



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLINIČKA MEDICINA

FIZIČKO-HEMIJSKE KARAKTERISTIKE
MEŠOVITIH MICELA SOLI ŽUČNIH KISELINA I
NEJONSKIH SURFAKTANATA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Mihalj Poša

Doc. dr Veljko Krstonošić

Kandidat:

Dejan Ćirin

Novi Sad, 2015. godine

Zahvaljujem se mojim mentorima, prof. dr Poša Mihalju i doc. dr Krstonošić Veljku, na nesebičnoj pomoći i podršci tokom rada na disertaciji, savetima i izdvojenom vremenu tokom naše dosadašnje saradnje.

Zahvaljujem se prof. dr Sakač Mariji na stručnoj pomoći tokom izrade disertacije, kao i na saradnji i podršci tokom mojih doktorskih studija.

Prof. dr Popović Jovanu, prof. dr Čanadi Janošu, prof. dr Milić Nataši, doc. dr Sebenji Ani, doc. dr Grbović Ljubici i doc. dr Milici Atanacković-Krstonošić se zahvaljujem na podršci i korisnim sugestijama tokom izrade disertacije.

Zahvaljujem se na izdvojenom vremenu i saradnji prof. dr Kseniji Kuhajdi.

Prof. dr Erne Kiš mi je nesebično pomogao da napravim početne korake u svetu nauke, zbog čega mu dugujem posebnu zahvalnost.

Zahvaljujem se na saradnji mr Obradović Stoji, mr Lončarević Daliborki, mr Lemić Ivani i Vidakov Zoranu.

Zahvaljujem se mojim roditeljima, bratu, tetki Nadi i Ljubici na podršci i razumevanju tokom mojih doktorskih studija.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dejan Ćirin
Mentori (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Mihalj Poša, vanredni profesor dr Veljko Krstonošić, docent
Naslov rada: NR	Fizičko-hemijske karakteristike mešovitih micela soli žučnih kiselina i nejonskih surfaktanata
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 7/ stranica 108/ slika 33 (zajedno sa grafikonima)/ grafikona 15 / referenci 156/ priloga-)
Naučna oblast: NO	Farmacija
Naučna disciplina: ND	Fizička hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Površinski aktivni agensi; Micele; Žučne kiseline i soli; Polisorbati
UDK	547.93.03/.04
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Surfaktanti imaju značajnu primenu u farmaciji i medicini. Ove supstance se primenjuju u farmakoterapiji, koriste se za solubilizaciju hidrofobnih lekova, a pojedina ispitivanja pokazuju da mogu unaprediti bioraspodivnost određenih aktivnih supstanci. U poslednje vreme se sve više pažnje posvećuje ispitivanju smeša surfaktanata, pošto je utvrđeno da sistemi dva ili više surfaktanta često pokazuju poželjnija svojstva od pojedinačnih surfaktanata za aplikaciju u farmaciji i medicini.</p> <p>U ovoj disertaciji su ispitivani binarni sistemi osam anjona žučnih kiselina i dva nejonska surfaktanta (polisorbat 40 i polisorbat 80). Ciljevi su određivanje vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija ispitivanih smeša surfaktanta, utvrđivanje međudejstva između različitih surfaktanta u njihovim mešovitim micelama, kao i ispitivanje uticaja stukture ispitivanih surfaktanata na fizičko-hemijske karakteristike mešoviti micela. Rezultati pokazuju da ispitivane smeše imaju znatno niže vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija od anjona žučnih kiselina. Smeše anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 imaju manje vrednosti eksperimentalnih kritičnih micelarnih koncentracija, od izračunatih, idealnih, vrednosti, što ukazuje na postojanje sinergističkih interakcija u mešovitim micelama. Smeše anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 imaju uglavnom veće vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija od idealnih</p>

	<p>vrednosti, što može biti posledica postojanja antagonističkih interakcija između gradivnih jedinica mešovityh micela.</p> <p>Vrednosti interakcija, koje dovode do neidealnog ponašanja sistema surfaktanata, su određene računanjem vrednosti interakcionog parametra, $\beta_{1,2}$, prema regular solution theory.</p> <p>Sistemi anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 imaju negativne vrednosti interakcionog parametra, dok sistemi anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 imaju uglavnom pozitivne vrednosti interakcionog parametra.</p> <p>Poređenjem fizičko-hemijskih parametara mešovityh micela je utvrđeno da postojanje privlačnih međudejstava između hidrofilnih delova različitih surfaktanata najverovatnije potiče od vodoničnih veza koje se formiraju između hidrofilnih grupa anjona žučnih kiselina i polioksietilenskih delova. Pozitivne vrednosti $\beta_{1,2}$ parametra su najverovatnije posledica sterno krute <i>cis</i> dvostruke veze oleinske kiseline u molekulu polisorbata 80, usled čega se lipofilni deo ovog nejonskog surfaktanta teže pakuje u jezgru mešovityh micela. Pretpostavlja se da zbog toga dolazi do formiranja dimera anjona žučnih kiselina u mešovityim micelama u kojima se javljaju odbojne interakcije između negativno naelektrisanih karboksilatnih grupa.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	15.11.2012.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: prof. dr Marija Sakač, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, član: prof. dr Jovan Popović, redovni profesor, Medicinski fakultet u Novom Sadu, član: prof. dr Janoš Čanadi, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu član: prof. dr Nataša Milić, vanredni profesor, Medicinski fakultet u Novom Sadu, član: doc. dr Ana Sebenji, docent, Medicinski fakultet u Novom Sadu

University of Novi Sad
ACIMSI
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Dejan Ćirin
Mentors: MN	Dr Mihalj Poša, Associate Professor Dr Veljko Krstonošić, Assistant Professor
Title: TI	Physico-chemical properties of mixed micelles of salts of bile acids and nonionic surfactants
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	srp. / eng.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Number of chapters 7 / pages 108 / figures 33 (including graphs)/ graphs 15/ references 156 / appendix-
Scientific field SF	Pharmacy
Scientific discipline SD	Physical chemistry
Subject, Key words SKW	Surface-Active Agents; Micelles; Bile Acids and Salts; Polysorbates
UC	547.93.03/.04
Holding data: HD	Library of the Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	<p>Surfactants have important application in pharmacy and medicine. These substances are applied in pharmacotherapy, they are used for hydrophobic drug solubilisation, and certain investigations indicate they can improve bioavailability of certain active substances. Lately, investigations of surfactant mixtures have gained a lot of attention, since it was found that systems of two or more surfactants often show more desirable properties than the individual surfactants, for application in pharmacy and medicine.</p> <p>In this dissertation, binary systems of eight bile acid anions and two nonionic surfactants (polysorbate 40 and polysorbate 80) were investigated. The aims were to determine values of critical micelle concentrations of investigated surfactant mixtures, interactions between different surfactants in their mixed micelles, and to investigate the influence of the structure of investigated surfactants on physico-chemical characteristics of mixed micelles. The results indicate that investigated mixtures have significantly lower values of critical micelle concentrations than bile acid anions. Mixtures of bile acid anions and polysorbate 40 have lower values of experimentally obtained critical micelle concentrations than the calculated, ideal, values, indicating the existence of synergistic</p>

	<p>interactions in mixed micelles. Mixtures of bile acid anions and polysorbate 80 have mainly higher values of critical micelle concentrations than the ideal values, what could be due to the existence of antagonistic interactions between building units of mixed micelles.</p> <p>The values of the interactions, attributing to the nonideal behaviour of the surfactant systems were obtained by calculating the values of the interaction parameter, $\beta_{1,2}$, according to the regular solution theory. Systems of bile acid anions and polysorbate 40 have negative values of the interaction parameter, while systems of bile acid anions and polysorbate 80 have mainly positive values of interaction parameter.</p> <p>By comparing the physico-chemical parameters of mixed micelles, it was determined that existence of attractive interactions between hydrophilic parts of different surfactants most probably originates from the hydrogen bonds, which are formed between hydrophilic groups of bile acid anions and polyoxyethylene parts. Positive values of $\beta_{1,2}$ parameter are most probably due to sterically rigid <i>cis</i> double bond of oleic acid in polysorbate 80 molecule, causing the lipophilic tail of this nonionic surfactant to pack less easily in the core of mixed micelles. It is hypothesised that this influences formation of dimers of bile acid anions in mixed micelles, where repulsive interactions emerge between negatively charged carboxylate groups.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	15.11.2012.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Dr. Marija Sakač, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, member: Dr. Jovan Popović, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, member: Dr. Janos Csanady, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, member: Dr. Nataša Milić, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, member: Dr. Ana Sebenji, Assistant Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1. Definicija i opšta struktura amfifila	4
2.1.1. Ponašanje amfifila u vodi	5
2.2. Nejonski surfaktanti	8
2.3. Jonski surfaktanti	11
2.3.1. Anjoni žučnih kiselina	11
2.3.1.1. Struktura žučnih kiselina	11
2.3.1.2. Rasprostranjenost i raznolikost žučnih kiselina.....	12
2.3.1.3. Sinteza i raznolikost žučnih kiselina u organizmu	12
2.3.1.4. Uticaj strukture žučnih kiselina na hidrofилne/lipofilne osobine (amfifilnost).....	16
2.3.1.4.1. Uticaj orijentacije hidrofилnih grupa steroidnog skeleta na polarnost.....	16
2.3.1.4.1.1. Promena polarnosti usled oksidacije.....	17
2.3.1.5. Uticaj strukture anjona žučnih kiselina na vrednost kritične micelarne koncentracije	17
2.3.1.6. Uticaj strukture anjona žučnih kiselina na toksičnost.....	17
2.3.1.7. Micele anjona žučnih kiselina i značaj vodoničnih veza na formiranje njihovih agregata	18
2.3.1.8. Mešovite micide anjona žučnih kiselina i značaj vodoničnih veza na formiranje njihovih agregata	19
2.3.1.9. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika smeša surfaktanata i njihov značaj za modelovanje agregata smeša surfaktanata.....	21
2.3.1.9.1. Ispitivanja sistema anjona žučnih kiselina i nejonskih surfaktanata	22
2.3.2. Značaj mešovitih micela anjona žučnih kiselina i žučnih soli u farmaciji i medicini	24
2.4. Modeli binarnih smeša surfaktanata	26
2.4.1. Model fazne separacije	26
2.4.1.1. Modeli idealnih smeša	26
2.4.1.2. Modeli neidealnih smeša	31
2.4.1.2.1. Rubing-Holandov model.....	32
2.4.2. Modeli aktivnosti masa	36

3. CILJEVI I HIPOTEZE	37
4. MATERIJAL I METODE	38
4.1. Materijal.....	38
4.2. Metode	39
4.2.1. <i>Merenja provodljivosti.....</i>	39
4.2.2. <i>Merenja površinskog napona.....</i>	39
4.2.3. <i>Spektrofluorimetrijska merenja</i>	39
5. REZULTATI I DISKUSIJA	41
5.1. Određivanje vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija	41
5.1.1. <i>Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija čistih surfaktanata.....</i>	45
5.2. Fizičko-hemijske karakteristike mešovitih micela anjona žučnih kiselina i polisorbata ..	46
5.2.1. <i>Određivanje fizičko-hemijskih parametara.....</i>	46
5.2.2. <i>Smeše anjona žučnih kiselina i polisorbata 40</i>	46
5.2.2.1. <i>Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija</i>	46
5.2.2.2. <i>Molski udeli i koeficijenti aktivnosti polisorbata 40 i anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama.....</i>	48
5.2.2.3. <i>Međudejstva između gradivnih jedinica mešovitih micela anjona žučnih kiselina i polisorbata 40.....</i>	51
5.2.2.3.1. <i>Analiza vrednosti interakcionog parametra.....</i>	54
5.2.2.3.2. <i>Uticaj broja hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra.....</i>	56
5.2.2.3.3. <i>Uticaj orijentacije hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra</i>	57
5.2.2.3.4. <i>Uticaj sternih faktora na vrednost interakcionog parametra.....</i>	59
5.2.2.3.5. <i>Uticaj oksidacije hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra</i>	60
5.2.2.3.6. <i>Uticaj vicinalnih hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra.....</i>	63
5.2.2.4. <i>Uticaj strukture anjona žučnih kiselina na termodinamičku stabilizaciju mešovitih micela.....</i>	64
5.2.2.5. <i>Ispitivanje micelarnih karakteristika pojedinih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 - spektrofluorimetrijskim merenjima</i>	66
5.2.3. <i>Smeše anjona žučnih kiselina i polisorbata 80</i>	67
5.2.3.1. <i>Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija</i>	67
5.2.3.2. <i>Molski udeli i koeficijenti aktivnosti polisorbata 80 i anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama.....</i>	69
5.2.3.3. <i>Međudejstva između gradivnih jedinica mešovitih micela anjona žučnih kiselina i polisorbata 80.....</i>	72

5.2.3.3.1. Analiza vrednosti interakcionog parametra.....	72
5.2.3.3.2. Uticaj strukture anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 na vrednost interakcionog parametra.....	74
5.2.3.3.3. Uticaj vicinalnih hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra.....	77
5.2.3.3.4. Uticaj oksidacije hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra	79
5.2.3.4. Uticaj strukture anjona žučnih kiselina na termodinamičku stabilizaciju mešovitih micela.....	79
5.2.4. Poređenje binarnih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 sa binarnim sistemima anjona žučnih kiselina i polisorbata 80	82
6. ZAKLJUČAK	89
7. LITERATURA	93

1. UVOD

Surfaktanti su supstance dvojne prirode, jer sadrže hidrofilni i hidrofobni deo, zbog čega imaju višestruku primenu u farmaciji i medicini.

Složeni agregati surfaktanata u vodi – micela, povećavaju rastvorljivost hidrofobnih supstanci u ovom rastvaraču [1,2], zbog čega se primenjuju u farmaceutskim formulacijama u cilju dobijanja vodenih rastvora hidrofobnih lekova [3-5]. Pored toga, agregati surfaktanata pomažu prolazak hidrofilnih lekova kroz biološke barijere [6], zbog čega se ispituje mogućnost upotrebe surfaktanata za unapređenje biorasploživosti aktivnih supstanci (posebno hidrofilnih makromolekula) [7-9].

Agregacija surfaktanata i karakteristike micela su predmet ispitivanja više decenija [10-13]. Kako bi se unapredila efikasnost micela i smanjila neželjena dejstva micelarnih rastvora, naučna zajednica veliku pažnju posvećuje ispitivanju agregata dva ili više različita surfaktanta, koji se nazivaju mešovite micela [13-15]. Naime, mešovite micela često imaju značajno drugačija fizičko-hemijska svojstva od jednokomponentnih micela [16-19], zbog čega se variranjem vrste i udela surfaktanata mogu dobiti mešovite micela poželjnijih osobina od micela građenih samo od istih molekula. Na primer, poznato je da smeše surfaktanata često pokazuju bolje solubilizacione karakteristike od rastvora pojedinačnih površinski aktivnih materija (PAM) [20-25]. Ova pojava je često posledica međudejstava između strukturno različitih gradivnih jedinica mešovitih micela koja dovode do formiranja agregata složene građe u koje potencijalno može da se ugradi veći broj hidrofobnih molekula nego u jednokomponentne micela [23-25]. Pojedine studije pokazuju da bi smeše surfaktanata mogle da se koriste za unapređenje biorasploživosti lekova, prilikom oralne aplikacije [26-28]. Takođe, poznato je da se membranotoksičnost hidrofobnih surfaktanata može smanjiti njihovim kombinovanjem sa hidrofilnijim amfifilima [29]. Prema tome, postoji više razloga zbog kojih je ispitivanje smeša različitih surfaktanata bitno za farmaciju i medicinu.

Među najčešće ispitivanim sistemima su smeše anjona žučnih kiselina ili žučnih soli i lecitina [30-36]. Iako je cilj ovih fizičko-hemijskih ispitivanja bio da se otkrije mehanizam kojim se žučne soli udružuju u složene agregate sa lecitinom i solubilizuju lipide u organizmu i time omogućavaju odvijanje određenih fizioloških procesa, u kasnijim istraživanjima pažnja je

više bila usmerena na razvoj efikasnijih farmaceutskih formulacija, odnosno pronalaženje smeša surfaktanata sa boljim solubilizacionim osobinama [20,21], koje unapređuju farmakokinetičke parametre lekova [26-28].

Određeni komercijalni farmaceutski preparati sadrže teško rastvorljivu aktivnu supstancu solubilizovanu u mešovitim micelama lecitina i žučnih soli.

Konakion[®] MM (Roche) predstavlja vodeni rastvor vitamina K₁, u kome je ovaj liposolubilni vitamin solubilizovan u mešovitim micelama lecitina i anjona glikoholne kiseline [4]. Mešovite micle lecitina i glikoholata se koriste za solubilizaciju hidrofobne aktivne supstance i u preparatu Valium[®] MM (Roche), koji predstavlja vodeni rastvor diazepama [5]. Zainteresovanost naučne zajednice za ispitivanje žučnih kiselina, odnosno njihovih anjona, je opravdana iz više razloga. Anjoni žučnih kiselina su surfaktanti steroidne osnove, zbog čega imaju znatno drugačije amfifilne osobine od klasičnih surfaktanata [10,37]. Anjoni konjugata žučnih kiselina imaju značajnu ulogu u regulisanju homeostaze holesterola [38], transportu holesterola iz jetre u tanko crevo [39], digestiji lipida iz namirnica [40,41]. Pored toga, anjoni žučnih kiselina se koriste u farmakoterapiji određenih bolesti [42], njihove smeše sa drugim amfifilima uglavnom imaju veći solubilizacioni kapacitet od pojedinačnih anjona žučnih kiselina [20,21], a takođe se već duže vreme ispituje i mogućnost njihove primene na unapređenju biorasploživosti lekova [8,9].

Od nejonskih surfaktanata, polisorbati spadaju među najčešće ispitivane surfaktante [43-50]. Polisorbati su surfaktanti klasične građe (polarna glava/hidrofobni rep), koji se u farmaceutskim formulacijama koriste kao solubilizatori [3], kao i za povećanje stabilnosti disperznih sistema [43-46]. Tokom poslednje decenije aktuelizovana su ispitivanja polisorbata zbog otkrića da ove supstance inhibiraju ćelijski mehanizam izbacivanja lekova preko glikoproteina permeabilnosti (P-gp), zbog čega bi polisorbati mogli posedovati sposobnost unapređenja biorasploživosti lekova [48-50].

Imajući u vidu prethodno navedena svojstva žučnih kiselina i polisorbata, i uzimajući u obzir da smeše anjona žučnih kiselina i klasičnih amfifila često pokazuju poželjnije osobine od pojedinačnih surfaktanata, u ovoj disertaciji su ispitivani binarni sistemi anjona osam žučnih kiselina i dva polisorbata (polisorbat 40 i polisorbat 80).

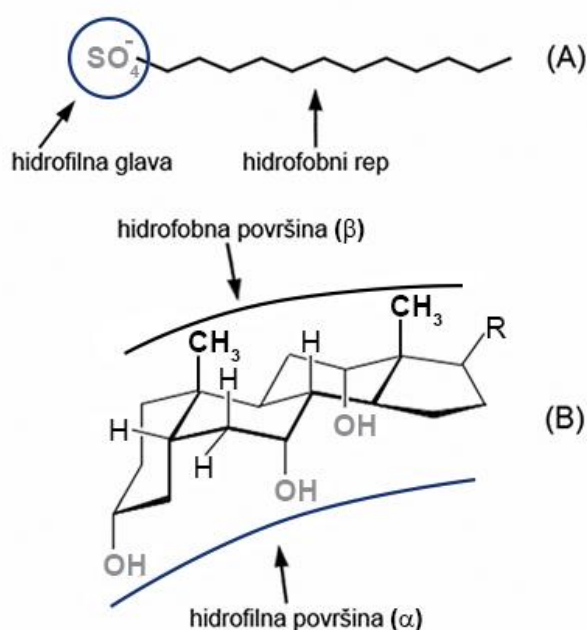
Ciljevi ove disertacije su određivanje vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija (*kmk*) ispitivanih smeša i ispitivanje međudejstava između gradivnih jedinica mešovitih micela, kao i ostalih fizičko-hemijskih parametara ovih sistema. Naime, vrednosti *kmk* surfaktanata, odnosno njihovih smeša, je neophodno poznavati, jer se tek na ovim koncentracijama odigrava solubilizacija aktivnih supstanci koje su teško rastvorljive u vodi [51]. Takođe, na osnovu vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija su određena fizičko-hemijska svojstva mešovitih micela, što predstavlja polaznu osnovu za razumevanje mehanizama kojim smeše surfaktanata mogu unaprediti rastvorljivost lekova [29], i njihovu bioraspoloživost [6].

2. OPŠTI DEO

2.1. DEFINICIJA I OPŠTA STRUKTURA AMFIFILA

Amfifili su jedinjenja specifične građe koja se sastoje od polarnog i nepolarnog dela, zbog čega ove supstance imaju difilni (amfifilni) karakter [51,52]. Polarni deo teži da se rastvara u vodi, dok nepolarni deo ima afinitet ka organskim tečnostima [51,53]. Zbog difilnih osobina, amfifili se adsorbuju na granici faza, pri čemu se surfaktanti orijentišu tako da hidrofilni deo ostaje u polarnoj fazi, dok je lipofilni deo istisnut ka nepolarnoj fazi [51,53]. Zbog osobine da se adsorbuju na granici faza, tj. da pokazuju površinsku aktivnost, nazivaju se i površinski aktivne materije, odnosno surfaktanti [51]. Prema prirodi polarnog dela, surfaktanti se dele na nejonske, anjonske, katjonske i amfoterne [52,53].

