0,00031
EUC/MCT (1:1)	3,34±0,14	0,93150±0,00014
PIN/MCT (1:1)	2,39±0,02	0,90007±0,00007

(n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Iako to prevazilazi domen konkretnog eksperimenta, interesantno je prokomentarisati i niže vrednosti gustine terpenskih jedinjenja, posebno pinena, u kontekstu koloidne stabilnosti. Velika

razlika u gustini između spoljašnje i unutrašnje faze nanoemulzije može kompromitovati stabilnost nanodisperzije. U konkretnom slučaju, kada bi se formirala nanoemulzija čija masna faza bi bila sastavljena isključivo iz terpenkih jedinjenja, moglo bi se očekivati relativno brzo razdvajanje faza, što je i pokazano u nekim preliminarnim eksperimentima. Iz tog razloga je važno obezbediti „noseće“ ulje za terpenka jedinjenja.

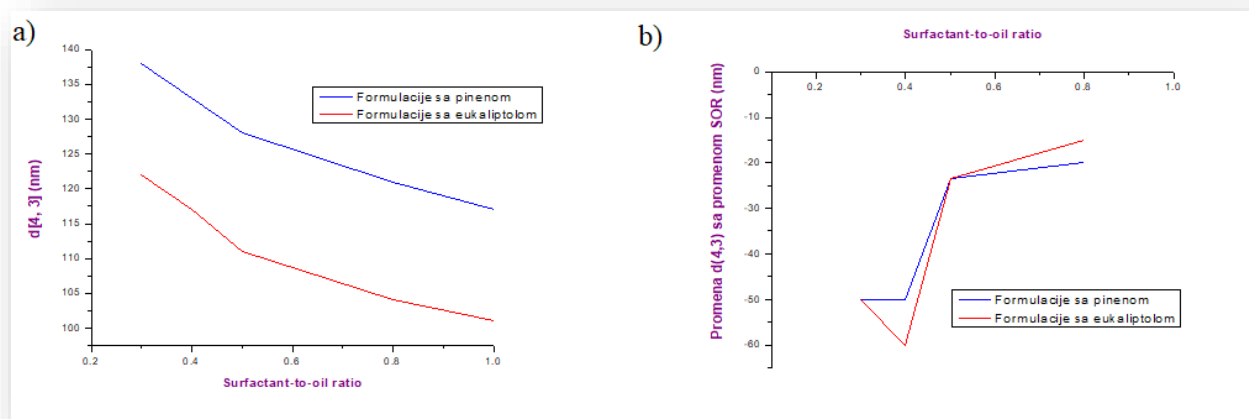
Kako bi se došlo do finalnog argumenta koji ide u prilog hipotezi da odabrani monoterpeni imaju efekat kostabilizatora, pripremljene su formulacije sa istim udelom i sastavom masne faze, ali uz variranje SOR vrednosti. Na Slici 4.20 prikazani su rezultati određivanja veličine dispergovanih kapi primenom laserske difrakcije za formulacije koje kao masnu fazu sadrže smeše MCT sa eukaliptolom ili pinenom, ali pri različitim SOR vrednostima. Interesantno je da su formulacije koje su kao deo masne faze sadržale monoterpene bile stabilne čak pri SOR 0,3, za razliku od situacije kada je MCT jedina komponenta masne faze, kada je minimalna SOR vrednost potrebna za dobijanje nanoemulzija 0,7. Upravo ovaj rezultat pokazuje da je prisustvo monoterpena smanjilo potrebu za uključivanjem emulgatora, tj. bila je dovoljna njihova značajno niža koncentracija, ukazujući na njihove efekte kostabilizatora. Evidentno je i da sistemi sa manjim SOR vrednostima imaju veće prosečne vrednosti veličine, što je i očekivano. Kada se zavisnost promene u veličini dispergovanih kapljica od SOR vrednosti prikaže grafički i matematički opiše (Slika 4.21a), uočava se da promena prati polinomsku regresiju drugog reda, a odgovarajuća funkcija je opadajuća u čitavom ispitivanom regionu za oba tipa masne faze (i smeša sa eukaliptolom i smeša sa pinenom). Kada se izračuna prvi izvod funkcije, postaje vidljivije da sa malom promenom SOR (tj. malim povećanjem koncentracije primenjenih surfaktanata) dolazi do značajnijeg smanjenja u veličini dispergovanih kapljica pri početnim SOR vrednostima, nakon čega je smanjenje manje izraženo (Slika 4.21b), čime se ponovo potvrđuje teorija De Aguiar i sar. (2010).



Slika 4.20. Volumenska distribucija veličina kapi nanoemulzija izrađenih sa monoterpenima u sastavu masne faze, pri različitim SOR vrednostima, određena laserskom difrakcijom: a) formulacije sa eukaliptolom; b) formulacije sa pinenom (n=6, srednja vrednost ± standardna devijacija)

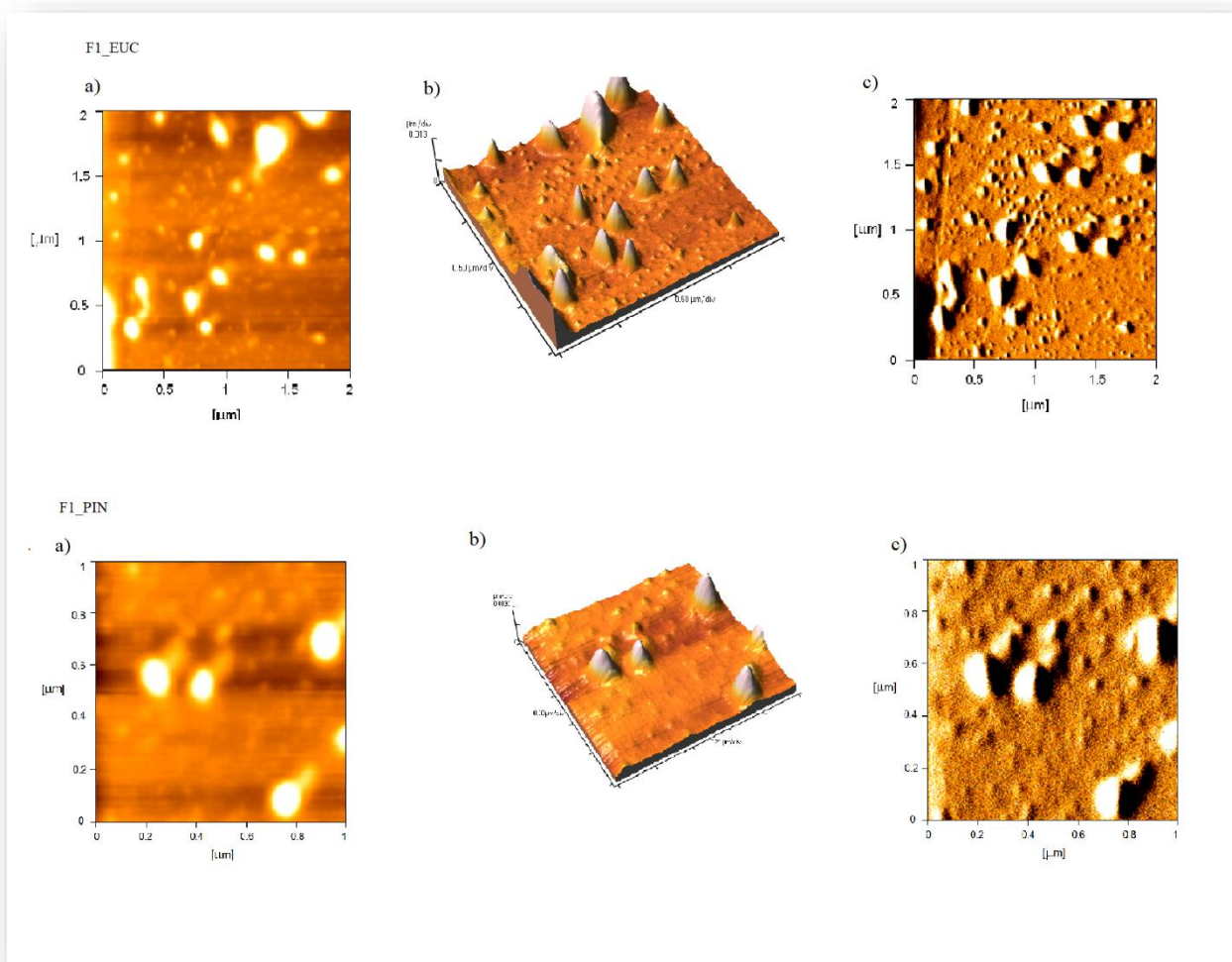
Usled zasićenja međupovršine, daljim povećanjem koncentracije smeše surfaktanata (iznad SOR 0,5) ne dobija se podjednako značajan efekat na smanjenje veličine kapi kao pri nižim SOR vrednostima. Slični nalazi su pokazani i za formulacije koje sadrže samo MCT kao masnu fazu, ali sa većim SOR vrednostima. Sama mogućnost formiranja stabilne nanoemulzije pri nižim SOR vrednostima kada su u sistemu prisutni monoterpeni, u poređenju sa sistemima gde je masna faza sastavljena samo od MCT, nedvosmisleno upućuje na njihov efekat kostabilizatora, koji verovatno potiče od interakcija na međupovršinskom sloju.

Efekat koji se uočava kada se deo masne faze zameni monoterpenima može se objasniti i analizom EACN upotrebljenih ulja – parametra koji govori o njihovoj polarnosti („oiliness“ of the oil). Literaturni izvori navode da je EACN za MCT oko 16, dok pinen ima EACN 3,6. Eukaliptol se takođe svrstava u vrlo polarna ulja – hemijski je ciklični alkan sa kiseonikom u strukturi, pa se može pretpostaviti da je i njegova EACN oko 3 (Bouton i sar, 2009; Engelskirchen i sar, 2007; Acosta i sar, 2003). Ovako polarna priroda terpenskih ulja omogućuje njihovu interakciju sa surfaktantima i olakšava proces solubilizacije, što je u skladu sa hipotezom da poseduju efekte kostabilizatora. Vrlo je verovatno da se monoterpeni, zbog svoje veće polarnosti, smeštaju u međupovršinski sloj, smanjujući posledično i gustinu surfaktanata na međupovršini. Eukaliptol (1,8-cineol) je monoterpen sa kiseonikom u svojoj strukturi, koji ima sposobnost građenja vodoničnih veza. Logično je očekivati da će na međupovršini uticati na stvaranje dipol-dipol interakcija sa polarnom glavom polisorbata 80, ali i sa molekulima vode, utičući na njihovu orijentaciju u površinskom sloju, čime doprinosi dodatnoj stabilizaciji (Zdrali i sar, 2017). Uz sve navedeno, pokazano je da se kod izrazito malih kapi koje poseduju naelektrisanu međupovršinu (što je ovde slučaj) javlja i dodatna elektrostatička interakcija – elektrostatičko odbijanje međusobno udaljenih delova iste međupovršine. Time su, uz prisustvo novih hemijskih vrsta, ukupne interakcije na međupovršini postale znatno kompleksnije za tumačenje.



Slika 4.21. Promena vrednosti prosečnog dijametra kapi različitih formulacija nanoemulzija kapi a) sa povećanjem SOR vrednosti; b) sa promenom SOR vrednosti

U cilju vizuelizacije kapljica unutrašnje faze nanoemulzija F1_EUC i F1_MCT_PIN, ponovo je sprovedena AFM analiza. U poređenju sa morfološkim karakteristikama kapljica nanoemulzije F1, formulacije sa monoterpenima odlikuju se kapljicama pravilnog sfernog oblika, a topografija ukazuje na njihovu glatku površinu (Slika 4.22), što govori o tome da su dodate komponente (monoterpeni) uticale na zakrivljenost i morfologiju međupovršinskog sloja, olakšavajući proces niskoenergetske nanoemulzifikacije. Kada se razmatra veličina dipergovanih kapljica, opet se vidi značajno veći udeo kapljica čiji prečnik je ispod 100 nm.



Slika 4.22. AFM mikrografije nanoemulzija F1_EUC i F1_PIN: a) 2D topografija, b) 3D topografija, c) „signal greške“

4.2.3. Procena uticaja solubilizacije kurkumina na karakteristike formulacija sa monoterpenima

Kao što je prikazano u Tabeli 4.5, kurkumin je solubilizovan u nanoemulzijama u najvišoj koncentraciji – 3 mg/ml. Praćenjem vrednosti fizičko-hemijskih parametara (Table 4.10), dolazi se do interesantnog nalaza da, za razliku od osnovne formulacije F1, sa solubilizacijom kurkumina u formulacijama sa monoterpenima ne dolazi do povećanja prosečnog dijametra kapi u odnosu na placebo nanoemulzije, što je bio dodatni motiv za procenu mikrostrukturne organizacije. Verovatno je to posledica njihovog pokazanog uticaja na molekularnu organizaciju na međupovršinskom sloju. Dodatno, solubilizacija kurkumina nije dovela do promene pH vrednosti i zeta potencijala kod formulacije sa eukaliptolom, dok je kod formulacije sa pinenom došlo do značajnog povećanja pH vrednosti u poređenju sa placebo formulacijom.

Tabela 4.10. Uporedni prikaz prosečnog dijametra kapi, pH vrednosti, električne provodljivosti i zeta potencijala nanoemulzija sa kurkuminom

Formulacija	d[4,3] (nm)	Z-ave (nm)	pH	Električna provodljivost (μ S/cm)	Zeta potencijal (mV)
F1_CU_3	128,67 \pm 2,52	124,9 \pm 2,3	5,36 \pm 0,03	95,1 \pm 0,9	30,33 \pm 1,81
F1_EUC_CU_3	102,67 \pm 1,53	53,35 \pm 0,36	6,23 \pm 0,01	99,7 \pm 1,5	31,1 \pm 0,1
F1_PIN_CU_3	115,33 \pm 0,58	63,12 \pm 1,00	5,80 \pm 0,03	96,5 \pm 1,1	22,27 \pm 0,06

Z-ave – prosečan hidrodinamički dijametar (određen foton korelacionom spektroskopijom)

Određivanje veličine kapi primenom laserske difrakcije;

(n=3, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Nakon sprovedene EPR spektroskopije, uočeno je da je dodatak kurkumina doveo do promena u mikrostrukturnoj organizaciji – došlo je do značajnog (skoro dvostrukog) povećanja τ_{R1} vrednosti za populaciju spin probe koja se nalazi u „rigidnijem“ mikrokruženju, dok je za onu populaciju koja je u „fleksibilnijem“ mikrokruženju zabeleženo smanjenje vrednosti ovog parametra u poređenju sa odgovarajućim placebo nanoemulzijama (Tabela 4.11). Dakle, i ovde se može izvesti sličan zaključak kao i kod formulacija bez monoterpena – kurkumin interaguje sa međupovršinskim slojem, i to dominantno sa nepolarnim regionom sloja stabilizatora i utiče na organizaciju međupovršinskog sloja. Svakako, ponovo treba napomenuti da, bez obzira na postojanje „rigidnijih“ i „fleksibilnijih“ regiona međupovršinskog sloja, dobijene vrednosti τ_R pripadaju oblasti sporog kretanja, te se može reći da i ove formulacije imaju prilično rigidan međupovršinski sloj.

Tabela 4.11. Uporedni prikaz vrednosti τ_R , kao parametra EPR spektra 5-DSA, za nanoemulzije sa kurkuminom

5-DSA		
Formulacija	τ_{R1} (ns)	τ_{R2} (ns)
F1_CU_3	5,5 \pm 0,1	6,5 \pm 0,1
F1_EUC_CU_3	8,5 \pm 0,2	13,4 \pm 0,5
F1_PIN_CU_3	5,9 \pm 0,4	13,2 \pm 0,2

5-DSA – 5-doksilstearinska kiselina; τ_R – rotaciono korelaciono vreme

(n=3, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Nakon sveukupne analize, može se zaključiti da na međupovršinskom sloju vlada čitav niz kompleksnih međumolekularnih interakcija, koje potiču od amfifilnih molekula stabilizatora, komponenata masne faze, ali i prisustva aktivne supstance. Upravo rasvetljavanje ovih odnosa predstavlja važan segment prikazanog istraživanja.

4.2.4. Ispitivanje dugoročne stabilnosti odabranih nanoemulzija

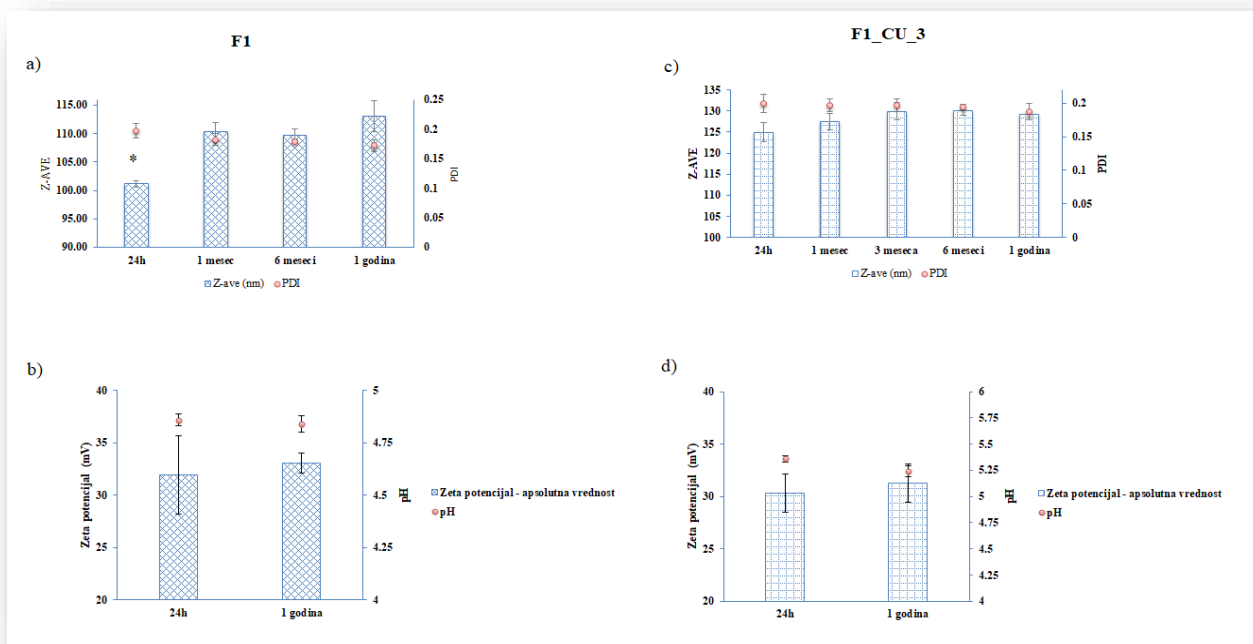
Nakon sprovedenog seta sveobuhvatne fizičko-hemijske karakterizacije kako placebo, tako i formulacija sa kurkuminom, neophodno je potvrditi dugoročnu (fizičku) stabilnost odabranih nanoemulzija, kao i hemijsku stabilnost solubilizovanog kurkumina. Sa tim ciljem, fizičko-hemijski parametri od interesa, odnosno sadržaj kurkumina u formulacijama, praćeni su tokom vremenskog perioda od godinu dana, i analiziran je trend njihovih promena kako bi se potvrdila preliminarna pogodnost primene datih formulacija.

Tokom čitavog perioda čuvanja, sve formulacije imale su ujednačena reološka svojstva, bile su niskoviskozne, i bez znakova razdvajanja faza. Kod formulacija sa kurkuminom, izostanak taloženja i pojave kristala kurkumina potvrđen je polarizacionom mikroskopijom.

Kada je u pitanju prosečan hidrodinamički dijametar, kod formulacije F1, postoji statistički značajno povećanje samo u poređenju sa prvom vremenskom tačkom (nakon 24h), dok je u ostatku vremenskog perioda praćenja veličina ujednačena (Slika 4.23). Ovakav nalaz bi se mogao dovesti u vezu sa konsolidacijom sistema u početnim vremenskim tačkama. Slično tome, PDI je u svim vremenskim tačkama bio ispod 0,2, bez statistički značajnih promena tokom vremena, sugerišući relativno usku distribuciju veličina, bez koalescencije (Slika 4.23).

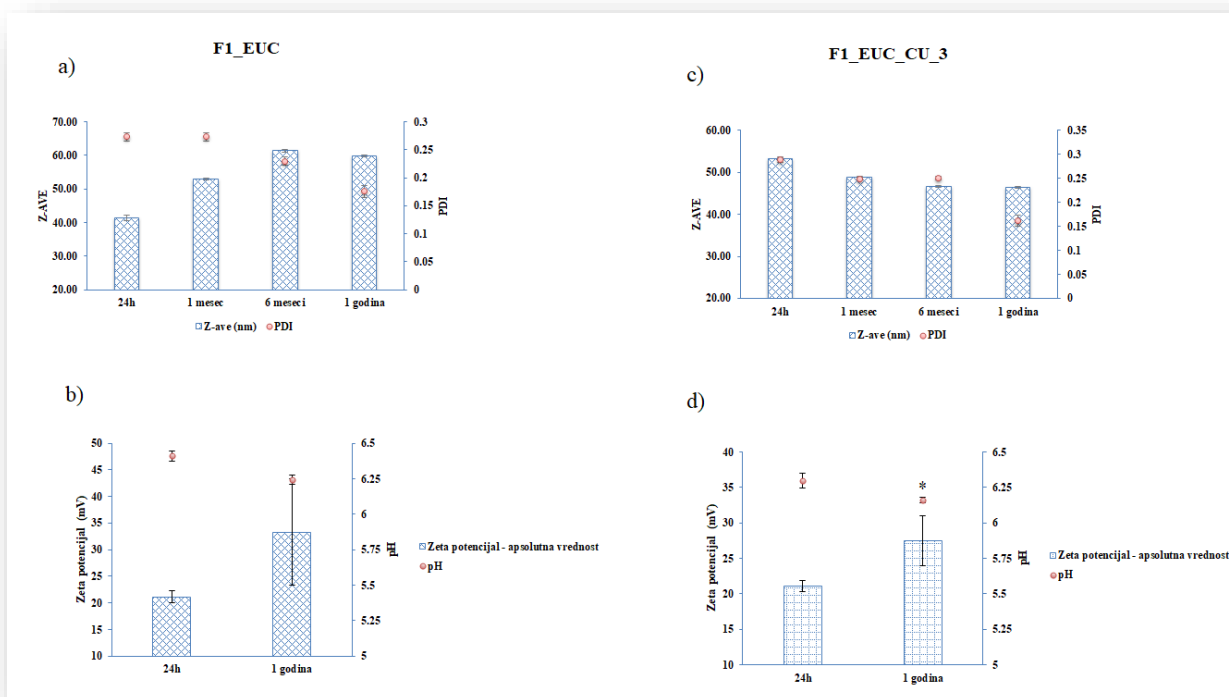
Ako se parametar Z-ave formulacije F1 uporedi sa formulacijom F1_CU_3, postoji statistički značajna razlika (u svim vremenskim tačkama), koja potiče od solubilizacije kurkumina i posledičnog povećanja hidrodinamičkog dijametara kapi nanoemulzije. Ali, i ova formulacija je očuvala ujednačene vrednosti veličine i distribucije veličina tokom čitavog vremena praćenja, bez statistički značajnih promena (Slika 4.23).

Sa druge strane, formulacije sa terpenima (F1_EUC i F1_PIN) pokazuju značajno manje vrednosti prosečnog hidrodinamičkog dijametara u poređenju sa F1. Kod uzorka F1_EUC zabeležen je i statistički značajan porast u vrednosti Z-ave od prve do druge vremenske tačke, koji je u nastavku perioda ispitivanja zadržao konstantne vrednosti, značajno ispod 100 nm (Slika 4.24). U poređenju sa F1, uzorak F1_EUC karakteriše se značajno širom distribucijom veličina kapi. Međutim, osim u prvoj vremenskoj tački, ovaj parametar zadržava vrednosti ispod 0,25, što opet ukazuje na relativno usku distribuciju veličina kapi. Slični nalazi dobijeni su i za mikroemulzione sisteme na bazi terpenskih ulja (Liu i sar, 2011). Veće PDI vrednosti bi se mogle objasniti postojanjem dodatne frakcije kapi manjih dimenzija. Kako je i navedeno, iako se u teoriji to tumači kao nepovoljno, zbog većeg rizika za Ostvaldovo sazrevanja, visok udeo surfaktanata, a i pokazani kostabilizujući efekat monoterpena obezbeđuju dugoročnu fizičku stabilnost ovih formulacija, što je i pokazano.



Slika 4.23. Odabrani parametri fizičke stabilnosti nanoemulzija F1 i F1_CU_3

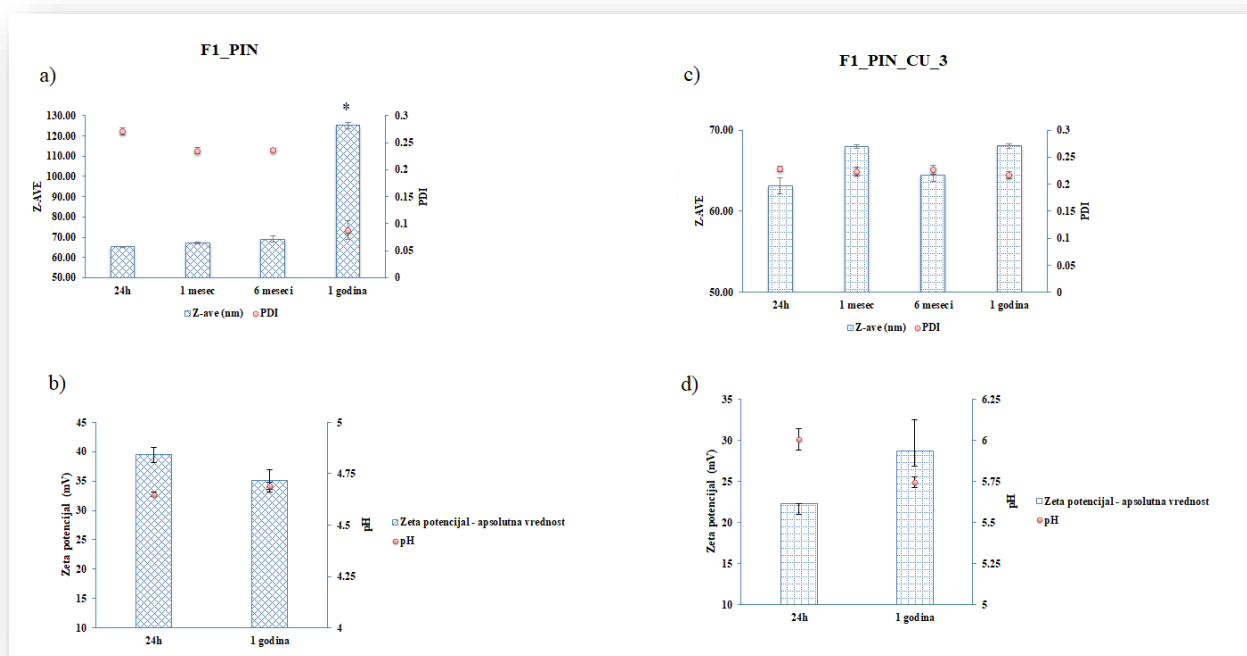
ANOVA: * $p < 0,05$ (Z-ave formulacije F1 24 h nakon izrade u odnosu na Z-ave vrednost u svim ostalim vremenskim tačkama; $n=3$, srednja vrednost \pm standardna devijacija)



Slika 4.24. Odabrani parametri fizičke stabilnosti nanoemulzija F1_EUC i F1_EUC_CU_3

Studentov t-test: * $p < 0,05$ (pH formulacije F1_EUC_CU_3 nakon godinu dana u odnosu na početnu vrednost; $n=3$, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Formulacija F1_PIN, za razliku od F1 i F1_EUC, pokazuje značajniju promenu u veličini kapi tokom vremena (Slika 4.25). Ove promene postaju i vizuelno uočljive nakon 6 meseci, kada se, nakon mućkanja, vidi i blago „zaostajanje“ formulacije po zidovima bočice. EPR spektroskopijom je pokazano da se pinen stacionira u međupovršinskom sloju, u interakciji sa nepolarnim repovima surfaktanata. Međutim, njegova struktura je takva da ne favorizuje stvaranje vodoničnih veza, pa međupovršinski sloj nema ovu dodatnu vrstu interakcija koja doprinosi stabilnosti, kao što je to slučaj kod F1_EUC. Njegovo prisustvo na međupovršini potencijalno utiče na smanjenje gustine stabilizatora, bez dodatnih interakcija sa slojem molekula vode koji su u prvom redu do međufaze, to može biti uzrok povećanja veličine kapi tokom vremena. Takođe, niža gustina pinena, odnosno njegove smeše sa MCT u odnosu na MCT, eukaliptol i smešu eukaliptola sa MCT (Tabela 4.8) ukazuje na to da se može očekivati veća podložnost razdvajanju 2 faze kod formulacije sa pinenom. Sa druge strane, interesantno je da se značajne promene u veličini tokom vremena ne dešavaju kod formulacije sa kurkuminom (F1_PIN_CU_3), što može biti posledica prisustva ovog molekula na međupovršini, koji, uprkos svojoj hidrofobnosti, ima mogućnost stvaranja vodoničnih veza sa vodom na međupovršinskom sloju (Ilnytskyi, 2016). Time formira blago orijentisane dipole vode na međupovršini, koji doprinose sprečavanju koalescencije kapi.