Hidrofilni deo se naziva i polarna glava [51], i građen je od polarnih atomskih grupa, dok se hidrofobni deo koji je uglavnom alifatične konformacije [52], naziva i nepolarni rep (**Slika 1(A)**) [51].



Slika 1. Molekularna građa klasičnih surfaktanata (A) i surfaktanata biplanarne građe (B)

Pored ove karakteristične građe, koja je zajednička za većinu surfaktanata, amfifili mogu biti i biplanarne građe [54]. Ovi surfaktanti sadrže hidrofobne i hidrofilne grupe grupisane u dve površine različite polarnosti, jednu površinu hidrofobnijeg karaktera, a drugu hidrofilnijeg, odnosno manje hidrofobnog karaktera [54]. Uglavnom se sastoje od osnove steroidne strukture, koja se naziva i steroidni nukelus [54], za koju su vezane hidrofilne i hidrofobne grupe, od kojih potiču difilne osobine ovih surfaktanata. Najzastupljeniji surfaktanti planarne polarnosti su anjoni žučnih kiselina, odnosno žučne soli (**Slika 1(B)**) [54].

Surfaktanti pokazuju jedinstveno ponašanje u vodenom rastvoru, jer se na granici faza adsorbuju, a u unutrašnjosti sistema formiraju agregate [51,52].

2.1.1. PONAŠANJE AMFIFILA U VODI

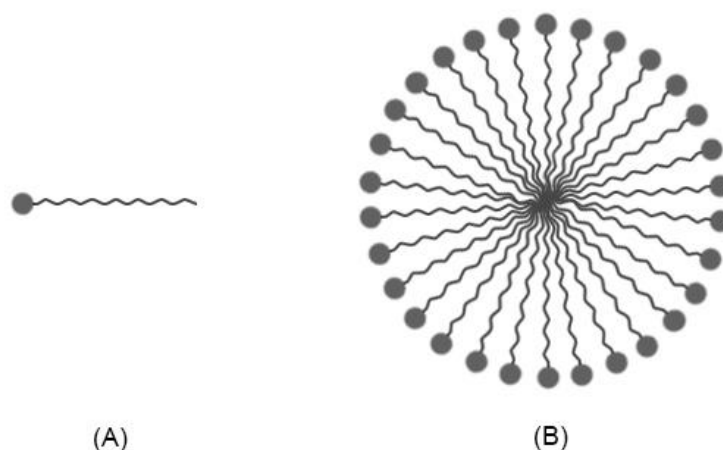
Pošto su amfifili supstance dvojne prirode, znatno se drugačije ponašaju u vodi od hidrofilnih i hidrofobnih supstanci [51,52].

Sa stanovišta termodinamike, ponašanje nepolarnih supstanci, pa samim tim i supstanci koje sadrže hidrofobne i hidrofilne grupe (surfaktanti) u vodi, na 25 °C, je u najvećoj meri entropijski usmereno [55,56]. Dodatkom nepolarnih supstanci, u vodi dolazi do smanjenja entropije i povećanja nestabilnosti sistema, zbog čega se sistem „ophodi“ prema nepolarnim molekulima u cilju povećanja ukupne entropije, odnosno stabilnosti sistema. Naime, kada su amfifili prisutni u vodi u obliku pojedinačnih molekula, „monomera“, oko njih dolazi do nagomilavanja molekula rastvarača, pri čemu se molekuli vode stabilizuju formiranjem vodoničnih veza sa hidrofilnim delom surfaktanta [57,58].

Međutim, molekuli vode nemaju afinitet ka nepolarnom delu surfaktanta, zbog čega oko njega formiraju uređeni omotač [55,58], u kome imaju manju pokretljivost nego ostali molekuli rastvarača [55,58]. Sloj molekula vode, odnosno mreža vodoničnih veza, se u literaturi naziva i „konveksni kavez“ [55]. Zbog smanjenja pokretljivosti molekula rastvarača, u sistemu surfaktanta i vode dolazi do opadanja entropije, što dovodi do povećanja Gibsove slobodne energije sistema, odnosno smanjenja njegove stabilnosti [58]. Prema tome, sa povećanjem koncentracije amfifila u vodi, odnosno sa povećanjem koncentracije hidrofobnih površina u vodi, povećava se i destabilizacija sistema usled povećanja koncentracije nestabilisanih molekula vode [58]. Zbog toga raste i težnja za izbacivanjem hidrofobnih

delova molekula amfifila iz sistema, kako bi se oslobodili molekuli vode iz solvacionog sloja oko hidrofobnog dela surfaktanta, povećala entropija sistema, odnosno smanjila Gibsova slobodna energija i sistem preveo u termodinamički stabilnije stanje [52,58]. Težnja molekula vode da izbací nepolarni deo PAM naziva se „hidrofobni efekat“ [59]. Posledica ovog efekta je adsorpcija amfifila na granici faza, a potom i stvaranje agregata (micela) u unutrašnjosti sistema [51]. Na granici faza, surfaktanti se orijentišu tako da polarni deo ostaje u vodi, dok se nepolarni deo potiskuje izvan polarne faze [51,52]. Adsorpcijom surfaktanata na granici faza dolazi do povećanja entropije sistema usled razrušavanja „kaveza“, odnosno oslobađanja molekula vode iz uređenog sloja oko hidrofobnog dela [58]. Pored toga, usled zamene molekula vode u površinskom sloju (odnosno na granici faza) sa amfilima dolazi i do smanjenja slobodne površinske energije (energije na granici faza) [52], usled čega dolazi do smanjenja Gibsove slobodne energije [52]. Prema tome, proces adsorpcije amfifila na granici faza je spontan proces jer je praćen porastom entropije i opadanjem entalpije sistema, zbog čega dolazi do smanjenja Gibsove slobodne energije [58].

Kada se granična površina zasiti surfaktantima, povećava se njihova koncentracija u vodi, pri čemu se formiraju predmicelarne strukture, odnosno agregati ovih amfifila, dimeri [51]. U agregatima molekuli surfaktanata se najčešće orijentišu tako da su njihove hidrofobne površine u što manjem kontaktu sa molekulima vode [52,59], kako bi se smanjio broj destabilizovanih molekula rastvarača u sistemu [60], odnosno kako bi se povećala entropija sistema [56]. Sa daljim povećanjem koncentracije surfaktanata, dolazi do formiranja većih agregata koji se nazivaju micide [51]. Na **Slici 2** je prikazana građa sfernih micela. U micelama su hidrofobni repovi surfaktanata orijentisani ka unutrašnjosti micela (micelarnom jezgru), dok su polarne glave orijentisane ka vodenoj fazi (na površini) [51,52].



Slika 2. Shematski prikaz surfaktanta (A) i sferne micelle (B)

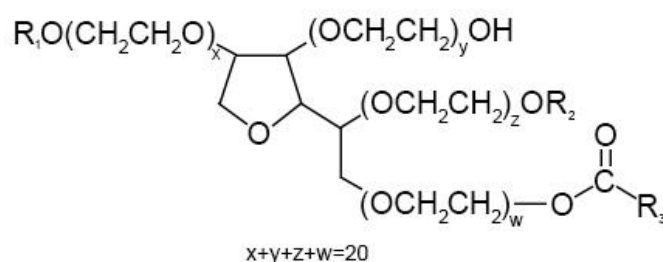
U micelarnom jezgru se između hidrofobnih repova, javljaju disperzione sile, koje predstavljaju kohezivne sile koje stabilizuju agregate [51,56,60].

Pri tome, koncentracija surfaktanta pri kojima se micelle mogu smatrati formiranim, naziva se kritična micelarna koncentracija [61].

Prilikom formiranja micela, slično kao i prilikom adsorpcije na granici faza i formiranja manjih agregata, molekuli vode se oslobađaju iz „kaveza“, tj. solvacionog sloja oko hidrofobnog dela surfaktanta, čime se povećava entropija sistema [60]. Ovo povećanje entropije sistema je znatno veće od smanjenja entropije koje je posledica uređenog pakovanja surfaktanata u agregate [60], zbog čega se u literaturi često navodi da je proces asocijacije surfaktanata entropijski vođen [55,56,62]. Pored toga, povećanju entropije sistema prilikom formiranja micela delimično može da doprinese i povećanje stepena rotacione slobode surfaktanata kada su prisutni u micelama, u odnosu na stanje kada su prisutni u vodi u obliku „monomera“ [56].

2.2. NEJONSKI SURFAKTANTI

Nejonski surfaktanti su surfaktanti koji ne disosuju na jone u vodenoj sredini [63]. Za njih je karakteristično da zbog odsustva naelektrisanja formiraju miclele pri nižim koncentracijama od jonskih surfaktanata [51]. Nejonski surfaktanti se smatraju za najmanje iritantne surfaktante [64], zbog čega se često koriste u kozmetičkim [63] i farmaceutskim formulacijama [43-46]. Pored toga, često se koriste u kozmetičkim preparatima u cilju smanjenja iritantnosti anjonskih surfaktanata [64]. Među najčešće korišćene predstavnike ove grupe PAM spadaju estri polioksietilenskog sorbitana i viših masnih kiselina, koji se po farmakopeji nazivaju polisorbati [65], dok se u literaturi često nazivaju Tween surfaktanti [52, 66-68]. Opšta hemijska struktura polisorbata je prikazana na **Slici 3**. Polarnu glavu predstavlja polihidroksilni alkohol, sorbitan, za koga su etarskim vezama vezana četiri oksietilenska niza [65]. U molekulima polisorbata, je prisutno oko dvadeset oksietilenskih, - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$ - grupa [65]. Hidrofobni deo predstavljaju više masne kiseline koje su estarskim vezama vezane za oksietilenske nizove, odnosno polarni deo [65].



hemijski naziv	R ₁	R ₂	R ₃
polioksietilen (20) sorbitan monolaurat	H	H	C ₁₁ H ₂₃
polioksietilen (20) sorbitan monopalmitat	H	H	C ₁₅ H ₃₁
polioksietilen (20) sorbitan monostearat	H	H	C ₁₇ H ₃₅
polioksietilen (20) sorbitan monooleat	H	H	C ₁₇ H ₃₃
polioksietilen (20) sorbitan trioleat	C ₁₇ H ₃₃ CO	C ₁₇ H ₃₃ CO	C ₁₇ H ₃₃

Slika 3. Opšta hemijska struktura polisorbata [52, 65]

U **Tabeli 1** je dat pregled određenih polisorbata.

Tabela 1. Primeri polisorbata [52, 65]

hemijski naziv	farmakopejski naziv	trgovački naziv
polioksietilen (20) sorbitan monolaurat	polisorbat 20	Tween [®] 20
polioksietilen (20) sorbitan monopalmitat	polisorbat 40	Tween [®] 40
polioksietilen (20) sorbitan monostearat	polisorbat 60	Tween [®] 60
polioksietilen (20) sorbitan monooleat	polisorbat 80	Tween [®] 80
polioksietilen (20) sorbitan trioleat	polisorbat 85	Tween [®] 85

Dvocifreni broj koji se nalazi u farmakopejskom i trgovačkom nazivu polisorbata, označava koja masna kiselina, odnosno ostatak koje masne kiseline je vezan za polarnu glavu, kao i broj ostataka te masne kiseline. Pri tome, druga cifra tog broja je rezervisana za broj ostataka masne kiseline (broj 0 se odnosi na jedan ostatak masne kiseline, a broj 5 na tri). Na primer, broj 40 označava da je za polarni deo vezan jedan ostatak palmitinske kiseline, broj 80 označava jedan ostatak oleinske kiseline, a broj 85 tri ostatka oleinske kiseline vezana za polarnu glavu [52, 65].

Zbog velikog udela polarnog dela u molekulu amfifila, polisorbati imaju visok HLB broj, rastvorljivi su u vodi [52] i spadaju u U/V emulgatore [43,46,67-71]. Ovi surfaktanti se nalaze u namirnicama, kozmetičkim i farmaceutskim preparatima [52]. Najčešće se koriste kao solubilizatori i za stabilizaciju disperznih sistema [3,43-46,66-71].

Iako se ove supstance u farmaceutskim formulacijama koriste pre svega kao inertne materije, odnosno za solubilizaciju i stabilizaciju disperznih sistema [3,43-46], novija istraživanja pokazuju da ove supstance mogu povećati bioraspoloživost lekova [48-50].

Naime, u prethodnim studijama je utvrđeno da polisorbati spadaju u inhibitore glikoproteina permeabilnosti [49,50]. Glikoprotein permeabilnosti je glikoprotein plazma membrane koji

učestvuje u aktivnom izbacivanju ksenobiotika (aktivnih supstanci) izvan ćelija, čime smanjuje biorasploživost velikog broja lekova [49,50].

Inhibitori glikoproteina permeabilnosti su supstance koje unapređuju transport lekova kroz biološke membrane tako što inhibiraju ovaj mehanizam izbacivanja lekova, povećavajući apsorpciju, tj. biorasploživost, lekova koji su supstrati ovog glikoproteina [72].

2.3. JONSKI SURFAKTANTI

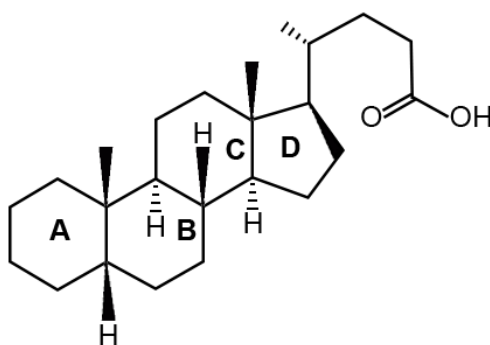
Jonski surfaktanti su supstance koje sadrže polarne grupe koje disosuju u vodi, zbog čega postaju jonizovane u ovom rastvaraču [63]. U zavisnosti od toga da li amfifilni deo sadrži negativno ili pozitivno naelektrisanje u vodenoj sredini, razlikuju se anjonski i katjonski surfaktanti. Određeni anjonski surfaktanti, kao što je Na-laurilsulfat spadaju u poznate iritanse [63]. Međutim, pri formulisanju određenih kozmetičkih i farmaceutskih preparata, anjonski surfaktanti imaju prednost zbog bolje penivosti [63]. Takođe, poznato je da smeše anjonskih i nejonskih surfaktanata imaju dobre solubilizacione osobine [20,21,47], a pojedine smeše ovih surfaktanata se nalaze i u komercijalnim farmaceutskim formulacijama [4,5].

Pored toga, u više studija je utvrđeno da anjonski surfaktanti imaju sposobnost unapređenja prolaska određenih lekova kroz biološke membrane [8,9,73-79], zbog čega postoji mogućnost primene ovih surfaktanata na unapređenju bioraspoloživosti lekova.

2.3.1. ANJONI ŽUČNIH KISELINA

2.3.1.1. Struktura žučnih kiselina

Žučne kiseline predstavljaju molekule raznovrsne strukture, građene od krute steroidne osnove (steroidnog skeleta), sa četiri ugljovodonična prstena (koja se uobičajeno označavaju slovima A, B, C, D, sa leva na desno), za koju su vezane hidroksilne i metil grupe i jedan fleksibilan alifatični niz koji se završava karboksilnom grupom (**Slika 4**) [80].



Slika 4. Molekulska struktura 5β-holanske kiseline

Na steroidnom skeletu se razlikuje konkavna (α) i konveksna (β) strana (površina) (**Slika 1B**) [54]. Pošto su ka konkavnoj strani uglavnom orijentisane hidroksilne grupe, ova strana je hidrofilna (manje hidrofobna), dok je β strana, ka kojoj su postavljene metil grupe, hidrofobnih osobina [54].

Površina steroidnog skeleta koja razdvaja hidrofilnu i lipofilnu stranu se naziva srednja ravan steroidnog skeleta (SRSS) [81,82].

Atomi, odnosno atomske grupe, mogu biti orijentisani normalno na srednju ravan steroidnog skeleta, pa se u tom slučaju nazivaju aksijalne (*a*), ili mogu biti orijentisane pod uglom od 30° , i u tom slučaju se nazivaju ekvatorijalne (*e*) [81,82].

U organizmu sisara su najzastupljeniji derivati 5β -holanske kiseline koji se međusobno razlikuju po poziciji, broju, i orijentaciji hidrofilnih grupa vezanih za steroidni nukleus [83,84,85].

2.3.1.2. Rasprostranjenost i raznolikost žučnih kiselina

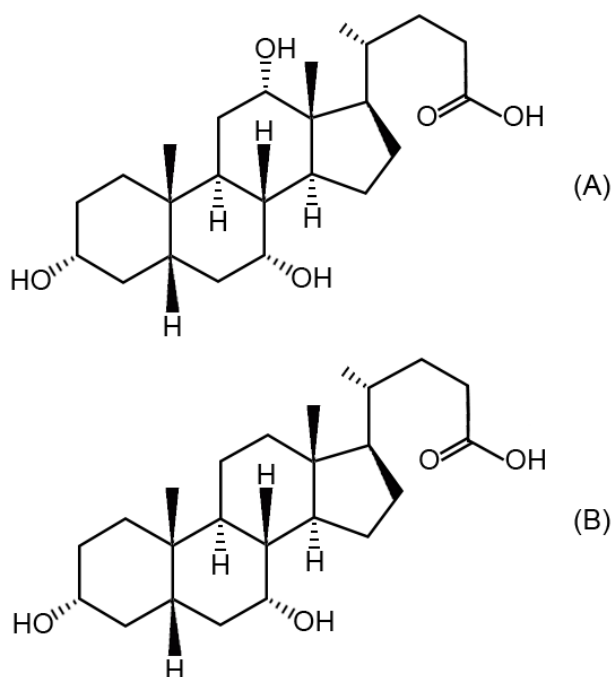
Žučne kiseline su zastupljene u žuči sisara, i ostalih kičmenjaka [84,85]. Primarne žučne kiseline sintetiše jetra, dok sekundarne nastaju od primarnih, mikrobiološkom transformacijom u digestivnom traktu [86].

Strukturna raznovrsnost žučnih kiselina u prirodi je u najvećoj meri posledica postojanja različitih biohemijskih pravaca za eliminaciju holesterola iz organizma koji su se razvili tokom evolucije kod različitih životinjskih vrsta, kao i zbog toga što su ova organska jedinjenja podložna enzimatskoj mikrobiološkoj transformaciji u digestivnom traktu kičmenjaka [84,85]. Diverzitet se javlja u pogledu različite stereochemije veze A i B prstena, različite pozicije, orijentacije i broja hidroksi i okso grupa, i u pogledu dužine, zasićenosti i prisustva supstituenata na bočnom ugljovodoničnom lancu [84,85].

2.3.1.3. Sinteza i raznolikost žučnih kiselina u organizmu

Žučne kiseline se sintetišu u jetri od holesterola, procesom koji predstavlja glavni put eliminacije ovog lipida iz organizma [38, 86]. Početni korak u razgradnji holesterola je

njegova oksidacija do 7α -hidroksiholesterola [87]. Ovaj proces, kojim se uvodi hidroksilna grupa na sedmom ugljenikovom atomu je katalizovan mikrozomalnim enzimima jetre [88]. Žučne kiseline koje se na ovaj način sintetišu u žuči sisara su derivati 5β -holanske kiseline [37]. Kod većine sisara, pa i ljudi, u jetri se od holesterola sintetišu dve žučne kiseline: holna i henodeoksiholna kiselina [86], (Slika 5), koje se u literaturi nazivaju primarne žučne kiseline [84-86].



Slika 5. Molekulska struktura primarnih žučnih kiselina kod ljudi (holna (A) i henodeoksiholna kiselina (B))

Nakon sinteze, žučne kiseline se u hepatocitima konjuguju sa glicinom i taurinom [86]. Nastali N-acetil konjugati predstavljaju jake kiseline, zbog čega su u žuči i tankom crevu u jonizovanom obliku [84], pa se u literaturi nazivaju žučne soli [86,89,90].

Žučne soli se iz hepatocita izlučuju u žučne puteve [91], gde učestvuju u transportu holesterola i obezbeđuju protok žuči do intestinalnog trakta, odnosno mesta gde se odigrava

varenje [39]. Epitel žučnih puteva i tankog creva je uglavnom nepropustan za anjone konjugata žučnih kiselina, zbog čega je moguće njihovo koncentrisanje u tankom crevu [84]. Žučne soli, odnosno njihove micelle, imaju slabu sposobnost solubilizacije holesterola [92]. Međutim, žučne soli u žuči formiraju mešovite micelle sa fosfolipidima, koje imaju značajno veći solubilizacioni kapacitet od micela građenih samo od žučnih soli, zahvaljujući čemu je omogućena solubilizacija holesterola i protok žuči [39]. Smatra se da žučne soli zahvaljujući deterđentnim svojstvima imaju i antimikrobnu ulogu u digestivnom traktu [39].

U intestinalnom traktu, žučne soli pomažu digestiju lipida i učestvuju u njihovoj apsorpciji [40,41,93].

Naime, u tankom crevu se pod dejstvom pankreasne lipaze, na površini masnih kapi građenih uglavnom od triglicerida, formiraju monogliceridi i masne kiseline [94]. Žučne soli formiraju mešovite micelle i solubilizuju ove proizvode lipolize, i transportuju ih do epitela creva, gde se lipidi apsorbuju [40,41,93,94]. Pored toga, zahvaljujući formiranju ovih mešoviti micela, moguća je i efikasnija solubilizacija i resorpcija holesterola i liposolubilnih vitamina, pošto mešovite micelle žučnih soli i monoglicerida, odnosno anjona masnih kiselina, imaju veći kapacitet solubilizacije lipida od micela građenih samo od žučnih soli [94].

Prema tome, zahvaljujući osobini žučnih soli da formiraju micelle, odnosno mešovite micelle sa monogliceridima i anjonima masnih kiselina, verovatno je enzimima u tankom crevu omogućen pristup preostalim količinama triglicerida, odnosno omogućeno je nesmetano odigravanje varenja hrane. Pored toga, žučne soli formiranjem mešoviti micela ubrzavaju transport proizvoda lipolize, difuzijom kroz mukusni, hidrofilni, sloj tankog creva [39,95], čime se ubrzava resorpcija lipida prisutnih u lumenu tankog creva.

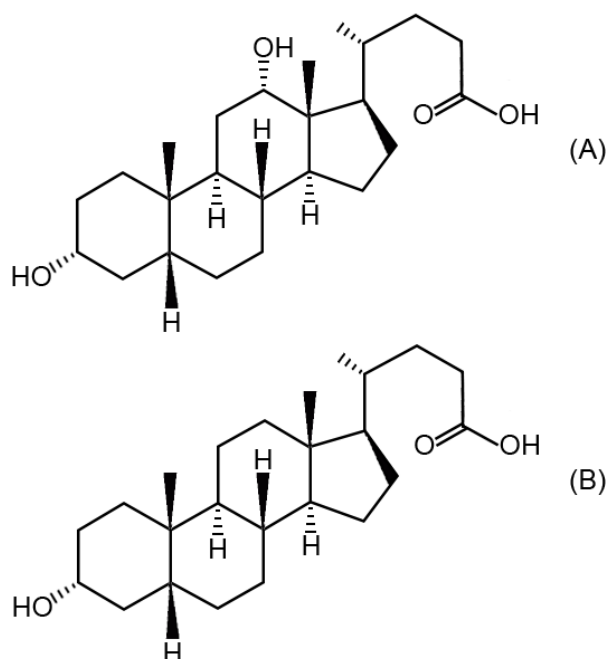
Formiraje mešoviti micela žučnih soli sa anjonima masnih kiselina i monogliceridima se odigrava u duodenumu i jejunumu [89]. Ovo je deo tankog creva u kome dolazi do apsorpcije masti [96].

Žučne soli se u većim količinama apsorbuju tek u ileumu, čime se u duodenumu i jejunumu obezbeđuje dovoljna koncentracija žučnih soli za solubilizaciju i apsorpciju preostale količine lipida [89, 94].

U lumenu creva, pod uticajem enzima bakterija, od primarnih žučnih kiselina nastaju sekundarne žučne kiseline [86]. Najverovatnije prvo dolazi do hidrolize konjugata žučnih

kiselina, zbog čega su u fecesu čoveka i životinja izolovane slobodne primarne žučne kiseline [97, 98].

U procesu enzimatske razgradnje, primarne žučne kiseline podležu dehidroksilaciji na 7α poziciji, zbog čega od holne nastaje deoksiholna, a od henodeoksiholne nastaje litoholna kiselina (**Slika 6**) [97]. Deoksiholna i litoholna kiselina se nazivaju sekundarne žučne kiseline [90].



Slika 6. Molekulska struktura sekundarnih žučnih kiselina kod ljudi (deoksiholna (A) i litoholna kiselina (B))

Veći deo žučnih kiselina se apsorbuje u ileumu, i preko portalnog krvotoka se vraća u jetru, u procesu koji se zove enterohepatička cirkulacija [86, 90]. Određena količina žučnih kiselina se izbacuje iz organizma, preko fecesa [90]. U jetri se sekundarne žučne kiseline konjuguju i sekretuju preko žuči [97].

Intestinalna mikroflora može dalje transformisati žučne kiseline u veliki broj različitih derivata, pri čemu normalni ljudski feces može sadržati više od dvadeset različitih žučnih kiselina koje potiču od primarnih žučnih kiselina, holne i henodeoksiholne kiseline [97-101].

U literaturi se pominje i termin tercijarne žučne kiseline, koji se odnosi na proizvode hepatičnog ili intestinalnog metabolizma sekundarnih žučnih kiselina, a koje se razlikuju od primarnih žučnih kiselina [90].

Prema tome, raznolikost žučnih kiselina u organizmu čoveka je rezultat dejstva enzima u jetri i enzima bakterija prisutnih u crevnom sistemu [97].

2.3.1.4. Uticaj strukture žučnih kiselina na hidrofилne/lipofilne osobine (amfifilnost)

Amfifilnost žučnih kiselina potiče od razdvojenosti hidrofилnih i hidrofobnih grupa na steroidnom skeletu, pri čemu se hidrofилne i hidrofobne grupe žučnih kiselina nalaze na različitim površinama [54], pa se za žučne kiseline u literaturi navodi da imaju planarnu polarnost [58,81,102-104].

Naime, polarne (hidroksilne i okso) grupe žučnih kiselina koje su vezane za steroidni skelet su uglavnom orijentisane prema konkavnoj, α strani steroidnog nukleusa [54]. Na β strani steroidnog skeleta se uglavnom ne nalaze hidrofobne grupe [54]. Zbog toga se α strana ponaša kao hidrofилni, a β strana kao hidrofobni deo, pa molekuli žučnih kiselina imaju difilni, odnosno amfifilni karakter [54].

Ova amfifilnost omogućava anjonima žučnih kiselina da formiraju micelle u vodenim rastvorima, kao i mešovite micelle, što omogućava žučnim solima da obavljaju bitne fiziološke funkcije u organizmu [94].

2.3.1.4.1. Uticaj orijentacije hidrofилnih grupa steroidnog skeleta na polarnost

Iako se može reći da postoji planarna razdvojenost hidrofилnih i hidrofobnih grupa na steroidnom skeletu žučnih kiselina, uglavnom ne postoji oštra granica između polarnog i nepolarnog dela molekula, kao kod klasičnih surfaktanata [81]. Izuzetak su žučne kiseline sa hidroksilnim grupama okrenutim isključivo ka α strani, pretežno aksijalne orijentacije [58,81]. Primer je holna kiselina, kod koje su sve tri hidroksilne grupe orijentisane ka α strani steroidnog skeleta, pri čemu su dve grupe u aksijalnom položaju, znatno udaljene od SRSS,

zbog čega kod holne kiseline postoji jasna granica između polarnog i nepolarnog dela molekula [58,81].

Što je veći broj atoma kiseonika koji su orijentisani bliže srednjoj ravni steroidnog skeleta, tj. što je veći broj atoma kiseonika u ekvatorijalnom položaju, to je veći udeo hidrofilne u odnosu na hidrofobnu površinu [58,81]. Dakle, polarnost žučnih kiselina zavisi od broja, ali i od orijentacije polarnih grupa žučnih kiselina (u odnosu na SRSS) [58,81,82].

2.3.1.4.1.1. Promena polarnosti usled oksidacije

Oksidacijom hidroksilne grupe, odnosno prevođenjem u okso grupu, atom kiseonika menja svoju orijentaciju u odnosu na steroidni skelet [81,82]. Oksidacijom α aksijalne hidroksilne grupe, formira se α ekvatorijalna okso grupa, koja zaklapa ugao od 30° sa SRSS, odnosno atom kiseonika se pomera za 60° ka hidrofobnoj, β strani [82]. Oksidacijom α ekvatorijalne hidroksilne grupe, atom kiseonika se takođe pomera za 60° , ali u β ekvatorijalni položaj, čime polarna grupa zalazi u nepolarni deo molekula [82]. Na ovaj način, oksidacijom, se povećava broj ekvatorijalno orijentisanih polarnih grupa, odnosno povećava se broj polarnih grupa pomerenih ka hidrofobnoj, β strani molekula [81,82]. Zbog toga se smanjuje hidrofobna površina anjona žučne kiseline u vodi [82].

2.3.1.5. Uticaj strukture anjona žučnih kiselina na vrednost kritične micelarne koncentracije

Poznato je da prevođenje hidroksilnih u okso grupe anjona žučnih kiselina povećava vrednost kritične micelarne koncentracije [105].

Međutim, u prethodnim studijama je utvrđeno da pored orijentacije, lokacija i broj hidroksilnih grupa takođe imaju značajan uticaj na formiranje micela, odnosno na vrednost kritične micelarne koncentracije [81,106].

Naime, sa povećanjem broja hidroksilnih grupa orijentisanih ka β strani smanjuje se hidrofobna površina anjona žučnih kiselina, čime se smanjuje i broj, odnosno koncentracija nestabilizovanih molekula vode [81]. Usled toga opada pozitivan entropijski doprinos asocijaciji molekula, surfaktanti imaju manju težnju ka samoasocijaciji, zbog čega se micle

formiraju pri većim koncentracijama, odnosno raste vrednost kritične micelarne koncentracije [81].

2.3.1.6. Uticaj strukture anjona žučnih kiselina na toksičnost

Poznato je da toksičnost žučnih kiselina, odnosno njihovih anjona, zavisi od njihove strukture, odnosno hidrofilnosti [81,107]. Hidrofilniji anjoni žučnih kiselina imaju manju membranotoksičnost od hidrofobnih derivata anjona 5 β -holanske kiseline, usled čega se prevođenjem hidroksilnih grupa anjona žučnih kiselina u okso grupe, smanjuje njihova membranolitička aktivnost (hemolitički potencijal) [81].

2.3.1.7. Micele anjona žučnih kiselina i značaj vodoničnih veza na formiranje njihovih agregata

Postoji više metoda kojima se mogu određivati kritične micelarne koncentracije surfaktanata i fizičko-hemijske karakteristike micela: merenjem površinskog napona [108-110], konduktometrijom [111], spektrofluorifotometrijskim merenjima [112-114], solubilizacijom boje [115,116], NMR-om [117,118], rasipanjem svetla [119,120] i dr.

Fizičko-hemijske karakteristike micela anjona žučnih kiselina, odnosno žučnih soli, su ispitivane u više studija [117,118,120-123], kako bi se opisale osobine njihovih agregata i ponašanje surfaktanata pri njihovom formiranju.

Prema najstarijim modelima, koje su predložili Smol (Small) i Kawamura (Kawamura), žučne kiseline i žučne soli formiraju agregate povezivanjem preko hidrofobnih strana [120,121].

Najpoznatiji model je predložio Smol [120]. Prema pretpostavki ovog autora anjoni derivata 5 β -holanske kiseline formiraju primarne i sekundarne micele. Tokom asocijacije se prvo formiraju dimeri. U dimerima su anjoni okrenuti jedni prema drugima svojim hidrofobnim stranama, duž longitudinalne (duže) ose. Primarne micele nastaju aksijalnim povezivanjem dimera preko hidrofobnih strana. Građene su od malog broja anjona (2-10). U ovim agregatima su anjoni svojim hidrofobnim stranama orijentisani ka unutrašnjosti, dok su hidrofilne površine okrenute ka vodenoj fazi. Prema Smolu, vodonične veze učestvuju u

formiranju agregata tek kada se sa povećanjem agregacionog broja, zbog smanjenja hidrofobne površine iscrpi mogućnost dalje asocijacije hidrofobnim stranama. Proces agregacije se najverovatnije nastavlja udruživanjem više primarnih micela, formiranjem vodoničnih veza između hidrofilnih supstituenata anjona 5β -holanske kiseline orijentisanih prema vodenoj fazi.

Okenful (Oakenfull) i Fišer (Fisher) su izneli hipotezu da formiranje vodoničnih veza ima najvažniju ulogu u formiranju micela anjona žučnih kiselina [122,123]. Izneta je pretpostavka da se pomoću vodoničnih veza prvo formiraju dimeri anjona žučnih kiselina, a potom se dalja asocijacija odvija preko hidrofobnih površina, ili se dimeri udružuju u tetramere formiranjem polifunkcionalnih vodoničnih veza [122]. Iako se ovo objašnjenje više ne koristi za opisivanje mehanizma nastanka primarnih micela anjona žučnih kiselina [58], utvrđeno je da vodonične veze ipak imaju značajnu ulogu pri formiranju agregata anjona žučnih kiselina u obliku heliksa [117,118]. Naime, Conte i saradnici su ustanovili postojanje agregata u obliku heliksa, čija je unutrašnjost hidrofilna, ispunjena molekulima vode i katjonima, dok je spoljašnjost hidrofobna [118]. Utvrđeno je da su vodonične veze koje se formiraju između anjona žučnih kiselina i molekula vode u unutrašnjosti agregata najverovatnije odgovorne za stabilizaciju ovih struktura, dok hidrofobne interakcije imaju zanemarljiv uticaj na njihovo formiranje.

2.3.1.8. Mešovite micelle anjona žučnih kiselina i značaj vodoničnih veza na formiranje njihovih agregata

U prethodnim studijama su ispitivane mešovite micelle žučnih soli ili anjona žučnih kiselina i različitih amfifila [30-36, 124-126].

Ovi sistemi se ispituju uglavnom zbog njihovog fiziološkog značaja [41,94-96], ali i potencijalne primene u farmaciji [20,21,47], i medicini [26,27].

Najviše su ispitivane mešovite micelle soli žučnih kiselina i lecitina [30-36,124], zbog fiziološkog značaja mešovitih micela žučnih soli i lecitina u ekskreciji holesterola i ostalih hidrofobnih supstanci putem žuči [39, 94], digestiji hrane [41,95,96], ali i zbog njihove potencijalne primene u solubilizaciji teško rastvorljivih aktivnih supstanci [20,21], i povećanja bioraspoloživosti određenih lekova [26,27].

U literaturi se najčešće opisuju dva modela mešovite micela žučnih soli i lecitina: model diska i model štapa [30, 34]. Po modelu diska koji je predložio Smol [30], mešovita micela se sastoji od dvosloja lecitina u obliku diska, cilindričnog oblika. Na obodu ovih struktura se nalaze žučne soli, čije hidrofobne strane pokrivaju alifatične lance lecitina. Hidrofilni delovi žučnih soli su orijentisani ka vodenom rastvoru, zbog čega je celokupna površina ove mešovite micelle hidrofilna.

Takođe postoji i model „mešanog diska“, po kome se u unutrašnjosti ovih dvosloja (diskova) nalaze dimeri žučnih soli, međusobno povezani vodoničnim vezama [32]. Odnosno, dvosloj se sastoji od lecitina i žučnih soli koje su jedna prema drugoj okrenute hidrofilnim stranama. Šankland (Shankland) je izneo hipotezu da se mešovite micelle, po Smolu, međusobno udružuju preko polarnih glava lecitina, formirajući strukture u obliku štapa („rod“), u kojima su diskovi paralelno orijentisani, njihovom dužom osom [33].

Ulmus (Ulmus) je predložio postojanje modela štapa sa radijalno orijentisanim lancima lecitina u odnosu na osu štapa, i anjonima žučnih kiselina raspoređenim na površini agregata, između polarnih glava lecitina [34]. Anjoni žučnih kiselina su, prema ovom modelu, svojom dužom osom normalno postavljeni u odnosu na osu štapa. Nikols (Nichols) i Ozarowski (Ozarowski) su predložili model po kome su u ovim strukturama u obliku štapa sa radijalno orijentisanim fosfolipidima, žučne soli postavljene paralelno sa osom štapa, dok na krajevima štapa formiraju strukture u obliku kape [35].

Prema Hjelm [Hjelm], kakav će oblik mešovite micelle imati, zavisi od koncentracije lipida [36]. Pri većim koncentracijama lipida, odnosno fosfatidilholina, prisutne su globularne micelle, dok sa smanjenjem koncentracije, micelle dobijaju izduženi oblik i oblik štapa.

Marink [Marrink] i Mark [Mark] su kasnijim ispitivanjima potvrdili da se anjoni žučnih kiselina nalaze na površini mešovite micela, sa hidroksilnim grupama orijentisanim ka vodenoj fazi [124]. Utvrđeno je da hidroksilne grupe imaju najveću tendenciju da formiraju vodonične veze sa polarnim glavama fosfolipida (odnosno sa karboksilnim kiseonikom fosfolipida), ali i sa molekulima vode. Ustanovljeno je da je verovatnoća formiranja vodoničnih veza u mešovitim micelama veća, što je veći udeo fosfolipida. Formiranje vodoničnih veza između samih anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama, prema ovim autorima, je vrlo malo verovatno.

Turner (Turner) i saradnici su na osnovu ispitivanja mešovutih micela glikoholata i anjona oleinske kiseline, pretpostavili model mešovite micelle po kome žučne soli formiraju hidrofobnu mrežu oko micelnog jezgra u koje se uklapaju hidrofobni repovi oleata, dok su karboksilatni anjoni masne kiseline locirani između žučnih soli, okrenuti ka vodenoj fazi (na periferiji micela) i solvatisani molekulima vode [125].

Ispitivanjem asocijacije ibuprofena i holne kiseline, ustanovljeno je da su molekuli holne kiseline svojim β stranama okrenuti ka unutrašnjosti micela, pri čemu se hidrofobni repovi ibuprofena pakuju u unutrašnjost micela [126].

2.3.1.9. *Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika smeša surfaktanata i njihov značaj za modelovanje agregata smeša surfaktanata*

Određivanje vrednosti kritičnih micelnih koncentracija smeša surfaktanata je neophodno u procesu ispitivanja novih koloidnih sistema za isporuku lekova. Naime, poznavanje kmk vrednosti binarnih smeša surfaktanata ima veliki praktični značaj pri razvoju farmaceutskih formulacija hidrofobnih lekova pošto se solubilizacija hidrofobnih supstanci odigrava kada su u vodenom rastvoru prisutne micelle [51]. Određivanje kritične micelarne koncentracije je neophodno i pri određivanju solubilizacionih kapaciteta smeša surfaktanata, tj. sposobnosti određenih binarnih sistema surfaktanata da solubilizuju različite hidrofobne molekule [2,22-25,127].

Pored toga, poznavanje kmk vrednosti je neophodno i u modelovanju, odnosno opisivanju mogućih mehanizama formiranja agregata mešovutih micela i ponašanja pojedinačnih surfaktanata u ovim agregatima [29,128-130], što može biti od velikog značaja za objašnjavanje procesa solubilizacije hidrofobnih molekula [29] i načina na koji surfaktanti pomažu transport lekova kroz biološke membrane [6].

Naime, poređenjem eksperimentalno dobijenih kmk vrednosti (kmk^{exp}) sa izračunatim vrednostima kmk idealnih sistema (kmk^{id}), može se utvrditi neidealno ponašanje smeše surfaktanata i pretpostaviti postojanje interakcija između različitih surfaktanata binarnih mešovutih micela [128]. Razvojem regular solution theory (RST), omogućeno je kvantifikovanje ovih interakcija, računanjem interakcionog parametra, β [109,131].

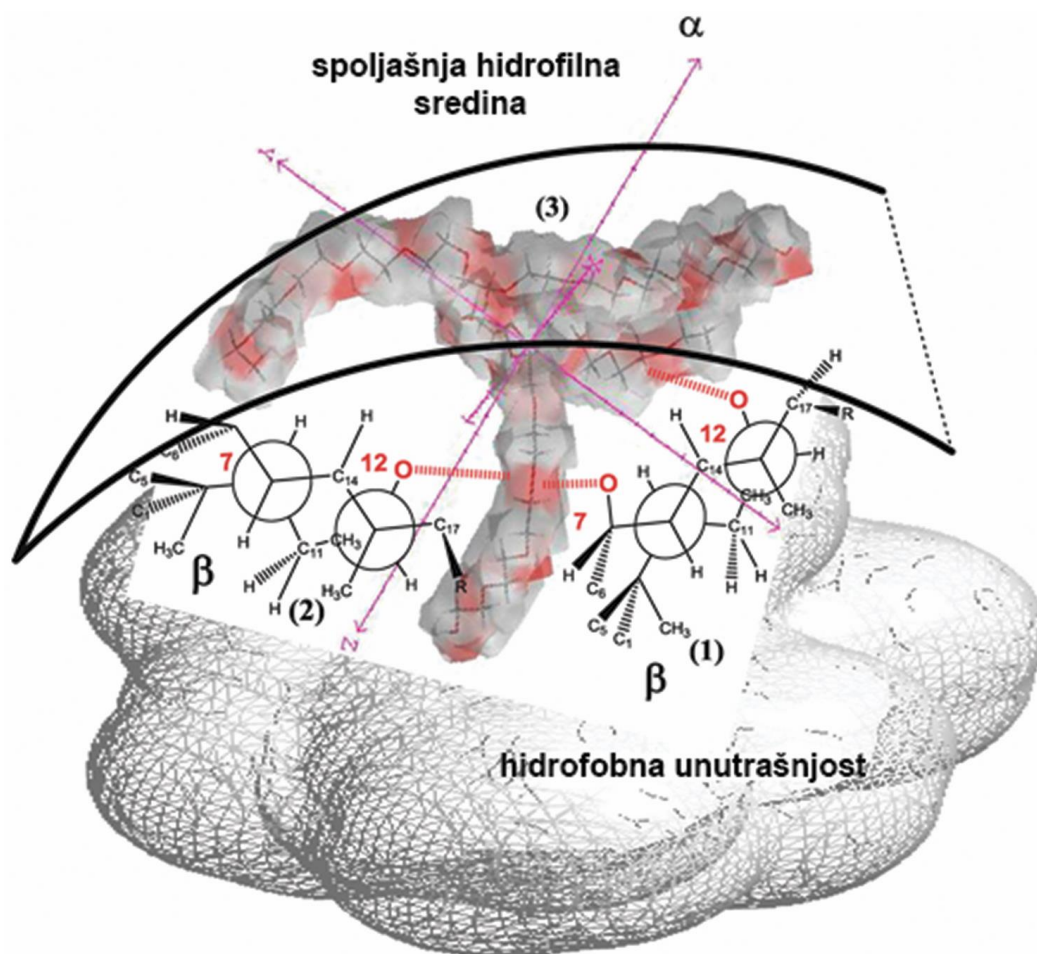
Pomoću RST se može pretpostaviti i sastav mešovitim micela, tj. molski udeli surfaktanata u mešovitim micelama, koeficijenti aktivnosti surfaktanata u mešovitim micelama [109,131], kao i promena stabilnosti mešovitim micela u odnosu na „idealne mešovite micide“ (micide u kojima ne postoje interakcije između različitih surfaktanata), preko dodatne Gibsove energije [130]. Na osnovu ovih podataka, u više studija je vršeno modelovanje, odnosno opisivanje mogućih mehanizama formiranja agregata mešovitim micela i ponašanja pojedinačnih surfaktanata u ovim agregatima [29,130,132-135].