Slika 4.25. Odabrani parametri fizičke stabilnosti nanoemulzija F1_PIN i F1_PIN_CU_3:

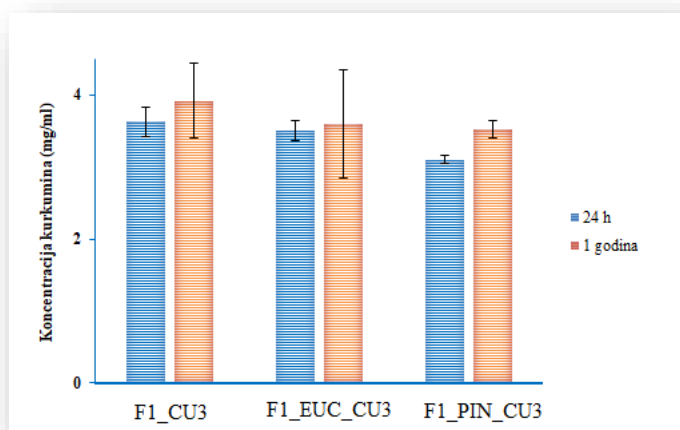
ANOVA: * $p < 0,05$ (Z-ave formulacije F1_PIN nakon godinu dana u odnosu na Z-ave u svim ostalim vremenskim tačkama; $n=3$, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Zeta potencijal, kao mera površinskog naelektrisanja, imao je stabilne vrednosti tokom čitavog perioda ispitivanja, bez statistički značajnih promena. Iako je već napomenuto da elektrostatički mehanizam nije jedini odgovoran za stabilizaciju datih nanoemulzija, eksperimentalni podaci pokazuju da nanoemulzije čije kapi imaju negativno naelektrisane monoslojeve amfifila pokazuju znatno bolju stabilnost u odnosu na formulacije sa pozitivno naelektrisanim ili elektroneutralnim međupovršinama. Prisustvo naelektrisanja na međupovršini obezbeđuje manju gustinu pakovanja na međupovršini usled postojanja elektrostatičkog odbijanja između suprotnih strana međupovršine, usled prisustva istoimenog naelektrisanja (Zdrali i sar, 2017).

Praćenjem pH vrednosti utvrđeno je da su sve ispitivane formulacije ostale u opsegu koji pogoduje i hemijskoj stabilnosti kurkumina, ali i nameravanom putu primene, uz statistički značajan pad nakon

godinu dana jedino kod formulacije F1_EUC_CU. Ali, uprkos rezultatu koji ukazuje na statističku značajnost, dobijene vrednosti su vrlo bliske i ne bi se mogle dovesti u vezu sa određenim vidom nestabilnosti formulacije.

Kako je kurkumin izrazito sklon oksidativnoj degradaciji, najveći izazov upravo predstavlja očuvanje njegove hemijske stabilnosti u formulaciji. Tokom perioda praćenja formulacija, nije došlo da značajnog pada u sadržaju kurkumina (Slika 4.26).



Slika 4.26. Sadržaj kurkumina u nanoemulzijama sa kurkuminom 24 h nakon izrade i nakon godinu dana (n=3, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Treba naglasiti da se većina oksidativnih reakcija dešava u blizini međupovršine nanoemulzionih kapi (McClements and Decker 2000). U praksi, odabir surfaktanata se najčešće bazira isključivo na njihovoj sposobnosti da obezbede fizičku (kinetičku) stabilnost formulacije, dok se vrlo malo pažnje obraća na njihovu mogućnost da zaštite bioaktivnu molekulu koja je solubilizovana u nanoemulziji (Pan i sar, 2013). Ipak, kao jedna od mogućnosti za poboljšanje oksidativne stabilnosti hemijski nestabilnih solubilizovanih aktivnih molekula, navodi se i činjenica da „gusto pakovanje“ molekula surfaktanata na međupovršinskom sloju U/V emulzija deluje kao fizička barijera (pro)oksidansima, što se može postići pri visokim koncentracijama surfaktanata (kao npr. kod niskoenergetskih nanoemulzija). Takođe, postoje i nalazi koji idu u prilog tvrdnji da višak surfaktanata u vodenoj fazi formira micelle koje imaju sposobnost „zarobljavanja“ prooksidativnih hemijskih vrsta (McClements i Decker, 2000). Dodatno, dokazana je i sposobnost lecitina da blokira permeaciju peroksi radikala kroz međupovršinu emulzija, štiteći solubilizovane aktivne molekule od oksidacije (Pan i sar, 2013). Dakle, može se pretpostaviti i da su navedeni faktori (visoka koncentracija surfaktanata na međupovršini i prisustvo lecitina), uporedo sa odgovarajućom pH vrednosti formulacija, doprineli hemijskoj stabilnosti kurkumina.

Na kraju, može se zaključiti da tokom ispitivanog perioda čuvanja na sobnoj temperaturi nisu uočeni ni fizički ni hemijski znaci nestabilnosti placebo nanoemulzija F1 i F1_EUC, dok je kod formulacije F1_PIN uočeno značajnije povećanje prosečne veličine kapi tokom navedenog perioda.

Sve nanoemulzije sa kurkuminom pokazale su se kao stabilne – i fizički i hemijski, tokom vremenskog perioda od godinu dana.

4.3. Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada

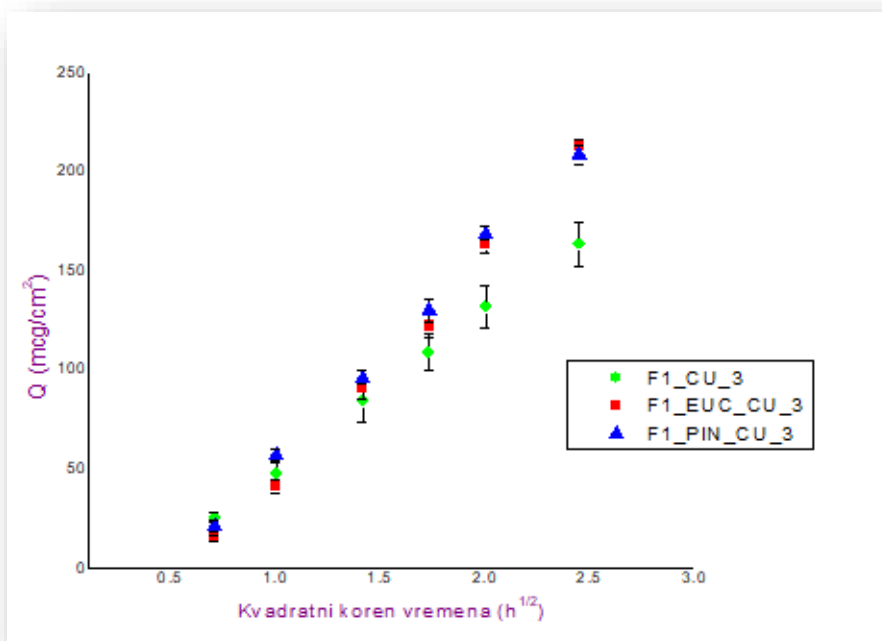
Nakon formulacionih ispitivanja i sveobuhvatne fizičko-hemijske analize u prvoj i drugoj fazi eksperimentalnog rada, fokus treće faze usmeren je ka određenim aspektima biofarmaceutске procene (ispitivanje *in vitro* oslobađanja kurkumina iz nanoemulzija), te *in vitro* procenu bioloških efekata.

4.3.1. Ispitivanje *in vitro* brzine oslobađanja kurkumina iz razvijenih nanoemulzija

U cilju preliminarne procene raspoloživosti aktivne supstance iz razvijenih nanoemulzionih sistema, sprovedeno je *in vitro* ispitivanje oslobađanja primenom vertikalnih difuzionih ćelija. Iako za ovaj tip sistema nema standardnih preporuka o metodologiji ispitivanja, primenjuje se one koje su date za polučvrste preparate za primenu na koži (USP, 2021). Jasno je da se na osnovu *in vitro* oslobađanja ne može doneti sud o bioraspoloživosti aktivne supstance nakon realne primene, ali ovaj vid ispitivanja može ukazati na određene razlike među formulacijama, odnosno efekat formulacionih i procesnih parametara na performanse proizvoda (USP, 2021; Shah i sar, 2015). Procena kinetike oslobađanja aktivne supstance iz razvijenog farmaceutskog oblika svakako je neophodan element sveobuhvatne karakterizacije i, logično, nameće se pre bilo kakvih *in vivo* procena.

Iako ispitivanje pri *finite dose* uslovima bolje odgovara primeni u realnim uslovima (Selzer i sar, 2013), usled slabe rastvorljivosti kurkumina i njegove relativno niske koncentracije u ispitivanim uzorcima, ispitivanje je rađeno pod *infinite dose* uslovima. Prema OECD vodiču, *finite dosing* za tečne preparate podrazumeva primenu $\leq 10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ (OECD 428, 2004), što u slučaju formulacije sa lako isparljivim ekcipientima (kakve su npr. nanoemulzije sa monoterpenima), može dovesti do taloženja supstance na membrani i posledično dobijanja rezultata testa koji ne odgovaraju realnom stanju (Selzer i sar, 2013). Takođe, bez poznavanja tačne terapijske koncentracije aktivne supstance, nije jednostavno ni odrediti odgovarajuću količinu formulacije koja je adekvatna za eksperimente pod *finite dosing* uslovima. Zato je, sa ciljem uočavanja eventualnih razlika u kinetici oslobađanja među razvijenim formulacijama, sprovedeno preliminarno ispitivanje pri *infinite dosing* uslovima. S obzirom na anticipirani put primene, test je trajao 6 h.

Na Slici 4.27 uočava se da sve tri formulacije imaju linearnu zavisnost kumulativne količine oslobođenog kurkumina u funkciji kvadratnog korena vremena ($r^2 > 0,99$ u sva tri slučaja), što ukazuje na to da se kinetika oslobađanja najbolje može opisati *Higuchi* modelom, odnosno da je oslobađanje kontrolisano difuzijom.



Slika 4.27. Rezultati ispitivanja *in vitro* oslobađanja kurkumina iz nanoemulzija F1_CU_3, F1_EUC_CU_3 i F1_PIN_CU_3 (n=6, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Takođe, jasno se uočava razlika u brzinama oslobađanja kurkumina iz nanoemulzija sa monoterpenima, u odnosu na nanoemulziju F1 (Tabela 4.12). Kumulativna količina oslobođenog kurkumina je statistički značajno veća kod formulacija F1_EUC_CU_3 i F1_PIN_CU_3 u odnosu na F1_CU_3. S obzirom da su sve formulacije niskoviskozne njutnovske tečnosti, data razlika se ne može objasniti razlikama u viskozitetu (koje su i najčešći uzrok koji dovodi do razlike u oslobađanju aktivne supstance iz formulacija). Kao logičan zaključak nameće se da je zamena jednog dela MCT monoterpenima imalo presudan uticaj na performanse emulzija u kontekstu brzine i količine oslobođenog kurkumina, i to prevashodno efektima na dinamiku međupovršinskog sloja, čineći ga fluidnijim i „lakše prohodnom“. Dodatno, poznato je da je glavna pokretačka snaga za difuziju aktivne molekule kroz membranu određena njenom termodinamičkom aktivnošću, koja zavisi od koncentracije i saturacione rastvorljivosti kako u formulaciji, tako i u akceptorskom medijumu (Walters, 1996). Moguće je i da je nakon 2-3 sata eksperimenta deo eukaliptola iz F1_EUC_CU_3, odnosno pinena iz F1_PIN_CU_3 ispario, smanjujući saturacionu rastvorljivost kurkumina u uzorku, što je povećalo brzinu difuzije/oslobađanja, a time i ukupnu količinu oslobođenog kurkumina na kraju testa. Svakako, ne može se ni zanemariti značajno manja veličina kapi nanoemulzija F1_EUC_CU_3 i F1_PIN_CU_3, što je dodatno moglo uticati na adheziju za membranu i oslobađanje aktivne supstance.

Tabela 4.12. Brzina oslobađanja i ukupna količina oslobođenog kurkumina nakon 6 h ispitivanja *in vitro* oslobađanja kurkumina iz nanoemulzija primenom Franz-ovih difuzionih ćelija

Uzorak	Brzina oslobađanja (µg/cm ² *h)	Ukupna količina oslobođenog kurkumina na kraju testa – Q _{6h} (µg/cm ²)
F1_CU_3	80,20±6,96	163,21±11,18
F1_EUC_CU_3	115,06 ± 3,20*	212,33±2,51*
F1_PIN_CU_3	108,08±1,94*	208,33 ± 4,73*

ANOVA: *p<0,05 u odnosu na F1_CU_3 (n=6, srednja vrednost±standardna devijacija)

Izračunati procenat oslobođene aktivne supstance iz uzoraka, kod formulacije F1_CU_3 iznosi oko 10%, dok su nanoemulzije sa monoterpenima oslobodile oko 14% kurkumina u periodu ispitivanja. Poređenjem količina oslobođenog kurkumina po jedinici površine iz ispitivanih formulacija, redosled nanoemulzija je sledeći: F1_EUC_CU_3>F1_PIN_CU_3>F1_CU_3.

4.3.2. Ispitivanje antioksidativnog potencijala nanoemulzija sa kurkuminom

Imajući u vidu biološka svojstva kurkumina kao model aktivne supstance, ispitivanje antioksidativnog potencijala nanoemulzija u kojima je ona solubilizovan predstavlja značajan element u preliminarnoj proceni njihove biološke efikasnosti, ali i njihove podobnosti da očuvaju hemijsku stabilnost inkorporiranog kurkumina.

Kao što se i fizičko-hemijska karakterizacija nanoemulzija mora bazirati na čitavom setu metoda i tehnika, tako se ni zaključak o antioksidativnoj aktivnosti ne može izneti na osnovu samo jednog testa, posebno kada se imaju u vidu značajne razlike koje su u osnovi trenutno etabliranih metoda, te poteškoće u poređenju rezultata (Alam i sar, 2013). Generalno, antioksidansi mogu neutralisati slobodne radikale kroz 2 mehanizma (Prior i sar, 2005):

- transferom vodonikovog atoma (engl. *hydrogen atom transfer – HAT-based methods*),
- transferom elektrona (engl. *single electron transfer – SET-based methods*).

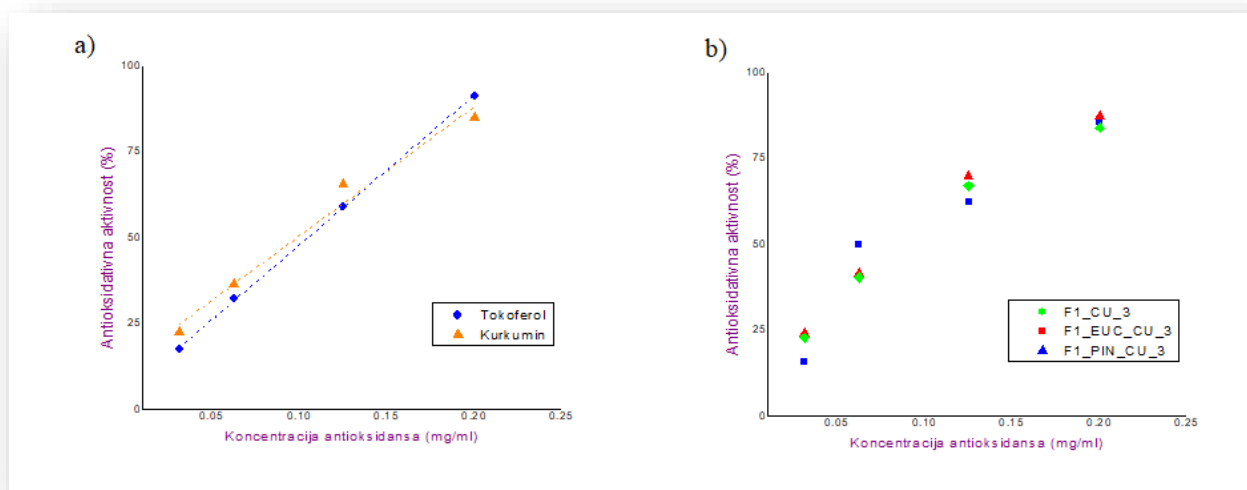
Naravno, moguće je da molekul ima takva svojstva da su oba mehanizma prisutna, ali jedan je uvek dominantan.

U kontekstu ispitivanja antioksidativnog potencijala antioksidanasa inkorporiranih u sisteme sa nanostrukturom (kakve su ispitivane nanoemulzije), važno je napomenuti i da nanomaterijali mogu posedovati inherentna antioksidativna svojstva koja potiču od njihove velike specifične površine i mogućnosti da adsorbuju ili „zarobe“ slobodne radikale, sprečavajući ih tako da nastavljaju lančane reakcije oksidacije. U cilju dobijanja adekvatnih zaključaka, i takve osobine nanomaterijala *per se* je potrebno proveriti (Valgimigli i sar, 2018).

U cilju što kompletnije karakterizacije, u ovom eksperimentalnom segmentu sprovedeni su DPPH i FRAP testovi, kao i procena stepena i kinetike antioksidativne aktivnosti primenom EPR spektroskopije. Zbog sličnosti u hemijskoj strukturi, kao poredbeni antioksidans korišćen je tokoferol.

DPPH antioksidativni test je spektrofotometrijski test koji se zasniva na neutralizaciji slobodnih radikala predominantno HAT mehanizmom. Kao rezultat testa mogu se dobiti podaci o procentu (%) antioksidativnog efekta u funkciji koncentracije antioksidansa, kao i IC_{50} koncentracija, koja je parameter značajan za poređenje antioksidativne sposobnosti različitih antioksidanasa procenjenih ovom metodom (Amorati i Valgimigli, 2014).

Na Slici 4.28 je prikazana zavisnost procenat neutralizacije DPPH radikala u funkciji koncentracije antioksidansa – samostalno, kao i u nanoemulzijama. Na osnovu IC_{50} vrednosti (Tabela 4.13), uočava se da je efekat kurkumina vrlo blizak tokoferolu – njemu strukturno sličnom i vrlo potentnom antioksidansu. Tokom samog eksperimenta, promena boje se dešava gotovo momentalno, upućujući na vrlo brz antioksidativni efekat kurkumina. Pokazano je da je keto-enolna tautomerija, odnosno keto-enol-enolat ravnoteža heptadienonske strukture kurkumina, uz aktivirani C-atom, odgovorna za antioksidativni efekat (Jovanović i sar, 1999). Kao i u slučaju samog kurkumina (u rastvoru), efekat formulacija je gotovo trenutno. Ipak, ovakav rezultat za nanoemulzije se mora uzeti sa rezervom, imajući u vidu uslove izvođenja testa, koji podrazumevaju primenu organskog rastvarača (metanola), što posledično dovodi do destrukcije nosača. Kurkumin biva oslobođen iz unutrašnje faze, što ga čini dostupnim za brzu reakciju – kao kod rastvora. Međutim, ovakav nalaz govori u prilog tome da se kroz postupak nanoemulzifikacije stabilnost kurkumina očuvava. To je i potvrđeno sprovođenjem istog testa nakon 6 meseci, čiji rezultati nisu odstupali od efekata sveže pripremljenih formulacija.



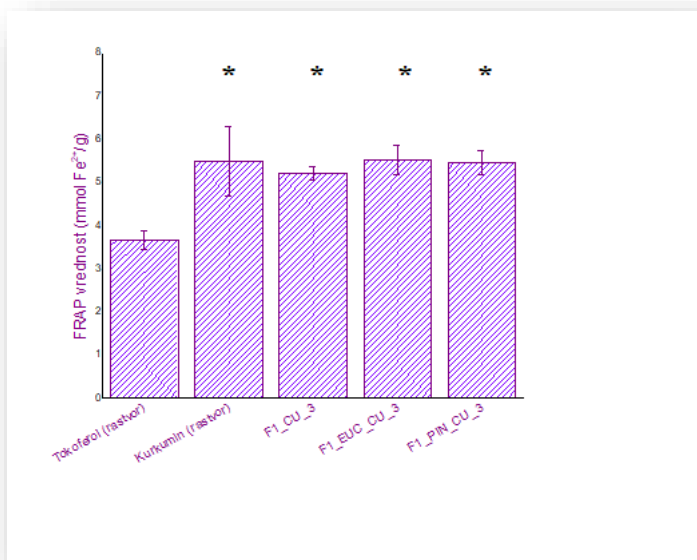
Slika 4.28. Rezultati ispitivanja antioksidativnog potencijala primenom DPPH testa:
 a) Rastvor kurkumina i rastvor tokoferola; b) Nanoemulzije sa kurkuminom
 (n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Tabela 4.13. Izračunate IC_{50} vrednosti nakon DPPH testa za kurkumin
 (rastvora i nanoemulzije) i za tokoferol (rastvor)

Uzorak	IC_{50} (mg/ml)
F1_CU_3	0,0994±00051
F1_EUC_CU_3	0,0929±0,0044
F1_PIN_CU_3	0,0979±0,0040
Kurkumin	0,1028±0,0056
Tokoferol	0,1106±0,0079

IC_{50} – koncentracija antioksidansa koja neutrališe 50% slobodnog radikala
 (n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Sa druge strane, primena FRAP testa je upravo pogodna ne samo za procenu antioksidativnog potencijala pojedinačnih supstanci, već i hidrofилnih formulacija, s obzirom da se izvodi u vodenoj sredini. To omogućuje da se uoče potencijalne razlike u aktivnosti između formulacije i čiste supstance. Analizom rezultata je utvrđeno da je FRAP vrednost za kurkumin značajno veća u odnosu na tokoferol, te da su formulacije imale gotovo isti antioksidativni efekat kao i kurkumin (Slika 4.29). Izraženiji efekat kurkumina potiče od njegove fenolne strukture koja omogućuje antioksidativnu aktivnost i SET mehanizmom, kao što je to pokazano i za neka druga fenolna jedinjenja (Žugić i sar, 2015; Jovanović i sar, 1999). Iako bi se možda moglo očekivati drugačije, nisu uočene značajne razlike između formulacija i rastvora kurkumina. Ovakav rezultat bi se možda mogao donekle i objasniti upravo podatkom da je kurkumin prisutan na međupovršini, što ga čini dostupnim za brzi kontakt sa oksidujućim agensima iz okoline, bez potrebe za oslobađanjem iz formulacije.



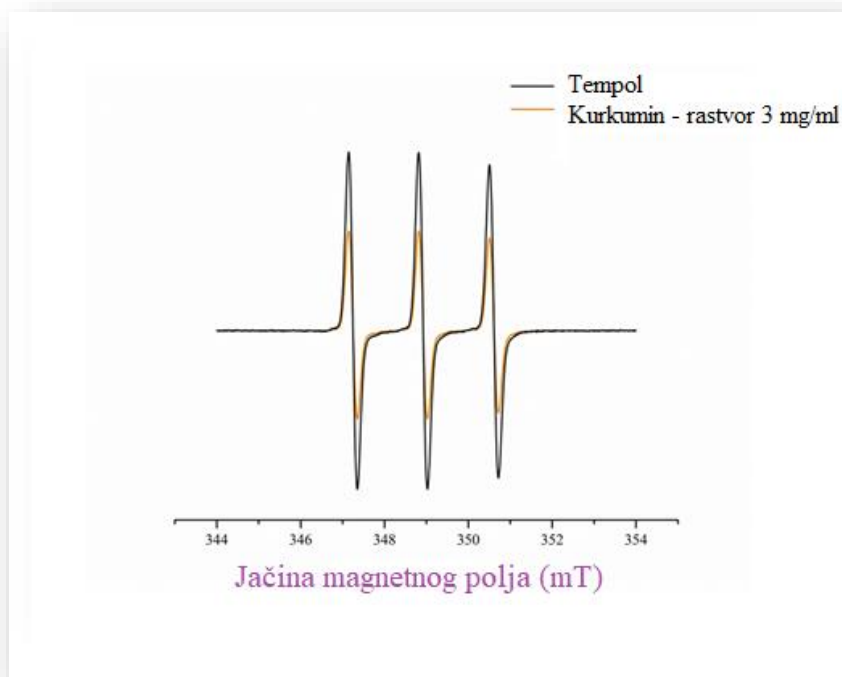
Slika 4.29. Izračunate FRAP vrednosti za ispitivane uzorke: kurkumin iz rastvora i iz nanoemulzija, i tokoferol iz rastvora;

ANOVA: * $p < 0,05$ u odnosu na tokoferol
($n=3$, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

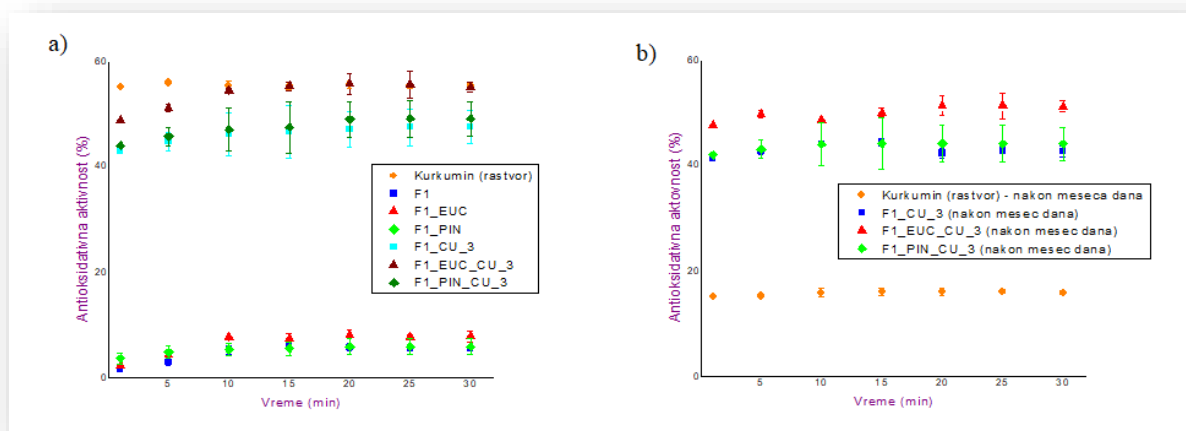
Kao pogodna alternativa prethodno opisanim spektrofotometrijskim metodama, predlaže se evaluacija antioksidativne aktivnosti primenom EPR spektroskopije, pošto omogućuje prevazilaženje potencijalnih problema koji se mogu desiti usled preklapanja apsorpcionih spektara uzorka sa primenjenim reagensom, uz dodatnu mogućnost praćenja kinetike ove reakcije (Valgimigli sar, 2018, Nawab i sar, 2017). Takođe, za razliku od prethodnih metoda, EPR spektroskopija omogućuje i detekciju inherentne antioksidativne aktivnosti nosača, koja potiče od fizičkih interakcija sa slobodnim radikalom, a ne kao posledica hemijskih promena. Takođe, mogućnost izvođenja u vodenoj sredini je značajna prednost za uzorke koji su tipa U/V nanoemulzije.