U literaturi se navodi da *kmk* vrednosti smeša anjonskih i jonskih surfaktanata odstupaju od *kmk* vrednosti idealnih sistema, što je posledica neidealnog ponašanja različitih surfaktanata u ovim smešama i postojanja interakcija između hidrofilnih delova surfaktanata u mešovitim micelama [128,136].

U više studija je utvrđeno da smeše jonskih i nejonskih surfaktanata imaju niže *kmk* vrednosti od idealnih što je uglavnom posledica sinergizma, odnosno privlačnih interakcija između polarnih glava različitih surfaktanata u mešovitim micelama [17,128,132-134]. U sistemima surfaktanata Na-laurilsulfata i polisorbata, privlačna međudejstva su najverovatnije posledica interakcija između jonizovanih polarnih glava anjonskog surfaktanta i pozitivno naelektrisanih delova oksietilenskih dipola koji sačinjavaju polarni deo polisorbata [17,132].

2.3.1.9.1. Ispitivanja sistema anjona žučnih kiselina i nejonskih surfaktanata

Na osnovu izračunatih vrednosti interakcionih parametara, primenom RST, utvrđeno je da postoje privlačne interakcije između anjonskih i nejonskih surfaktanata u njihovim binarnim mešovitim micelama [16,17,132-134,136]. U studiji u kojoj su ispitivane fizičko-hemijske osobine binarnih mešovitim micela holata i deoksiholata sa polisorbitom 20 i polisorbitom 60, pretpostavljeno je da su privlačne interakcije posledica formiranja vodoničnih veza između hidroksilnih grupa anjona žučnih kiselina i kiseonikovih atoma polioksietilenskih delova [133]. Naime, na osnovu ovih ispitivanja, u mešovitim micelama holata i ispitivanih polisorbata, postoje veće sinergističke interakcije u odnosu na mešovite micide sa deoksiholatom, najverovatnije zbog toga što holna kiselina sadrži jednu hidroksilnu grupu više od deoksiholne kiseline vezanu za steroidni skelet (na poziciji C7), zbog čega verovatno formira veći broj vodoničnih veza od deoksiholata (**Slika 7**).



Slika 7. Vodonične veze između aksijalnih hidroksilnih grupa holata i deoksiholata i oksietilenskih nizova polisorbata [133]

Ispitivanjem interakcija u binarnim smešama Tritona X-100 i holata, deoksiholata i 7-okso deoksiholata, takođe je utvrđeno postojanje sinergizma između gradivnih jedinica mešovitih micela [134]. Kvantifikovanjem interakcija, u ovoj studiji je, kao i u prethodnoj, utvrđeno da na interakcije između surfaktanata u mešovitim micelama utiče broj hidrofилnih grupa vezanih za steroidni skelet, ali je izneta i pretpostavka da na jačinu međudejstava utiče i orijentacija kiseonikovog atoma.

2.3.2. ZNAČAJ MEŠOVITIH MICELA ANJONA ŽUČNIH KISELINA I ŽUČNIH SOLI U FARMACIJI I MEDICINI

Soli žučnih kiselina, odnosno njihove micelle, imaju slabu sposobnost solubilizacije holesterola [92]. Međutim, poznato je da mešovite micelle žučnih soli i lecitina, kao i mešovite micelle žučnih soli i monoglicerida imaju veći kapacitet solubilizacije holesterola i masnih kiselina od micela građenih samo od žučnih soli [94], usled čega je omogućeno obavljanje važnih fizioloških procesa u organizmu.

Zbog toga su, u cilju poboljšanja rastvorljivosti hidrofobnih lekova, mešovite micelle anjona žučnih kiselina, žučnih soli, i različitih surfaktanata bile predmet ispitivanja u više studija [20,21,47,137,138]. Ispitivana je rastvorljivost hidrofobnih lekova u mešovitim micelama anjona žučnih kiselina ili žučnih soli i fosfolipida [20,21,137,138]. Utvrđeno je da ove smeše efikasnije solubilizuju određene aktivne supstance u odnosu na micelle građene samo od pojedinačnih anjona žučnih kiselina ili žučnih soli. Tako na primer, ove smeše efikasnije solubilizuju benzodiazepine i liposolubilne vitamine (K₁ i E) [20,21,137,138]. Međutim, steroidne supstance, kao što su prednizolon i estradiol su pokazale bolju rastvorljivost u micelarnim rastvorima pojedinačnih anjona žučnih kiselina, nego u rastvorima mešovitih micela [20].

U više *in vivo* studija je utvrđeno da anjoni žučnih kiselina i žučne soli mogu unaprediti transport određenih (hidrofilnih) lekovitih supstanci kroz bukalnu sluzokožu [8,9,75-79], kao i kroz nazalnu sluzokožu [6,7].

Dokazano je da anjoni žučnih kiselina i žučne soli unapređuju prolazak insulina kroz bukalnu sluzokožu [76], ali i kroz nazalnu sluzokožu [6,7,139].

Pretpostavlja se da anjoni žučnih kiselina i žučne soli unapređuju prolazak insulina i drugih hidrofilnih supstanci (lekova) kroz biološke membrane najverovatnije formiranjem hidrofilnih kanala i reverznih micela [6]. Takođe, poznato je da mešovite micelle (smeše) glikoholata i linoleinske kiseline sinergistički unapređuju resorpciju insulina preko nazalne sluzokože, što znači da je resorpcija pomoću smeše veća nego pomoću glikoholata ili linoleinske kiseline zasebno [140].

U novijim studijama je utvrđeno da mešovite micela anjona žučnih kiselina i fosfolipida mogu unaprediti farmakokinetički profil hidrofobnih lekovitih supstanci, pri oralnoj aplikaciji [26,27].

Utvrđeno je, *in vivo* eksperimentima, da se oralnom aplikacijom silibina solubilisanog pomoću mešovitih micela holata i fosfolipida postiže bolja bioraspodivnost, nego kada se ova supstanca aplikuje u hidrofilnom obliku, kao silibin-N-metilglukamin [26].

Takođe, *in vivo* ispitivanjima, je ustanovljeno da se oralnom aplikacijom glicirizina solubilisanog pomoću mešovitih micela deoksiholata i fosfolipida postiže bolja bioraspodivnost ove supstance, nego kada se aplikuje hidrofilni oblik glicirizina [27].

2.4. MODELI BINARNIH SMEŠA SURFAKTANATA

Postoji više modela koji imaju za cilj da opišu formiranje i strukturu micela u vodenima rastvorima binarnih smeša surfaktanata [108,109,129]. Prema većini modela, proces micelizacije je praćen uspostavljanjem termodinamičke ravnoteže između molekula surfaktanata (pojedinačnih surfaktanata) u vodi i micelama [108,109,131].

2.4.1. MODEL FAZNE SEPARACIJE

Prema modelu fazne separacije, micide se predstavljaju kao zasebna faza [116]. Ovaj model se često naziva i model pseudo-fazne separacije (pseudo-phase separation model) [109,129,131,141-143], pošto micide ne predstavljaju zasebnu fazu, već „pseudofazu“ [129,130]. Kritična micelarna koncentracija se posmatra kao maksimalna rastvorljivost surfaktanata, pri čemu se nova „faza“ formira na kritičnoj micelarnoj koncentraciji [141]. Prema ovoj teoriji, na kritičnoj micelarnoj koncentraciji se uspostavlja ravnoteža između molekula surfaktanata (pojedinačnih surfaktanata) u vodi i molekula surfaktanata (pojedinačnih surfaktanata) u micelarnoj „fazi“, što se naziva fazna ravnoteža [130,142]. Zbog toga se smatra da su hemijski potencijali surfaktanata u vodenoj fazi jednaki hemijskom potencijalu pojedinačnih surfaktanata u micelarnoj pseudofazi [108,109,131].

2.4.1.1. Modeli idealnih smeša

Modeli idealnih smeša objašnjavaju formiranje mešoviti micela u binarnim sistemima surfaktanta na osnovu modela fazne separacije, pri čemu se mešovite micide posmatraju kao idealne smeše pojedinačnih komponenti tj. čistih (jednokomponentnih) micela [108,115,130]. U ovim modelima se pretpostavlja da ne postoje interakcije između različitih surfaktanata u njihovim mešovitim micelama [108,130,131]. *Kmk* ovih smeša se naziva i „idealna *kmk*“ [29], a mešovite micide „idealne mešovite micide“ [130].

Najčešće korišćen model idealnih smeša je predstavio Klint (Clint) [108]. U ovom modelu su dati izrazi za računanje kritične micelarne koncentracije smeše surfaktanata, micelnog sastava i koncentracije pojedinačnih surfaktanata.

U literaturi se navodi da se pomoću ove teorije mogu izračunati tačne *kmk* vrednosti, (odnosno da se mogu predvideti *kmk* vrednosti) uglavnom samo za smeše homolognih nejonskih surfaktanata sa istim polarnim delom, odnosno samo za smeše koje se ponašaju približno idealno [108]. Zbog toga odstupanje vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija izračunatih po Klintovoj teoriji od eksperimentalnih *kmk* vrednosti najčešće predstavlja indikaciju da se ispitivana smeša ponaša neidealno, odnosno da između različitih surfaktanata u mešovitim micelama postoje interakcije [17,143].

Na osnovu hemijskih potencijala pojedinačnih surfaktanata, može se dobiti izraz za računanje vrednosti kritične micelarne koncentracije sistema surfaktanata pri idealnom mešanju (idealnih smeša surfaktanata) [108,115].

Ukoliko se pretpostavi da se pojedinačni surfaktanti (monomeri) u rastvoru ponašaju idealno, tada je koeficijent aktivnosti ovih slobodnih (ne-micelarnih) monomera jednak jedinici, pa važi sledeća jednakost [108]:

$$\mu_1 = \mu_1^0 + RT \ln c_1^m \quad (1)$$

pri čemu su: μ_1 -hemijski potencijal slobodnog (ne-micelnog) surfaktanta 1, μ_1^0 - standardni hemijski potencijal slobodnog surfaktanta 1, R - univerzalna gasna konstanta, T - termodinamička temperatura, c_1^m - koncentracija surfaktanta 1 u rastvoru.

Pošto je jedna od pretpostavki Klintove teorije da se mešovite micidele ponašaju kao idealna smeša, pri čemu je koeficijent aktivnosti pojedinačnih surfaktanata u mešovitim micelama jednak jedinici, tada važi sledeća jednakost [108]:

$$\mu_1^M = \mu_1^{0M} + RT \ln x_1 \quad (2)$$

gde je μ_1^M - hemijski potencijal surfaktanta 1 u mešovitim micelama, μ_1^{0M} - hemijski potencijal surfaktanta 1 u jednokomponentnim micelama, x_1 - molski udeo surfaktanta 1 u mešovitoj miceli.

Pošto na osnovu teorije fazne separacije fazna ravnoteža između molekula surfaktanta 1 u rastvoru i molekula surfaktanta 1 u micelarnoj pseudofazi postoji kada je koncentracija surfaktanta veća ili jednaka kritičnoj micelarnoj koncentraciji, tada je i hemijski potencijal slobodnog (ne-micelarnog) surfaktanta 1 jednak hemijskom potencijalu surfaktanta 1 u jednokomponentnim micelama:

$\mu_1 = \mu_1^{0M}$, pa je:

$$\mu_1^{0M} = \mu_1^0 + RT \ln c_1^* \quad (3)$$

gde je c_1^* kritična micelarna koncentracija surfaktanta 1.

Da bi se dobio izraz za računanje vrednosti kritične micelarne koncentracije sistema surfaktanata pri idealnom mešanju, polazi se od izraza za računanje koncentracije pojedinačnih surfaktanata u ne-micelarnim rastvorima [108,115].

Pri ukupnoj koncentraciji smeše surfaktanata manjoj od kritične micelarne koncentracije, koncentracije pojedinačnih surfaktanata u rastvoru (c_1^m i c_2^m) su date sledećim izrazima [108]:

$$c_1^m = \alpha c, \quad (4)$$

$$c_2^m = (1 - \alpha)c_t \quad (5)$$

gde je:

α – molski udeo surfaktanta 1 u smeši surfaktanata,

c_t – ukupna koncentracija surfaktanata 1 i 2.

Pri ukupnim koncentracijama koje su veće ili jednake *kmk* smeše surfaktanata ($c_{1,2}^*$), prema teoriji fazne separacije, smatra se da je ukupna koncentracija monomera u rastvoru jednaka vrednosti kritične micelarne koncentracije, dok je preostala količina (koncentracija) monomera ugrađena u mešovite micelle [141]. Prema tome, koncentracija surfaktanta 1 koja je u micelarnoj pseudofazi, pri $c_t \geq c_{1,2}^*$, je:

$$c_1 = \alpha c_t - c_1^m, \quad (6)$$

odnosno koncentracija surfaktanta 2 u mešovitoj miceli je:

$$c_2 = (1 - \alpha)c_t - c_2^m. \quad (7)$$

Prema tome, molski udeo surfaktanta 1 u mešovitoj miceli je:

$$x_1 = \frac{c_1}{c_2}, \text{ odnosno,}$$

$$x_1 = \frac{\alpha c_t - c_1^m}{c_t - c_2^m - c_1^m}. \quad (8)$$

Na osnovu teorije fazne separacije za smeše surfaktanata, u uslovima fazne ravnoteže važi [141]:

$\mu_1^M = \mu_1$, zbog čega se na osnovu jednačina (1), (2) i (8) dobija [108]:

$$\ln c_1^* + \ln x_1 = \ln c_1^m$$

odnosno:

$$c_1^m = x_1 c_1^* \quad (9)$$

Slično se dobija da je za surfaktant 2:

$$c_2^m = (1 - x_1) c_2^* \quad (10)$$

gde je c_2^* kritična micelarna koncentracija surfaktanta 2.

Na osnovu jednačina (4), (5), (9) i (10), dobija se da je na kritičnoj micelarnoj koncentraciji smeše surfaktanata [108]:

$$\alpha c_{1,2}^* = x c_1^*$$

i

$$(1 - \alpha) c_{1,2}^* = (1 - x_1) c_2^*.$$

Na osnovu prethodne dve jednačine dobija se izraz za računanje vrednosti kritične micelarne koncentracije idealnih smeša [108]:

$$\frac{1}{c_{1,2}^*} = \frac{\alpha}{c_1^*} + \frac{(1 - \alpha)}{c_2^*} \quad (11)$$

Ova teorija je u više studija uspešno primenjena za predviđanje vrednosti kmk binarnih nejonskih i binarnih jonskih smeša homolognih surfaktanata, tj. surfaktanata iste polarne glave, a različite dužine hidrofobnih lanaca [108]. Međutim, kod binarnih smeša surfaktanata različitih polarnih grupa, utvrđeno je odstupanje vrednosti kmk od pretpostavljenih idealnih vrednosti kmk , zbog čega se ove smeše nazivaju još i neidealni sistemi [17,128,143]. Pošto su smeše surfaktanata koje se koriste u industriji uglavnom sastavljene od nehomolognih

surfaktanata, razvijen je model i za opisivanje neidealnih sistema, odnosno sistema koji se ne mogu uspešno tretirati pomoću modela idealnih smeša [109,129,131].

Model po Klintu je korišćen u više studija kako bi se utvrdilo postojanje neidealnosti, u ispitivanim sistemima [17,128,143]. Naime poređenjem eksperimentalno dobijenih vrednosti kmk neke smeše surfaktanata sa idealnim vrednostima, računatih po formuli (11), može se utvrditi da li postoji odstupanje od idealnog ponašanja [17,128,143].

Pri tome, ukoliko je vrednost eksperimentalne kmk niža od izračunate, idealne, može se pretpostaviti da u mešovitim micelama postoji sinergizam [143]. Suprotno, ako su eksperimentalne vrednosti kmk veće od idealnih, može se pretpostaviti, da u mešovitim micelama postoji antagonizam.

2.4.1.2. Modeli neidealnih smeša

Razvijeno je više modela za opisivanje sistema surfaktanata. Jedan od najčešće primenjivanih modela za opisivanje neidealnih, odnosno realnih binarnih sistema surfaktanata, su predstavili Rubing (Rubingh) i Holand (Holland) [109,129,131]. Ovaj model koristi principe RST za opisivanje neidealnog mešanja surfaktanata u mešovitim micelama. Osmišljen je za modelovanje smeša nejonskih surfaktanata [129], ali se često koristi i za opisivanje smeša jonskih i nejonskih surfaktanata [135,136].

Osnovna pretpostavka Rubing-Holandovog modela je da mešovite micelle predstavljaju neidealne smeše, odnosno da između različitih surfaktanata u mešovitim micelama postoje interakcije [109,131], zbog čega promena slobodne energije pri mešanju surfaktanata nije jednaka nuli [130]. Pri tome, kako bi se pojednostavilo modelovanje mešovitih micela, koristi se pretpostavka regular solution theory da je dodatna entropija mešanja jednaka nuli [131]. Prema Holandu i Rubingu neidealnost u mešovitim micelama anjonskih i nejonskih surfaktanata najverovatnije potiče od interakcija između različitih polarnih glava, koje su uglavnom elektrostatičke prirode [129]. Zbog toga se u RST uzima da je dodatna Gibsova energija pri mešanju surfaktanata u binarnim sistemima jednaka dodatnoj entalpiji mešanja, dok se pretpostavlja da je dodatna entropija mešanja surfaktanata jednaka nuli [130,131].

2.4.1.2.1. Rubing-Holandov model

Na osnovu pretpostavke da se mešovite micelle ponašaju kao neidealni sistem, odnosno da koeficijent aktivnosti pojedinačnih surfaktanata u binarnoj mešovitoj miceli (f) nije jednak jedinici, jednačinu (2) je potrebno korigovati, tako da izraz dobija sledeći oblik [109,131]:

$$\mu_1^M = \mu_1^{0M} + RT \ln f_1 x_1 \quad (12)$$

pri čemu je f_1 koeficijent aktivnosti surfaktanata 1 u binarnoj mešovitoj miceli.

Ukoliko se kao i u prethodnom slučaju, primeni teorija fazne separacije, odnosno ukoliko se uzme u obzir uslov fazne ravnoteže koja postoji između određenog molekula surfaktanta (surfaktant 1) iz vodenog rastvora i micelarne pseudofaze, $\mu_1^M = \mu_1$ [141], tada se na osnovu jednačina (1), (8) i (12) dobija sledeća jednakost [109,131]:

$$\ln c_1^* + \ln f_1 x_1 = \ln c_1^m$$

odnosno [109,131]:

$$c_1^m = f_1 x_1 c_1^* \quad (13)$$

Slično se dobija da je za surfaktant 2:

$$c_2^m = (1 - x_1) f_2 c_2^* \quad (14)$$

Na osnovu jednačina (4), (5), (13) i (14), dobija se da je na kritičnoj micelarnoj koncentraciji smeše surfaktanata ($c_{1,2}^*$):

$$\alpha c_{1,2}^* = f_1 x_1 c_1^* \quad (15)$$

i

$$(1-\alpha)c_{1,2}^* = f_2(1-x_1)c_2^* \quad (16)$$

te se na osnovu prethodne dve jednačine dobija izraz za računanje vrednosti kritične micelarne koncentracije realnih smeša surfaktanata [109,131]:

$$\frac{1}{c_{1,2}^*} = \frac{\alpha}{f_1 c_1^*} + \frac{(1-\alpha)}{f_2 c_2^*}. \quad (17)$$

Pošto se RST koristi za opisivanje neidealnih sistema, tj. sistema kod kojih koeficijent aktivnosti pojedinačnih surfaktanata u binarnoj mešovitoj miceli nije jednak jedinici, odnosno kod kojih između različitih gradivnih jedinica u mešovitim micelama postoje interakcije [109,131], neophodno je dati izraze za računanje koeficijenta f i kvantifikovanje interakcija između različitih surfaktanata u mešovitim micelama.