Upravo ovom tehnikom je potvrđena izrazita reaktivnost kurkumina u neutralizaciji slobodnog radikala, koja se dešava već u prvom minutu nakon kontakta sa TEMPOL-om (Slika 4.30). Praćenjem reakcije tokom 30 minuta, ukupan izračunati antioksidativni efekat kurkumina (u rastvoru) bio je oko 56 % (pri koncentraciji kurkumina 3 mg/ml). Antioksidativna aktivnost formulacija F1_CU_3, F1_EUC_CU_3 i F1_PIN_CU_3 bile su nešto niže (oko 47%, 55% i 49 %, respektivno), uz identičnu kinetiku reakcije sa rastvorom kurkumina – plato se dostigao već u prvim minutima reakcije (Slika 4.31a). Nešto niže vrednosti kod nanoemulzija sa kurkuminom su donekle i očekivane, s obzorom na to da je kurkumin u formulacijama solubilizovan, a ne u slobodnom obliku, kao u rastvoru. Međutim, važno je napomenuti da je uočen i određeni efekat placebo formulacija na neutralizaciju slobodnog radikala (Slika 4.31a) – oko 5,7% za F1, čak 8% za F1_EUC, i 5,9% za F1_PIN. Ovakve performanse placebo formulacija su verovatno posledica antioksidativne aktivnosti stabilizatora (lecitina pre svega) (Pan i sar, 2013), ali i poznatog antioksidativnog efekta monoterpena i etarskih ulja čiji su oni glavni konstituenti (Chabir i sar, 2011). Pan i sar. (2013) eksperimentalno su pokazali značajnu barijernu funkciju međupovršine nanoemulzija koje u svom sastavu imaju lecitin - u kontekstu zaštite solubilizovanih bioaktivnih jedinjenja od prodora oksidativnih vrsta. Ovakvi zaključci su potvrđeni i na ovom primeru, kada je merenje antioksidativnog potencijala ponovljeno nakon mesec dana. Antioksidativna aktivnost kurkumina u etanolnom rastvoru opala je za više od 70%, dok je aktivnost formulacija ostala skoro

nepromenjena (Slika 4.31b). Dakle, inkapsulacija kurkumina u dizajnirane nanoemulzije nedvosmisleno je doprinela njegovoj dugoročnoj hemijskoj stabilnosti.



Slika 4.30. EPR spektar Tempola – samostalno i u prisustvu rastvora kurkumina 3 mg/ml



Slika 4.31. Antioksidativna aktivnost kurkumina, nanoemulzija sa kurkuminom i odgovarajućih placebo formulacija a) inicijalno i b) nakon mesec dana čuvanja na sobnoj temperaturi, zaštićeno od direktnog izlaganja svetlosti (n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Prilikom odabira stabilizatora nanoemulzije, obično se pažnja obraća na sposobnosti fizičke stabilizacije, dok se na dodatne efekte, kao što je sposobnost sprečavanja oksidacionih procesa, obraća vrlo malo pažnje. To je posebno važno u slučaju kada inkapsulirani biomolekuli pokazuju izrazitu oksidativnu osetljivost. Do sada se pristup prevenciji neželjenih hemijskih promena mahom bazirao na dodavanju antioksidanasa u neku od faza nanoemulzije. Međutim, s obzirom na činjenicu da se većina procesa oksidacije dešava upravo na međupovršinskom sloju nanokapi (Lomova i sar, 2010; McClements i Dacker, 2000), prisustvo amfifila sa antioksidativnim

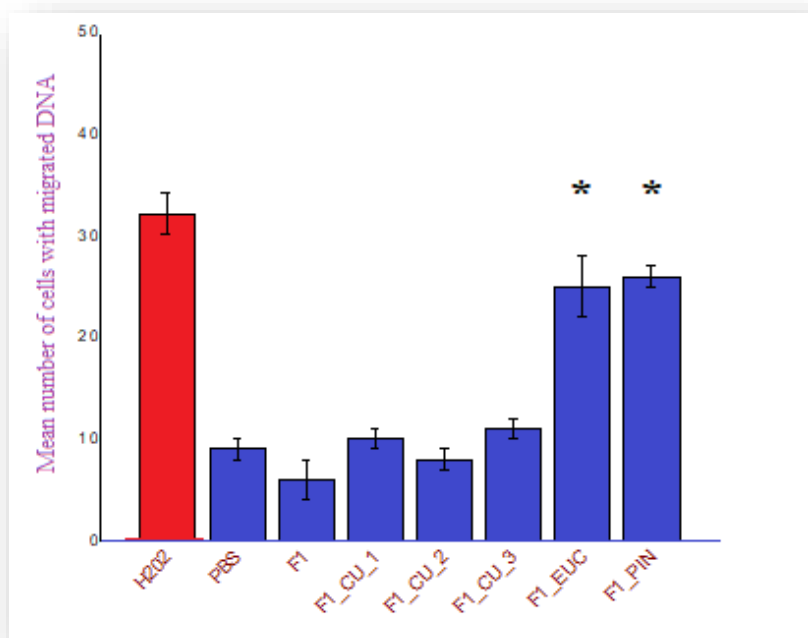
svojstvima ima mnogo veći praktični značaj u očuvanju hemijske stabilnosti solubilizovane aktivne molekule (Pan i sar, 2013). Uz to, sama formulacija se pojednostavljuje, jer nema potrebe za korišćenjem dodatnih ekscipijenasa/antioksidanasa.

4.3.3. *In vitro* procena bezbednosnog profila nanoemulzija i sposobnosti za ostvarivanje bioloških efekata

Primena *in vitro* metodologija u preliminarnoj proceni bezbednosti, a zatim i efikasnosti nanomaterijala predstavlja vrlo važan segment karakterizacije, čineći prekretnicu u daljem toku istraživanja. Kako bi se procenio bezbednosni profil izrađenih nanoemulzija, najpre je sproveden COMET test (u cilju procene genotoksičnosti), a nakon toga i procena citotoksičnosti kroz MTT test. U nastavku, primenom istih metodologija, odabrane formulacije podvrgnute su proceni efikasnosti u obezbeđivanju poznatih bioloških efekata kurkumina, za koje postoje određeni literaturni navodi (antigenotoksični i antikancerogeni efekti) (Sharam i sar, 2005).

4.3.3.1. Ispitivanje genotoksičnog efekta

Na osnovu rezultata COMET testa, poredeći efekat F1 formulacije sa PBS-om kao negativnom kontrolom, evidentno je da nanoemulzija nije izazvala oštećenja na DNK humanih ćelija periferne krvi. Slično, i formulacije sa kurkuminom pokazale su odsustvo genotoksičnog efekta, iako je stepen oštećenja DNK bio nešto izraženiji (ali ne statistički značajno) u poređenju sa placebo formulacijom i PBS-om (kao negativnom kontrolom) (Slika 4.32). Kako bi se uočilo eventualno postojanje koncentracionog zavisnog efekta, ispitane su nanoemulzije sa 3 mg/ml (F1_CU_3), 2 mg/ml (F1_CU_2) i 1 mg/ml kurkumina (F1_CU_1). Međutim, u svim slučajevima dobijeni su uporedivi rezultati, bez uočenog koncentraciono-zavisnog trenda. Iako određene studije navode da kurkumin može ispoljiti i cito- i genotoksične efekte na ćelije (Sebastia i sar, 2012), ovde to nije pokazano.



Slika 4.32. Rezultati COMET testa: ispitivanje genotoksičnosti razvijenih nanoemulzija
ANOVA: * $p < 0,05$ u odnosu na efekat vodonik-peroksida
($n=6$, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Sa druge strane, formulacije sa monoterpenima izazvale su značajna oštećenja genetskog materijala. Ovakav rezultat ne treba da bude iznenađujući, s obzirom na to da su geno- i citotoksični efekti monoterpena poznati, posebno kada se primenjuju u višim koncentracijama (Nikolić i sar, 2015). U ovoj eksperimentalnoj postavci, nanoemulzije su primenjene bez prethodnog razblaživanja, pri koncentraciji monoterpena od 5%, što je verovatno doprinelo ovakvom rezultatu. Takođe, potencijalni biološki efekti koji se pripisuju monoterpenima, npr. antitumorski ili antivirusni, upravo se zasnivaju na genotoksičnom ili antioksidativnom efektu, kao i na uticaju na brojne ćelijske signalne puteve (Sobral i sar, 2014; Chaudhary i sar, 2012; Horvathova i sar, 2006). Slično je i sa njihovim uticajem na povećanje dermalne raspoloživosti lekovitih supstanci, koji se, između ostalog, zasniva na promeni u strukturi i organizaciji lipoproteinskog matriksa *stratum corneum*-a, što često može biti u vezi sa neželjenim reakcijama na koži (Marwah i sar, 2016). Ta interakcija sa lipidima i proteinima nije selektivna, te se određeni stepen „toksičnosti“ ovih molekula može očekivati u *in vitro* testovima. Šta više, iako su različiti monoterpeni, odnosno etarska ulja koja ih sadrže u izrazito visokom procentu, česti sastojci kozmetičkih i proizvoda prehrambene industrije, i to najčešće kao mirisne note, poznat je njihov visok potencijal da izazovu reakcije senzitivizacije nakon kontakta sa kožom (EDQM, 2016). Ipak, imajući u vidu specifičnost izvođenja testa, uz direktnu izloženost ćelija uzorku, koja ne odgovara uobičajenim uslovima primene, ovakvi rezultati svakako ne treba da budu striktno uzeti kao dokaz generalne neprihvatljivosti formulacija sa monoterpenima.

Na osnovu dobijenih rezultata, radi jednostavnije procene efekta koji ispoljava kurkumin nakon primene u obliku nanoemulzije, za nastavak biološke karakterizacije odabrane su formulacije bez monoterpena.

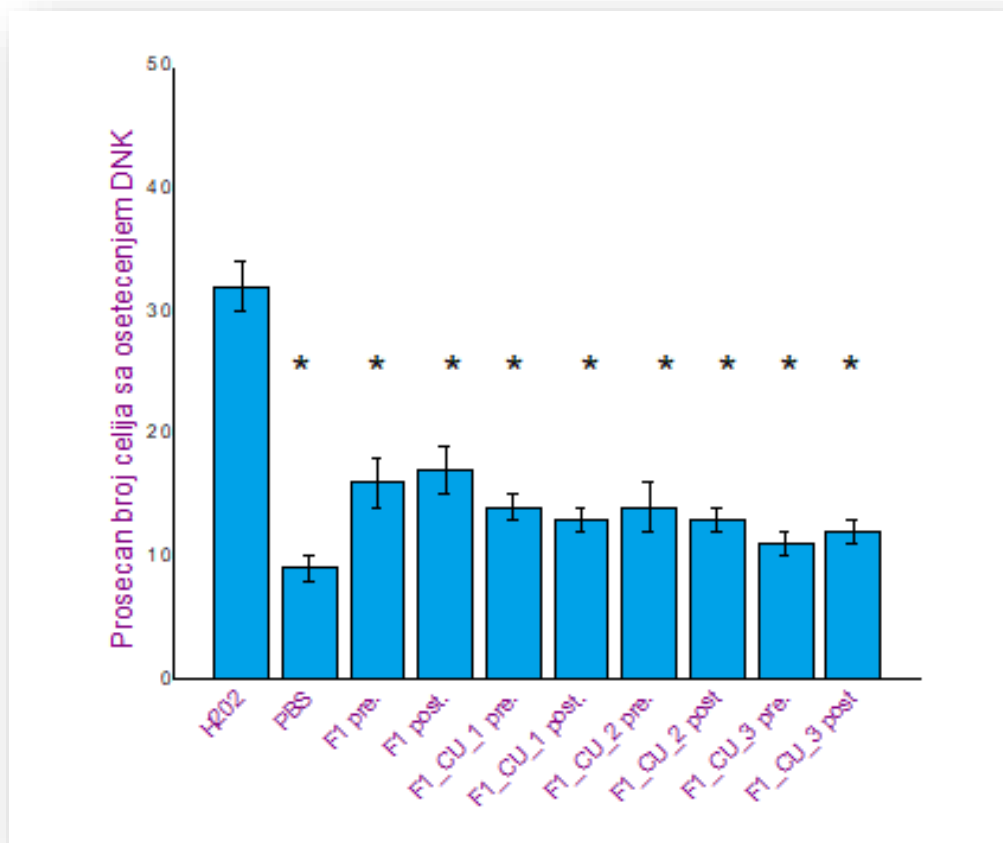
4.3.3.2. Ispitivaje antigenotoksičnog efekta

Procena antigenotoksičnog potencijala značajna je sa aspekta realnog uvida u mogućnosti kurkumina da ostvari neke od anticipiranih biološki važnih uloga, i to nakon primene u obliku nanoemulzije. Sa tim ciljem, ponovo je sproveden COMET test, ali sada u 2 različita protokola: protokol sa predtretmanom i protokol sa posttretmanom.

U protokolu sa predtretmanom, kako bi se procenio efekat kurkumina da prevenira oksidativna oštećenja DNK, humani leukociti iz periferne krvi su prvo tretirani odabranim formulacijama, a zatim, nakon ispiranja, podvrgnuti su delovanju vodonik-peroksida. U drugom protokolu, redosled je bio obrnut – leukociti su prvo tretirani oksidacionim agensom, nakon čega su podvrgnuti delovanju odabranih nanoemulzija, kako bi se procenila mogućnost kurkumina iz nanoemulzija da vrši oporavak oštećene DNK.

I u jednom i u drugom slučaju, pokazan je izraziti antigenotoksični efekat nanoemulzija sa kurkuminom (Slika 4.33). S obzirom na tip oštećenja, logično je zaključiti da je antigenotoksični efekat kurkumina u predtretmanu, barem jednim delom, u vezi sa njegovim već pokazanim potentnim antioksidativnim svojstvima. Sa druge strane, intenzivna reparacija DNK nakon već izvršenog oštećenja sugerise da neutralizacija slobodnih radikala nije jedini mehanizam za postizanje ovog biološki važnog efekta, već da je moguće pretpostaviti i da je došlo do preuzimanja kurkumina od strane ćelija (Banajeree i sar, 2008), uz stimulaciju enzima odgovornih za reparaciju DNK i antioksidativnu zaštitu u uslovima oksidativnog stresa. Slični rezultati već su pokazani i za neka druga polifenolna jedinjenja (Ghanema i sar, 2012). Šta više, u prilog ovoj tvrdnji idu i dokazi o tome da kurkumin povećava intracelularnu koncentraciju redukovane forme glutationa i učestvuje u regulaciji ekspresije gena odgovornih za adaptivni odgovor ćelija na stresne uslove spoljašnje sredine (Sharma i sar, 2005). I u ovom eksperimentu je ispitano eventualno postojanje koncentraciono-zavisnog efekta. Međutim, u opsegu 1-3 mg/ml nije primećena razlika u efektu.

Interesantno je prokomentarisati i da je i placebo formulacija pokazala određenu efikasnost, što se može dovestu u vezu sa već prethodno opisanim i uočenim antioksidativnim svojstvima lecitina (Pan i sar, 2013), ali i mogućnošću i da same nanostrukture (micele, nanoemulzione kapi) *per se* imaju sposobost „hvatanja“ prooksidativnih vrsta, sprečavajući ih da vrše dalja oštećenja (McClements i Dacker, 2000).



Slika 4.33. Rezultati COMET testa: ispitivanje antigenotoksičnog potencijala razvijenih nanoemulzija u pretretmanu i posttretmanu u odnosu na indukovana oštećenja vodonik-peroksidom na humanim ćelijama periferne krvi
ANOVA: * $p < 0,05$ u odnosu na efekat vodonik-peroksida (n=6, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

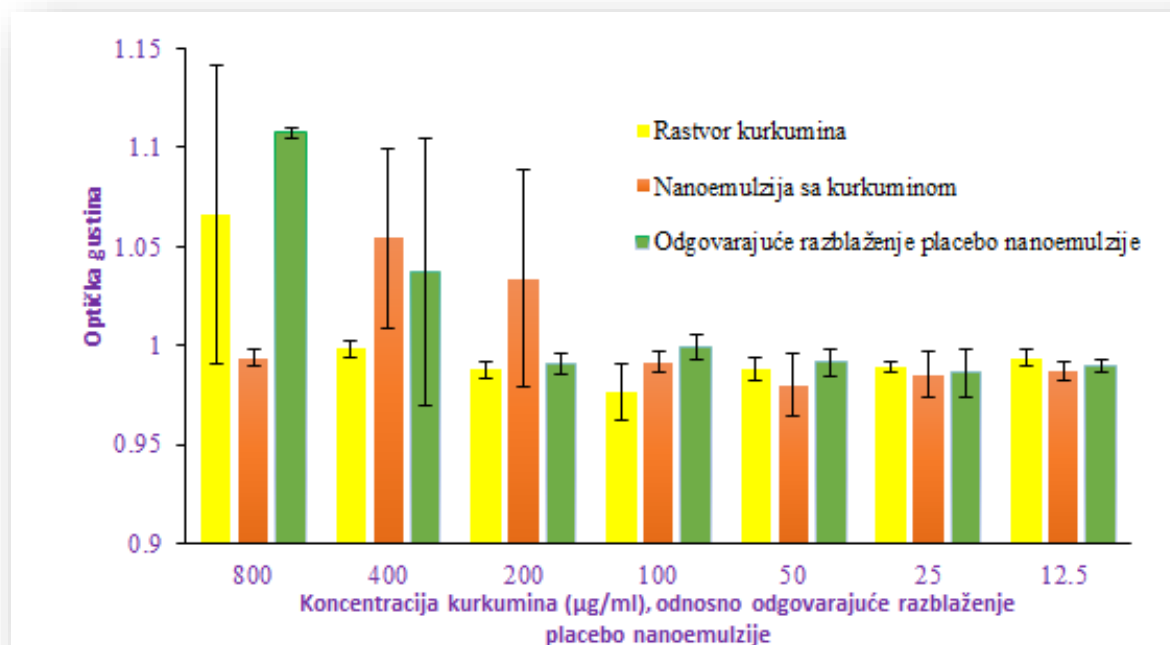
4.3.3.3. Ispitivanje citotoksičnosti

U nastavku ispitivanja bezbednosti, sprovedeni su testovi citotoksičnosti na HaCaT (normalnim humanim keratinocitima) i MRC-5 (normalnim fibroblastima pluća) ćelijskim linijama, inkubiranjem formulacija u različitim koncentracijama tokom 48 h. Ove ćelije odabrane su na osnovu anticipiranog puta primene (primena na koži), budući da su dominantne gradivne ćelije epidermisa, odnosno dermisa.

Praćenjem ćelijske vijabilnosti, pokazano je da na keratinocitima nije došlo do značajnog pada u broju metabolički aktivnih ćelija u koncentracionom opsegu od 800 do 12,5 $\mu\text{g/ml}$ kurkumina, odnosno odgovarajućih razblaženja nanoemulzije F1_CU_3 i placebo formulacije F1 (Slika 4.34), što je ukazalo na dobar bezbednosni profil. Praćenjem efekta na MRC-5 liniju uočene su značajnije

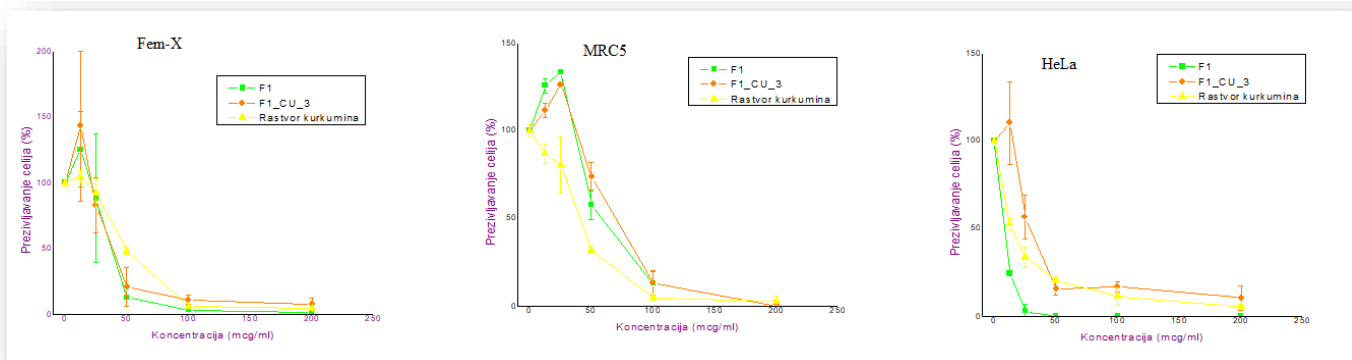
promene, pri čemu je kurkumin pokazao izraženiji efekat na ćelijsku vijabilnost u odnosu na F1_CU_3. Testni opseg je u ovom slučaju bio nešto uži – od 200 do 12.5 µg/ml, s obzirom na to da je značajan pad u ćelijskoj vijabilnosti zabeležen pri koncentracijama iznad 25 µg/ml kurkumina u rastvoru, odnosno iznad 50 µg/ml kurkumina u nanoemulziji i korespondentim razblaženjima placebo nanoemulzije (Slika 4.35).

Kod kontrolne grupe ćelija nije bilo promena u metaboličkoj aktivnosti, niti u morfološkim karakteristikama.



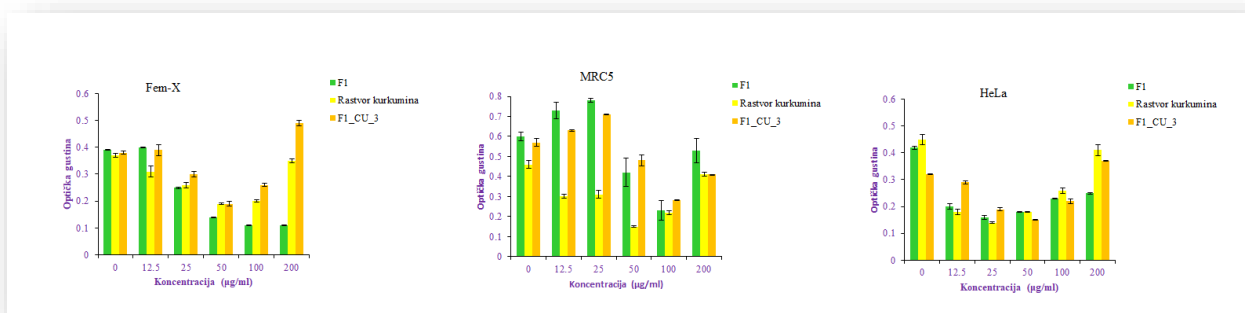
Slika 4.34. Optička gustuna normalnih humanih keratinocita tretiranih rastvorom kurkumina, nanoemulzijom F1_CU_3 i placebo nanoemulzijom F1 (n=6, srednja vrednost ±standardna devijacija)

Kako bi se procenio efekat kurkumina i nanoemulzija sa kurkuminom na maligne ćelije, te potencijalna selektivnost u citotoksičnom efektu, isti eksperiment je sproveden na Fem-X ćelijskoj liniji (maligni humani melanom), i HeLa liniji (humani cervikalni karcinom) – kao u literaturi često korišćenoj liniji za ispitivanje citotoksičnosti. I ovde je trend u promeni metaboličke aktivnosti bio očekivan, i zavisio je od primenjene koncentracije uzorka. HeLa linija je pokazala znatnu osetljivost na sva tri ispitivana uzorka, ali se bolja distinkcija u efektu mogla uočiti kod Fem-X linije (Slika 4.35).



Slika 4.35. Rezultati MTT testa – ćelijaska vijabilnost (MRC-5, HeLa i Fem-X ćelijske linije) u funkciji koncentracije kurkumina iz rastvora, kurkumina iz nanoemulzije, i korespondentnog razblaženja placebo nanoemulzije (n=6, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Ipak, na osnovu podataka o optičkoj gustini u funkciji koncentracije uzorka kod MRC-5, HeLa i Fem-X linija (Slika 4.36), važno je prokomentarisati da se kod uzoraka sa kurkuminom javlja trend povećanja optičke gustine pri najvišim koncentracijama, što je opisan fenomen u literaturi povezan sa spektroskopskim metodama, koji može remetiti tačnost dobijenih rezultata (Gioria i sar 2018).



Slika 4.36. Optička gustina ćelija u kulturi (MRC-5, Fem-X i HeLa) u funkciji koncentracije kurkumina u rastvoru, kurkumina iz nanoemulzije F1_CU_3 i korespondentnih razblaženja placebo nanoemulzije F1 (n=6, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Nije neobično da se u toku *in vitro* ispitivanja nanočestica/nanoemulzija primenom ovih standardnih tehnika može uočiti netipičan trend u vijabilnosti, odnosno optičkoj gustini u funkciji koncentracije. Npr. u literaturi su opisane nelogične promene u trendu preživljavanja (povećanje metaboličke aktivnosti) kod visokih koncentracija nanomaterijala, koja ne odgovara realnom stanju već je posledica interferencije analita u toku samog merenja. Takođe, nije redak slučaj da se pri vrlo niskim koncentracijama uzorka dobije neočekivan pad u metaboličkoj aktivnosti, koji je, u stvari, posledica prevelikog razblaženja nanomaterijala, koji dovodi do desorpcije stabilizatora i narušavanja strukture sistema, pa oslobođene komponente dovode do povećanog oštećenja ćelija, što nije inherentna karakteristika nanomaterijala sa očuvanom strukturom (Gioria i sar, 2018). Ovim se još jednom pokazuje kolika je neophodnost širokog opsega metoda karatkerizacije nanomaterijala, kojima bi se uočila i prevazišla ograničenja.

Kada se pogledaju IC₅₀ vrednosti (Tabela 4.14), vidi se da je solubilizacija kurkumina dovela do povećanja IC₅₀ vrednosti u odnosu na rastvor kurkumina kod HeLa i MRC-5 ćelijskih linija. Upravo

ovakav rezultat dobar je kontekst za komentarisanje dozimetrije prilikom *in vitro* procene nanomaterijala. Naime, zbog malih dimenzija i prisutnih stabilizatora, nanomaterijali nisu podložni efektima sile gravitacije. Kako ćelije obično adheriraju za dno bunarića, može se desiti da ne budu izložene istoj količini uzorka kao kada se ispituju rastvori određenih aktivnih supstanci, za koje se zna da se vrlo brzo raspodeljuju u u čitavoj zapremini medijuma u bunariću. Za razliku od rastvora, kod nanomaterijala se ne može tvrditi da je efektivna izloženost ćelija uzorku jednaka količini/koncentraciji uzorka koji je dodat, što može predstavljati poteškoću u ispitivanjima citotoksičnosti (Rischior i sar, 2016; Lison i sar, 2008). Interesantan nalaz koji govori u prilog tome jeste i rad Moore i sar (2019), koji je pokazao da način dodavanja uzorka, kada su u pitanju nanomaterijali, utiče na eksperimentalne rezultate. Ispitivani su „bolus“ dodavanje bez mešanja, bolus dodavanje praćeno mešanjem pomoću pipete, i na kraju dodatak već pripremljenog razblaženja u ćelijskom medijumu. Različiti rezultati upravo su dovedeni u vezu sa različitom mogućnošću da nanočestice dopru do monosloja čestica, odnosno u razlikama u efektivnoj izloženosti ćelija uzorku.

Table 4.14. IC_{50} vrednosti za kurkumin iz rastvora i kurkumin iz nanoemulzije F1_CU_3 na Fem-X, HeLa i MRC-5 ćelijskim linijama

Uzorak	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	Fem-X	HeLa	MRC-5
Kurkumin	70,73 \pm 30,89	15,03 \pm 0,61	71,17 \pm 22,60
F1_CU_3 * (izraženo na kurkumin)	37,87 \pm 7,09 [#]	22,89 \pm 2,09	67,72 \pm 0,48 [#]

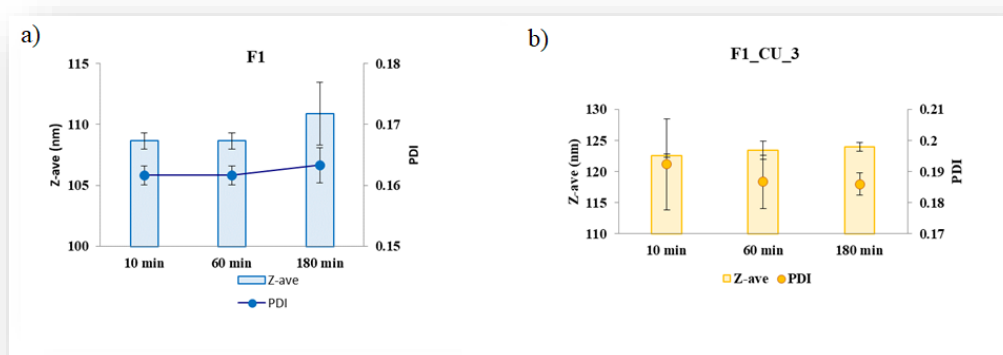
IC_{50} - koncentracija supstance koja dovodi do pada u ćelijskoj vijabilnosti od 50%
ANOVA: * $p < 0,05$ u poređenju sa ($n=6$, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Sa druge strane, nanomaterijali podležu i određenim interakcijama sa ćelijskim medijumom, pa, u zavisnosti od veličine, oblika i površinskih svojstava, mogu imati različite transportne mehanizme preko kojih stupaju u kontakt sa ćelijama (Cohen i sar, 2014; Cho i sar, 2011; Teeguarden i sar, 2007), a moguća je i adsorpcija biomolekula u ćelijskom medijumu (npr. proteina), što može izazvati promene u veličini i stabilnosti nanomaterijala, uz direktni uticaj na dostizanje ćelijskog monosloja i eventualno preuzimanje od strane ćelija (Cohen i sar, 2014). Kada je u pitanju dozimetrija nanomaterijala u *in vitro* testovima, poseban segment zauzima i određivanje opsega koncentracija u okviru testa. Na primer, pri višim koncentracijama uzorka može se desiti i mehaničko oštećenje ćelijskog monosloja, usled tzv. preopterećenja ćelija (engl. *cellular overload*), što se, oslanjajući se na uobičajenu praksu u radu sa rastvorima supstanci, može pogrešno protumačiti kao citotoksični efekat koji je inherentna karakteristika datog nanomaterijala (Wittmaack i sar, 2011).

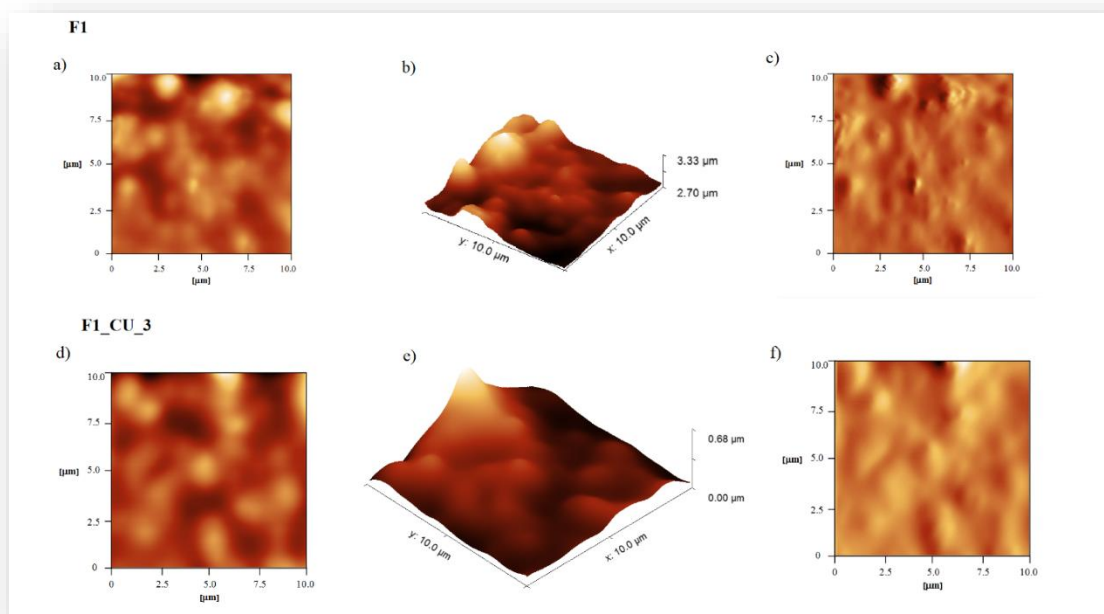
Kako bi se procenila efektivna izloženost ćelija nanočesticama u toku testa, Rischior i sar. (2016) su predložili praćenje koncentracije nanomaterijala, u nekoliko vremenskih tačaka, u supernatantu bunarića sa ćelijama u kojima je dodat uzorak, i poređenjem koncentracije nanomaterijala u supernatantu bunarića u kome je prisutan samo medijum, bez ćelija. Međutim, ovakav pristup bi se mogao primeniti samo na nanomaterijale koji pokazuju adsorpciju u UV/VIS delu spektra.

Oslanjajući se na navedene izazove *in vitro* testova nanomaterijala, kako bi se procenio efekat ćelijskog medijuma na veličinu, stvaranje protein korone ili agregaciju nanoemulzionih kapi i mogući uticaj na rezultate *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti, nanoemulzije su razblažene ćelijskim medijumom u koncentraciji koja odgovara razblaženju korišćenom tokom ispitivanja veličine primenom DLS-a (*in situ* tehnika). Zatim su, nakon 10, 60 i 180 min određeni Z-ave i PDI. Dodatno, disperzije nanoemulzionih kapi snimljene su i AFM-om (*ex situ* tehnika), sa ciljem da se uoče eventualno prisutni adsorbovani slojevi biomolekula ili specifične interakcije kapi.

Obrađivanjem dobijenih rezultata, a i prostim osvrtom na konkretne vrednosti, primenom DLS-a nisu detektovane promene u veličini i distribuciji veličina kapi u odnosu na vrednosti koje se dobijaju razblaživanjem u visokoprečišćenoj vodi (Slika 4.37). Međutim, kada se pogledaju mikrografije dobijene nakon AFM-a, uočava se izvesno povećanje veličine kapi (Slika 4.38). Vrlo verovatno, dati nalazi korespondiraju sa interakcijom kapi sa složenim ćelijskim medijumom uz stvaranje protein korone – sloja adsorbovanih proteina na površini nanoemulzionih kapi. Ovaj fenomen može uticati na kontakt nanomaterijala sa ćelijama, i to u oba smera – može olakšati kontakt i preuzimanje ili pak smanjiti intenzitet interakcija (Monopoli i sar, 2012; Walkey i sar, 2012; Lynch i sar, 2009). Pokazano je da komponente iz biološkog okruženja (dominantno proteini) utiču na prepoznavanje nanostrukture od strane ćelija. Drugim rečima, ishodi interakcije nanostrukture sa ćelijama, barem delimično, ovise o identitetu protein korone i vremenu zadržavanja na površini nanostrukture (Albanese i sar, 2014). Nepodudaranje nalaza dve primenjene tehnike možda je posledica upravo nesavršenosti *batch mode* DLS-a da primeti fine razlike u veličini. Ipak, za potvrdu ovakvih tvrdnji bilo bi neophodno sprovesti detaljniju procenu uzoraka, primenom metoda koje bi obezbedile tačno određivanje prisustva i vrste adsorbovanih proteina.



Slika 4.37. Praćenje hidrodinamičkog prečnika i distribucije veličina nanoemulzionih kapi nakon inkubacije nanoemulzije u hranljivom ćelijskom medijumu nakon 10, 60 i 180 minuta: a) placebo nanoemulzija – F1, b) nanoemulzija sa kurkuminom – F1_CU_3 (n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)



Slika 4.38. AFM mikrofotografije nanoemulzija nakon inkubiranja u hranjivom ćelijskom medijumu; placebo nanoemulzija – F1: a) 2D topografija, b) 3D topografija, c) “signal greške”; Nanoemulzija sa kurkuminom – F1_CU_3: d) 2D topografija, e) 3D topografija, f) “signal greške”

U svakom slučaju, eksperimenti na ćelijskim linijama pokazali su odličan bezbednosni profil nanoemulzija na humanim keratinocitima, koji su ujedno i glavni konstituenti epidermisa. Dodatno, značajan citotoksični efekat nanoemulzija sa kurkuminom prema maligno transformisanim ćelijskim linijama pokazao je efikasnost i određenu selektivnost u ispoljavanju citotoksičnih efekata.

4.3.3.4. Analiza ćelijskog ciklusa

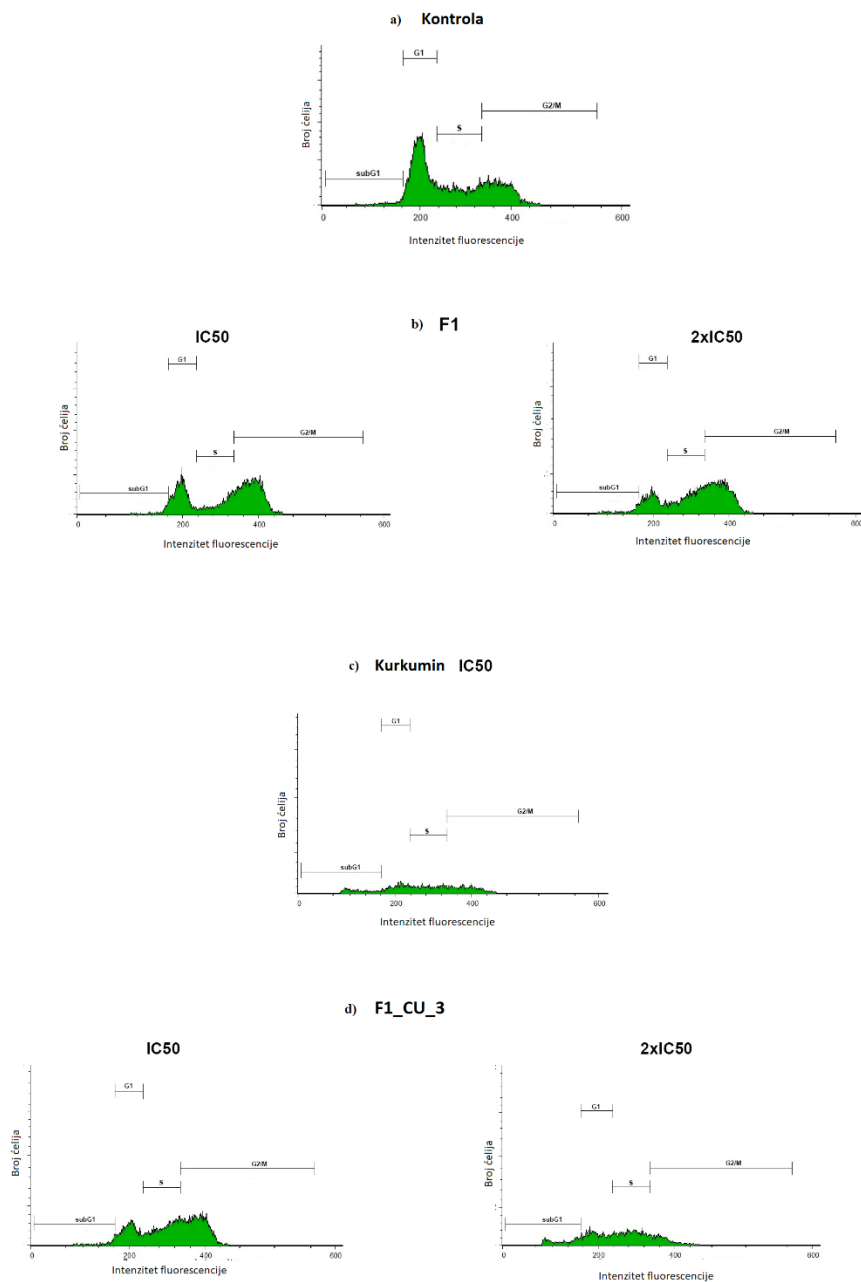
Kako bi bolje rasvetlio tačan mehanizam delovanja kurkumina i nanoemulzija sa kurkuminom, odnosno kako bi se odredilo u kojoj fazi ćelijskog ciklusa se dešava zastoj u metaboličkoj aktivnosti ćelija, sprovedena je analiza ćelijskog ciklusa na Fem-X i HeLa linijama. Kako bi se detektovao efekat primenjene koncentracije, eksperimenti su urađeni pri 2 koncentracije – IC_{50} i $2IC_{50}$.

Kod Fem-X ćelija tretiranih kurkuminom u nižoj koncentraciji (IC_{50}), zastoj u ćelijskom ciklusu primećen je u subG1, S i G2/M fazama, dok 24 h nakon primene $2IC_{50}$ većina ćelija više nije pokazivala metaboličku aktivnost. F1_CU_3 u koncentraciji IC_{50} dovela do akumulacije u S i G2/M fazama. Pri koncentraciji $2IC_{50}$ došlo je do višestrukog povećanja ćelija u SubG1 fazi u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 4.39).

HeLa ćelije tretirane obema koncentracijama kurkumina (u rastvoru) pokazale su akumulaciju ćelija u G2/M, dok se primenom nanoemulzije sa kurkuminom došlo do akumulacije ćelija u subG1 i G2/M fazi. Međutim, 24 h nakon primene $2 IC_{50}$ kurkumina u nanoemulzijama, većina ćelija nije bila živa (Slika 4.40).

Neovisno o koncentraciji, kada se uporedi sa kontrolnom grupom ćelija, uzorak F1 nije doveo do primetnih razlika u ćelijskom ciklusu kod HeLa ćelija, dok je kod Fem-X ćelija došlo do akumulacije u G2/M fazi (Slike 4.39 i 4.40).

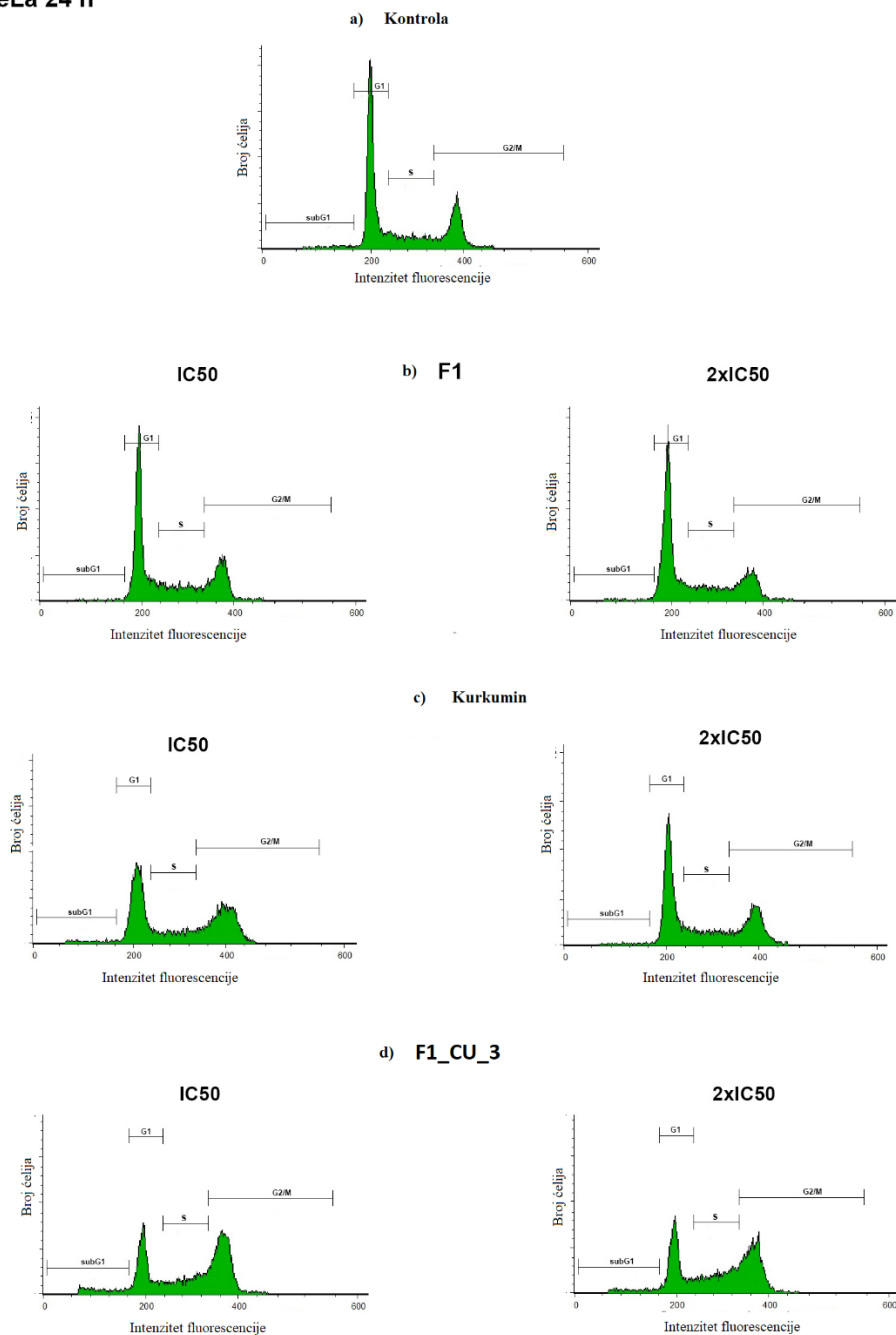
Fem-X 24 h



Slika 4.39. Rezultati analize ćelijskog ciklusa na Fem-X ćelijskoj liniji, 24 h nakon tretmana ispitivanim uzorcima: IC₅₀ koncentracija kurkumina iz rastvora (c); IC₅₀ i 2IC₅₀ koncentracije kurkumina iz nanoemulzije (d); korespondentna razblaženja placebo nanoemulzije F1 (b)

IC₅₀ – koncentracija kurkumina (odnosno korespondentno razblaženje placebo nanoemulzije) koja dovodi do smanjenja vijabilnosti ćelija za 50% (n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija).

HeLa 24 h



Slika 4.40. Rezultati analize ćelijskog ciklusa na HeLa ćelijskoj liniji, 24 h nakon tretmana ispitivanim uzorcima: IC₅₀ i 2IC₅₀ koncentracije kurkumina iz rastvora (c); IC₅₀ i 2IC₅₀ koncentracije kurkumina iz nanoemulzije (d); korespondentna razblaženja placebo nanoemulzije F1 (b)

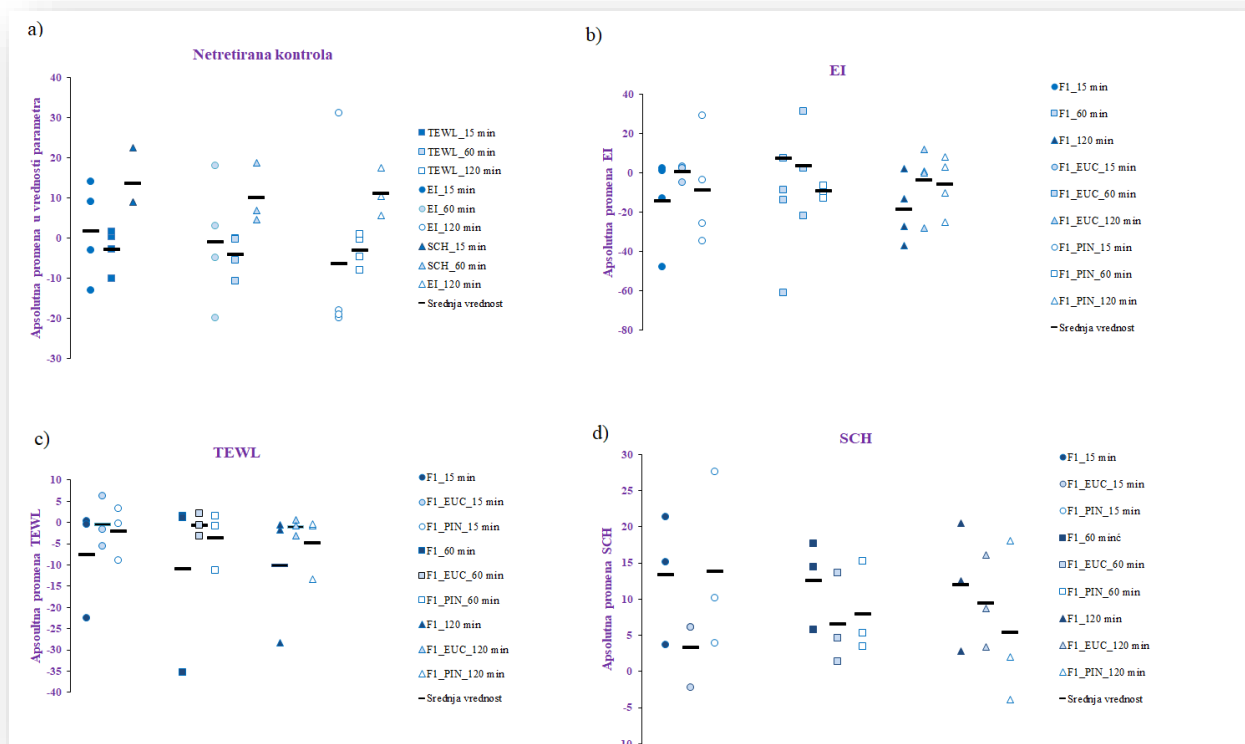
IC₅₀ – koncentracija kurkumina (odnosno korespondentno razblaženje placebo nanoemulzije) koja dovodi do smanjenja vijabilnosti ćelija za 50% (n=3, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Prikazani rezultati pokazuju da su ispitivani uzorci sa kurkuminom doveli do značajnih promena u broju ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa, ali nije se mogao uočiti zajednički šablon po kome se navedene promene dešavaju. Ovo nije jedinstven slučaj u literaturi (Antonijević-Nikolić i sar, 2019) i verovatno je u vezi sa činjenicom da kurkumin ostvaruje efekte na ćelije brojnim mehanizmima, interagujući sa velikim brojem signalnih puteva (Wang i sar, 2019). Ipak, može se izvesti zaključak da se zastoj u ćelijskom ciklusu najčešće javljao u G2/M i subG1 fazama, dok je koncentraciona zavisnost pokazana kod Fem-X ćelija. Zastoj u G2/M fazi ukazuje na uticaj uzorka na mitozu (Di Paola, 2002; Tyagi i sar, 2002), dok akumulacija u subG1 fazi može ukazivati na apoptozu (Li i sar, 2018). Međutim, mehanizme koji su odgovorni za dobijene efekte neophodno je detaljnije ispitati metodama molekularne biologije, kako bi se uočilo eventualno postojanje zajedničkog mehanizma, ili utvrdila različitost u efektima u zavisnosti od ćelijskog tipa i mikrookruženja.

4.3.4. *In vivo* studija bezbednosti placebo nanoemulzija

Lokalna primena dermalnih preparata povezana je sa promenama u barijernim svojstvima kože, što može izazvati i ispoljavanje određenih neželjenih reakcija, posebno ukoliko formulacije sadrže relativno visok udeo surfaktanata (kao što je slučaj sa nanoemulzijama izrađenim niskoenergetskim postupcima), i neke druge pojačivače penetracije. Nanoemulzije koje su predmet ovog istraživanja sadže 10% surfaktanata, pri čemu je dominantno prisutan polisorbitat 80 – nejonski surfaktant. Iako se za ovaj tip surfaktanata navodi da su relativno blagi za kožu, dodatno prisustvo monoterpena može izmeniti bezbednosni profil datih formulacija. Iz tog razloga, sprovedena je *in vivo* studija bezbednosti placebo formulacija (F1, F1_EUC, F1_PIN) primenom tehnika bioinženjeringa kože, u uslovima koji realnije oslikavaju potencijalnu primenu, kroz praćenje parametara *TEWL*, *EI* i *SCH*.

Dodatno, kako bi se procenila dinamika pojavljivanja eventualnih promena, nakon merenja bazalnih vrednosti, isti parametri su određeni 15, 60 i 120 minuta po nanošenju uzoraka. Takođe, kako bi se stekao potpuniji uvid, test mesta su posmatrana i vizuelno, a ispitanici su zamoljeni da prijave bilo kakve senzacije koje osećaju (npr. peckanje, zatezanje kože, i sl.), a koje se mogu dovesti u vezu sa primenom formulacija. Na Slici 4.41. prikazane su apsolutne promene u vrednostima ispitivanih parametara u svim vremenskim tačkama i za svakog ispitanika.



Slika 4.41. Rezultati *in vivo* procene bezbednosti placebo nanoemulzija F1, F1_EUC i F1_PIN kroz praćenje apsolutnih promena parametara EI, TEWL i SCH 15, 60 i 120 minuta po nanošenju formulacija, kao i praćenjem promena istih parametara na netretiranom mestu (netretirana kontrola): a) promena ispitivanih parametara na netretiranom mestu; b) promena EI; c) promena TEWL; d) promena SCH (n=4, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Kao primarni parametar koji može kvantifikovati promene kao što su crvenilo i iritacija, izmerene su vrednosti EI. Iako se kod pojedinih ispitanika mogao uočiti trend povećanja EI u odnosu na bazalnu vrednost, date promene se ne bi mogle okarakterisati kao značajne s obzirom na velike inter-, ali i intraindividualne varijabilnosti kod ovog tipa merenja. Dodatno, kod istih ispitanika, slične promene su uočene i na mestima koja su označena kao netretirana kontrola, što dodatno potvrđuje iznети zaključak. Takođe, pregledom tretiranih mesta nije se moglo ustanoviti postojanje crvenila, a anketiranjem ispitanika konstatovano je da formulacije nisu izazivale peckanje, niti bilo kakvu drugu vrstu neprijatnosti koja bi bila posledica neželjenih efekata na koži.

Na sam integritet kožne barijere bolje mogu ukazati vrednosti TEWL, koje su bile ujednačene tokom ispitivanja, i nisu uočena povećanja ni u odnosu na bazalne vrednosti, niti u odnosu na netretiranu kontrolu, ni za jedan uzorak, ni u jednoj vremenskoj tački. Ovakvi nalazi ukazuju na dobar bezbednosni profil, uprkos prisustvu monoterpena u nekim od ispitivanih uzoraka.

Promene u vrednostim SCH na test mestu formulacije F1 pratile su promene netretirane kontrole. Takođe, kod istog uzorka, porast u SCH bio je najveći u prvoj vremenskoj tački (15 minuta nakon nanošenja formulacije), što se može povezati i sa velikim udelom vode u formulaciji, ali bez statističke značajnosti u odnosu na naredne dve vremenske tačke. Promene SCH ni na test mestima za F1_EUC i F1_PIN nisu bile značajno promenjene u odnosu na bazalnu vrednost, iako je, upravo zbog isparljivosti monoterpena, i posledičnog potencijala da isušuje kožu, bilo sasvim opravdano očekivati i blagu dehidraciju kože na test mestima koja su tretirana uzorcima sa monoterpenima.