Za određivanje koeficijenta aktivnosti surfaktanata u binarnim mešovitim micelama, u ovom modelu se koristi izraz iz RST koji se inače koristio za računanje koeficijenta aktivnosti nekog fluida u smeši dve tečnosti, pa su izrazi za koeficijent aktivnosti surfaktanta 1 i koeficijent aktivnosti surfaktanta 2 u binarnim mešovitim micelama dati sledećim jednačinama [131]:

$$f_1 = \exp \beta_{1,2} (1-x_1)^2 \quad (18)$$

$$f_2 = \exp \beta_{1,2} (x_1)^2. \quad (19)$$

Takođe, na osnovu jednačina (15) i (16), koeficijenti aktivnosti se mogu izraziti na sledeći način [109,131]:

$$f_1 = \frac{\alpha c_{1,2}^*}{c_1 x_1} \quad (20)$$

$$f_2 = \frac{(1-\alpha) c_{1,2}^*}{c_2 (1-x_1)}. \quad (21)$$

Dalje, kombinovanjem jednačina (18)-(21), može se dobiti izraz za računanje molskog udela surfaktanta 1 u mešovitim micelama [109,131]:

$$1 = \frac{(x_1)^2 \ln(\alpha c_{1,2}^* / c_1 x_1)}{(1-x_1)^2 \ln((1-\alpha) c_{1,2}^* / c_2 (1-x_1))} \quad (22)$$

pri čemu se x_1 određuje iterativno.

Vrednost molskog udela surfaktanta 2 u mešovitim micelama (x_2) se može izračunati na sledeći način:

$$x_2 = 1 - x_1. \quad (23)$$

Na osnovu jednačina (18) i (20) dobija se izraz za određivanje koeficijenta interakcije u binarnim mešovitim micelama [109,131]:

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{(1-x_1)^2} \ln \frac{\alpha c_{1,2}^*}{c_1 x_1}. \quad (24)$$

Prema tome, poznavajući vrednosti kmk čistih surfaktanata i njihovih smeša ($c_1^*, c_2^*, c_{1,2}^*$) može se odrediti x_1 , a potom i $\beta_{1,2}$. Dalje, na osnovu jednačina (18) i (19) se mogu dobiti vrednosti koeficijenata f_1 i f_2 .

Interakcioni parametar predstavlja bezdimenzionalnu veličinu i koristi se za kvantifikovanje interakcija, odnosno neidealnosti, između različitih gradivnih jedinica u binarnim mešovitim micelama [109,130,131]. Ako je vrednost parametra interakcije jednaka nuli, smatra se da se smeša ponaša idealno [131]. Predznak vrednosti interakcionog parametra ukazuje na prirodu interakcija, tj. da li su one sinergističke, u slučaju negativnih vrednosti [17,130,136], ili antagonističke, u slučaju pozitivnih vrednosti [130]. Što je apsolutna vrednost ovog parametra veća, veća su međudejstva između polarnih delova surfaktanata [130,136].

Takođe, prema RST, $\beta_{1,2}$ predstavlja razliku između srednje energije intermolekulanih interakcija u mešovitim micelama i zbira srednjih intermolekularnih interakcija u čistim (jednokomponentnim) micelama [130].

Kako bi se utvrdilo u kojoj meri su binarne mešovite micelle termodinamički stabilnije od idealnih mešovitih micela [130], koristi se dodatna Gibsova energija (G^E) [131]:

$$G^E = RT(x_1 \ln f_1 + (1-x_1) \ln f_2). \quad (25)$$

Primenom RST, u više studija su ispitivana međudejstva u binarnim mešovitim micelama različitih surfaktanata [16,17,29,143-146].

Ispitivane su interakcije u binarnim mešovitim micelama između Na-laurilsulfata, Na-lauriletarsulfata, deoksiholata, holata, 7-oksodeoksiholata i Triton-a X-100 [16,134,143-145], kao i smeše polisorbata i Na-laurilsulfata [17,132], odnosno rađena je uporedna analiza fizičko-hemijskih karakteristika binarnih mešovitih micela polisorbata 20, polisorbata 60 i holata i deoksiholata [133].

U ovim studijama su dobijene negativne vrednosti interakcionog parametra, što pokazuje da između anjonskih i nejonskih surfaktanata u njihovim mešovitim micelama postoji sinergizam.

Najniže vrednosti interakcionog parametra su dobijene u studijama katjonskih i anjonskih surfaktanata, najverovatnije zbog elektrostatičkih privlačnih sila između pozitivno i negativno naelektrisanih polarnih delova katjonskih i anjonskih surfaktanata [146].

Najslabija međudejstva između polarnih glava, računatih na osnovu RST, su dobijena između nejonskih surfaktanata [17].

2.4.2. MODELI AKTIVNOSTI MASA

Kod ovih modela, formiranje micela se posmatra kao ravnotežni proces kod koga je prisutan niz micela različitih veličina [129].

Pri tome, hemijski potencijal surfaktanata zavisi od agregacionog broja micela (N) [129]. Razlikuje se od modela fazne separacije po tome što agregacioni broj predstavlja određenu, konačnu vrednost, pa je zbog toga i sam model kompleksniji [129].

Zbog neophodnosti postojanja velikog broja parametara i dodatne kompleksnosti modela aktivnosti masa u poređenju sa teorijom fazne separacije, ovaj model je primenjivan samo za modelovanje ograničenog broja sistema [129].

3. CILJEVI I HIPOTEZE

Na osnovu prethodno navedenih primera primene anjona žučnih kiselina i polisorbata u farmaciji i medicini, očigledno je da postoji potreba za određivanjem vrednosti *kmk*, kao i za ispitivanjem agregacionih i micelarnih karakteristika smeša ovih surfaktanata.

Zbog toga su u ovoj disertaciji ispitivane binarne smeše anjona osam žučnih kiselina i dva nejonska surfaktanta (polisorbat 40; P40, i polisorbat 80; P80). Korišćeni su sledeći anjoni žučnih kiselina: anjon 3 α ,12 α -dihidroksi-5 β -holanske kiseline (anjon deoksiholne kiseline; D), 3 α ,6 α -dihidroksi-5 β -holanske kiseline (anjon hiodeoksiholne kiseline; hioD), 3 α ,7 α -dihidroksi-5 β -holanske kiseline (anjon henodeoksiholne kiseline; henoD), 3 α ,7 α ,12 α -trihidroksi-5 β -holanske kiseline (anjon holne kiseline; C), 3 α ,6 α ,12 α -trihidroksi-5 β -holanske kiseline (anjon hioholne kiseline; hioC), 3 α -hidroksi-12-okso-5 β -holanske kiseline (anjon 12-oksolitoholne kiseline; 12OL), 3 α ,12 α -dihidroksi-7-okso-5 β -holanske kiseline (anjon 7-oksodeoksiholne kiseline; 7OD) i 3,12-dioksido-5 β -holanske kiseline (3,12DH).

Ciljevi ove doktorske disertacije su sledeći:

1. Eksperimentalno određivanje kritičnih micelarnih koncentracija mešovutih micela.
2. Određivanje vrednosti interakcionih parametara između gradivnih jedinica mešovutih micela.
3. Upoređivanje fizičko-hemijskih osobina ispitivanih mešovutih micela.

Očekivani rezultati doktorske disertacije su sledeće hipoteze:

1. Eksperimentalne vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija su niže u odnosu na vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija izračunatih po modelu idealnih smeša.
2. Vrednosti interakcionih parametara su negativne, odnosno pokazuju postojanje sinergizma u ispitivanim smešama.
3. Soli žučnih kiselina sa hidrofilnijim, okso (keto) grupama, pokazuju jači sinergizam sa nejonskim surfaktantima i povećanu stabilnost formiranih mešovutih micela zbog privlačnih interakcija sa oksietilenskim grupama ispitivanih Tween-ova.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

U ovoj disertaciji su korišćene sledeće supstance:

- deoksiholna, hiodeoksiholna, henodeoksiholna, holna, hiolna kiselina (Sigma, Novi Zeland; 99,98%),
- Tween[®] 40 (Merck, Nemačka),
- Tween[®] 80 (J.T.Baker, Holandija).

Holna i deoksiholna kiselina su korišćene kao polazne supstance za sintezu njihovih okso derivata: 3 α -hidroksi-12-okso-5 β -holanske kiseline, 3 α ,12 α -dihidroksi-7-okso-5 β -holanske kiseline i 3,12-diokso-5 β -holanske kiseline.

3 α -hidroksi-12-okso-5 β -holanska kiselina je pripremljena prema proceduri koju su razvili Miljković i saradnici [147], dok je 3 α ,12 α -dihidroksi-7-okso-5 β -holanska kiselina sintetisana prema Tularu (Tullar) [148]. 3,12-diokso-5 β -holanska kiselina je sintetisana prema poznatoj metodi [149].

Sve žučne kiseline su prevedene u njihove natrijumove soli na osnovu poznate procedure [37].

Rastvori surfaktanata su pripremljeni rastvaranjem tačno odmerenih količina surfaktanata u odgovarajućim zapreminama dejonizovane vode. Dejonizovana voda (provodljivost <1 μ S cm⁻¹, na 25°C) je korišćena za sve potrebe.

4.2. METODE

4.2.1. MERENJA PROVODLJIVOSTI

U ovom radu je merena specifična provodljivost (κ) rastvora čistih surfaktanata i njihovih smeša, pripremljenih u dejonizovanoj vodi. Pripremljeni rastvori su postepeno razblaživani dejonizovanom vodom, pri čemu je očitavana vrednost specifične provodljivosti. Praćena je promena specifične provodljivosti u zavisnosti od koncentracije (na osnovu čega je određivana kritična micelarna koncentracija). Molski udeo hidrofobnijeg surfaktanta (polisorbata) u smešama (α) je menjan od 0,1 do 0,5, za smeše Na-soli žučnih kiselina i polisorbata 40, dok je molski udeo nejonskog surfaktanta u smešama Na-soli žučnih kiselina i polisorbata 80 variran od 0,05 do 0,5. Za merenje specifične provodljivosti korišćen je konduktometar Consort C 860. Merenja su se odvijala pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Sva merenja su ponovljena najmanje tri puta. Greška pri merenjima nije bila veća od 4%.

4.2.2. MERENJA POVRŠINSKOG NAPONA

Površinski napon (γ) rastvora čistih surfaktanata i njihovih smeša je određivan koristeći du Nouy metod prstena. Meren je površinski napon različitih koncentracija čistih surfaktanata i njihovih smeša. Praćena je promena dobijenih vrednosti površinskih napona od koncentracije surfaktanata, odnosno od ukupne koncentracije smeše surfaktanata (c_t). Kao i kod merenja provodljivosti, molski udeo polisorbata je menjan u smešama od 0,1 do 0,5, za smeše Na-soli žučnih kiselina i polisorbata 40, dok je molski udeo nejonskog surfaktanta u smešama Na-soli žučnih kiselina i polisorbata 80 variran od 0,05 do 0,5. Za merenje površinskog napona korišćen je Krüss tenziometar (Nemačka). Merenja su vršena pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Merenja su ponovljena najmanje tri puta. Greška pri merenjima nije bila veća od 4%.

4.2.3. SPEKTROFLUORIFOTOMETRIJSKA MERENJA

Rastvori binarnih smeša surfaktanata (rastvori Na-soli žučnih kiselina i polisorbata 40) su pravljene pomoću vode koja je zasićena sa pirenom.

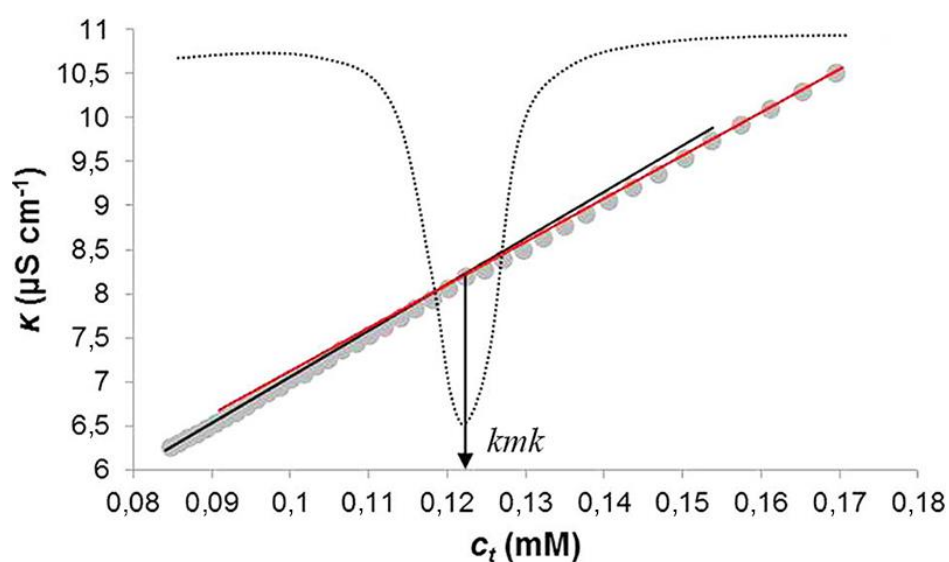
Piren je ekscitovan pri talasnoj dužini od 334 nm. Spektrofluorimetrijska merenja su izvedena na uređaju Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Agilent, Nemačka). Praćene su promene intenziteta prve (I_1 , 373 nm) i treće (I_3 , 384 nm) vibracione emisije trake pirena u funkciji ukupne koncentracije surfaktanata na sledećim temperaturama: 10, 25 i 35 °C. Sva merenja su ponovljena tri puta, greška pri merenjima nije bila veća od 4%.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Kako bi se odredile vrednosti idealnih kmk , fizičko-hemijske karakteristike mešovitih micela, međudejstva između gradivnih jedinica i stepen termodinamičke stabilizacije mešovitih micela, neophodno je poznavati eksperimentalne vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija pojedinačnih surfaktanata i njihovih smeša.

5.1. ODREĐIVANJE VREDNOSTI KRITIČNIH MICELARNIH KONCENTRACIJA

U ovom radu su vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija čistih surfaktanata i njihovih smeša određivane konduktometrijski i tenziometrijski. Pomoću konduktometra su određene kmk anjona žučnih kiselina i njihovih smeša sa polisorbata. Merena je specifična provodljivost rastvora različitih koncentracija (odnosno različitih ukupnih koncentracija kada su ispitivane smeše surfaktanata), a potom su na osnovu grafika zavisnosti specifične provodljivosti od koncentracije određene vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija (**Slika 8**).



Slika 8. Zavisnost specifične provodljivosti od ukupne koncentracije surfaktanata. Primer smeše Na-holata i polisorbata 40 ($\alpha=0,2$). Prave spajaju tačke u premicelarnoj i micelarnoj oblasti.

Naime, sa **Slike 8** se može uočiti da sa porastom koncentracije, specifična provodljivost raste linearno. Nakon određene koncentracije, nagib prave se menja i specifična provodljivost nastavlja da raste pod smanjenim nagibom. Koncentracija na kojoj dolazi do promene predstavlja kritičnu micelarnu koncentraciju. Pošto tačka koja odgovara *kmk* na grafiku zavisnosti specifične provodljivosti od koncentracije deli grafik na dva linearna dela (premicelarni i postmicelarni deo), vrednosti *kmk* anjona žučnih kiselina i njihovih smeša sa polisorbatom 40 su određene kao presečne tačke dve prave koje spajaju tačke u premicelarnoj i postmicelarnoj oblasti. Prave su dobijene fitovanjem podataka pre i posle pregibne tačke u dve jednačine oblika $\kappa = ac + b$, gde je *c* koncentracija surfaktanta (ili ukupna koncentracija surfaktanata). Rešavanjem dve jednačine po *c* dobija se vrednost presečne tačke, odnosno vrednost *kmk* (Vilijamsova (Williams) metoda) [150].

Promena nagiba se najverovatnije dešava zbog toga što su micelle veće od pojedinačnih „monomera“ površinski aktivnih materija pa su slabije pokretljive.

Povećanjem koncentracije surfaktanata iznad *kmk* dolazi do povećanja koncentracije micela, dok koncentracija „monomera“ ostaje nepromenjena, što verovatno rezultuje manjom promenom specifične provodljivosti sa povećanjem ukupne koncentracije surfaktanta u micelarnoj oblasti. Takođe, do promene nagiba dolazi verovatno i zbog toga što micelle zahvaljujući negativno naelektrisanjoj površini, na kojoj se nalaze karboksilatne grupe, vezuju pozitivno naelektrisane Na^+ jone, pri čemu je stepen njihovog vezivanja veći nego u nemicelarnom (premicelarnom) opsegu koncentracija. Odnosno, micelle se ponašaju kao slabiji elektroliti od pojedinačnih surfaktanata zbog manjeg stepena disocijacije u vodenoj sredini. Zbog toga, Na^+ joni slabije učestvuju u provodljivosti rastvora pri micelarnim koncentracijama površinski aktivnih materija, usled čega specifična provodljivost slabije raste sa povećanjem koncentracije surfaktanata, nego kada su u rastvoru prisutni samo pojedinačni surfaktanti.

Međutim, promena nagiba specifične provodljivosti u funkciji koncentracije kod ispitivanih čistih surfaktanata i njihovih smeša je slaba i teško uočljiva zbog toga što su micelle ispitivanih anjona žučnih kiselina i mešovite micelle građene od malog broja anjona žučnih kiselina, pa su i efekti promene nagiba slabiji.

Kako bi vrednosti *kmk* dobijene na prethodno opisan način bile potvrđene, vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija anjona žučnih kiselina su pored Vilijamsove metode, u ovom radu,

određene i Filipsovom (Phillips) metodom [151]. Kod Filipsove metode, kmk se određuje kao koncentracija, odnosno ukupna koncentracija surfaktanata pri kojoj dolazi do najveće promene gradijenta određene osobine rastvora (specifične provodljivosti) u zavisnosti od koncentracije:

$$\left(\frac{d^3\kappa}{dc_t^3}\right)_{c_t} = kmk = 0$$

Međutim, zbog male promene nagiba funkcije $\kappa = f(c_t)$, nije moguće primeniti klasični Filipsov metod (fitovanje $d^3\kappa/dc_t^3$ podataka Gausnom funkcijom), zbog čega je korišćen Rung-Kuta (Runge-Kutta) metod integracije sa fitovanjem najmanjih kvadrata prema Levenberg – Markarad (Levenberg-Marquardt) proceduri (**Slika 8**) [152].

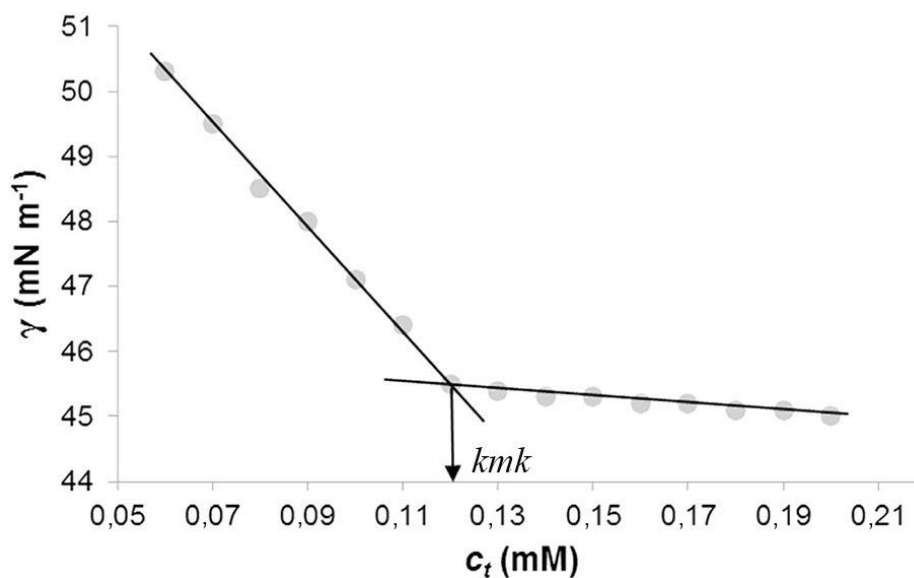
Između vrednosti kmk dobijenih Vilijamsovom i Filipsovom metodom nije utvrđena statistički značajna razlika, zbog čega su u daljem radu korišćene vrednosti određene Filipsovom metodom.

Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija smeša anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 su određene samo Filipsovom metodom.

Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija čistih surfaktanata i ispitivanih binarnih smeša su određene i tenziometrijski (**Slika 9**).

Sa povećanjem koncentracije, vrednost površinskog napona naglo opada (silazni deo krive) usled adsorpcije površinski aktivnih materija na granici faza voda/vazduh, do saturacije granične površine [51].

Daljim povećanjem koncentracije surfaktanata, površinski napon znatno slabije opada (približno konstantni deo krive na **Slici 9**) zbog toga što je granična površina zasićena, pa se surfaktanti udružuju u rastvoru formirajući micide [51]. Dodatkom novih količina PAM, povećava se samo koncentracija micela, koje ne utiču na vrednost površinskog napona jer micide nisu površinski aktivne [51]. Zbog toga kmk predstavlja presečnu tačku dve prave u premicelanoj i postmicelarnoj oblasti (**Slika 9**). Presečne tačke, odnosno vrednosti kmk ispitivanih pojedinačnih surfaktanata i smeša surfaktanata su određene Vilijamsovom metodom.