Zbog malog broja ispitanika, na osnovu prikazane studije se ne može izvesti potpun i definitivan zaključak. Ipak, preliminarni rezultati ukazali su na to da su placebo nanoemulzije pokazale dobar bezbednosni profil, bez ispoljavanja neželjenih reakcija na koži ispitanika.

4.4. Rezultati i diskusija četvrte faze eksperimentalnog rada

Kako je već napomenuto, cilj četvrte faze eksperimentalnog rada, jednim delom, posvećen je razvoju dermalnog adhezivnog sistema za isporuku aktivne supstance u kožu primenom jontoforeze. Kako bi se uspostavio adekvatan protokol za sprovođenje samog postupka jontoforeze, na početku su varirani uslovi u pogledu napona izvora struje, i dužine trajanja jontoforeze, odnosno primene kontinuiranog ili intermitentnog protoka električne energije kroz kožu. Nakon sprovedene *in vivo* studije, protokoli koji nisu ispoljili neželjene efekte na koži ispitanika, odabrani su za dalji rad.

U nastavku poslednje faze eksperimentalnog rada, sprovedena je *in vivo* procena penetracije kurkumina primenom *tape stripping* metode, i analiziran je i upoređen efekat hemijskih pojačivača penetracije (eukaliptola i pinena), odnosno jontoforeze kao fizičke metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti kurkumina.

4.4.1. Odabir eksperimentalnih uslova za sprovođenje jontoforeze: *in vivo* studija bezbednosti

Kako bi se stekao uvid u efekte jontoforeze na kožu i njena barijerna svojstva, u okviru *in vivo* stuje koja je uključila 8 ispitanika, ponovo su praćeni EI, TEWL i SCH. Kako bi se pokrio veći broj različitih protokola za primenu jontoforeze, ispitane su 3 kombinacije koje su uključile sledeće uslove:

- kontinuirani protok struje tokom 15 minuta – 15-0;
- diskontinuirani protok – 5 minuta protoka uz 1 minut pauze (3 ciklusa) – 5-1;
- diskontinuirani protok - 3 minuta protoka uz 2 minuta pauze (5 ciklusa) – 3-2.

Dakle, ukupno trajanje protoka struje kroz kožu je bilo isto za sve ispitivane protokole – 15 minuta.

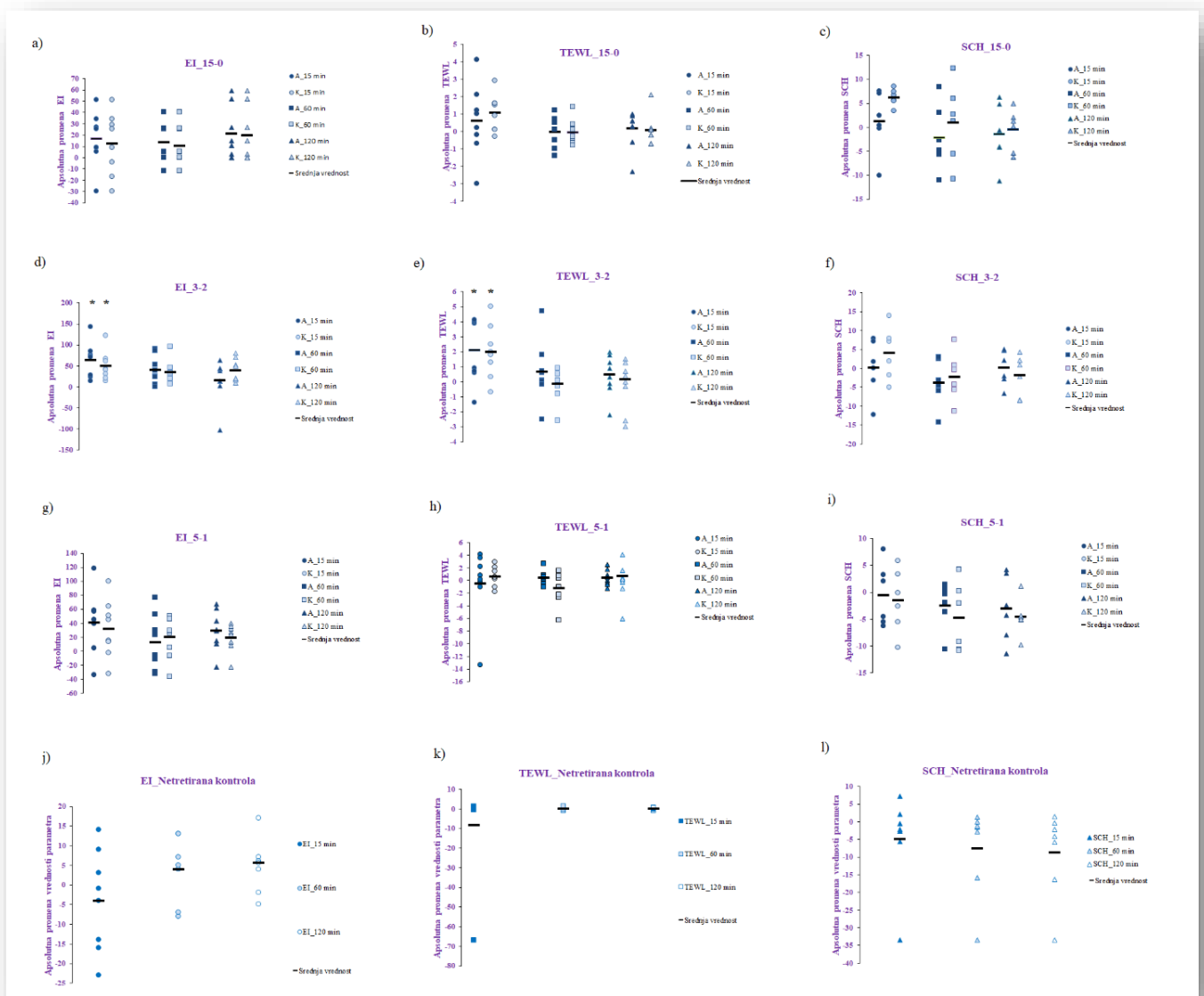
Kao izvor napajanja korišćene su spregnute baterije od 32 V i 9 V, odnosno samo baterija od 9 V. U prvom slučaju, kada su oba izvora napajanja korišćena u sprezi, odmah po uključivanju protoka struje, osetilo bi se izraženo peckanje i toplota na mestu na kome su pričvršćene elektrode na koži, koji bi doveli do pojave crvenila. Zbog neprijatnog propratnog osećaja, i potencijalnog oštećenja kože koje se moglo javiti kod određenih ispitanika, u eksperimentalnoj postavci je nadalje korišćen jedino izvor napajanja od 9 V.

Merenje parametara EI, TEWL i SCH sprovedeno je na mestima koja odgovaraju i katodi i anodi, kao i na mestu označenom kao netretirana kontrola.

Kod protokola 3-2, nakon merenja EI i poređenjem sa netretiranom kontrolom, vrednosti su se statistički značajno promenile na mestu katode i na mestu anode, i to u prvoj vremenskoj tački, nakon čega su se vrednosti ovog parametra vraćale na bazalne (Slika 4.42d). Tada se i vizuelno moglo uočiti blago crvenilo koje je prolazilo nakon 15-ak minuta. Takođe, sami ispitanicu su navodili da bi kod ovog diskontinuiranog protoka struje osetili nešto što su opisivali kao „blago i povremeno golicanje“, koje nisu okarakterisali kao neprijatno. Kako bi se bolje uočile promene u barijernim svojstvima kože, analizirane su vrednosti TEWL. Ova merenja su ukazala na značajne promene u prvoj vremenskoj tački - i kod mesta za katodu i kod mesta za anodu (Slika 4.42e). Vrednosti SCH nisu pokazale značajne promene tokom ispitivanja (Slika 4.42f).

Kod protokola 5-1 pokazalo se da je jedina značajna promena bila porast vrednosti EI na mestu anode, u odnosu na netretiranu kontrolu, i to samo u prvoj vremenskoj tački (Slika 4.42g), ali to nije bilo praćeno vidljivim povećanjem crvenila. Svi ostali parametri bili su ujednačeni tokom eksperimenta, bez značajnih promena u odnosu na netretiranu kontrolu (slike 4.42h i 4.42i).

Protokol kod koga je protok struje bio kontinuiran, nije pokazao značajne promene ispitivanih parametara ni na jednom test mestu, ni u jednoj vremenskoj tački (slike 4.42a, 4.42b i 4.42c).



Slika 4.42. Rezultati *in vivo* procene bezbednosti predloženih protokola jontoforeze (15-0; 3-2 i 5-1) kroz praćenje apsolutnih promena parametara EI, TEWL i SCH 15, 60 i 120 minuta po završetku jontoforeze, kao i praćenjem promena istih parametara na netretiranom mestu (netretirana kontrola); protokol 15-0: a) apsolutne promene EI, b) apsolutne promene TEWL, c) apsolutne promene SCH; protokol 3-2: d) apsolutne promene EI, e) apsolutne promene TEWL, f) apsolutne promene SCH; protokol 5-1: g) apsolutne promene EI, h) apsolutne promene TEWL, i) apsolutne promene SCH; netretirana kontrola: j) apsolutne promene EI, k) apsolutne promene TEWL, l) apsolutne promene SCH (n=8, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Sveukupnom analizom, može se zaključiti da ispitivani protokoli jontoforeze ne izazivaju neželjene promene na koži. Iako su kod protokola 3-2 i 5-1 uočena povećanja u vrednostima EI i/ili TEWL u

prvoj vremenskoj tački, te promene nisu bile takvog karaktera koji bi podrazumevao bezbednosni rizik po ispitanike. Takođe, određeni stepen povećanja bio je i očekivan, s obzirom na ulogu jontoforeze u isporuci aktivnih supstanci u kožu. Iz navedenih razloga, sva tri ispitivana protokola su uključena u dalja ispitivanja u domenu procenjene njihove efikasnosti u dermalnoj isporuci kurkumina.

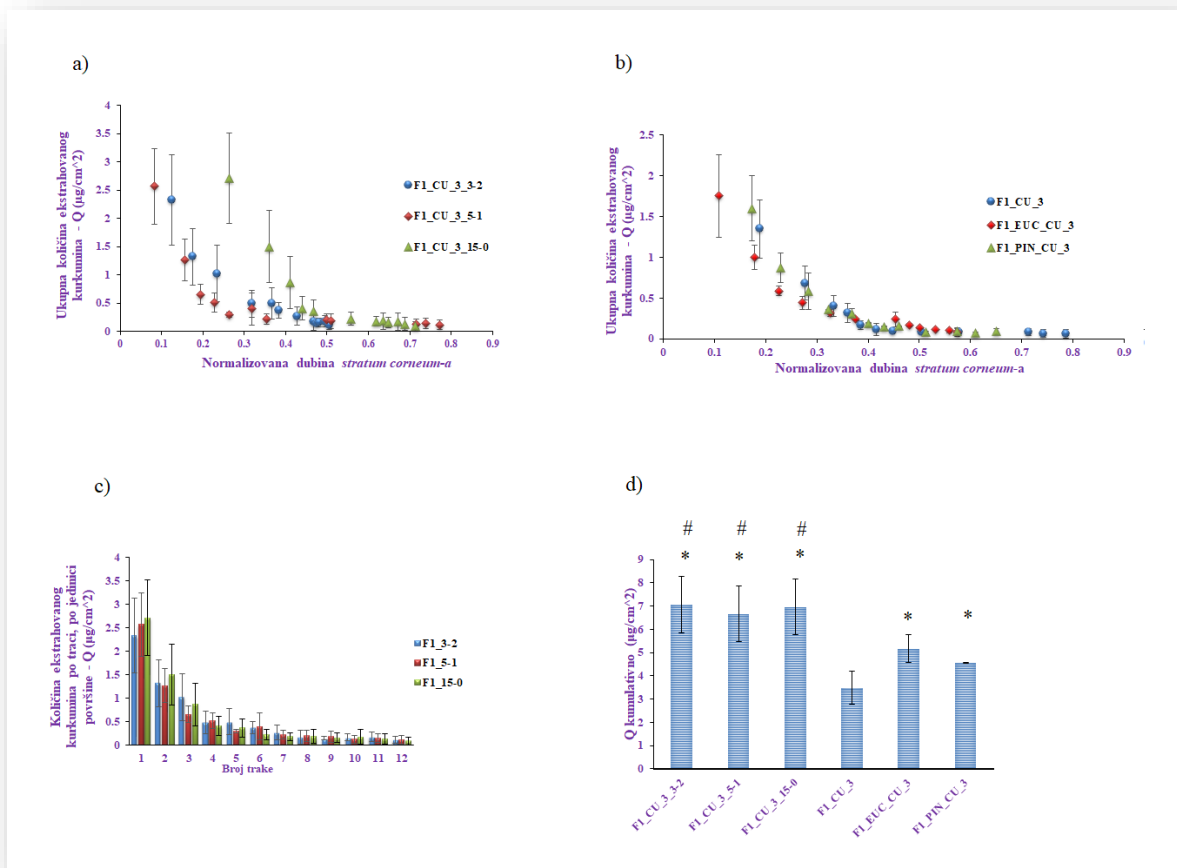
4.4.2. *In vivo* procena penetracije kurkumina kroz kožu nakon primene nanoemulzija: poređenje efekata hemijskih pojačivača penetracije i jontoforeze

Kako bi se procenila penetracija kurkumina kroz kožu nakon primene nanoemulzija, odnosno predloženih protokola jontoforeze, sprovedena je dermatofamakokinetička analiza primenom *tape stripping* tehnike, u *in vivo* studiji koja je uključila 4 ispitanika. Kod procene efekta jontoforeze, primenjena je samo nanoemulzija F1_CU_3 (bez hemijskih pojačivača penetracije). Na ovaj način omogućeno je da se proceni efekat nanoemulzija između sebe (F1_CU_3, F1_EUC_CU_3 i F1_PIN_CU_3), tj. efekat hemijskih pojačivača penetracije, te efekat jontoforeze tako što će se pratiti penetracija kurkumina iz formulacije F1_CU_3 samostalno, a zatim i uz primenu sva tri protokola jontoforeze. Dodatno, ovakav eksperimentalni protokol ukazaće i na postojanje razlika u penetraciji kurkumina primenom jontoforeze kada se koristi kontinuirani i diskontinuirani protok električne energije.

4.4.2.1. Određivanje penetracionog profila kurkumina iz nanoemulzije uz primenu jontoforeze

Kurkumin ima 3 pK_a vrednosti: $pK_{a1}=7,8$, $pK_{a2}=8,5$ i $pK_{a3}=9,0$ (Tønnesen i sar, 2001), koje ukazuju na to da je pri pH vrednostima 3-7 nenaelektrisan. Dodatno, kako je pH formulacija veća od pI kože, može se zaključiti da bi, prilikom primene jontoforeze, glavni mehanizam odgovoran za transport kurkumina kroz kožu bila elektroosmoza. Dakle, u predloženom eksperimentalnom protokolu, nanoemulzija sa kurkuminom nanosena je na mesto koje odgovara anodi – anoda je bila „aktivna elektroda“. Ipak, zbog lipofilnosti kurkumina, očekuje se i određeni doprinos pasivne difuzije u njegovom dopremanju u kožu.

Na slici 4.43a prikazan je penetracioni profil kurkumina iz nanoemulzije F1_CU_3, nakon primene sva tri predložena protokola jontoforeze. U sva tri slučaja, jontoforeza je dovela do skoro dvostrukog povećanja količine penetrirane supstance po jedinici površine u poređenju sa F1_CU_3 bez primene jontoforeze. Međutim, uprkos literaturnim navodima da diskontinuirani protok može biti efikasniji u dermalnoj isporuci u poređenju sa kontinuiranim (Gratieri i Kalia, 2017), ovde to nije pokazano. Naime, za sva tri testirana načina ekspozicije električnoj energiji, nisu uočene statistički značajne promene u ukupnoj količini kurkumina koji je penetrirao kroz kožu ($Q_{3-2}=7,04\pm 3,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $Q_{5-1}=6,66\pm 2,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $Q_{15-0}=6,96\pm 3,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $Q_{\text{bez jontoforeze, uz skidanje adhezivne trake}}=3,49\pm 0,70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). U prilog tome govori i količina ekstrahovanog kurkumina po jedinici površine za svaku primenjenu traku (Slika 4.43c). Dodatno, na osnovu rezultata studije iritacije jontoforeze, mogla se očekivati blaga prednost diskontinuiranog protokola (pre svega 3-2), s obzirom na povećane vrednosti EI i TEWL koje su dobijene u prvim vremenskim tačkama.



Slika 4.43. Penetracioni profili kurkumina određeni u *in vivo* studiji primenom *tape stripping* metode: a) penetracioni profilili dobijeni nakon primene nanoemulzije F1_CU_3 uz jontoforezu (poređenje 3 protokola jontoforeze); b) penetracioni profili kurkumina iz nanomulzija (procena uticaja hemijskih pojačivača penetracije uz modifikaciju protokola), c) ukupna količina kurkumina ekstrahovana sa svake trake, po jedinici površine kod protokola sa jontoforezom; d) kumulativne količine ekstrahovanog kurkumina – jontoforeza vs. hemijski pojačivači penetracije (uz modifikaciju protokola) ANOVA: * $p < 0,05$ u poređenju sa F1_CU_3; # $p < 0,05$ u poređenju sa svim F1_CU_3 i formulacijama sa hemijskim pojačivačima penetracije (n=4, srednja vrednost \pm standardna devijacija)

Ovde treba napomenuti da sam adhezivni nosač za elektrodu uklanja određeni deo *stratum corneum*-a nakon skidanja elektrode sa kože, a time i jedan deo kurkumina sa površine. Kako bi se na adekvatan način uporedile količine aktivne supstance koja je penetrirala kroz kožu uz primenu jontoforeze, sa količinom koja je penetrirala bez primene ove metode, urađeno je prilagođavanje protokola. *Tape stripping* na mestu gde je primenjena samo nanoemulzija sa kurkuminom (bez jontoforeze) urađen tako što je na tom test mestu adhezivna traka sa elektrodom ipak postavljena, a zatim uklonjena nakon 15 minuta. Na taj način je protokol prilagođen, tako da se u svakom od ispitivanih slučajeva uklonila ista količina kurkumina (odnosno površinskih slojeva *stratum corneum*-a), što je obezbedilo adekvatno poređenje rezultata.

Navedeni izostanak razlike u efikasnosti isporuke jontoforeze kontinuiranog u odnosu na diskontinuirani protokol može biti posledica i relativno malog broja ispitanika u studiji, ali i toga da je, uprkos postojanju diskontinuiteta u protoku struje, efektivno trajanje protoka i pauze bilo istog

reda veličina. U nekim budućim eksperimentima, korisno bi bilo ispitati i efekte koji se dobijaju pri mnogo kraćim vremenskim intervalima protoka i pauze.

4.4.2.2. Određivanje penetracionog profila kurkumina iz nanoemulzija – procena efekata hemijskih pojačivača penetracije

Nasuprot nalazima koji su dobijeni tokom ispitivanja jontoforeze, poređenjem rezultata nakon primene nanoemulzija (bez jontoforeze), uočena je značajna razlika u ukupnoj količini kurkumina koji je penetrirao kroz površinske slojeve kože. Kao što se može videti sa slike penetracionog profila kurkumina (slike 4.44a i 4.44b), najuspešnija formulacija bila je F1_EUC_CU_3, zatim F1_CU_3, dok je najmanje uspešna bila formulacija F1_PIN_3 (Tabela 4.15).

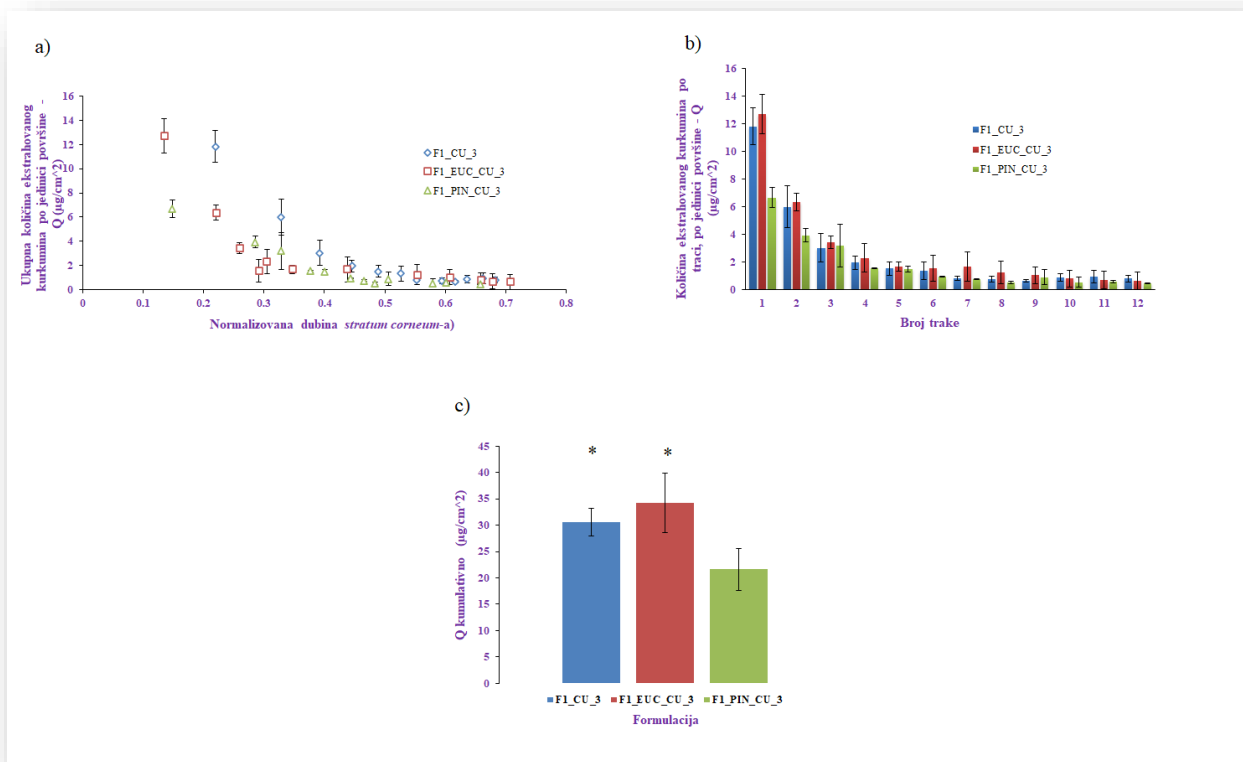
Tabela 4.15. Kumulativna količina kurkumina koja je penetrirala kroz površinske slojeve kože po jedinici površine iz ispitivanih nanoemulzija

Formulacija	Ukupna količina kurkumina koja je penetrirala kroz <i>stratum corneum</i> po jedinici površine ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
F1_CU_3	30,62±2,62
F1_EUC_CU_3	34,24±5,68 [#]
F1_PIN_CU_3*	21,61±4,01*

ANOVA: * $p < 0,05$ u poređenju sa F1_CU_3 i F1_EUC_CU_3; [#] $p < 0,05$ u poređenju sa F1_CU_3 (n=4, srednja vrednost ± standardna devijacija)

Ovakav nalaz nije u potpunosti očekivan, s obzirom na činjenicu da se formulacija sa pinenom pokazala daleko manje uspešnom u dermalnoj isporuci kurkumina u poređenju sa nanoemulzijom koja nije sadržala monoterpene. Veća ukupna količina penetriranog kurkumina iz formulacije F1_EUC_CU_3 i F1_CU_3 u odnosu na F1_PIN_CU_3 mogla bi se objasniti razlikama u rastvorljivosti kurkumina u dva primenjena monoterpena i u MCT. Naime, određena rastvorljivost u eukaliptolu bila je oko 4,18 mg/ml, u MCT 1,67 mg/ml, dok je u pinenu višestruko manja – oko 0,21 mg/ml. U slučaju F1_EUC_CU_3, takve razlike mogle su dovesti do veće termodinamičke aktivnosti kurkumina nakon isparavanja monoterpena sa kože, uz posledično bolju penetraciju kroz *stratum corneum*. Sa druge strane, bolja rastvorljivost u MCT u odnosu na pinen mogla je dovesti do značajnije interakcije aktivne supstance sa endogenim lipidima, i na taj način doprineti penetraciji, koja se nije mogla ostvariti nakon primene F1_PIN_CU_3.

Ovakvi rezultati podvlače značaj procene interakcija na molekularnom nivou, na konkretnom uzorku, ukazujući na nedovoljnu pouzdanost opštih zaključaka. Dakle, iako bi se očekivalo da formulacija sa monoterpenom uvek bude superiorna u kontekstu dermalne raspoloživosti u odnosu na onu koja ne sadrži penetracione inhezore, pokazalo se da su fizičko-hemijska svojstva aktivne supstance i njena rastvorljivost u odabranim komponentama masne faze nanoemulzije presudna za ostvarivanje ispitivanih efekata.



Slika 4.44. Penetracioni profili kurkumina određeni u *in vivo* studiji primenom *tape stripping* metode: a) penetracioni profili kurkumina iz nanoemulzija (procena uticaja hemijskih pojačivača penetracije), b) ukupna količina kurkumina ekstrahovana sa svake trake, po jedinici površine nakon primene nanoemulzija sa kurkuminom; c) kumulativne količine ekstrahovanog kurkumina – poređenje efikasnosti nanoemulzija ANOVA: * $p < 0,05$ u poređenju sa F1_CU_3 (n=4, srednja vrednost \pm standardna devijacija).

4.4.2.3. Hemijski pojačivači penetracije vs. fizičke metode za poboljšanje dermalne raspoloživosti kurkumina: poređenje rezultata

Konačno, ako se uporede ukupne količine kurkumina koji je penetrirao kroz stratum corneum po jedinici površine, može se videti da je jontoforeza bila statistički značajno uspešnija u isporuci kurkumina u odnosu na formulacije sa hemijskim pojačivačima penetracije (Slika 4.43d). I ovde je, sa ciljem adekvatnog poređenja, sprovedena mala izmena u protokolu uz primenu adhezivnog nosača sa elektrodom i na onim mestima gde nije primenjena električna energija.

Ovakvi nalazi su vrlo značajni imajući u vidu da je ovde kurkumin poslužio kao model supstance, iako ne predstavlja molekulu koja je po svojim fizičko-hemijskim karakteristikama prvi izbor u pogledu primene jontoforeze u dermalnoj isporuci. Takođe, određeni nedostatak ove studije ogleda se u tome što je jontoforeza primenjena relativno kratko vreme, svega 15 minuta. Bilo bi logično očekivati da bi se u toku dužeg vremena ekspozicije mogle očekivati i veće količine supstance u dubljim slojevima kože. Međutim, s obzirom na raspoloživu metodologiju, u slučaju penetracije u dublje slojeve, primenom *tape stripping* tehnike date količine se ne bi mogle adekvatno kvantifikovati. Takođe, prikazane apsolutne vrednosti ukupne količine kurkumina koji je penetrirao kroz površinske slojeve kože u eksperimentu sa jontoforezom manje su od realnih, s obzirom na već napomenuti nedostatak koji se ogleda u uklanjanju značajnog dela korneocita putem adhezivnog nosača za elektrode. Ipak, i ovakav eksperimentalni pristup obezbedio je uvid u efekte i trend koji

se može očekivati nakon primene električne energije u okviru stimulisane dermalne isporuke aktivne supstance.

5. ZAKLJUČAK

5.1. Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

- Nakon selekcije ekspcipijenas, primenom spontanoemulgujućeg postupka kao niskoenergetske metode izrade, pripremljene su nanoemulzije sa trigliceridima srednje dužine lanca kao masnom fazom, smešom polisorbata 80 i lecitina soje (u odnosu 9:1) kao stabilizatorima i visokoprečišćenom vodom kao vodenom fazom. Kroz set eksperimenata, rasvetljeni su neki od fundamentalnih aspekata odgovornih za nastanak nanoemulzija kroz niskoenergetski postupak. Pokazano je da, pri odabranim ekspcipijensima i njihovim konkretnim udelima, na samom kontaktu masne i vodene faze, usled infiltracije smeše masne faze i stabilizatora u vodenu fazu, dolazi do stvaranja visokoviskozne lamelarne tečnokristalne strukture, koja se daljim mešanjem transformiše i „otkida“, dajući dispergovane kapljice ulja stabilisane slojem emulgatora.
- Praćenjem faznog ponašanja u sistemu sa 10% *m/m* masne faze, pokazano je da nanoemulzije izrađene spontanoemulgujućim postupkom mogu nastati u uskom opsegu masenih odnosa smeše surfaktanata i masne faze (*surfactant-to-oil-ratio* – SOR) - od 0,7 do 1,5. Tako izrađene nanoemulzije imale su prosečan hidrodinamički dijametar kapi u opsegu od 105 nm do 167 nm, uz relativno usku distribuciju veličina kapi (<0,2). Apsolutna vrednost zeta potencijala bila je iznad 30 mV (ukazujući na dobru dugoročnu stabilnost), a pH vrednost u opsegu od 4,35 do 4,86. Pokazano je da veličina kapi opada sa porastom SOR, pri čemu, kada je $SOR \geq 1$, uz smanjenje veličina, dolazi i do značajnog povećanja distribucije veličina, usled stvaranja većeg broja frakcija kapi malih dimenzija.
- Smanjenje veličina kapi sa porastom SOR značajnije je do momenta dostizanja SOR 1. Nakon toga, usled zasićenja međupovršinskog sloja i specifičnog molekularnog uređenja stabilizatora na zakrivljenim nanopovršinama, daljim povećanjem SOR ne dobija se podjednako značajan efekat na smanjenje veličine kapi. Dobijeni rezultati idu u prilog najsavremenijim analizama međupovršinskih slojeva nanoemulzija sa jonskim stabilizatorima, koji ukazuju na razlike u molekularnom uređenju amfifila na zakrivljenim nanopovršinama u odnosu na planarne sisteme. Dodatno, ovim rezultatima, zaključci o uređenju međupovršinskog sloja nanoemulzija prošireni su i na sisteme koji sadrže kombinaciju jonskih i nejonskih surfaktanata.
- Uzimajući u obzir rezultate fizičko-hemijskih ispitivanja i procenjenu kratkoročnu fizičku stabilnost nanoemulzija, za solubilizaciju kurkumina odabrana je formulacija sa SOR1 i 10% *m/m* masne faze (F1). Veličina, oblik i morfologija dispergovanih kapi analizirani su primenom AFM-a, i vizuelizovane su sferoidne kapljice neravnih površina, dimenzija koje su u skladu sa vrednostima procenjenim kroz DLS. Ovakav izgled dispergovane faze upravo ide u prilog teoriji da se tokom nanoemulzifikacije kroz spontanoemulgujući postupak dešava „otkidanje“ porcija masne faze vođeno molekulima amfifila. S obzirom na tip odabranih stabilizatora i formiranje tečnih kristala na kontaktnoj površini, može se pretpostaviti da je međupovršinski sloj rigidan, što je u saglasju sa nalazima da dispergovane kapljice nemaju oblik idealne sfere.
- Maksimalan kapacitet solubilizacije kurkumina u formulaciji F1 je 3 mg/ml. Primenom termalne analize nisu uočeni pikovi koji bi poticali od nesolubilizovanih čestica aktivne supstance, što je podržano i polarizacionom mikroskopijom. Dodatak kurkumina doveo je do povećanja veličine kapi (porast Z-ave sa 101,13 nm na 127,47 nm) i pH vrednosti (sa 4,86 na 5,8), i dalje ostajući u domenu pH vrednosti koje pogoduju hemijskoj stabilnosti kurkumina. Sa solubilizacijom kurkumina nije bilo promena u viskozitetu formulacija. Primenom AFM-a i ovde je utvrđeno postojanje sferoidnih kapljica, ali, slično kao i kod placebo nanoemulzija, uočen je znatan udeo malih kapi, dimenzija ispod 100 nm, što se nije bilo moguće otkriti primenom samo DLS tehnike i oslanjajući se na zaključke nakon *batch*

- mode* DLS analize. Na ovaj način istaknuta je važnost primene komplementarnih tehnika u analizi fizičko-hemijskih svojstava formulacije u cilju dobijanja pouzdanih rezultata.
- Praćenjem fluidnosti međupovršinskog sloja primenom EPR spektroskopije, potvrđeno je da je međupovršina izrađenih nanoemulzija vrlo rigidna, ali da se razlikuju dva regiona – tzv. region „bržeg kretanja“ ($\tau_{R1} = 4,9$ ns, dominantno prisutni molekuli polisorbata) i tzv. region „sporijeg kretanja“ ($\tau_{R2} = 12,8$ ns, prisutni i molekuli lecitina i polisorbata), čija zastupljenost približno odgovara udelima surfaktanata u formulaciji. Nakon solubilizacije, kurkumin utiče na molekularno uređenje međupovršinskog sloja, što se posebno moglo uočiti regionu „sporijeg kretanja“, raspoređujući se na međupovršini, bliže regionu lipofilnih repova surfaktanata. Ovakva lokalizacija aktivne molekule čini je dostupnijom za isporuku i ispoljavanje efekata.

5.2. Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

- Formulacije sa hemijskim pojačivačima penetracije izrađene su na isti način kao i osnovna formulacija, ali je polovina masne faze zamenjen eukaliptolom, odnosno pinenom. Dodatak monoterpena doveo je do značajnog smanjenja hidrodinamičkog prečnika dispergovanih kapi (promena Z-ave sa 101,13 nm na 41,25 nm za formulaciju F1_EUC, odnosno na 62,24 za formulaciju F1_PIN). Dobijeni rezultati ukazali su na kostabilizujući efekat monoterpena, koji je pokazan i primenom EPR spektroskopije – detektovano je njihovo prisustvo na međupovršinskom sloju nanoemulzija. I u ovom slučaju su primećene 2 mikrosredine, sa vrednostima $\tau_{R1} = 5,7 \pm 0,3$ ns i $\tau_{R2} = 14,4 \pm 0,3$ ns za F1_EUC, odnosno $\tau_{R1} = 4,3 \pm 0,5$ ns i $\tau_{R2} = 13,8 \pm 0,3$ ns za F1_PIN. Dodatno, na mikrogrijama AFM-a uočeno je postojanje dispergovanih kapljica pravilnog sfernog oblika i glatkih površina, što je takođe uticalo na zaključak da monoterpeni imaju određeni efekat na međupovršinskom sloju. Kao finalni dokaz njihovih kostabilizujućih svojstava, može se navesti i nalaz da je stabilizaciju nanoemulzija u prisustvu monoterpena bila dovoljna znatno niža koncentracija surfaktanata (minimalni SOR pri 10% *m/m* masne faze bio je 0,3, za razliku od situacije kada su samo MCT deo masne faze, kada je minimalna vrednost potrebnog SOR-a bila 0,7). Uočena pojava može se objasniti kako nižim viskozitetom monoterpena u odnosu na MCT, tako i njihovom polarnom prirodom, koja im omogućuje interakciju sa slojem surfaktanata, građenje vodoničnih veza (u slučaju eukaliptola) i reorijentaciju molekula vode na međupovršini, pružajući dodatnu stabilizaciju nanokapi.
- Interesantno je da solubilizacija kurkumina u koncentraciji 3 mg/ml nije dovela do promena u veličini dispergovanih kapi, što može biti posledica kompleksnih interakcija na međupovršini. Očekivano, i u ovim nanoemulzijama, kurkumin se rasporedio na međupovršinskom sloju, verovatno bliže nepolarnim regionima surfaktanata, što je zaključeno na osnovu EPR spektroskopije ($\tau_{R1} = 8,5 \pm 0,2$ ns i $\tau_{R2} = 13,4 \pm 0,5$ ns za F1_EUC_CU_3, odnosno $\tau_{R1} = 5,9 \pm 0,4$ ns i $\tau_{R2} = 13,2 \pm 0,2$ ns za F1_PIN_CU_3).
- Tokom praćenja dugoročne fizičke stabilnosti i placebo i formulacija sa kurkuminom, tokom godinu dana, sve nanoemulzije su bile nepromenjenih reoloških svojstava (niskoviskozne njutnovske tečnosti), bez znakova razdvajanja faza ili taloženja kurkumina. Praćenjem hidrodinamičkog dijametara kapi, u većini slučajeva dolazi samo do značajnijeg porasta u veličini kapi u drugoj vremenskoj tački (nakon meseca dana od izrade), što se može dovesti u vezu sa konsolidacijom sistema u toku prvih nedelja od izrade. Jedino formulacija F1_PIN pokazuje značajniju promenu u veličini dispergovanih kapi tokom vremena. Vrlo verovatno, prisustvo pinena na međupovršini dovodi do smanjenja gustine stabilizatora na međupovršinskom sloju. Kako pinen nema mogućnost stvaranja vodoničnih veza i dipol-dipol interakcija sa susednim molekulima, on u formulaciji F1_PIN nema onaj doprinos stabilnosti koji ima eukaliptol u formulaciji F1_EUC. Sa druge strane, značajne promene u veličini kapi tokom vremena se ne dešavaju kod formulacije F1_PIN_CU_3, što može biti posledica prisustva kurkumina na međupovršini, koji, uprkos svojoj hidrofobnosti, ima

mogućnost stvaranja vodoničnih veza sa vodom na međupovršinskom sloju. Stvaranjem sloja blago orijentisanih molekula vode na međupovršini, sprečena je koalescencija kapi. Polidisperzni indeks, kao mera distribucije veličina, zeta potencijal, kao mera površinskog naelektrisanja, i pH vrednost imali su stabilne i ujednačene vrednosti tokom čitavog perioda praćenja.

Tokom godinu dana nije došlo ni do značajnog pada u sadržaju kurkumina u formulacijama. Pored pogodne pH vrednosti formulacija, koja je od izrazitog značaja kada je u pitanju hemijska stabilnost kurkumina, gust sloj stabilizatora i prisustvo lecitina (koji ima antioksidativna svojstva) imali su značajan uticaj na prevenciju oksidativnih oštećenja kurkumina, predstavljajući efikasnu barijeru za prodor prooksidativnih vrsta.

5.3. Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

- *In vitro* ispitivanje brzine oslobađanja kurkumina iz formulacija primenom Franz-ovih difuzionih ćelija pokazalo je da se oslobađanje kurkumina iz sve tri odabrane nanoemulzije može najbolje opisati Higuchi modelom. Uočene su znatne razlike u brzini oslobađanja kurkumina iz formulacija sa monoterpenima (F1_EUC_CU_3: $115,06 \pm 3,20$ mg/cm²·h; F1_PIN_CU_3: $108,08 \pm 1,94$ mg/cm²·h u odnosu na F1_CU_3 ($80,20 \pm 6,96$ mg/cm²·h). Kumulativne količine oslobođenog kurkumina nakon 6h ispitivanje pratile su isti redosled: $212,33 \pm 2,51$ mg/cm² za F1_EUC_CU_3, $208,33 \pm 4,73$ mg/cm² za F1_PIN_CU_3, i $163,21 \pm 11,18$ mg/cm² za F1_CU_3. Dobijeni rezultati navode na zaključak da je zamena dela masne faze monoterpenima uticala na termodinamičku aktivnost kurkumina. Usled delimičnog isparavanja monoterpena u toku trajanja eksperimenta (nekoliko sati), smanjena je saturaciona rastvorljivost kurkumina u formulaciji i posledično povećavana brzina oslobađanja. Svakako, ne može se prenebregnuti ni činjenica da nanoemulzije sa monoterpenima imaju i značajno manju veličinu kapi u odnosu na F1_CU_3 (što povoljno utiče na adheziju kapljica za membranu), kao ni rezultati EPR spektroskopije, koji ukazuju na razliku u dinamici međupovršinskog sloja među ispitivanim nanoemulzijama, što se sve odražava i na *in vitro* kinetiku oslobađanja aktivne supstance.
- Antioksidativna aktivnost kurkumina i nanoemulzija sa kurkuminom ispitana je kroz 3 različita testa. Primenom DPPH testa, efekti i kurkumina iz rastvora, ali i nanoemulzija sa kurkuminom bili su gotovo trenutni. Dobijene IC₅₀ vrednosti ukazale su na to da nema razlike u efektu između kurkumina (IC₅₀ = $0,1028 \pm 0,0056$ mg/ml) i njegovih formulacija (IC₅₀ = $0,0994 \pm 0,0051$ mg/ml za F1_CU_3, IC₅₀ = $0,0929 \pm 0,0044$ mg/ml za F1_EUC_CU_3 i IC₅₀ = $0,0979 \pm 0,0040$ mg/ml za F1_PIN_CU_3) te i da je aktivnost kurkumina u ovom testu vrlo bliska tokoferolu, njemu strukturno sličnom antioksidansu (IC₅₀ = $0,1106 \pm 0,0079$ mg/ml). U nastavku, FRAP test je pokazao i na značajnu aktivnost kurkumina u vodenoj sredini, što je od većeg značaja, imajući u vidu da tokom ovog testa ne dolazi do narušavanja strukture samog nosača. Takođe, ovaj test zasniva se na drugom antioksidativnom mehanizmu, čime je pokazao da kurkumin ostvaruje antioksidativni efekat i putem doniranja H⁺ jona, i putem transfera elektrona. Na kraju, primenom EPR spektroskopije potvrđena je izrazita reaktivnost kurkumina u neutralizaciji slobodnog radikala, koja se dešava već u prvom minutu nakon kontakta. Praćenjem reakcije tokom 30 minuta, ukupan izračunati antioksidativni efekat kurkumina (u rastvoru) bio je oko 56 % (pri koncentraciji kurkumina 3 mg/ml). Antioksidativna aktivnost formulacija F1_CU_3, F1_EUC_CU_3 i F1_PIN_CU_3 bile su nešto niže (oko 47%, 55% i 49 %, respektivno), uz identičnu kinetiku reakcije sa rastvorom kurkumina – plato se dostigao već u prvim minutima reakcije, što i ne čudi, s obzirom da je kurkumin u nanoemulzijama solubilizovan u dispergovanoj fazi, pa time i nešto manje dostupan nego kada se reakcija dešava sa rastvorom kurkumina. Uočen i određeni efekat placebo formulacija na neutralizaciju slobodnog radikala – oko 5,7% za F1, čak 8% za F1_EUC, i 5,9% za F1_PIN. Ovakve performanse placebo formulacija su verovatno posledica

antioksidativne aktivnosti stabilizatora (lecitina pre svega), ali i poznatog antioksidativnog efekta monoterpena i etarskih ulja čiji su oni glavni konstituenasi. Merenje antioksidativnog potencijala istom tehnikom nakon mesec dana, aktivnost kurkumina u etanolnom rastvoru opala je za više od 70%, dok je aktivnost formulacija ostala skoro nepromenjena. Dakle, inkapsulacija kurkumina u dizajnirane nanoemulzije nedvosmisleno je doprinela njegovoj dugoročnoj hemijskoj stabilnosti.

- Na osnovu rezultata COMET testa, pokazano je odsustvo genotoksičnog potencijala nanoemulzija F1 i F1_CU_3. Takođe, formulacija sa kurkuminom imala je i izražen antigenotoksični potencijal – i preventivni i reparativni, čime je dokazana efikasnost nanoemulzija sa kurkuminom u zaštiti ćelija od oksidativnog stresa. U opsegu koncentracija kurkumina u nanoemulziji od 1 do 3 mg/ml, nije zabeležena koncentraciona zavisnost u efektima. Sa druge strane, donekle i očekivano, formulacije sa monoterpenima su pokazale genotoksični efekat
- Ispitivanje citotoksičnih efekata na ćelijskim kulturama primenom MTT testa pokazano je da formulacije F1 i F1_CU_3 ne utiču na vijabilnost humanih keratinocita, i to u vrlo širokom koncentracionom opsegu kurkumin (od 800 do 12,5 µg/ml) i odgovarajućim razblaženjima placebo formulacije, što je ukazalo na njihov odličan bezbednosni profil. To je posebno važno imajući u vidu da su keratinociti najbrojnije ćelije epidermisa, i stoga važne u kontekstu dermalne primene farmaceutskih preparata. U nastavku je pokazan i citotoksični efekat kurkumina i nanoemulzija sa kurkuminom prema maligno transformisanim ćelijama Fem-X (ćelije humanog melanoma; $IC_{50}=71,17\pm 22,60$ za kurkumin iz rastvora, $IC_{50}=67,72\pm 0,48$ za F1_CU_3) i HeLa (ćelije humanog cervikalnog karcinoma; $IC_{50}=15,03\pm 0,61$ za kurkumin iz rastvora, $IC_{50}=22,89\pm 2,09$ za F1_CU_3). Ispitivanjem citotoksičnosti pokazana je efikasnost u ispoljavanju efekta nanoemulzija sa kurkuminom prema maligno transformisanim ćelijama.
Na osnovu ispitivanja efekata kurkumina iz rastvora, nanoemulzija sa kurkuminom i odgovarajuće placebo nanoemulzije na ćelijski ciklus, može se izvesti zaključak da se zastoj u ćelijskom ciklusu najčešće javljao u G2/M i subG1 fazama, dok je koncentraciona zavisnost pokazana je kod Fem-X ćelija. Zastoj u G2/M fazi ukazuje na uticaj uzorka na ćelijsku deobu, dok akumulacija u subG1 fazi može ukazivati na apoptozu ćelija.
- Rezultati *in vivo* studije bezbednost ukazali su na dobar bezbednosni profil placebo nanoemulzija, bez ispoljavanja neželjenih reakcija na koži ispitanika. U odnosu na netretiranu kontrolu, nisu zabeležene značajne promene u vrednostima parametara EI, TEWL i SCH ni za jedan ispitivani uzorak (F1, F1_EUC, i F1_PIN).

5.4. Zaključak četvrte faze eksperimentalnog rada

- U cilju odabira optimalnih uslova za sprovođenje jontoforeze kao fizičke metode u poboljšanju dermalne raspoloživosti, sprovedena je *in vivo* studija iritacionog potencijala koja je pokazala da primena izvora napajanja od 9 V u tri predložena protokola (kontinuirani protok struje tokom 15 minuta (15-0); diskontinuirani protok – 3 minuta sa pauzom 2 minuta (3-2, 5 ciklusa); diskontinuirani protok – 5 minuta sa pauzom 1 minut (5-1, 3 ciklusa)) ne dovodi do neželjenih promena na koži. Praćenjem parametara EI, TEWL i SCH, u odnosu na netretiranu kontrolu, kod protokola 3-2 uočeno je značajnije povećanje EI (pojava blagog i kratkotrajnog crvenila) i TEWL u prvoj vremenskoj tački 15 minuta po prekidu protoka struje kroz kožu), na test-mestima i za katodu i za anodu, dok je kod protokola 5-1 uočeno samo značajno povećanje EI u prvoj vremenskoj tački, i to samo na mestu za anodu. Međutim, sve vrednosti su se vraćale na bazalne veoma brzo, pa povećane vrednosti nisu zabeležene u drugim vremenskim tačkama (nakon 60 i 120 minuta). Kod protokola 15-0 nije bilo značajnih promena u ispitivanim parametrima. Iz navedenih razloga, eksperimenti su sprovedeni prema sva tri protokola, u cilju provere njihove

efikasnosti u dermalnoj isporuci kurkumina. U istoj eksperimentalnoj postavci pokušano je i ispitivanje sa 2 spregnuta izvora napajanja – od 32 V i 9 V. Međutim, ovakvi uslovi doveli su do peckanja i pojave crvenila na koži, izazivajući neprijatan osećaj tokom primene, te nisu uzeti u obzir za dalja ispitivanja.

- Tokom *in vivo* ispitivanja penetracije kurkumina kroz kožu iz formulacije F1_CU_3 uz primene jontoforeze, nisu uočene značajne razlike među 3 predložena protokola u ukupnoj količini aktivne supstance koja je penetrirala kroz površinske slojeve kože po jedinici površine ($Q_{3-2}=7,04\pm 3,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $Q_{5-1}=6,66\pm 2,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $Q_{15-0}=6,96\pm 3,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Međutim, primena jontoforeze pokazala se značajno efikasnijom u isporuci kurkumina u odnosu na primenu formulacija sa hemijskim pojačivačima penetracije ($Q_{\text{EUC}}=5,16\pm 0,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; $Q_{\text{PIN}}=4,55\pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).
- Tokom procene uticaja dodatka hemijskih pojačivača penetracije, došlo se do donekle neočekivanih nalaza. Iako bi se na osnovu poznavanja efekata monoterpena moglo očekivati da su nanoemulzije sa hemijskim pojačivačima penetracije iz ove grupe apsolutno superiornije u dermalnoj isporuci kurkumina u odnosu na nanoemulziju bez monoterpena, pokazalo se da to nije slučaj. Sama rastvorljivost aktivne supstance u odabranim ekscipijensima i interakcija sa komponentama nanoemulzija pokazale su se kao presudne. U konkretnom slučaju, redosled formulacija prema efikasnosti dermalne isporuke bio je sledeći: F1_EUC_CU_3 > F1_CU_3 > F1_PIN_CU_3. Ovakav redosled korespondira sa rastvorljivijom kurkumina u komponentama masne faze nanoemulzija.
- Kroz prikazane eksperimente dokazano je da jontoforeza, pri predloženim uslovima, u kombinaciji sa naprednim nosačem sa nanostrukturom obezbeđuje efikasniju dermalnu isporuku kurkumina u poređenju sa formulacijama koje sadrže hemijske pojačivače penetracije. Dodatno, jontoforeza nudi brojne mogućnosti za dalja istraživanja, uz variranje napona i vremena ekspozicije kože protoku električne energije. Logično bi bilo očekivati da bi se sa produženjem trajanja jontoforeze mogle detektovati i veće količine aktivne supstance koje su penetrirale u dublje slojeve kože. Međutim, dostupnom metodologijom za analizu dermalne raspoloživosti (*tape stripping*) ne bi se moglo na adekvatan način kvantifikovati količina supstance u dubljim slojevima epidermisa, pa je u ovom radu ispitana samo jontoforeza u trajanju od 15 minuta.

5.5. Opšti zaključak i osvrt na dalja istraživanja

Kao rezultat eksperimentalnog rada prikazanog u ovoj doktorskoj disertaciji, razvijene su visokobezbedne niskoenergetske nanoemulzije namenjene dermalnoj isporuci kurkumina. Primenom niza komplementarnih tehnika, detaljno su okarakterisane u domenu mikrostrukture, oblika, veličine i morfologije dispergovane faze, fizičke stabilnosti, bezbednosti primene i pogodnosti za očuvanje hemijske stabilnosti supstance složenih fizičko-hemijskih osobina sa aspekta uključivanja u sastav formulacije farmaceutskog preparata. Na samom kraju, *in vivo* je ispitana penetracija kurkumina iz razvijenih nanoemulzija (sa hemijskim pojačivačima penetracije ili bez njih) i upoređena sa primenom adhezivnog sistema za jontoforezu u kombinaciji sa nanoemulzijom kao naprednog i inovativnog načina za efikasnu dermalnu isporuku aktivnih supstanci.

Kao najveći fundamentalni naučni doprinos ove doktorske disertacije može se smatrati analiza fenomena na granici faza, otkrivanje doprinosa različitih ekscipijenasa koloidnoj stabilnosti, i proširenje savremene teorije stabilizacije nanoemulzija, koja se bitno razlikuje od dosadašnjih razmatranja u ovoj oblasti. Poseban naglasak stavljen je i na značajnost primene većeg broja tehnika u tzv. kaskadnoj karakterizaciji nanosistema, a sve sa ciljem dobijanja pouzdanih rezultata. Prikazani rezultati eksperimentalnog dela rasvetlili su neke od mehanizama odgovornih za nastanak nanoemulzija kroz spontanoemulgujući postupak.

Dalja istraživanja u ovoj oblasti svakako bi se morala osvrnuti na nova saznanja u domenu analize međupovršinskih slojeva nanoemulzija, i primenu savremenih tehnika karakterizacije.

Dobijena saznanja mogla bi značajno doprineti razumevanju relacije između fizičko-hemijskih osobina nanosistema i njihovih bioperformansi, što je, uprkos dugoj tradiciji proučavanja, i dalje oblast sa mnogo nepoznanica.

Konačno, usavršavanje efikasnog mobilnog adhezivnog sistema za jontoforezu bio bi značajan praktičan doprinos u domenu dermalne primene lekova.

6. LITERATURA

Aboalnaja, K.O., Yaghmoor, S., Kumosani, T.A. and McClements, D.J., 2016. Utilization of nanoemulsions to enhance bioactivity of pharmaceuticals, supplements, and nutraceuticals: Nanoemulsion delivery systems and nanoemulsion excipient systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13, pp. 1327-1336.

Aboudzadeh, M.A. (ed.), 2020. *Emulsion-based Encapsulation of Antioxidants: Design and Performance*. Cham: Springer Nature.

Acosta, E., Szekeres, E., Sabatini, D. A., and Harwell, J. H., 2003. Net-average curvature model for solubilization and supersolubilization in surfactant microemulsions. *Langmuir*, 19, pp. 186-195.

Agrahari, V., Burnouf, P.A., Burnouf, T. and Agrahari, V., 2019. Nanoformulation properties, characterization, and behavior in complex biological matrices: Challenges and opportunities for brain-targeted drug delivery applications and enhanced translational potential. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 148, pp. 146-180.

Ahangari, N., Kargozar, S., Ghayour-Mobarhan, M., Baino, F., Pasdar, A., Sahebkar, A., Ferns, G.A., Kim, H.W. and Mozafari, M., 2019. Curcumin in tissue engineering: A traditional remedy for modern medicine. *BioFactors*, 45, pp. 135-151.

Ahlin, P., Krist. K., Pečar S., Štrancar, J., and Šentjerc, M., 2003. The effect of lipophilicity of spin-labeled compounds on their distribution in solid lipid nanoparticle dispersions studied by electron paramagnetic resonance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, pp. 58-66.

Alam, M.N., Bristi, N.J. and Rafiquzzaman, M., 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, pp. 143-152.

Albanese, A., Tang, P.S. and Chan, W.C., 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14, pp. 1-16.

Allan, J.E., Ferreri, A., Grande, S., Giannantonio, R. and Matteucci, F., 2019. Technology Transfer in Nanotechnology. Luxembourg: Publications Office of the European Union. Dostupno na: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC115968> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Allen, C., Qiu, T.A., Pramanik, S., Buchman, J.T., Krause, M.O. and Murphy, C.J., 2017. Research highlights: investigating the role of nanoparticle surface charge in nano-bio interactions. *Environmental Science: Nano*, 4, pp. 741-746.

Ambardekar, V.V. and Stern, S.T., 2015. NBCD pharmacokinetics and bioanalytical methods to measure drug release. *Non-biological Complex Drugs*, 261-287.

Ameluz – internet prezentacija proizvođača. Dostupno na: <http://www.biofrontera.us.com/nanoemulsion/> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Ameluz – Sažetak karakteristika leka. Dostupno na: <https://www.dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=650daa9f-aeec-49ce-95b9-5fa20b988afd> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Amorati, R. and Valgimigli, L., 2015. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*, 49, pp. 33-649.

Anton, N. and Vandamme, T.F., 2009. The universality of low-energy nano-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, 377, pp. 142-147.

Anton, N. and Vandamme, T.F., 2011. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical Research*, 28, pp. 978-985.

Antonijević-Nikolić, M., Antić-Stanković, J., Dražić, B. and Tanasković, S., 2019. New macrocyclic Cu (II) complex with bridge terephthalate: Synthesis, spectral properties, in vitro cytotoxic and antimicrobial activity. Comparison with related complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1184, pp. 41-48.