Slika 9. Zavisnost vrednosti površinskog napona od ukupne koncentracije surfaktanata (c_t).
Primer smeše holata i polisorbata 40 ($\alpha=0,2$). Prave spajaju tačke u premicelarnoj i micelarnoj oblasti.

5.1.1. VREDNOSTI KRITIČNIH MICELARNIH KONCENTRACIJA ČISTIH SURFAKTANATA

Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija čistih (zasebnih) anjona žučnih kiselina i nejonskih surfaktanata, određene merenjima specifične provodljivosti i površinskog napona na 25 °C, predstavljene su u **Tabeli 2**.

Tabela 2. Eksperimentalno dobijene vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija čistih surfaktanata

Surfaktant	kmk^{exp} (mM)	
	<i>a</i>	<i>b</i>
D	4,0	4,1
henoD	6,1	6,0
hioD	16	16,3
C	11,2	11,1
hioC	19,8	19,6
7OD	60,5	60,3
12OL	16,7	16,9
3,12DH	50,4	50,1
polisorbat 40		0,0295
polisorbat 80		0,0120

a-vrednosti dobijene merenjima specifične provodljivosti,

b-vrednosti dobijene merenjima površinskog napona,

kmk^{exp} – eksperimentalno dobijene *kmk* vrednosti ispitivanih surfaktanata; svaka vrednost je srednja vrednost najmanje tri različita merenja. Greška pri određivanju *kmk* nije veća od 4%.

5.2. FIZIČKO-HEMIJSKE KARAKTERISTIKE MEŠOVITIH MICELA ANJONA ŽUČNIH KISELINA I POLISORBATA

5.2.1. ODREĐIVANJE FIZIČKO-HEMIJSKIH PARAMETARA

Za računanje fizičko-hemijskih parametara mešovityh micela: molski udeo hidrofobnijeg surfaktanta u mešovitoj miceli (x_1), molski udeo hidrofilnijeg surfaktanta u mešovitoj miceli (x_2), interakcioni parameter ($\beta_{1,2}$), koeficijent aktivnosti hidrofobnijeg surfaktanta u mešovitoj miceli (f_1), koeficijent aktivnosti hidrofilnijeg surfaktanta u mešovitoj miceli (f_2), dodatna Gibsova energija (G^E), korišćena je regular solution theory, eksperimentalne vrednosti kmk čistih surfaktanata i smeša anjona žučnih kiselina i ispitivanih polisorbata, kao i molski udeli polisorbata u ispitivanim binarnim smešama (α).

5.2.2. SMEŠE ANJONA ŽUČNIH KISELINA I POLISORBATA 40

5.2.2.1. Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija

Na graficima zavisnosti specifične provodljivosti od ukupne koncentracije surfaktanata, kao i na graficima zavisnosti površinskog napona od totalne koncentracije surfaktanata uočeno je postojanje samo jedne kritične micelarne koncentracije. U pojedinim studijama je utvrđeno da u određenim smešama anjonskih surfaktanata i polisorbata postoji više kritičnih micelarnih koncentracija [128,132]. Ova pojava je uočena konduktometrijskim ispitivanjem smeša Na-laurilsulfata i polisorbata, gde su na graficima zavisnosti specifične provodljivosti od ukupne koncentracije surfaktanata dobijene dve pregibne tačke, odnosno dve kritične micelarne koncentracije. Na osnovu ispitivanja koja su prethodno sprovedena, pojava dve pregibne tačke, odnosno dve kmk , najverovatnije znači da se u ovim smešama mogu formirati dva tipa micela, pri čemu pregibna tačka koja se javlja pri nižim koncentracijama najverovatnije odgovara koncentraciji pri kojoj se formiraju mešovite micidele sa većim udelom nejonskog surfaktanta [128]. Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija binarnih smeša anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 određenih tenziometrijom i konduktometrijom

su predstavljene u **Tabeli 3**, zajedno sa vrednostima idealnih kritičnih micelarnih koncentracija (kmk idealnih smeša) ovih sistema izračunatih pomoću jednačine (11).

Tabela 3. Eksperimentalno određene vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija ispitivanih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 i idealne vrednosti kmk ovih smeša

α [polisorbat 40]	kmk^{exp} (mM)							
	a							
	D	henoD	hioD	C	hioC	7OD	12OL	3,12DH
0,1	0,209	0,201	0,185	0,209	0,165	0,196	0,159	0,098
0,2	0,108	0,115	0,097	0,122	0,090	0,11	0,097	0,059
0,3	0,077	0,081	0,083	0,085	0,069	0,067	0,061	0,049
0,4	0,062	0,063	0,060	0,066	0,054	0,060	0,054	0,043
0,5	0,052	0,054	0,053	0,055	0,045	0,051	0,047	0,034
	b							
0,1	0,207	0,199	0,184	0,210	0,163	0,193	0,157	0,099
0,2	0,107	0,115	0,096	0,120	0,089	0,114	0,098	0,061
0,3	0,078	0,080	0,081	0,084	0,070	0,065	0,063	0,050
0,4	0,060	0,062	0,059	0,064	0,052	0,061	0,052	0,042
0,5	0,053	0,055	0,051	0,053	0,044	0,050	0,046	0,059
	kmk^{id} (mM)							
0,1	0,277	0,283	0,290	0,288	0,291	0,294	0,290	0,293
0,2	0,143	0,145	0,146	0,146	0,147	0,147	0,146	0,147
0,3	0,097	0,097	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098
0,4	0,073	0,073	0,073	0,073	0,074	0,074	0,073	0,074
0,5	0,059	0,059	0,059	0,059	0,059	0,059	0,059	0,059

a -vrednosti dobijene merenjima specifične provodljivosti,

b -vrednosti dobijene merenjima površinskog napona,

kmk^{exp} – eksperimentalno dobijene kmk vrednosti binarnih sistema ispitivanih anjona žučnih kiselina i polisorbata 40; svaki rezultat je srednja vrednost tri različita merenja. Greška pri određivanju kmk nije veća od 3%,

kmk^{id} – vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija idealnih smeša ispitivanih anjona žučnih kiselina i polisorbata 40, izračunate na osnovu Klintovog modela idealnih smeša

Nema statistički značajne razlike između *kmk* vrednosti dobijenih konduktometrijskim i tenziometrijskim merenjima (u statističkom smislu, pripadaju istoj populaciji, (t-test, $p < 0,05$)).

Na osnovu vrednosti datih u **Tabeli 2 i 3**, uočava se da su eksperimentalne vrednosti *kmk* smeša anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 znatno niže od vrednosti *kmk* pojedinačnih anjona žučnih kiselina. Takođe, uočava se tendencija opadanja vrednosti *kmk* sa povećanjem molskog udela polisorbata u smeši, za sve ispitivane sisteme.

Pojava da binarne smeše anjonskih i nejonskih surfaktanata imaju znatno niže *kmk* vrednosti od anjonskog surfaktanta je uočena i u prethodnim studijama [17,128]. Na osnovu rezultata priloženih u **Tabeli 3**, uočava se znatno odstupanje eksperimentalno dobijenih vrednosti od izračunatih idealnih *kmk* vrednosti ispitivanih smeša. To najverovatnije znači da se ispitivani sistemi ne ponašaju kao idealne smeše, već da između različitih surfaktanata, tj. gradivnih jedinica mešovitim micela koje se formiraju u vodenim rastvorima ovih smeša, postoje privlačne interakcije koje dodatno olakšavaju njihovo formiranje, te se micelle formiraju pri nižim vrednostima *kmk* od idealnih vrednosti. Odnosno, ove smeše se ponašaju neidealno.

Naime, na prethodnim ispitivanjima je utvrđeno da smeše anjonskih i nejonskih surfaktanata uglavnom pokazuju neidealno ponašanje, najverovatnije zbog postojanja privlačnih interakcija između polarnih delova amfifila u mešovitim micelama [17,128,132-134,143]. Ispitivanjem smeša Na-laurilsulfata i Tween surfaktanata [17,128,132], je utvrđeno postojanje značajnog sinergizma, tj. privlačnih interakcija između polarnih delova anjonskog i nejonskog surfaktanta, najverovatnije kao posledica jon - dipol interakcija, odnosno međudejstava između negativno naelektrisane polarne glave Na-laurilsulfata (SO_4^-) i pozitivno naelektrisanih delova dipola oksietilenskih nizova u molekulima polisorbata [17,128,132].

5.2.2.2. Molski udeli i koeficijenti aktivnosti polisorbata 40 i anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama

Vrednosti molskih udela polisorbata 40 i anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama (x_1 i x_2) su računati na osnovu jednačina (22) i (23). Vrednosti koeficijenata aktivnosti polisorbata 40 (f_1) i anjona žučnih kiselina (f_2) su određene korišćenjem odgovarajućih izraza RST (18) i

(19). U **Tabeli 4** su date vrednosti molskih udela surfaktanata u mešovitim micelama i vrednosti njihovih koeficijenata aktivnosti.

Tabela 4. Molski udeli polisorbata 40 (x_1) i anjona žučnih kiselina (x_2) u mešovitim micelama i koeficijenti aktivnosti surfaktanata u mešovitim micelama (f_1, f_2) u zavisnosti od molskog udela polisorbata 40 u smeši (α)

α [P40]	x_1							
	D	henoD	hioD	C	hioC	7OD	12OL	3,12DH
0,1	0,7889	0,7871	0,7856	0,8099	0,7672	0,8172	0,7579	0,7194
0,2	0,8162	0,8442	0,8084	0,8742	0,7957	0,8538	0,8090	0,7491
0,3	0,8473	0,8718	0,8896	0,8980	0,8326	0,8568	0,8308	0,7817
0,4	0,8808	0,8914	0,8783	0,9178	0,8526	0,8866	0,8461	0,8094
0,5	0,9066	0,9190	0,9227	0,9430	0,8687	0,9104	0,8742	0,8113
x_2								
0,1	0,2111	0,2129	0,2144	0,1901	0,2328	0,1828	0,2421	0,2806
0,2	0,1838	0,1558	0,1916	0,1258	0,2043	0,1462	0,191	0,2509
0,3	0,1527	0,1282	0,1104	0,102	0,1674	0,1432	0,1692	0,2183
0,4	0,1192	0,1086	0,1217	0,0822	0,1474	0,1134	0,1539	0,1906
0,5	0,0934	0,081	0,0773	0,057	0,1313	0,0896	0,1258	0,1887
f_1								
0,1	0,8982	0,8658	0,7983	0,8748	0,7291	0,8137	0,7114	0,4619
0,2	0,8972	0,9235	0,8136	0,9461	0,7668	0,8734	0,8128	0,5339
0,3	0,9242	0,9449	0,9488	0,9629	0,8429	0,8665	0,8446	0,6374
0,4	0,9545	0,9583	0,9263	0,9750	0,8749	0,9176	0,8655	0,7203
0,5	0,9721	0,9775	0,9736	0,9886	0,8975	0,9494	0,9113	0,7103
f_2								
0,1	0,2231	0,0944	0,0486	0,0883	0,0323	0,0162	0,0355	0,0062
0,2	0,1178	0,0966	0,0254	0,0689	0,0178	0,0099	0,0243	0,0037
0,3	0,0883	0,0726	0,0330	0,0523	0,0146	0,0059	0,0170	0,0031
0,4	0,0785	0,0568	0,0167	0,0428	0,0114	0,0052	0,0127	0,0027
0,5	0,0697	0,0534	0,0160	0,0429	0,0088	0,0047	0,0113	0,0018

x_1 – molski udeo polisorbata 40 u mešovitoj miceli, prema RST,

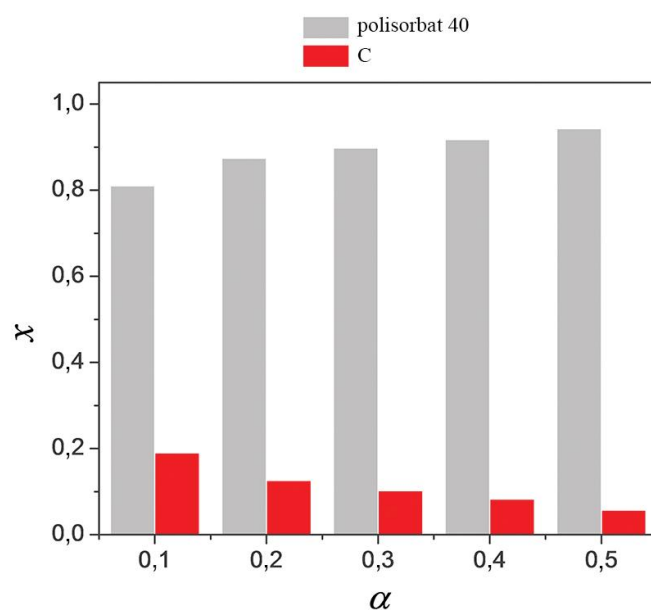
x_2 – molski udeo anjona žučnih kiselina u mešovitoj miceli, prema RST,

f_1 – koeficijent aktivnosti polisorbata 40 u mešovitim micelama, prema RST

f_2 – koeficijent aktivnosti anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama, prema RST

Na osnovu podataka u **Tabeli 4**, uočava se da su vrednosti molskog udela polisorbata 40 u mešovitim micelama znatno veće od njegovog udela u smešama, pri čemu su vrednosti molskog udela anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama znatno manji.

Može se zaključiti da prenos surfaktanata iz rastvora u mešovite micelle nije ekvivalentan njihovom molskom odnosu u rastvoru, odnosno veći je transfer nejonskog surfaktanta, polisorbata 40 u mešovite micelle. Razlika u molskim udelima različitih surfaktanata u mešovitim micelama je najizraženija kod smeša polisorbata 40 i holata (**Slika 10**).

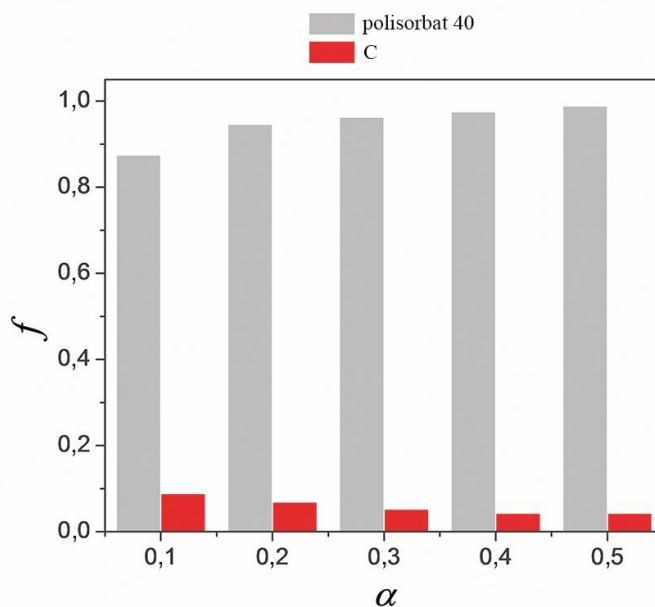


Slika 10. Zavisnost molskog udela surfaktanata u mešovitoj miceli (x) od udela nejonskog surfaktanta (α) u smeši polisorbata 40 i holata

Ova pojava je karakteristična za smeše anjonskih i nejonskih surfaktanata (primećena i u smešama Na-laurilsulfata i polisorbata 20) [17]. Verovatno se javlja kao posledica veće hidrofobnosti nejonskih surfaktanata zbog čega ovi molekuli imaju manju težnju da ostanu u rastvoru u obliku monomera te se ugrađuju u micelle [17].

Mešovite micelle ispitivanih surfaktanata sadrže veće molske udele polisorbata 40 nego anjonskih surfaktanata, zbog čega su i vrednosti koeficijenta aktivnosti nejonskog surfaktanta u mešovitim micelama znatno veće od vrednosti koeficijenta aktivnosti anjona žučnih kiselina. Vrednosti koeficijenta aktivnosti polisorbata 40 su veće pri svim ispitivanjima

α od vrednosti koeficijenta aktivnosti anjona žučnih kiselina. Najizraženija razlika između f_1 i f_2 je kod smeša polisorbata 40 i anjona holne kiseline (**Slika 11**).



Slika 11. Zavisnost vrednosti koeficijenta aktivnosti surfaktanata u mešovitoj miceli (f) od udela nejonskog surfaktanta (α) u smeši polisorbata 40 i holata

5.2.2.3. Međudejstva između gradivnih jedinica mešovitih micela anjona žučnih kiselina i polisorbata 40

Kako bi se kvantifikovala međudejstva između polisorbata 40 i anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama, izračunate su vrednosti interakcionog parametra ($\beta_{1,2}$) ispitivanih sistema, u skladu sa regular solution theory i prezentovane u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Vrednosti interakcionog parametra mešovutih micela anjona žučnih kiselina i polisorbata 40

α [P40]	$\beta_{1,2}$							
	D	henoD	hioD	C	hioC	7OD	12OL	3,12DH
0,1	-2,41	-3,18	-4,90	-3,70	-5,83	-6,17	-5,81	-9,81
0,2	-3,21	-3,28	-5,62	-3,50	-6,36	-6,33	-5,68	-9,97
0,3	-3,38	-3,45	-4,31	-3,66	-6,10	-6,99	-5,90	-9,45
0,4	-3,28	-3,61	-5,17	-3,74	-6,16	-6,69	-6,10	-9,03
0,5	-3,24	-3,47	-4,48	-3,54	-6,27	-6,46	-5,87	-9,61

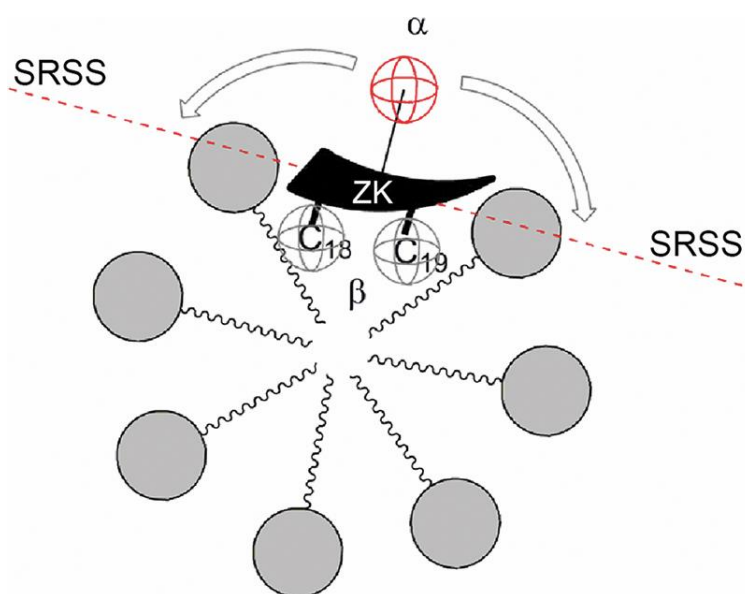
Što je apsolutna vrednost interakcionog parametra veća, jače su interakcije između različitih gradivnih jedinica mešovite micelle [130,136]. Pri tome, negativna vrednost interakcionog parametra označava postojanje sinergizma tj. privlačnog međudejstva kosurfaktanata [17,130,136], dok pozitivna vrednost označava postojanje antagonizma, tj. odbojnih sila između gradivnih jedinica mešovite micelle [130]. Prema pretpostavkama Holanda i Rubinga, neidealnost u smešama anjonskih i nejonskih surfaktanata je najverovatnije posledica interakcija između polarnih delova jonskih i nejonskih surfaktanata [129], pa samim tim i vrednost interakcionog parametra često kvantifikuje međudejstva između polarnih glava jonskih i nejonskih surfaktanata u njihovim mešovitim micelama, koje najčešće potiču od elektrostatičkih interakcija.

Na osnovu vrednosti datih u **Tabeli 5**, uočava se da su vrednosti interakcionih parametara negativne za sve ispitivane smeše, što ukazuje na postojanje sinergizma, odnosno privlačnih interakcija između svih ispitivanih anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 u njihovim mešovitim micelama.

Negativne vrednosti interakcionog parametra su dobijene i u prethodnim studijama smeša anjonskih i nejonskih surfaktanata [132-134]. U ovim studijama je izneta pretpostavka da privlačna međudejstva najverovatnije potiču od primarnih (vodoničnih) i sekundarnih (elektrostatičkih) veza između polarnih glava različitih surfaktanata koje grade mešovite micelle [132-134].