Aslantürk, Ö. S., 2018. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. In: Larramendy, M.L., Soloneski, S. (eds.) *Genotoxicity: A Predictable Risk to Our Actual World*, London: InTechOpen, pp. 1-17.

Assay cascade protocols. Dostupno na: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols> (poslednji pristup: novembar, 2021)

ASTM, 2013. Standard test method for evaluation of cytotoxicity of nanoparticulate materials in porcine kidney cells and human hepatocarcinoma cells (E2526–08)

Atkinson, J.P., Maibach, H.I. and Dragicevic, N., 2015. Targets in dermal and transdermal delivery and classification of penetration enhancement methods. In: Dragičević, N., Maibach, H.I. (eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers: Chemical Methods in Penetration Enhancement*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 93-108.

Avramiotis, S., Cazianis, C.T. and Xenakis, A., 2000. Membrane spin-probe studies in lecithin and bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium salt water-in-oil microemulsions. *Trends in Colloid and Interface Science*, XIV, pp. 196-200.

Azmi, N.A.N., Elgharbawy, A.A., Motlagh, S.R., Samsudin, N. and Salleh, H.M., 2019. Nanoemulsions: factory for food, pharmaceutical and cosmetics. *Processes*, 7, p. 617.

Bali, V., Ali, M. and Ali, J., 2010. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, pp. 410-420.

Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Fu, T. and Tan, W., 2012. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*, 7, pp.1253-1271.

Banerjee, A., Kunwar, A., Mishra, B. and Priyadarsini, K.I., 2008. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chemico-Biological Interactions*, 174, pp. 134-139.

Bastogne, T., 2017. Quality-by-design of nanopharmaceuticals – a state of the art. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13, pp. 2151-2157.

Berardesca, E., Loden, M., Serup, J., Masson, P. and Rodrigues, L.M., 2018. The revised EEMCO guidance for the in vivo measurement of water in the skin. *Skin Research and Technology*, 24, pp. 351-358.

Bisso, S. and Leroux, J.C., 2020. Nanopharmaceuticals: A focus on their clinical translatability. *International Journal of Pharmaceutics*, 578, 119098.

Borriin, T.R., Georges, E.L., Moraes, I.C. and Pinho, S.C., 2016. Curcumin-loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: An evaluation of process parameters and physico-chemical stability. *Journal of Food Engineering*, 169, pp. 1-9.

Bosetti, R. and Jones, S.L., 2019. Cost-effectiveness of nanomedicine: estimating the real size of nano-costs. *Nanomedicine*, 14, pp. 1367-1370.

Bouton, F., Durand, M., Nardello-Rataj, V., Serry, M. and Aubry, J.M., 2009. Classification of terpene oils using the fish diagrams and the Equivalent Alkane Carbon (EACN) scale. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 338, pp. 142-147.

Boyd, B.J., 2008. Past and future evolution in colloidal drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5, pp. 69-85.

Bremer-Hoffmann, S., Halamoda-Kenzaoui, B. and Borgos, S.E., 2018. Identification of regulatory needs for nanomedicines. *Journal of Interdisciplinary Nanomedicine*, 3, pp. 4-15.

Brown, M.B., Martin, G.P., Jones, S.A. and Akomeah, F.K., 2006. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Delivery*, 13, pp. 175-187.

Buchanan, M., Egelhaaf, S.U., and Cates, M.E., 2000. Dynamics of interface instabilities in nonionic lamellar phases. *Langmuir*, 16, pp. 3718-3726.

Caputo, F., Clogston, J., Calzolari, L., Rösslein, M. and Prina-Mello, A. (2019) Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *Journal of Controlled Release*, 299, pp. 31-43.

Chabir, N., Romdhane, M., Valentin, A., Moukarzel, B., Marzoug, H.N.B., Brahim, N.B., Mars, M. and Bouajila, J., 2011. Chemical study and antimalarial, antioxidant, and anticancer activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm essential oil. *Journal of Medicinal Food*, 14, pp.1383-1388.

Chanamai, R., Horn, G. and McClements, D.J., 2002. Influence of oil polarity on droplet growth in oil-in-water emulsions stabilized by a weakly adsorbing biopolymer or a nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 247, pp. 167-176.

Chang, Y. and McClements, D.J., 2014. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, pp. 2306-2312.

Chaudhary, S.C., Siddiqui, M.S., Athar, M. and Alam, M.S., 2012. D-Limonene modulates inflammation, oxidative stress and Ras-ERK pathway to inhibit murine skin tumorigenesis. *Human & Experimental Toxicology*, 31, pp. 798-811.

Chen, Y., Wu, Q., Zhang, Z., Yuan, L., Liu, X. and Zhou, L., 2012. Preparation of curcumin-loaded liposomes and evaluation of their skin permeation and pharmacodynamics. *Molecules*, 17, pp. 5972-5987.

Ching-San, A., 1982. Spin Labels: Biomembranes. In: Ayscough, P.B. (ed),. *Electron Spin Resonance: Volume 7*. London: Royal Society of chemistry, pp. 314-339.

Cho, E.C., Zhang, Q. and Xia, Y., 2011. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 6, pp. 385-391.

Choudhary, V., Shivakumar, H. and Ojha, H., 2019. Curcumin-loaded liposomes for wound healing: Preparation, optimization, in-vivo skin permeation and bioevaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49, pp. 683-691.

Clogston, J.D. and Vermilya, A., 2020. NCL Method PCC-2: Measuring Zeta Potential of Nanoparticles. Dostupno na: https://ncl.cancer.gov/sites/default/files/NCL_Method_PCC-2.pdf (poslednji pristup: novembar, 2021)

Cohen, J.M., Teeguarden, J.G. and Demokritou, P., 2014. An integrated approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*, 11, pp. 1-12.

Community Research and Development Information Service (CORDIS), 2020. Dostupno na: <https://cordis.europa.eu/> (poslednji pristip: maj, 2020)

Coty, J. B. and Vauthier, C., 2018. Characterization of nanomedicines: A reflection on a field under construction needed for clinical translation success. *Journal of Controlled Release*, 275, pp. 254-268.

Crist, R.M., Grossman, J.H., Patri, A.K., Stern, S.T., Dobrovolskaia, M.A., Adisheshaiah, P.P., Clogston, J.D. and McNeil, S.E., 2013. Common pitfalls in nanotechnology: lessons learned from NCI's Nanotechnology Characterization Laboratory. *Integrative Biology*, 5, pp. 66-73.

Dahner, F., 2016. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *Journal of Controlled Release*, 244, pp. 108-121.

Daneshmand, S., Golmohammadzadeh, S., Jaafari, M.R., Movaffagh, J., Rezaee, M., Sahebkar, A. and Malaekheh-Nikouei, B., 2018. Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119, pp. 4251-4264.

Dasgupta, N., Ranjan, S. and Gandhi, M., 2019. Nanoemulsions in food: market demand. *Environmental Chemistry Letters*, 17, pp. 1003-1009.

Daull, P., Amrane, M. and Garrigue, J., 2017. Novasorb[®] Cationic Nanoemulsion and Latanoprost: The ideal combination for glaucoma management. *Journal of Eye Diseases and Disorders*, 2, 107.

De Aguiar, H.B., De Beer, A.G., Strader, M.L. and Roke, S., 2010. The interfacial tension of nanoscopic oil droplets in water is hardly affected by SDS surfactant. *Journal of the American Chemical Society*, 132, pp. 2122-2123.

De Aguiar, H.B., Samson, J.S. and Roke, S., 2011. Probing nanoscopic droplet interfaces in aqueous solution with vibrational sum-frequency scattering: A study of the effects of path length, droplet density and pulse energy. *Chemical Physics Letters*, 512, pp. 6-80.

De Castro Santana, R., Fasolin, L.H. and Da Cunha, R.L., 2012. Effects of a cosurfactant on the shear-dependent structures of systems composed of biocompatible ingredients. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 398, pp. 54-63.

Devalapally, H., Zhou, F., McDade, J., Goloverda, G., Owen, A., Hidalgo, I. J. and Silchenko, S., 2015. Optimization of PEGylated nanoemulsions for improved pharmacokinetics of BCS class II compounds. *Drug Delivery*, 22, pp. 467-474.

Di Paola, R.S., 2002. To arrest or not to G2-M Cell-cycle arrest: commentary re: AK Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis. *Clinical Cancer Research*, 8, pp. 3311-3314.

Do, L.D., Withayyapayanon, A., Harwell, J.H. and Sabatini, D.A., 2009. Environmentally friendly vegetable oil microemulsions using extended surfactants and linkers. *Journal of Surfactants and Detergents*, 12, pp. 91-99.

Donowitz, M., Turner, J.R., Verkman, A.S. and Zachos, N.C., 2020. Current and potential future applications of human stem cell models in drug development. *The Journal of Clinical Investigation*, 130, pp. 3342-3344.

Đaković, Lj., 2012. *Koloidna hemija*, 5. izdanje. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, str. 5-20.

European Directorate for Quality of Medicines (EDQM), 2016. Guidance on essential oils in cosmetic products. Dostupno na: <https://www.edqm.eu/en/guidance-essential-oils-cosmetic-products> (poslednji pristup: novembar, 2021).

European Medicines Agenci (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2018. Draft guideline on quality and equivalence of topical products. CHMP/QWP/708282/2018. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/quality-equivalence-topical-products#current-version-section> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Engelskirchen, S., Elsner, N., Sottmann, T. and Strey, R., 2007. Triacylglycerol microemulsions stabilized by alkyl ethoxylate surfactants—a basic study: phase behavior, interfacial tension and microstructure. *Journal of Colloid and Interface Science*, 312, pp. 114-121.

EU Commission, 2011. Recommendation on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). *Official Journal of the European Commission (online)*, 275, pp. 38-40. Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32011H0696&qid=1637263348582> (poslednji pristup: novembar, 2021)

EUNCL project, 2015. Dostupno na: <https://cordis.europa.eu/project/id/654190> (poslednji pristup: novembar, 2021)

European Science Foundation, 2005. Nanomedicine, an ESF–European Medical Research Councils (EMRC) forward look report. Dostupno na: http://archives.esf.org/fileadmin/Public_documents/Publications/Nanomedicine.pdf (poslednji pristup: novembar, 2011)

Faria, M., Björnmalm, M., Thurecht, K.J, Kent, S.J., Parton, R.G., Kavallaris, M., Johnston, A.P.R., Gooding, J.J., Corrie, S.R., Boyd, B.J., Thordarson, P., Whittaker, A.K., Stevens, M.M., Prestidge, C.A., Porter, C.J.H., Park, W.J., Davis, T.P., Crampin, E.J. and Caruso, F., 2018. Minimum information reporting in bio–nano experimental literature. *Nature Nanotechnology*, 13, pp. 777-785.

Feynman, R., 1960. There's Plenty Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics. *Caltech's Engineering and Science Magazine*, 23, pp. 22-36.

Fukuta, T., Oshima, Y., Michiue, K., Tanaka, D. and Kogure, K., 2020. Non-invasive delivery of biological macromolecular drugs into the skin by iontophoresis and its application to psoriasis treatment. *Journal of Controlled Release*, 323, pp. 323-332.

Fullerton, A., Fisher, T., Lahti, A., Wilhelm, K.-P., Takiwaki, H. And Serup, J., 1996. Guidelines for measurement of skin colour and erythema. *Contact Dermatitis*, 35, pp. 1-10.

Ghanema, I.I.A. and Sadek, K.M., 2012. Olive leaves extract restored the antioxidant perturbations in red blood cells hemolysate in streptozotocin induced diabetic rats. *International Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 6, pp. 124-130.

Gioria, S., Caputo, F., Urbán, P., Maguire, C.M., Bremer-Hoffmann, S., Prina-Mello, A., Calzolari, L. and Mehn, D., 2018. Are existing standard methods suitable for the evaluation of nanomedicines: some case studies. *Nanomedicine*, 13, pp. 539-554.

Gouze, N. and Boisseau, P., 2013. White Paper to the Horizon 2020 Framework Programme for Research and Innovation - Recommendations from the Nanomedicine Community. Dostupno na: <https://etp-nanomedicine.eu/wp-content/uploads/2018/10/2013-White-Paper-ETPN-contribution-Horizon-2020.pdf> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Gratieri, T., Kalaria, D. and Kalia, Y.N., 2011. Non-invasive iontophoretic delivery of peptides and proteins across the skin. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8, pp. 645-663.

Gratieri, T., Kalia, Y.N., 2017. Iontophoresis: Basic Principles. In: Dragičević, N., Maibach, H.I. (eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers: Physical Methods in Penetration Enhancement*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 61-76.

Grossman, J.H., Crist, R.M. and Clogston, J.D., 2017. Early development challenges for drug products containing nanomaterials. *The AAPS Journal*, 19, pp. 92-102.

Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A. and Doyle, P.S., 2016. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12, pp. 2826-2841.

Gupta, A.N., 2020. Nanoemulsions. In: Chung, E.J., Leon, L., Rinaldi, C. (eds.), *Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical*. Elsevier, pp. 371-384.

Gupta, R., Dwadasi, B.S., Rai, B. and Mitragotri, S., 2019. Effect of chemical permeation enhancers on skin permeability: in silico screening using molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 9, pp. 1-11.

Gupta, S.C., Patchva, S. and Aggarwal, B.B., 2013. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The AAPS Journal*, 15, pp. 195-218.

Guttoff, M., Saberi, A.H. and McClements, D.J., 2015. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: factors affecting particle size and stability. *Food Chemistry*, 171, pp. 117-122.

Guy, R.H., Kalia, Y.N., Delgado-Charro, M.B., Merino, V., López, A. and Marro, D., 2000. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. *Journal of Controlled Release*, 64, pp. 129-132.

Hackley, V.A. and Clogston, J.D., 2010. NIST-NCL Joint Assay Protocol, PCC-1: Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering. Dostupno na: https://ncl.cancer.gov/sites/default/files/protocols/NCL_Method_PCC-1.pdf (poslednji pristup: novembar, 2021)

Halamoda-Kenzaoui, B., Holzwarth, U., Roebben, G., Bogni, A. and Bremer-Hoffmann, S., 2019. Mapping of the available standards against the regulatory needs for nanomedicines. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 11, 1531.

Harkins, W.D., Davies, E.C. and Clark, G.L., 1917. The orientation of molecules in the surfaces of liquids, the energy relations at surfaces, solubility, adsorption, emulsification, molecular association, and the effect of acids and bases on interfacial tension (surface energy VI). *Journal of the American Chemical Society*, 39, pp. 541-596.

Helgeson, M.E., 2016. Colloidal behavior of nanoemulsions: Interactions, structure, and rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 25, pp. 39-50.

Hensel, J.K., Carpenter, A.P., Ciszewski, R.K., Schabes, B.K., Kittredge, C.T., Moore, F.G. and Richmond, G.L., 2017. Molecular characterization of water and surfactant AOT at nanoemulsion surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, pp. 13351-13356.

Horváthová, E., Sramková, M., Lábaj, J. and Slamenová, D., 2006. Study of cytotoxic, genotoxic and DNA-protective effects of selected plant essential oils on human cells cultured in vitro. *Neuro Endocrinology Letters*, 27, pp. 44-47.

Ikervis – Izveštaj o bezbednosti. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ikervis> (Poslednji pristup: novembar, 2021)

Isailović, T., Đorđević, S., Marković, B., Ranđelović, D., Cekić, N., Lukić, M., Pantelić, I., Daniels, R. and Savić, S., 2016. Biocompatible nanoemulsions for improved aceclofenac skin

delivery: formulation approach using combined mixture-process experimental design. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, pp. 308-323.

ISO 22412:2017, 2017. Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS)

ISO/TR 18196:2016, 2016. Nanotechnologies — Measurement technique matrix for the characterization of nano-objects

ISO:13099-1:2012, 2012a. Colloidal systems — Methods for zeta-potential determination — Part 1: Electroacoustic and electrokinetic phenomena

ISO:13099-2:2012, 2012b. Colloidal systems — Methods for zeta-potential determination — Part 2: Optical methods

ISO/TS 80004-1:2015, 2015.. Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms

Israelachvili, J. N., 2011. *Intermolecular and Surface Forces*, 3rd ed. San Diego: Academic Press, pp. 577-616.

Jacobs, C. and Müller, R.H., 2002. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. *Pharmaceutical Research*, 19, pp. 189-194.

Jadoul, A., Bouwstra, J. and Preat, V., 1999. Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum: review of the biophysical studies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35, pp. 89-105.

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A. and Danquah, M.K., 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, pp. 1050-1074.

Jie, M. and Lin, J.M., 2018. Microfluidic Cell Culture Systems for Drug Research. In: Lin, J.M. (ed.) *Cell Analysis on Microfluidics*. Singapore: Springer, pp. 339-370.

Jokanović, V., 2014a. Mikroskopija atomskih sila. U: *Instrumentalne metode: Ključ za razumevanje nanotehnologije i nanomedicine*. Beograd: Inženjerska akademija Srbije i Institut za nuklearne nauke Vinča, str.779-845.

Jokanović, V., 2014b. Elektronska paramagnetna rezonancija. U: *Instrumentalne metode: Ključ za razumevanje nanotehnologije i nanomedicine*. Beograd: Inženjerska akademija Srbije i Institut za nuklearne nauke Vinča, str. 290-312.

Joris, F., Valdepérez, D., Pelaz, B., Soenen, S.J., Manshian, B.B., Parak, W.J., De Smedt, S.C. and Raemdonck, K., 2016. The impact of species and cell type on the nanosafety profile of iron oxide nanoparticles in neural cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 14, pp. 1-13.

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Boone, C.W. and Simic, M.G., 1999. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *Journal of the American Chemical Society*, 121, pp. 9677-9681.

Karande, P., Jain, A., Ergun, K., Kispersky, V. and Mitragotri, S., 2005. Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, pp. 4688-4693.

Keck, C.M. and Müller, R.H., 2013. Nanotoxicological classification system (NCS) – a guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84, pp. 445-448.

Kinnear, C., Moore, T.L., Rodriguez-Lorenzo, L., Rothen-Rutishauser, B. and Petri-Fink, A., 2017. Form follows function: nanoparticle shape and its implications for nanomedicine. *Chemical Reviews*, 117, pp. 11476-11521.

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

Komaiko, J. and McClements, D.J., 2014. Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: Hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 425, pp. 59-66.

Komaiko, J.S. and McClements, D.J., 2016. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, pp. 331-352.

Krajišnik, D., Ilić, T., Nikolić, I. and Savić, S., 2019. Established and advanced adjuvants in vaccines' formulation: Mineral adsorbents, nanoparticulate carriers and microneedle delivery systems. *Arhiv za farmaciju*, 69, pp. 420-451.

Kunz, W., Testard, F. and Zemb, T., 2009. Correspondence between curvature, packing parameter, and hydrophilic– lipophilic deviation scales around the phase-inversion temperature. *Langmuir*, 25, pp. 112-115.

Lane, M. E., 2013. Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*. 447, pp. 12-21.

Langmuir, I., 1917. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 39, pp. 1848-1906.

Lawrence, M.J. and Rees, G.D., 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45, pp. 89-121.

Li, J., Wang, X., Li, C., Fan, N., Wang, J., He, Z. and Sun, J., 2017. Viewing molecular and interface interactions of curcumin amorphous solid dispersions for comprehending dissolution mechanisms. *Molecular Pharmaceutics*, 14, pp. 2781-2792.

Li, T.H. and Yan, H.X., 2018. Antitumor-and apoptosis-inducing effects of pomolic acid against SK-MEL-2 human malignant melanoma cells are mediated via inhibition of cell migration and sub-G1 cell cycle arrest. *Molecular Medicine Reports*, 17, pp. 1035-1040.

Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C. and Sridhar, R., 2014. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32, pp. 711-726.

Lipinski, C. A., 2005. Solubility in water and DMSO: Issues and potential solutions. In: R. Borchardt, R., Kerns, E., Lipinski, C., Thakker, D., Wang, B. (eds.), *Pharmaceutical profiling in drug discovery for lead selection*. Arlington: AAPS Press, pp. 93-125.

Lison, D., Thomassen, L.C., Rabolli, V., Gonzalez, L., Napierska, D., Seo, J.W., Kirsch-Volders, M., Hoet, P., Kirschhock, C.E. and Martens, J.A., 2008. Nominal and effective dosimetry of silica nanoparticles in cytotoxicity assays. *Toxicological Sciences*, 104, pp. 155-162.

Liu, C.H., Chang, F.Y. and Hung, D.K., 2011. Terpene microemulsions for transdermal curcumin delivery: effects of terpenes and cosurfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82, pp. 63-70.

Liu, W., Deng, Y., Liu, Y., Gong, W. and Deng, W., 2013. Stem cell models for drug discovery and toxicology studies. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 27, pp. 17-27.

Lomova, M.V., Sukhorukov, G.B. and Antipina, M.N., 2010. Antioxidant coating of micronsized droplets for prevention of lipid peroxidation in oil-in-water emulsion. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2, pp. 3669-3676.

Lopes, L.B., J Garcia, M.T. and LB Bentley, M.V., 2015. Chemical penetration enhancers. *Therapeutic Delivery*, 6, pp. 1053-1061.

López-Montilla, J.C., Herrera-Morales, P.E., Pandey, S. and Shah, D.O., 2002. Spontaneous emulsification: mechanisms, physicochemical aspects, modeling, and applications. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23, pp. 219-268.

Lovelyn, C. and Attama, A.A., 2011. Current state of nanoemulsions in drug delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2, 626.

Lyklema, J. (ed.), 2005. *Fundamentals of Interface and Colloid Science: Soft Colloids*. Amsterdam: Elsevier Science.

Lynch, I., Salvati, A. and Dawson, K.A., 2009. What does the cell see? *Nature Nanotechnology*, 4, pp. 546-547.

Marsh, D., 1989. Experimental Methods in Spin-Label Spectral Analysis. In: Berliner L.J., Reuben, J. (eds.), *Spin Labeling: Theory and Applications*. Boston: Springer-Verlag, pp. 255-303.

Marwah, H., Garg, T., Goyal, A.K. and Rath, G., 2016. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Delivery*, 23, pp. 564-578.

Mason, T. G., 1999. New fundamental concepts in emulsion rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 4, pp. 231-238.

Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B. and Graves, S.M., 2006. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18, R635.

McClements, D.J. and Decker, E.A., 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65, pp. 1270-1282.

McClements, D.J., 2004. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.

McClements, D.J., 2011. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7, pp. 2297-2316.

McGrath, J.A. and Uitto, J., 2010. Structure and function of the skin. *Rook's Textbook of Dermatology*, Eighth Edition. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1-52.

Mehn, D., Iavicoli, P., Cabaleiro, N., Borgos, S.E., Caputo, F., Geiss, O., Calzolari, L., Rossi, F. and Gilliland, D., 2017. Analytical ultracentrifugation for analysis of doxorubicin loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 523, pp. 320-326.

Mishra, B.B., Patel, B.B. and Tiwari, S., 2010. *Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6, pp. 9-24.

Mitragotri, S., Lammers, T., Bae, Y.H., Schwendeman, S., De Smedt, S.C., Leroux, J.C., Peer, D., Kwon, I.C., Harashima, H., Kikuchi, A. and Oh, Y.K., 2017. Drug delivery research for the future: expanding the nano horizons and beyond. *Journal of Controlled Release*, 246, pp. 183-184.

Mitsou, E., Kalogianni, E. P., Georgiou, D., Stamatis, H., Xenakis, A., and Zoumpanioti, M., 2018. Formulation and structural study of a biocompatible water-in-oil microemulsion as an appropriate enzyme carrier: the model case of horseradish peroxidase. *Langmuir*, 35, pp. 150-160.

Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A., and Dawson, K. A., 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7, pp.779-786.

Moore, T.L., Urban, D.A., Rodriguez-Lorenzo, L., Milosevic, A., Crippa, F., Spuch-Calvar, M., Balog, S., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M. and Petri-Fink, A., 2019. Nanoparticle administration method in cell culture alters particle-cell interaction. *Scientific Reports*, 9, pp. 1-9.

Mu, Q., Yu, J., McConnachie, L.A., Kraft, J.C., Gao, Y., Gulati, G.K. and Ho, R.J., 2018. Translation of combination nanodrugs into nanomedicines: lessons learned and future outlook. *Journal of Drug Targeting*, 26, pp. 435-447.

Mühlebach, S., Borchard, G. and Yildiz, S., 2015. Regulatory challenges and approaches to characterize nanomedicines and their follow-on similars. *Nanomedicine*, 10, pp. 659-674.

Müller, R.H., Harden, D. and Keck, C.M., 2012. Development of industrially feasible concentrated 30% and 40% nanoemulsions for intravenous drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 38 pp. 420-430.

Myers, D., 1999. *Surfaces, interfaces, and colloids*. New York: Wiley-Vch, pp. 1-7.

Nash, J.J. and Erk, K.A., 2017. Stability and interfacial viscoelasticity of oil-water nanoemulsions stabilized by soy lecithin and Tween 20 for the encapsulation of bioactive carvacrol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 517, pp. 1-11.

Nawab, A., Nichols, A., Klug, R., Shapiro, J.I. and Sodhi, K., 2017. Spin trapping: a review for the study of obesity related oxidative stress and Na⁺/K⁺-ATPase. *Journal of Cclinical & Cellular Immunology*, 8(3).

Ng, K.W. and Lau, W.M., 2015. Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. In: Dragičević, N., Maibach, H.I. (eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers: chemical methods in penetration enhancement*. Berlin, Heilderber: Springer-Verlag, pp. 2-11

Nikolić, B., Vasiljević, B., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B. and Knežević-Vukčević, J., 2015. Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells. *Chemico-Biological Interactions*, 242, pp. 263-271.

Nile, S.H., Khobragade, N.C. and Park, W.S., 2012. Optimized and comparative antioxidant assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis as antioxidants. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, pp. 1007-1014.

OECD, 2004. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 28: Guidance document for the conduct of skin absorption studies. Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development.

Ojha, T., Pathak, V., Shi, Y., Hennink, W. E., Moonen, C. T., Storm, G., Kiessling, F. and Lammers, T., 2017. Pharmacological and physical vessel modulation strategies to improve EPR-mediated drug targeting to tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 119, pp. 44-60.

Olotu, F., Agoni, C., Soremekun, O. and Soliman, M.E., 2020. An update on the pharmacological usage of curcumin: has it failed in the drug discovery pipeline? *Cell Biochemistry and Biophysics*, 78, pp. 267-289.

Onoue, S., Yamada, S. and Chan, H.K., 2014. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *International Journal of Nanomedicine*, 9, pp. 1025.

Oppenheimer, A., 1937. Turmeric (curcumin) in biliary diseases. *The Lancet*, 229, pp. 619-621.

ORCHID project, 2017. Dostupno na: <https://cordis.europa.eu/project/id/766884> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Pan, Y., Tikekar, R. V. and Nitin, N., 2013. Effect of antioxidant properties of lecithin emulsifier on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 450, pp. 129-137.

Panahi, Y., Fazlolahzadeh, O., Atkin, S.L., Majeed, M., Butler, A.E., Johnston, T.P. and Sahebkar, A., 2019. Evidence of curcumin and curcumin analogue effects in skin diseases: A narrative review. *Journal of Cellular Physiology*, 234, pp. 1165-1178.

Pantelić, I., 2013. *Dermalna raspoloživost lekova sa antiinflamatornim delovanjem iz podloga sa šećernim emulgatorom: komparativna primena metoda in vitro/in vivo karakterizacije*, doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet.

Papadimitriou, V., Pispas, S., Syriou, S., Pournara, A., Zoumpanioti, M., Sotiroidis, T.G. and Xenakis, A., 2008. Biocompatible microemulsions based on limonene: formulation, structure, and applications. *Langmuir*, 24, pp. 3380-3386.