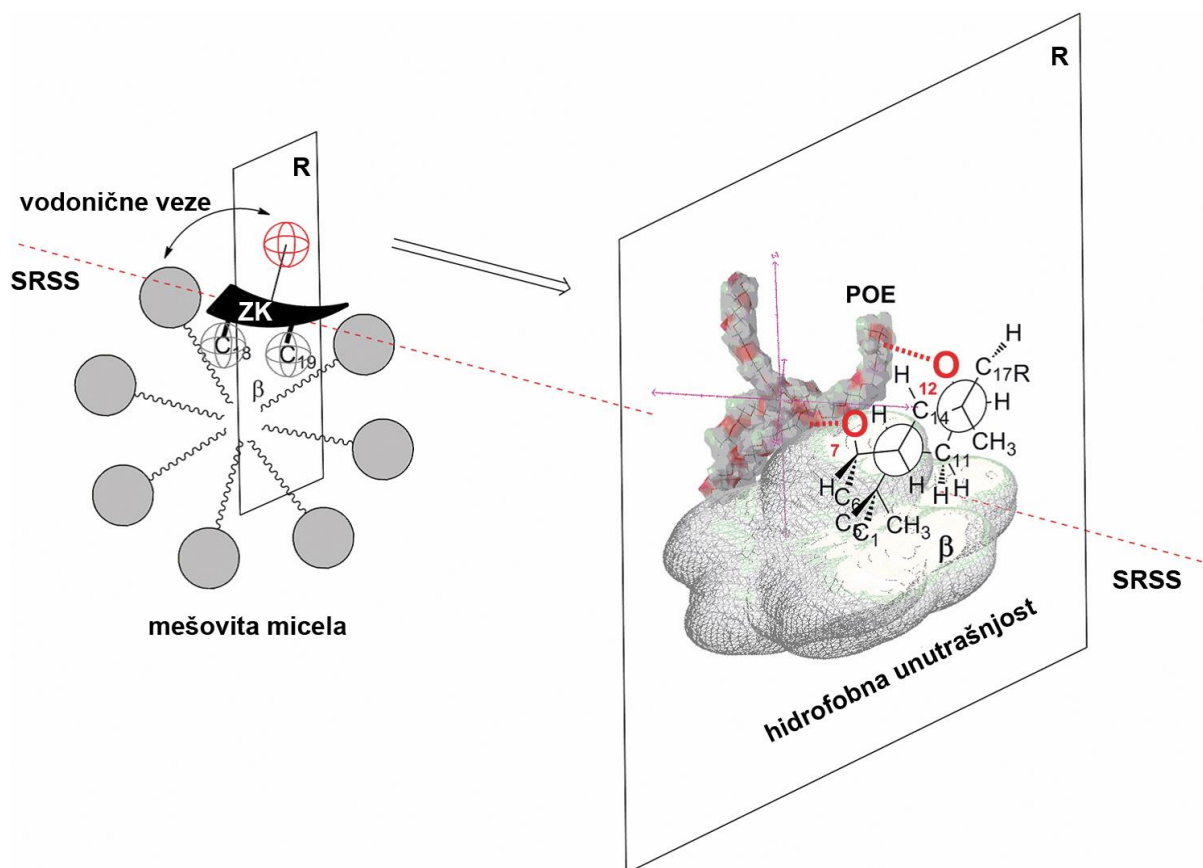
Na osnovu vrednosti $\beta_{1,2}$ parametra, datih u **Tabeli 4**, može se pretpostaviti da neidealnost, odnosno sinergizam u ispitivanim mešovitim micelama, najverovatnije potiče od privlačnog

međudejstva između polarnih grupa različitih surfaktanata u mešovitim micelama, odnosno između oksietilenskih nizova polisorbata 40 i hidrofilnih grupa anjona žučnih kiselina. Naime, zbog preferencijalne ugradnje nejonskog surfaktanta u mešovite micelle može se pretpostaviti da su mešovite micelle polisorbata 40 i soli žučnih kiselina u blizini *kmk* istog oblika kao i micelle polisorbata 40, tj. sfernog oblika. Takođe, na osnovu zaključaka iznetih u prethodnim ispitivanjima žučnih soli i drugih amfifila, može se pretpostaviti da se anjoni žučnih kiselina asociraju svojim hidrofobnim stranama [30,125], pri čemu su anjoni žučnih kiselina najverovatnije tangencijalno postavljeni na površini mešovite micela (**Slika 12**). Odnosno, hidrofobna, β strana, je verovatno orijentisana ka unutrašnjosti micelle, tj. ka hidrofobnom jezgru građenom od ugljovodoničnih nizova molekula Tween-a 40, kako bi hidrofobne grupe steroidnog skeleta bile što manje izložene molekulima vode.



Slika 12. Prikaz mešovite micelle polisorbata 40 i anjona žučne kiseline (ZK) u blizini *kmk* (SRSS=srednja ravan steroidnog skeleta)

Pri takvoj poziciji molekula soli žučnih kiselina u mešovitim micelama, hidrofilna strana anjona žučnih kiselina je najverovatnije orijentisana ka vodenoj fazi. Ovakva orijentacija anjona žučnih kiselina omogućava uspostavljanje vodoničnih veza između polioksietilenskih delova i hidrofilnih grupa anjona žučnih kiselina (**Slika 13**).



Slika 13. Vodonične veze između OH grupa anjona žučne kiseline i polioksietilenskih (POE) delova polarne glave polisorbata 40 (u ravni „R“ je kao primer data Njumanova projekciona formula steroidnog skeleta holata; SRSS=srednja ravan steroidnog skeleta)

5.2.2.3.1. Analiza vrednosti interakcionog parametra

Kako bi se izvršila analiza uticaja strukture anjona žučnih kiselina na vrednosti interakcionih parametara mešovitih micela, na osnovu podataka datih u **Tabeli 5** su izračunate srednje vrednosti $\beta_{1,2}$ parametra ispitivanih sistema polisorbata 40 i anjona žučnih kiselina i prezentovane u **Tabeli 6**.

Tabela 6. Srednje vrednosti $\beta_{1,2}$ parametra ispitivanih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 40

	D	henoD	hioD	C	hioC	7OD	12OL	3,12DH
ukupan broj OH i/ili =O grupa	2	2	2	3	3	3	2	2
broj <i>e</i> OH i/ili =O grupa	1	1	2	1	2	3	2	2
broj <i>a</i> OH i/ili =O grupa	1	1	0	2	1	0	0	0
$\beta_{1,2}$	-3,104	-3,398	-4,896	-3,628	-6,144	-6,528	-5,872	-9,574

Dakle, vrednost interakcionog parametra ispitivanih sistema opada sledećim redosledom (ako se posmatra anjon žučne kiseline koji ulazi u sastav mešovite micelle):

$$D(-3,10) < \text{henoD}(-3,398) < C(-3,628) < \text{hioD}(-4,896) < 12\text{OL}(-5,872) < \text{hioC}(-6,144) < 7\text{OD}(-6,528) < 3,12\text{DH}(-9,574)$$

Poređenjem vrednosti interakcionog parametra može se primetiti da vrednost interakcionog parametra značajno varira u zavisnosti od strukture anjona žučne kiseline koja ulazi u sastav mešovite micelle. Odnosno, pošto svi ispitivani anjoni žučnih kiselina imaju istu steroidnu osnovu, a razlikuju se po broju, orijentaciji i poziciji hidrofilnih grupa, može se reći da vrednost interakcionog parametra zavisi od broja i prostorne orijentacije ovih hidrofilnih grupa (odnosno grupa koje sadrže atom kiseonika) u steroidnom skeletu anjona žučnih kiselina, kao i od njihove pozicije na steroidnom skeletu.

Na osnovu **Tabele 6** se može grubo zaključiti da ukoliko anjon žučne kiseline ima veći broj grupa koje sadrže atom kiseonika vezanih u ekvatorijalnom položaju za steroidni skelet, veća je apsolutna vrednost parametra interakcije mešovite micelle koju gradi sa polisorbatom 40.

5.2.2.3.2. Uticaj broja hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra

Na osnovu **Tabele 6** se uočava da broj OH grupa vezanih za steroidni skelet određene žučne kiseline ima značajan uticaj na vrednost interakcionog parametra. Međutim, očigledno je da je apsolutna vrednost interakcionog parametra u boljoj korelaciji sa brojem ekvatorijalno orijentisanih OH grupa.

Postojanje korelacije između broja hidroksilnih grupa i vrednosti interakcionog parametra, tj. sinergizma, je najverovatnije posledica stvaranja vodoničnih veza između hidrofilnih grupa anjona žučnih kiselina i oksietilenskih nizova polisorbata 40 u mešovitim micelama. Pri tome, što je veća mogućnost formiranja vodoničnih veza između anjona žučnih kiselina i oksietilenskih nizova polisorbata 40, to je vrednost interakcionog parametra negativnija, tj. veći je sinergizam u ispitivanim mešovitim micelama. Na osnovu **Tabele 6**, veću verovatnoću formiranja vodoničnih veza očigledno imaju anjoni žučnih kiselina sa većim brojem ekvatorijalno orijentisanih OH grupa, pri čemu se može zaključiti da i aksijalno orijentisane OH grupe doprinose sinergizmu.

Svi ispitivani anjoni žučnih kiselina sa OH supstituentima na steroidnom skeletu imaju bar jednu ekvatorijalno orijentisanu OH grupu (na C3). Deoksiholna kiselina i henodeoskiholna kiselina imaju samo jednu OH grupu u ekvatorijalnom položaju (na C3, koja zbog svoje prostorne orijentacije ima manju verovatnoću formiranja vodoničnih veza od ostalih *e* OH grupa), i samo jednu OH grupu aksijalne orijentacije. Zbog toga, anjoni deoksiholne i henodeoksiholne kiseline najverovatnije formiraju manji broj vodoničnih veza sa molekulima polisorbata 40 od anjona ostalih žučnih kiselina (koji sadrže veći broj ekvatorijalno orijentisanih i/ili veći broj aksijalno orijentisanih OH grupa), zbog čega je i apsolutna vrednost interakcionog parametra sistema deoksiholata i henodeoksiholata i nejonskog surfaktanta najmanja, tj. najmanji je sinergizam.

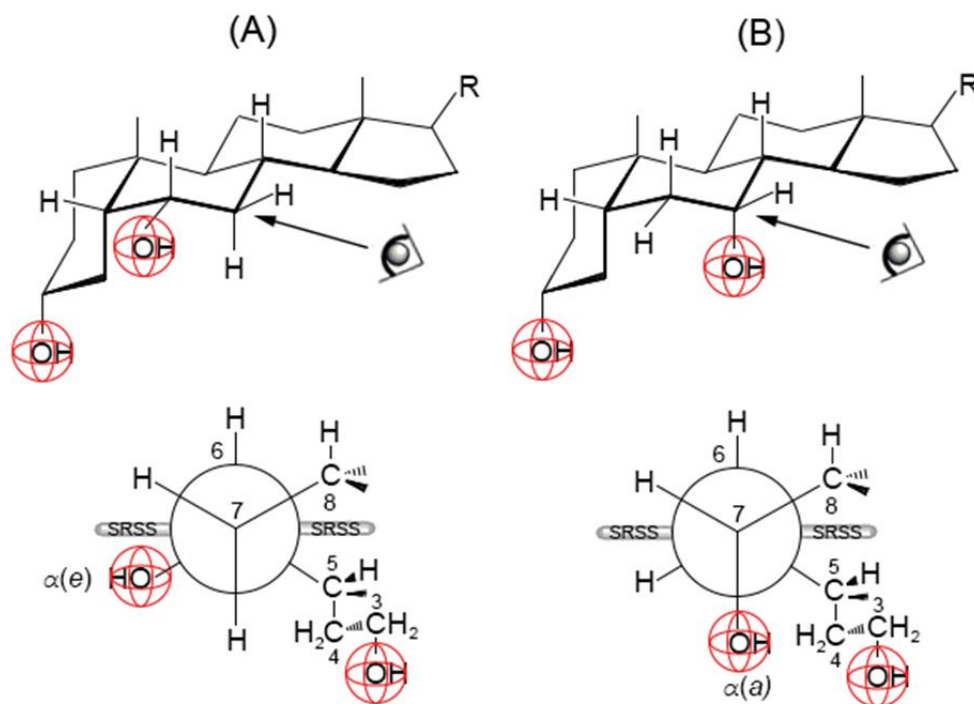
Holna kiselina sadrži jednu hidroksilnu grupu više (aksijalne orijentacije) od deoksiholne i henodeoksiholne, zbog čega najverovatnije ima veću verovatnoću formiranja vodoničnih veza u mešovitim micelama sa polisorbatom 40, odnosno veću apsolutnu vrednost interakcionog parametra.

Pošto se pretpostavlja da su molekuli anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama tangencijalno postavljeni, tj. da srednja ravan steroidnog skeleta zauzima ugao od 90° sa prečnikom sfere mešovite micela, kao i da su oksietilenski lanci polisorbata 40 najverovatnije tangencijalno postavljeni na površini mešovite micela (kako bi sprečili penetraciju molekula vode u unutrašnjost mešovite micela), može se očekivati da su hidrofilne grupe ispitivanih anjona žučnih kiselina koje su bliže SRSS, bliže i oksietilenskim nizovima nejonskog surfaktanta, odnosno imaju veću verovatnoću formiranja vodoničnih veza.

Odnosno, hidroksilne grupe koje su vezane za SRSS pod uglom od 30° tj. u ekvatorijalnom položaju, najverovatnije su bliže oksietilenskim nizovima od aksijalnih OH grupa i lakše formiraju vodonične veze sa polisorbatom 40.

Prema tome, može se pretpostaviti da i anjoni žučnih kiselina sa većim brojem ekvatorijalno orijentisanih hidroksilnih grupa imaju veću verovatnoću formiranja vodoničnih veza sa polisorbatom 40 u mešovitim micelama, zbog čega mešovite micelle anjona ovih žučnih kiselina imaju veću apsolutnu vrednost parametra interakcije.

Ukoliko se posmatraju sistemi anjona žučnih kiselina koje ne sadrže okso grupe, na osnovu **Tabele 6** se uočava da sistem sa hiodeoksiholatom ima veću apsolutnu vrednost parametra interakcije od sistema ostalih dihidroksilnih anjona žučnih kiselina, kao i od holata (koji sadrži tri hidroksilne grupe), najverovatnije zato što ovaj anjon, pored C3 e hidroksilne grupe, sadrži još jednu ekvatorijalno orijentisanu hidroksilnu grupu, na C6 položaju (**Slika 15**), za razliku od deoksiholne, henodeoksiholne i holne kiseline koje imaju samo jednu ekvatorijalno orijentisanu hidroksilnu grupu (na C3).



Slika 15. Razlika u poziciji i orijentaciji OH grupa hiodeoksiholne (A) i henodeoksiholne kiseline (B)

Analizom **Tabele 6**, se takođe može uočiti da je srednja vrednost interakcionog parametra sistema hiholata i polisorbata 40 veća od vrednosti interakcionog parametra holata i polisorbata 40, iako hiholat i holat sadrže isti broj hidroksilnih grupa. Prema tome, veći sinergizam u smešama sa anjonom hiholne kiseline je verovatno posledica većeg broja ekvatorijalno orijentisanih OH grupa u anjonu hiholne kiseline (2) u odnosu na anjon holne kiseline (1).

5.2.2.3.4. Uticaj sternih faktora na vrednost interakcionog parametra

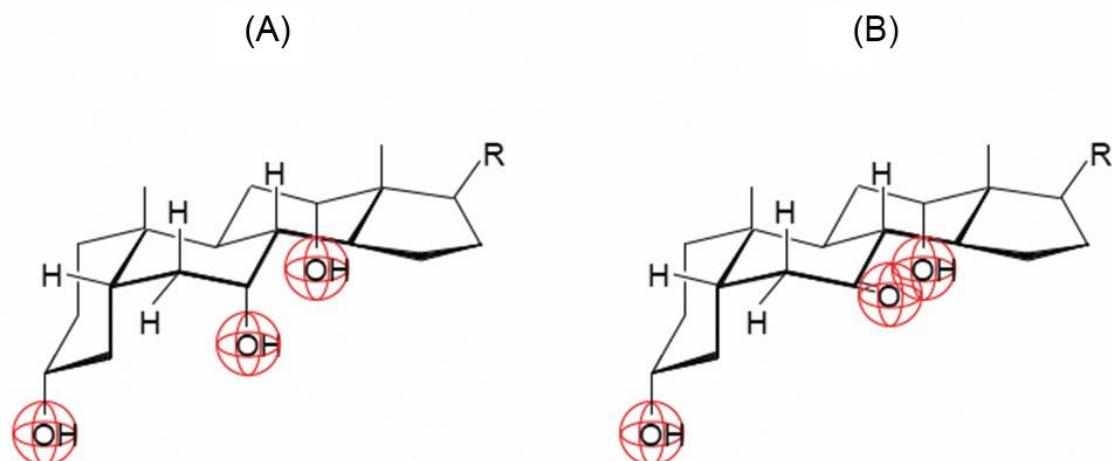
Nešto slabije interakcije u mešovitim micelama deoksiholata od henodeoksiholata se najverovatnije javljaju zbog sternog zaklanjanja C12 OH grupe anjona deoksiholne kiseline, dok anjon henodeoksiholne kiseline ne sadrži OH grupu na C12. Naime, bočni lanac steroidnog skeleta vezan za C17 je u sinklinalnom položaju sa C12 OH grupom.

Na taj način, bočni lanac steroidnog skeleta sterno zaklanja hidroksilnu grupu na C12, ometajući formiranje vodonične veze sa oksietilenskim nizovima polisorbata 40 u mešovitim micelama, zbog čega deoksiholat najverovatnije ima manju verovatnoću formiranja vodoničnih veza od henodeoksiholata, iako imaju isti broj hidroksilnih grupa identične orijentacije. Zbog toga su najverovatnije interakcije u mešovitim micelama sa anjonom deoksiholne kiseline manje od interakcija u micelama građenih od anjona henodeoksiholne kiseline.

5.2.2.3.5. Uticaj oksidacije hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra

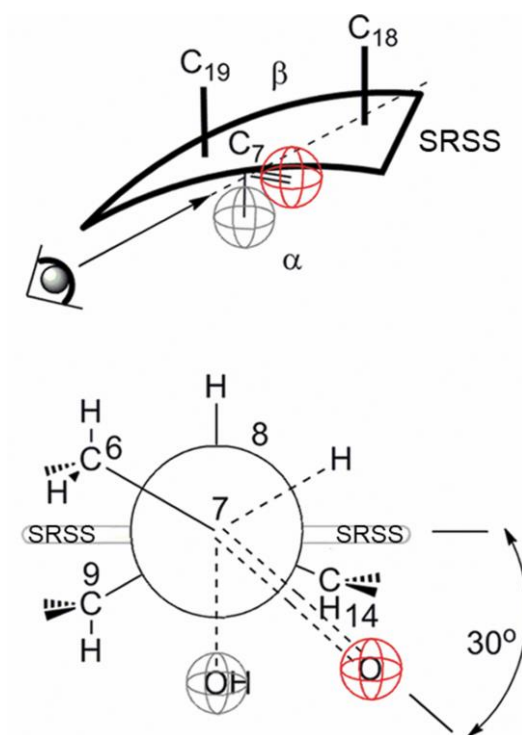
Regioselektivnom oksidacijom anjona hidroksilnih derivata 5 β -holanske kiseline nastaju njihovi okso derivati. Pri konverziji hidroksilne u okso grupu, atom kiseonika menja svoju orijentaciju u odnosu na srednju ravan steroidnog skeleta [82].

Na osnovu **Tabele 6**, može se uočiti da mešovite micelle građene od anjona žučnih kiselina sa okso grupama imaju veću apsolutnu vrednost interakcionog parametra od mešovitih micela sa anjonima žučnih kiselina koje imaju samo hidroksilne supstituente. Tako je na primer, apsolutna vrednost interakcionog parametra mešovitih micela sa 7OD veća od vrednosti $\beta_{1,2}$ parametra mešovitih micela sa holatom. Pošto obe žučne kiseline imaju dve OH grupe, na C3 i C12, iste orijentacije (α ekvatorijalne i α aksijalne orijentacije), može se pretpostaviti da je razlika u vrednosti interakcionog parametra posledica postojanja različitih hidrofилnih grupa na C7. Naime, kod holata je na sedmom ugljenikovom atomu prisutna hidroksilna grupa, dok je kod 7OD, na C7 za steroidni skelet vezana okso grupa (**Slika 16**).



Slika 16. Razlika u strukturi holne kiseline (A) i 7-oksodeoksiholne kiseline (B)

Kod holne kiseline je kiseonikov atom, tj. OH grupa, aksijalne orijentacije na C7, dok je kod 7OD, kiseonikov atom, tj. okso grupa, ekvatorijalne orijentacije, odnosno mnogo je bliži SRSS. Prema tome, uočava se da intenzitet synergizma raste prevođenjem α aksijalnih hidroksilnih grupa u okso grupe, najverovatnije zato što se na taj način atom kiseonika koji učestvuje u formiranju vodoničnih veza sa oksietilenskim nizovima polisorbata 40, pomera za 60° ka SRSS, tj. u ekvatorijalni položaj, zbog čega raste verovatnoća formiranja vodonične veze (**Slika 17**). Odnosno, zbog toga što anjon 7OD sadrži veći broj ekvatorijalno orijentisanih hidrofilnih grupa (dva ekvatorijalna kiseonikova atoma), od holata, koji sadrži samo jedan ekvatorijalno vezan atom kiseonika, najverovatnije je veća verovatnoća formiranja vodoničnih veza tj. veći je synergizam u mešovitim micelama sa 7OD.



Slika 17. Pozicija atoma kiseonika okso grupe u Njumanovoj projekcionoj formuli u odnosu na aksijalnu hidroksilnu grupu i SRSS (primer: 7OD).