Pardeike, J. and Müller, R.H., 2010. Nanosuspensions: a promising formulation for the new phospholipase A2 inhibitor PX-18. *International Journal of Pharmaceutics*, 391, pp. 322–329.

Perestrelo, A.R., Águas, A.C., Rainer, A. and Forte, G., 2015. Microfluidic organ/body-on-a-chip devices at the convergence of biology and microengineering. *Sensors*, 15, pp. 31142-31170.

Potter, T.M. and Stern, S.T., 2011. Evaluation of cytotoxicity of nanoparticulate materials in porcine kidney cells and human hepatocarcinoma cells. In: McNeil, S.E. (ed.) *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, New Jersey: Human Press, pp. 157-165.

Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 4290-4302.

Ragelle, H., Danhier, F., Préat, V., Langer, R. and Anderson, D.G., 2017. Nanoparticle-based drug delivery systems: a commercial and regulatory outlook as the field matures. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14, pp. 851-864.

Rai, V.K., Mishra, N., Yadav, K.S. and Yadav, N.P., 2018. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *Journal of Controlled Release*, 270, pp. 203-225.

REFINE project, 2017. Dostupno na: <https://cordis.europa.eu/project/id/761104> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Reinhold, U., Dirschka, T., Ostendorf, R., Aschoff, R., Berking, C., Philipp-Dormston, W.G., Hahn, S., Lau, K., Jäger, A., Schmitz, B. and Lübbert, H., 2016. A randomized, double-blind, phase III, multicentre study to evaluate the safety and efficacy of BF-200 ALA (Ameluz®) vs. placebo in the field-directed treatment of mild-to-moderate actinic keratosis with photodynamic therapy (PDT) when using the BF-Rhodo LED® lamp. *British Journal of Dermatology*, 175, pp. 696-705.

Reuters Fact Check, 2020. Dostupni na: <https://www.reuters.com/article/uk-factcheck-vaccine-nanoparticles-idUSKBN28F0I9> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Reuters Fact Cheeck, 2021. Dostupno na: <https://www.reuters.com/article/factcheck-mrna-megamix-idUSL1N2M61HW> (poslednji pristup: novembar, 2021).

Rischitor, G., Parracino, M., La Spina, R., Urbán, P., Ojea-Jiménez, I., Bellido, E., Valsesia, A., Gioria, S., Capomaccio, R., Kinsner-Ovaskainen, A. and Gilliland, D., 2016. Quantification of the cellular dose and characterization of nanoparticle transport during in vitro testing. *Particle and FFibre Toxicology*, 13, pp. 1-16.

Rogiers, V., 2001. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacology and Physiology*, 14, pp. 117-128.

Rossi, J. and Leroux, J.C., 2007. Principles in the development of intravenous lipid emulsions. In: Wasan, K.M. (ed.) *Role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery: basic principles and biological examples*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc., pp. 88–123.

Rozentur, E., Nassar, T. and Benita, S., 2010. Materials for nanoemulsions and their influence on the biofate. In: Torchilin, V., Amiji, M.M. (eds.), *Handbook of materials for nanomedicine*. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., pp. 515–554.

Saberi, A.H., Fang, Y. and McClements, D.J., 2013. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 391, pp. 95-102.

Sampathi, S., Mankala, S.K., Wankar, J. and Dodoala, S., 2015. Nanoemulsion based hydrogels of Itraconazole for transdermal drug delivery. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 74, pp. 88-92.

Saraf, S., 2016. Application of Colloidal Properties in Drug Delivery. In: Fanun, M. (ed), *Colloids in Drug Delivery*. Boca Raton: CRC Press, Taylor&Francis Group, pp. 55-69.

SCCS/1611/19, 2019. Scientific Committee on Consumer Safety, Guidance on the Safety Assessment of Nanomaterials in Cosmetics.

Sebastià, N., Soriano, J. M., Barquinero, J. F., Villaescusa, J. I., Almonacid, M., Cervera, J., Such, E., Silla, M. and Montoro, A., 2012. In vitro cytogenetic and genotoxic effects of curcumin on human peripheral blood lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50, pp. 3229-3233.

Selzer, D., Abdel-Mottaleb, M.M., Hahn, T., Schaefer, U.F. and Neumann, D., 2013. Finite and infinite dosing: difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, pp. 278-294.

Shah, M.R., Imran, M. and Ullah, S., 2017. Naoemulsions. In: Shah, M.R., Imran, M. And Ullar, S. (eds). *Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis*. William Andrew, pp. 111-137.

Shah, V.P., Yacobi, A., Rădulescu, F.Ş., Miron, D.S. and Lane, M.E., 2015. A science based approach to topical drug classification system (TCS). *International Journal of Pharmaceutics*, 49, pp. 21-25.

Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005. Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer*, 41, pp. 1955–1968.

Shchipunov, Y.A., 2001. Lecithin organogel: a micellar system with unique properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 183, pp. 541-554.

Shen, J. and Burgess, D.J., 2013. In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. *Drug Delivery and Translational Research*, 3, pp. 409-415.

Smolentsev, N. and Roke, S., 2020. Self-assembly at water nanodroplet interfaces quantified with nonlinear light scattering. *Langmuir*, 36, pp. 9317-9322.

Smolentsev, N., Smit, W. J., Bakker, H. J. and Roke, S., 2017. The interfacial structure of water droplets in a hydrophobic liquid. *Nature Communications*, 8, pp. 1-6.

Sobral, M.V., Xavier, A.L., Lima, T.C. and de Sousa, D.P., 2014. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014, 953451.

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. and Garcia-Celma, M.J., 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10, pp. 102-110.

Sreekanth, V. and Bajaj, A., 2013. Number of free hydroxyl groups on bile acid phospholipids determines the fluidity and hydration of model membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117, pp. 12135-12144.

Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L. and Blázquez-Castro, A., 2018. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120, pp. 159-167.

Tadros, T., 2013. *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Berlin, Heilderberg: Springer.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. and Solans, C., 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, pp. 303-318.

Technov, R., 2021. Understanding the nanotechnology in COVID-19 vaccines. American Chemical Society. Dostupno na: <https://www.cas.org/resource/blog/understanding-nanotechnology-covid-19-vaccines> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Teeguarden, J.G., Hinderliter, P.M., Orr, G., Thrall, B.D. and Pounds, J.G., 2007. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences*, 95, pp. 300-312.

The Guardian, 2011. Dostupno na: <https://www.theguardian.com/nanotechnology-world/sunscreens-in-the-nanotechnology-safety-spotlight> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Theochari, I., Goulielmaki, M., Danino, D., Papadimitriou, V., Pintzas, A. and Xenakis, A., 2017. Drug nanocarriers for cancer chemotherapy based on microemulsions: The case of Vemurafenib analog PLX4720. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, pp. 350-356.

Todosijević, M.N., Cekić, N.D., Savić, M.M., Gašperlin, M., Randelović, D.V. and Savić, S.D., 2014. Sucrose ester-based biocompatible microemulsions as vehicles for aceclofenac as a model drug: formulation approach using D-optimal mixture design. *Colloid and Polymer Science*, 292, pp. 3061-3076.

Trietsch, S.J., Israëls, G.D., Joore, J., Hankemeier, T., Vulto, P., 2013. Microfluidic titer plate for stratified 3D cell culture. *Lab on a Chip*, 13, pp. 3548-3554.

Tyagi, A.K., Singh, R.P., Agarwal, C., Chan, D.C. and Agarwal, R., 2002. Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis. *Clinical Cancer Research*, 8, pp. 3512-3519.

US FDA, 2014. Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology – Guidance for Industry. Dostupno na: <https://www.fda.gov/regulatory->

information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology (poslednji pristup: novembar, 2021)

US FDA, 2017. GRAS Notice 686 – Curcumin from tumeric (*Curcuma longa L.*). Dostupno na: https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=686&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=curcumin (poslednji pristup: novembar, 2021)

US FDA, 2019. GRAS Notice 822 – Curcumin. Dostupno na: https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=822&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=curcumin (poslednji pristup: novembar, 2021)

USP, 2021: United States Pharmacopoeia 43 – National Formulary 38, Chapter 1724: Semisolid drug products—performance tests. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.

Valgimigli, L., Baschieri, A. and Amorati, R., 2018. Antioxidant activity of nanomaterials. *Journal of Materials Chemistry B*, 6, pp. 2036-2051.

Varenne, F., Botton, J., Merlet, C., Vachon, J.J., Geiger, S., Infante, I.C., Chehimi, M.M. and Vauthier, C. (2015). Standardization and validation of a protocol of zeta potential measurements by electrophoretic light scattering for nanomaterial characterization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 486, pp. 218-231.

Verkaiza – Monografija proizvoda sa medicinskim informacijama. Dostupno na: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00048991.PDF (poslednji pristup: novembar, 2021)

Verkaiza – Sažetak karakteristika leka. Dostupno na: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/9491/pil> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Voltaren, Emulgel 1% - Uputstvo za pacijente. Dostupno na: <https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/pil/515-01-00608-18-002.pdf> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Voltaren, Emulgel 2% - Sažetak karakteristika leka. Dostupno na: <https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpc/515-01-01317-13-001.pdf> (Poslednji pristup: novembar, 2021)

Wagner, V., Hüsing, B., Gaisser, S. and Bock, A.K. (2008). Nanomedicine: Drivers for development and possible impacts. Luxemburg: Office for Official Publications of the European Communities. Dostupno na: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC46744> (poslednji pristup: novembar, 2021)

Walkey, C.D. and Chan, W.C., 2012. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews*, 41, pp. 2780-2799.

Walters, K., 1996, Some novel aspects of transdermal drug delivery. In: Karsa, D.R., Stephenson, D.A. (eds.) *Chemical Aspects of Drug Delivery Systems*. London: Royal Society of Chemistry, pp. 41-55.

Warheit, D.B., 2018. Hazard and risk assessment strategies for nanoparticle exposures: how far have we come in the past 10 years? *FI000Research*, 7.

Weltring, K.M., Gouze, N., Martin, N., Pereira, N., Baanante, I., Gramatica, F., 2016. Strategic Research and Innovation Agenda For Nanomedicine 2016 – 2030. Dostupno na: <https://etp-nanomedicine.eu/about-nanomedicine/strategic-research-and-innovation-agenda/> (poslednji pristup: novembar, 2021).

Wilhelm, S., Tavares, A.J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H.F. and Chan, W.C., 2016. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1, pp. 1-12.

Williams, D., 2003. Revisiting the definition of biocompatibility, *Medical Device Technology*, 14, pp. 10–13.

Wittmaack, K., 2011. Excessive delivery of nanostructured matter to submersed cells caused by rapid gravitational settling. *ACS Nano*, 5, pp. 3766-3778.

Wooster, T.J., Golding, M. and Sanguansri, P., 2008. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24, pp. 12758-12765.

Yallapu, M.M., Bhusetty Nagesh, P.K., Jaggi, M. and Chauhan, S.C., 2015. Therapeutic applications of curcumin nanoformulations. *The AAPS Journal*, 17, pp. 1341–1355

Yallapu, M.M., Jaggi, M. and Chauhan, S.C., 2012. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discovery Today*, 17, pp. 71-80.

Zänker, S., Tölle, W., Blümel, G. and Probst, J., 1980. Evaluation of surfactant-like effects of commonly used remedies for colds. *Respiration*, 39, pp. 150-157.

Zdrali, E., Chen, Y., Okur, H.I., Wilkins, D.M. and Roke, S., 2017. The molecular mechanism of nanodroplet stability. *ACS Nano*, 11, pp. 12111-12120.

Zdrali, E., Etienne, G., Smolentsev, N., Amstad, E. and Roke, S., 2019. The interfacial structure of nano- and micron-sized oil and water droplets stabilized with SDS and Span80. *The Journal of Chemical Physics*, 150, 204704.

Zorec, B., Prát, V., Miklavčič, D. and Pavšelj, N., 2013. Active enhancement methods for intra- and transdermal drug delivery: a review. *Slovenian Medical Journal*, 82(5).

Zou, L., Liu, W., Liu, C., Xiao, H., and McClements, D.J., 2015a. Designing excipient emulsions to increase nutraceutical bioavailability: emulsifier type influences curcumin stability and bioaccessibility by altering gastrointestinal fate. *Food & function*, 6, pp. 2475-2486.

Zou, L., Zheng, B., Liu, W., Liu, C., Xiao, H., and McClements, D.J., 2015b. Enhancing nutraceutical bioavailability using excipient emulsions: Influence of lipid droplet size on solubility and bioaccessibility of powdered curcumin. *Journal of Functional Foods*, 15, pp. 72-83.

Zugic, A., Jeremic, I., Isakovic, A., Arsic, I., Savic, S. and Tadic, V., 2016. Evaluation of anticancer and antioxidant activity of a commercially available CO₂ supercritical extract of old man's beard (*Usnea barbata*). *PLoS One*, 11, p.e0146342.

Žukovec Topalović, D., Živković, L., Čabarkapa, A., Djelić, N., Bajić, V., Dekanski, D. and Spremo-Potparević, B., 2015. Dry olive leaf extract counteracts L-thyroxine-induced genotoxicity in human peripheral blood leukocytes in vitro. *Oxidative medicine and cellular longevity*.

7. PRILOZI

Publikovani i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u vidu dva poglavlja u istaknutim monografijama međunarodnog značaja (M14), četiri rada u časopisima koji su na SCI listi (tri rada kategorije M21 i jedan rad kategorije M23), i u formi većeg broja saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima štampanim u celini ili u izvodu, uz tri usmena izlaganja na međunarodnim konferencijama, i jedno usmeno izlaganje na nacionalnom skupu. Podaci o publikovanim radovima dati su u nastavku.

○ Poglavlja u knjigama/monografijama međunarodnog značaja (M14)

Nikolić I, Gledović A, Tamburić S, Major T, Savić S. (2020) Nanoemulsions as Carriers for Natural Antioxidants: Formulation Development and Optimisation. In: Aboudzadeh M.A. (eds) Emulsion-based Encapsulation of Antioxidants. Food Bioactive Ingredients. Springer, Cham.

Nikolić I, Cekić N, Ilić T, Savić S.M, Savić S. D. (2017). Biocompatible Low-energy Nanoemulsions as Novel Curcumin Carriers: Formulation Design and Physicochemical Characterization. *Serbia-Italia: Nano for Health* (pp. 153-171). Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy – University of Belgrade

○ Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

Nikolić I, Mitsou E, Damjanović A, Papadimitriou V, Antić-Stanković J, Stanojević B, Xenakis A, Savić S. (2020). Curcumin-loaded low-energy nanoemulsions: Linking EPR spectroscopy-analysed microstructure and antioxidant potential with in vitro evaluated biological activity. *Journal of Molecular Liquids*, 301. IF 2020 = 6,165 (Physics, Atomic, Molecular & Chemical: 4/37; Chemistry, Physical: 43/162)

Nikolić I, Mitsou E, Pantelić I, Randjelovic D, Marković B, Papadimitriou V, Xenakis A, Lunter DJ, Zugić A, Savić, S. (2019). Microstructure and biopharmaceutical performances of curcumin-loaded low-energy nanoemulsions containing eucalyptol and pinene: Terpenes' role overcome penetration enhancement effect? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 142, 105135. IF 2019 = 3,616 (Pharmacology & Pharmacy: 77/271)

Nikolic I, Lunter DJ, Randjelovic D, Zugić A, Tadić V, Markovic B, Cekić N, Živković L, Topalović D, Spremo-Potparević B, Savic, S. (2018). Curcumin-loaded low-energy nanoemulsions as a prototype of multifunctional vehicles for different administration routes: Physicochemical and in vitro peculiarities important for dermal application. *International Journal of Pharmaceutics*, 550(1-2), 333-346. IF 2018 = 4,213 (Pharmacology & Pharmacy: 44/267)

○ Rad u međunarodnom časopisu (M23)

Nikolić I, Antić-Stanković J, Božić D, Randjelovic D, Marković B, Lunter DJ, Kremenović A, Savić M, Savić S. (2020). Curcumin nanonization using an alternative small-scale production unit: selection of proper stabilizer applying basic physicochemical consideration and biological activity assessment of nanocrystals. *Reviews on Advanced Materials Science*, 59(1), 406-424. IF 2020 = 3,364 (Nanoscience & Nanotechnology: 64/106)

○ **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)**

Nikolić I, Simić M, Pantelić I, Stojanović G, Savić S. Iontophoresis vs. chemical penetration enhancers towards improved dermal drug delivery: A case study with curcumin. 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 11 - 14 May 2021; online

Nikolić I, Randjelović D, Lunter DJ, Marković B, Savić S. Top-down method for lab-scale production of nanocrystals of active pharmaceutical ingredients – formulation approach and selection of optimal process parameters. 42nd International Semiconductor Conference, 9 – 11 October 2019; Sinaia, Romania (Oral communication)

Nikolić I, Mitsou E, Lunter DJ, Papadimitriou V, Xenakis A, Daniels R, Savić S. Linking microstructural analysis and drug-carrier interactions with biological activity: a study with curcumin. 3rd European Conference on Pharmaceutics, 25-25 March 2019, Bologna, Italy.

Nikolić I, Pantelić I, Marković B, Ilić T, Savić S. Low-energy nanoemulsions enriched with terpen compounds – combination of two methodologies for effective skin penetration. 10th International Congress Nanotechnology in Medicine and Biology, 15-17 April 2019, Graz, Austria.

Nikolić I, Mitsou E, Damjanović A, Papadimitriou V, Antić Stanković J, Xenakis A, Savić S. Linking microstructure of the low-energy nanoemulsions with biological effects: a curcumin case study. 3rd International Symposium on Pharmaceutical Engineering Research, 25-27 September 2019; Beauschweig, Germany

Nikolić I, Randjelovic D, Savić S. Potentials, Implementation and Perspectives of Atomic Force Microscopy for Characterization of Drug Delivery Nanocarriers. First International Conference on Electron Microscopy of Nanostructures ELMINA 2018, 27-29 August 2018, Belgrade, Serbia (Abstract book pp. 134-135)

Nikolic I, Mitsou E, Markovic B, Papadimitriou V, Xenakis A, Savić S. An insight to interface properties of low-energy nanoemulsions for curcumin dermal application using electron paramagnetic resonance - a link with release kinetics and biological activity. Nanomedicine ROME 2018, 18-21 June 2018; Rome, Italy

Nikolic I, Žukovec Topalovic D, Živkovic L, Spremo-Potparevic B, Djokovic J, Savić S. Eucalyptol as prospective co-surfactant and penetration enhancer in low-energy nanoemulsions? Physicochemical vs. genotoxicity data. 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 19-23 March 2018; Granada, Spain

Nikolic I, Mitsou E, Randjelovic, D, Lunter D. J, Papadimitriou V, Daniels R, Xenakis A, Savić S. Interactions at the interface of low-energy nanoemulsions: closer view through atomic force microscopy and electron paramagnetic resonance spectroscopy as inspection tools. EUFEPS Annual Meeting, 24-26 May 2018; Athens, Greece (Abstract reference: EP33)

Nikolic I, Lunter D. J, Daniels R, Randjelovic D, Žugić A, Tadić V, Živković L, Žukovec Topalović D, Spremo-Potparević B, Bubić Pajić N, Vuleta G, Savić S. Low-energy nanoemulsions for curcumin dermal application – special reference to antioxidant and antigenotoxic properties. First Croatian Congress on Dermatopharmacy with International Participation, 23-24 March 2018; Zagreb, Croatia (Oral communication, L-30)

Nikolić I, Ilić T, Cekić N, Savić S. M, Arsić N, Savić S. D. Biocompatible low-energy nanoemulsions for curcumin dermal delivery – the effect of terpene oil and drug content. 7th BBBB

International Conference on Pharmaceutical Sciences, 5-7 October 2017; Balatonfüred, Hungary (Abstract book: p. 140)

Nikolić I, Todosijević M, Ilić T, Daniels R, Savić S. Lecithin-based microemulsions for curcumin dermal delivery – physicochemical characterization. 2nd European Conference on Pharmaceutics, 3-4 April 2017; Krakow, Poland, USB stick (poster number 38)

○ **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)**

Nikolić I, Savić S. The nature of the nanoemulsion nano(visible)interface. NanoGVA Symposium, 13-14 October 2021, Geneva, Switzerland (Oral communication: P7)

Nikolić I, Mitsou E, Antić-Stanković J, Pantelić I, Randjelovic D, Papadimitriou V, Xenakis A, Savić S. Curcumin-loaded nanoemulsions in the view of dermal application: interfacial phenomena in the colloidal system and biological performances. 35th Conference of the European Colloid and Interface Society, 5-10 September 2021, Athens, Greece; Book of abstracts-Poster presentations; p. 177

Nikolić I, Simić M, Savić S. Improving dermal delivery of active substances using nanoemulsion combined with iontophoresis: A case study with curcumin. Virtual Summer School on Non-Animal Approaches in Science, 17-21 May 2021; Ispra, Italy; Poster presentation: 83

Nikolić I, Savić S. Low-energy nanoemulsions for curcumin delivery: investigation of the interfacial phenomena in the colloidal system and peculiarities important for biological performances. In: Symposium of Young Researchers on Pharmaceutical Technology, Biotechnology and Regulatory Science, (2). p. 32. (2020)

Nikolic I, Mitsou E, Papadimitriou V, Lunter D. J, Xenakis A, Daniels R, Savic S. Lecithin-based low-energy nanoemulsions with eucalyptol as a co-stabilizer: interfacial phenomena examination by electron paramagnetic resonance spectroscopy. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 20-11 September 2018; Szeged, Hungary

○ **Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)**

Nikolić I, Mitsou E, Lunter D. J, Papidimitriou V, Xenakis A, Daniels R, Savić S. Drug loading influence on the interfacial membrane dynamics of low-energy nanoemulsions – A curcumin case study. Serbian Congress of Pharmacy with International Participation, 10–13 October 2018; Belgrade, Serbia (Oral communication)

Biografija autora

Ines Nikolić rođena je 5. avgusta 1991. godine u Zadru (Hrvatska). Osnovnu školu *Milan Rakić* i IX gimanziju *Mihailo Petrović Alas* završila je u Beogradu, a na Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala se školske 2010/2011. godine. Tokom školovanja, više puta je bila nagrađivana za svoj uspeh i postignute rezultate na različitim poljima. Bila je i stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka i stipendista Grada Beograda.

Nakon završenih integrisanih akademskih studija, školske 2015/2016. godine upisala se na doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu – modul Farmaceutska tehnologija. Uporedo sa tim, Ines Nikolić je započela i pripravnički staž za farmaceute koji je obavila u javnoj apoteci *Mr Matej Ivanović* (Apoteka Beograd) i u Sektoru za farmaciju Vojnomedicinske akademije u Beogradu, nakon čega je 2016. godine položila stručni ispit za magistre farmacije.

Tokom doktorskih akademskih studija, Ines Nikolić je imala nekoliko istraživačkih boravaka u inostranstvu – na Institutu za farmaceutsku tehnologiju Eberhard-Karls u Tibingenu (Nemačka), na Institutu za medicinsku hemiju Nacionalne helenske istraživačke fondacije u Atini (Grčka), i u Nanobiotehnološkoj laboratoriji Zajedničkog istraživačkog centra Evropske komisije u Ispri (Italija). Njene istraživačke aktivnosti usmerenu su ka razvoju i fizičko-hemijskim i biološkim ispitivanjima nanosistema za isporuku aktivnih supstanci. Angažovana je na nekoliko međunarodnih i nacionalnih projekata sa ovom temom:

- EC Joint Research Center project *Nanoparticle Enabled Medicinal Products: Temptations in the Step-by-Step Characterization (NanoTemptAble)*, u okviru poziva *Open Access to JRC Infrastructures* (2022)
- H2020 projekat (linija Innovative Medicines Initiative) *Neurotoxicity De-Risking in Preclinical Drug Discovery (NeuroDeRisk; 1. mart 2019. godine – 31. avgust 2022. godine)*
- Projekat bilateralne saradnje sa Saveznom Republikom Nemačkom *Innovative nanoformulations for brain/skin delivery* (2020-2021)
- EC Joint Research Center Training and Capacity Building Project *Advanced Training and Capacity Building for In Chemico/In Vitro Studies of Cosmetic Nanomaterials and Nanostructured Products (NanoCosMetrics, 2020)*
- EC Joint Research Center Training and Capacity Building Project *Boosting Capacities for Advanced Characterization of Nano-Dispersed Drug-Delivery Systems (NanoDiction, 2019)*
- Projekat bilateralne saradnje sa Saveznom Republikom Nemačkom *Biosurfactants and biopolysaccharides/fim-forming polymers as cosmetic raw materials and prospective pharmaceutical excipients: formulation of colloidal and film-forming delivery systems* (2017-2018)
- Nacionalni projekat Fonda za nauku Republike Srbije – Ideje: *Neuroimmune aspects of mood, anxiety and cognitive effects of leads/drug candidates acting at GABA_A and/or sigma-2 receptors: In vitro/in vivo delineation by nano- and hiPSCbased platforms* (2022-2024)
- Nacionalni projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije *Razvoj mikro- i nanosistema kao nosačaza lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju* (projekat tehnološkog razvoja 34031; 2015-2019).

Ines Nikolić je zaposlena na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju od školske 2015/2016. godine, prvo kao saradnik u nastavi, zatim kao istraživač na nacionalnom projektu *Razvoj mikro- i nanosistema kao nosačaza lekove sa antiinflamatornim delovanjem i metoda za njihovu karakterizaciju*, a 2018. godine izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Farmaceutska tehnologija.

Učestvovuje u izvođenju praktične nastave na tri obavezna predmeta i jednom izbornom predmetu na integrisanim akademskim studijama (smer Farmacija), na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju:

- Farmaceutska tehnologija 1 (VI semestar, obavezni predmet),
- Farmaceutska tehnologija 2 (VII semestar, obavezni predmet),
- Kozmetologija (IX semestar, obavezni predmet),
- Osnovi farmaceutske biotehnologije (X semestar, izborni predmet).

Od školske 2020/2021. godine, učestvuje u izvođenju praktične nastave na Specijalističkim akademskim studijama – modul Kozmetologija.

Kao deo dodatnih aktivnosti, može se istaći članstvo u Radnoj grupi za nauku i međunarodnu saradnju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, te članstvo u Komisiji za praćenje i unapređenje kvaliteta poslediplomskih studija Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i Komisiji za naučno-istraživački rad studenata Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Ines Nikolić je u sklopu svog usavršavanja pohađala niz obuka iz oblasti biomedicinskih istraživanja, upravljanja istraživačkim projektima, te didaktike u visokom obrazovanju i metodike nastave.

Do sada, Ines Nikolić je autor ili koautor dva poglavlja u monografijama međunarodnog značaja (M14), jednog rada u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a), 10 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jednog rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), jednog rada u međunarodnom časopisu (M23), jednog rada u nacionalnom časopisu (M51) i velikog broja saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima (M33, M34, M64).

Tečno govori engleski i francuski jezik.

U slobodno vreme se bavi sportom, a pored farmacije, veliko interesovanja gaji prema opštoj i kognitivnoj lingvistici.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Инес Николић

Број индекса 15/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Спонтаноемулгујуће наноемулзије за примену куркумина на кожи: истраживање утицаја међуфазних феномена у колоидном систему на ефикасност испоруке и биолошку активност

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 11. марта 2022. године

Инес Николић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Инес Николић

Број индекса 15/2015

Студијски програм Докторске академске студије - модул фармацеутска технологија

Наслов рада Спонтаноемулгујуће наноемулзије за примену куркумина на кожи:
истраживње утицаја међуфазних феномена у колоидном систему на ефикасност испоруке и биолошку активност

Ментор проф. др Снежана Савић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 11. марта 2022. године

Инес Николић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Спонтаноемулгујуће наноемулзије за примену куркумина на кожи:
истраживање утицаја међуфазних феномена у колоидном систему на ефикасност испоруке и биолошку активност

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 11. марта 2022. године

Андре Николић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.