Anjon 3,12DH ima okso grupu na C3, koja je dobijena oksidacijom hidroksilne ekvatorijalne grupe, zbog čega je to jedini ispitivani anjon sa kiseonikom u β ekvatorijalnom položaju, što doprinosi privlačnim interakcijama sa polioksietilenskim delovima.

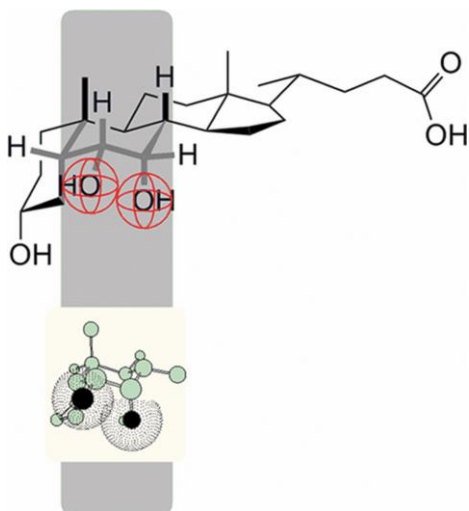
Takođe, anjon 12OL, zbog toga što sadrži veći broj ekvatorijalno orijentisanih atoma kiseonika (dva ekvatorijalna kiseonikova atoma) od deoksiholata i henodeoksiholata, formira mešovite micelle koje imaju veću apsolutnu vrednost interakcionog parametra od mešovitih micela građenih od anjona deoksiholne ili henodeoksiholne kiseline koji sadrže dva atoma kiseonika vezanih za steroidni skelet, ali samo jedan atom u ekvatorijalnom položaju (na C3).

5.2.2.3.6. Uticaj vicinalnih hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra

Poređenjem strukture 7OD i hioholata, sa vrednostima interakcionih parametara njihovih mešovutih micela, može se uočiti da se na osnovu broja ekvatorijalno orijentisanih atoma kiseonika ne može objasniti razlika u synergizmu u mešovitim micelama koje ovi anjoni grade sa polisorbatom 40.

Razlika u interakcijama koje postoje u mešovitim micelama dva anjona su najverovatnije posledica različite pozicije hidrofilnih grupa na steroidnom skeletu.

Naime, hioholat sadrži dve vicinalne OH grupe (na C6 i C7) koje se zbog međusobne blizine najverovatnije ponašaju kao jedna OH grupa, pri interakciji sa polioksietilenskim delom polisorbata 40 (**Slika 18**), pa je i manja verovatnoća formiranja vodoničnih veza sa polarnom glavom nejonskog surfaktanta, nego kada su hidrofilne grupe na većem međusobnom rastojanju, kao što je slučaj sa 7OD i 3,12DH.



Slika 18. Vicinalne OH grupe u steroidnom skeletu hioholne kiseline (H)

5.2.2.4. Uticaj strukture anjona žučnih kiselina na termodinamičku stabilizaciju mešovutih micela

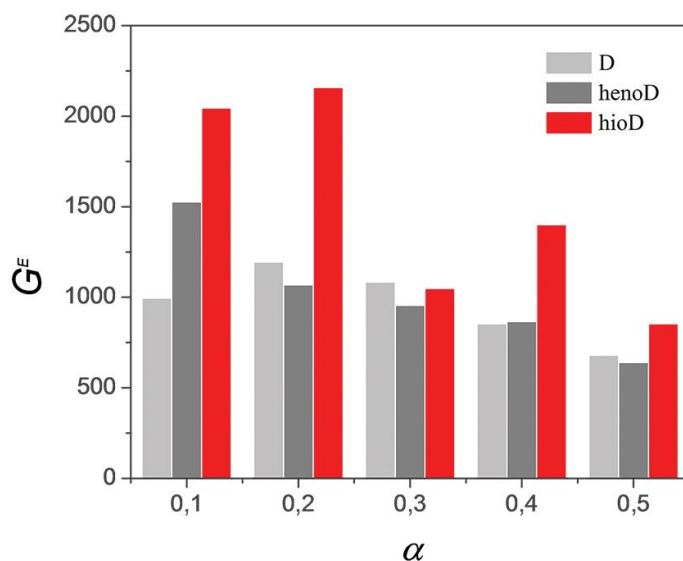
Kako bi se utvrdilo u kojoj meri su ispitivane mešovite micelle stabilnije od idealnih mešovutih micela, izračunate su vrednosti dodatne Gibsove energije (G^E) za ispitivane sisteme, na osnovu jednačine (25) i prezentovane u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Vrednosti dodatne Gibsove energije ispitivanih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 40

α [P40]	G^E (Jmol ⁻¹)							
	D	henoD	hioD	C	hioC	7OD	12OL	3,12DH
0,1	-994,8	-1526,7	-2045,5	-1412,3	-2580,7	-2284,7	-2642,7	-4908,8
0,2	-1193,8	-1069,1	-2157,8	-954,1	-2562,8	-1958,5	-2175,4	-4644,8
0,3	-1084,2	-955,6	-1049,3	-830,9	-2107,5	-2125,8	-2055,7	-3997,3
0,4	-853,5	-866,3	-1401,1	-699,5	-1918,6	-1667,0	-1968,9	-3453,0
0,5	-680,4	-640,3	-853,2	-471,6	-1772,8	-1307,6	-1600,1	-3646,6

G^E pokazuje u kojoj meri su mešovite micelle određene smeše surfaktanata termodinamički stabilnije od idealnih mešovutih micela iste smeše [130]. Što G^E ima više negativnu vrednost, to su realne mešovite micelle stabilnije od idealnih [130]. Takođe, G^E je pokazatelj spontanosti formiranja mešovutih micela. Što G^E ima više negativnu vrednost, to je proces formiranja mešovutih micela spontaniji, nego proces formiranja idealnih mešovutih micela [130].

Prema tome, na osnovu podataka datih u **Tabeli 7**, može se primetiti da je vrednost G^E više negativna u smešama koje sadrže anjone žučnih kiselina sa većim brojem ekvatorijalno orijentisanih hidrofilnih grupa. Na primer, uočava se da među anjonima derivata 5 β -holanske kiseline koji sadrže dve hidroksilne grupe, hiodeoksiholat ima najveće negativne vrednosti G^E , za većinu vrednosti α , odnosno formira mešovite micelle sa polisorbatom 40 koje su u najvećoj meri stabilizovane u odnosu na idealne mešovite micelle (**Slika 19**).



Slika 19. Zavisnost G^E mešovitih micela ispitivanih anjona dihidroksilnih derivata 5 β -holanske kiseline i polisorbata 40 od udela nejonskog surfaktanta (α)

Takođe, uočava se da anjon hioholne kiseline, kao i ispitivani anjoni okso derivata 5 β -holanske kiseline formiraju mešovite micelle koje su u većoj meri stabilizovane u odnosu na idealne mešovite micelle, od anjona holne kiseline.

To znači da, grubo rečeno, vrednost G^E zavisi od broja i orijentacije hidrofilnih grupa, slično kao i vrednost interakcionog parametra.

Poređenjem vrednosti datih u **Tabeli 7** i vrednosti interakcionog parametra prikazanih u **Tabeli 5**, može se uočiti postojanje iste tendencije: što je apsolutna vrednost $\beta_{1,2}$ parametra veća za određen sistem surfaktanata, to i G^E ima veću apsolutnu vrednost.

Odnosno, može se pretpostaviti da je negativna vrednost G^E u ispitivanim sistemima najverovatnije posledica formiranja vodoničnih veza u hidrofilnom delu mešovitih micela. Što se veći broj vodoničnih veza formira između različitih surfaktanata u mešovitoj miceli, to je veća termodinamička stabilnost mešovite micelle u odnosu na idealnu mešovitu micelu, tj. formiranje realne mešovite micelle je spontaniji proces u odnosu na formiranje idealne mešovite micelle. Pri tome, pošto verovatnoća formiranja vodoničnih veza zavisi od broja, prostorne orijentacije i pozicije hidrofilnih grupa vezanih za steroidni skelet, može se reći da

je i termodinamička stabilnost mešovitih micela anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 u odnosu na idealne, funkcija broja, prostorne orijentacije i pozicije hidrofilnih grupa anjona žučnih kiselina.

5.2.2.5. Ispitivanje micelarnih karakteristika pojedinih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 - spektrofluorimetrijskim merenjima

Odnos intenziteta prve i treće emisije trake pirena zavisi od polarnosti mikrosredine u kojoj se nalazi piren [153-156]. Što je sredina hidrofobnija, to je niža vrednost odnosa intenziteta prve i treće emisije trake pirena. Odnosno, što su molekuli pirena u kontaktu sa većim brojem molekula vode, tj. što je sredina hidrofilnija, veći je odnos intenziteta emisijih traka pirena. Na ovaj način se može ispitivati i polarnost micela, tj. jezgra micela, pošto se piren solubilizuje u ovim složenim agregatima [154-156]. Prema tome, može se pretpostaviti da je ispitivanjem zavisnosti odnosa intenziteta prve i treće emisije trake pirena od temperature, u oblasti micelarnih koncentracija, moguće utvrditi propustljivost micela prema molekulima vode sa variranjem temperature, odnosno da je moguće ispitati fleksibilnost ispitivanih micela. U ovom radu su spektrofluorimetrijskom metodom ispitivane micelarne karakteristike anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 na primeru smeše holata i polisorbata 40 i smeše 3,12-dioekso-5 β -holanata i polisorbata 40.

Za određivanje fleksibilnosti micela sa promenom temperature, praćeni su odnosi intenziteta prve i treće emisije trake pirena na dve različite temperature: 15 °C i 35 °C, pri micelanim koncentracijama surfaktanata. Dobijene su sledeće srednje vrednosti razlika odnosa intenziteta prve i treće emisije trake na dve temperature: 0,0203 za smešu C-polisorbat 40, i 0,0224 za smešu 3,12DH-polisorbat 40.

Veća razlika odnosa intenziteta prve i treće emisije trake u smeši 3,12-dioekso-5 β -holanata i polisorbata 40 se može objasniti kao posledica formiranja mešovitih micela koje postaju fleksibilnije sa povećanjem temperature u odnosu na mešovite micelle građene od holata i polisorbata 40. Naime, 3,12-dioekso-5 β -holanat zbog formiranja većeg broj vodoničnih veza sa polisorbataom 40 najverovatnije formira rigidnije mešovite micelle, koje nakon raskidanja vodoničnih veza, sa povećanjem temperature, postaju poroznije u odnosu na mešovite micelle formirane na nižoj temperaturi.

Odnosno, sa povećanjem temperature, molekuli pirena verovatno dolaze u kontakt sa većim brojem molekula vode. Zbog toga je najverovatnije izraženiji porast odnosa intenziteta prve i treće emisione trake u smešama 3,12-diokso-5 β -holanata i polisorbata 40.

5.2.3. SMEŠE ANJONA ŽUČNIH KISELINA I POLISORBATA 80

5.2.3.1. Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija

Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija binarnih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 su određene merenjem površinskog napona i prikazane u **Tabeli 8**. Vrednosti *kmk* su određene i konduktometrijom. Nema statistički značajne razlike između vrednosti *kmk* dobijenih konduktometrijskim i tenziometrijskim merenjima, odnosno u statističkom smislu ove vrednosti pripadaju istoj populaciji (t-test, $p < 0,05$).

Grafici zavisnosti površinskog napona od totalne koncentracije surfaktanata i specifične provodljivosti od ukupne koncentracije surfaktanata su pokazali postojanje samo jedne *kmk* vrednosti u ovim sistemima. Takođe, izračunate su vrednosti idealnih kritičnih micelarnih koncentracija ovih sistema prema jednačini (11) i prezentovane u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Eksperimentalno određene vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija ispitivanih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 i idealne vrednosti kmk ovih smeša

α [P80]	kmk^{exp} (mM)							
	D	henoD	hioD	C	hioC	7OD	12OL	3,12DH
0,05	0,200	0,210	0,213	0,216	0,220	0,229	0,249	0,239
0,1	0,063	0,105	0,09	0,062	0,083	0,119	0,19	0,21
0,15	0,130	0,113	0,118	0,131	0,071	0,086	0,119	0,124
0,2	0,098	0,103	0,083	0,120	0,055	0,064	0,091	0,071
0,3	0,096	0,110	0,122	0,100	0,084	0,123	0,078	0,148
0,4	0,070	0,121	0,088	0,073	0,105	0,047	0,080	0,049
0,5	0,068	0,092	0,072	0,058	0,084	0,112	0,084	0,114
	kmk^{id} (mM)							
0,05	0,227	0,231	0,237	0,235	0,237	0,239	0,237	0,239
0,1	0,117	0,118	0,119	0,119	0,119	0,120	0,119	0,120
0,15	0,079	0,080	0,080	0,079	0,080	0,080	0,080	0,080
0,2	0,059	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060
0,3	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040
0,4	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
0,5	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024

kmk^{exp} – eksperimentalno dobijene kmk vrednosti binarnih sistema ispitivanih anjona žučnih kiselina i polisorbata 80; svaki rezultat je srednja vrednost sedam različitih merenja. Greška pri određivanju kmk nije veća od 4%,

kmk^{id} – vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija idealnih smeša ispitivanih anjona žučnih kiselina i polisorbata 80, izračunate na osnovu Klintovog modela idealnih smeša

Na osnovu eksperimentalno određenih vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija čistih surfaktanata i binarnih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 (kmk^{exp}), datih u **Tabelama 2 i 8**, uočava se da su vrednosti kmk ispitivanih smeša znatno niže od kmk anjona žučnih kiselina, odnosno znatno su bliže vrednosti kmk polisorbata 80.

Iz **Tabele 8**, se primećuje odstupanje eksperimentalno dobijenih vrednosti od izračunatih idealnih vrednosti kmk ispitivanih smeša, što znači da se ispitivane smeše ne ponašaju kao idealni sistemi.

Može se primetiti da su kod mešoviti micela građenih od anjona žučnih kiselina koje sadrže samo OH grupe, eksperimentalno određene vrednosti kmk manje od idealnih samo za $\alpha \leq 0,10$ (odnosno za $\alpha \leq 0,2$ kod mešoviti micela građenih od hioholata). Ovo najverovatnije znači da su mešovite micelle koje se formiraju u rastvorima ovih smeša stabilnije od idealnih,

odnosno da u mešovitim micelama ovih binarnih smeša najverovatnije postoje dodatne privlačne interakcije između različitih surfaktanata koje povećavaju stabilnost mešovutih micela i snižavaju vrednost njihove kritične micelarne koncentracije.

Za $\alpha > 0,10$, kod anjona žučnih kiselina koje sadrže atom kiseonika samo u obliku OH grupa (odnosno za $\alpha > 0,2$ kod mešovutih micela građenih od hioholata), eksperimentalne vrednosti k_{mk} su veće od idealnih što najverovatnije znači da su mešovite micelle formirane u ovim smešama manje stabilne od idealnih.

5.2.3.2. Molski udeli i koeficijenti aktivnosti polisorbata 80 i anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama

U **Tabeli 9** su date vrednosti molskog udela polisorbata 80 (x_1) i anjona žučnih kiselina (x_2) u mešovitim micelama i koeficijenti aktivnosti polisorbata 80 (f_1) i anjona žučnih kiselina (f_2) u ispitivanim sistemima.

Vrednosti molskog udela polisorbata 80 i anjona žučnih kiselina su određene na osnovu jednačina (22) i (23). Vrednosti f_1 i f_2 su izračunate pomoću izraza (18) i (19).

Tabela 9. Molski udeli polisorbata 80 (x_1) i anjona žučnih kiselina (x_2) u mešovitim micelama i koeficijenti aktivnosti surfaktanata u mešovitim micelama (f_1, f_2) u zavisnosti od molskog udela polisorbata 80 u smeši (α)

α [P80]	x_1							
	D	henoD	hioD	C	hioC	7OD	12OL	3,12DH
0,05	0,859	0,891	0,899	0,913	0,927	0,851	0,748	0,810
0,1	0,743	0,897	0,844	0,761	0,824	0,838	0,667	0,685
0,15	0,624	0,668	0,695	0,663	0,914	0,808	0,694	0,681
0,2	0,635	0,646	0,718	0,644	0,932	0,818	0,701	0,781
0,3	0,603	0,757	0,621	0,632	0,653	0,653	0,676	0,631
0,4	0,623	0,575	0,637	0,648	0,624	0,759	0,648	0,735
0,5	0,613	0,593	0,645	0,659	0,634	0,634	0,630	0,628
x_2								
0,05	0,141	0,109	0,101	0,087	0,073	0,149	0,252	0,19
0,1	0,257	0,103	0,156	0,239	0,176	0,162	0,333	0,315
0,15	0,376	0,332	0,305	0,337	0,086	0,192	0,306	0,319
0,2	0,365	0,354	0,282	0,356	0,068	0,182	0,299	0,219
0,3	0,397	0,243	0,379	0,368	0,347	0,347	0,324	0,369
0,4	0,377	0,425	0,363	0,352	0,376	0,241	0,352	0,265
0,5	0,387	0,407	0,355	0,341	0,366	0,366	0,370	0,372
f_1								
0,05	0,970	0,9821	0,9733	0,9858	0,9889	1,1211	1,3869	1,2293
0,1	0,7065	0,9755	0,8887	0,6824	0,8394	1,1832	2,3748	2,5540
0,15	2,6079	2,1137	2,1224	2,4695	0,9710	1,3302	2,1430	3,0350
0,2	2,6097	2,6577	1,9272	3,1050	0,9835	1,3038	2,1630	1,6008
0,3	3,9775	1,7349	4,9113	3,9533	3,5363	4,7010	2,8840	5,8634
0,4	3,7448	7,0086	4,6053	3,7558	5,6113	1,8889	4,1164	2,2221
0,5	4,6211	6,3197	4,6530	3,6651	5,5176	7,3591	5,5510	7,5623
f_2								
0,05	0,3234	0,2992	0,1174	0,2069	0,1645	41,6639	17,8400	42,6442
0,1	0,05482	0,1522	0,0316	0,0208	0,0216	90,1418	32,1411	84,2827
0,15	14,0128	20,6944	49,7829	33,0813	0,0360	156,5174	50,4265	157,5326
0,2	18,2328	25,9213	70,3212	40,7616	0,0442	212,6576	69,4627	396,9131
0,3	24,1725	209,8824	71,7295	57,6364	87,6218	241,7451	100,5734	176,2867
0,4	36,8081	35,3090	110,2624	88,6392	115,6290	548,9937	120,9411	465,1492
0,5	46,5422	50,0916	160,0530	127,8578	168,1639	399,073	143,91	319,2243

x_1 – molski udeo polisorbata 80 u mešovitoj miceli, prema RST,

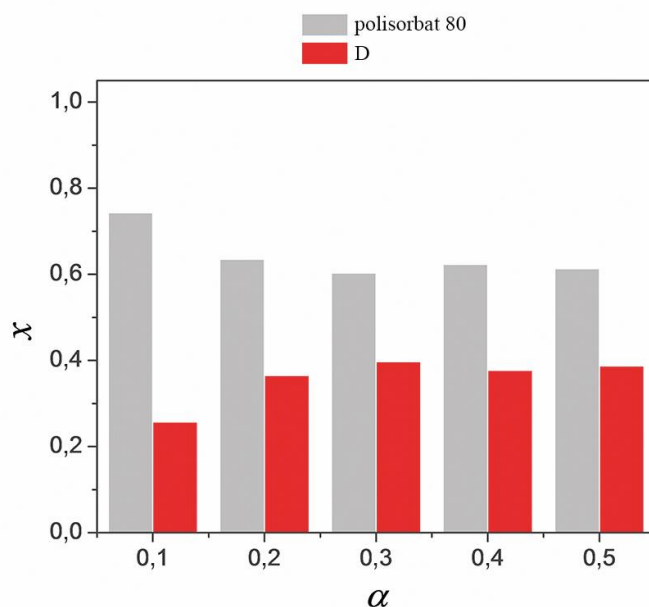
x_2 – molski udeo anjona žučnih kiselina u mešovitoj miceli, prema RST,

f_1 – koeficijent aktivnosti polisorbata 80 u mešovitim micelama, prema RST

f_2 – koeficijent aktivnosti anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama, prema RST

Na osnovu podataka u **Tabeli 9**, uočava se da su molski udeli polisorbata 80 u mešovitim micelama (x_1) veći od njegovog udela u smešama (α), što je izraženo i pri malim vrednostima molskog udela polisorbata 80 u smešama (0,05 i 0,01). Slično kao i u smešama sa polisorbatom 40, očigledno je da je transfer polisorbata 80 u mešovite micelle veći od prenosa anjona žučnih kiselina. Ova pojava se može objasniti većom hidrofobnošću polisorbata 80, zbog čega ima veću težnju da se nagomilava u micelle. Suprotno tome, anjoni žučnih kiselina su hidrofilniji od ispitivanog nejonskog surfaktanta i imaju veću težnju da ostanu u rastvoru u obliku monomera. Na **Slici 20** je pokazana razlika između molskih udela surfaktanata u mešovitim micelama na primeru sistema deoksiholata i polisorbata 80, kod kojih je primećena najveća razlika između vrednosti x_1 i x_2 .

Prema vrednostima datim u **Tabeli 9**, sa povećanjem udela polisorbata 80 u smeši znatno raste koeficijent aktivnosti ovog surfaktanta u mešovitim micelama (f_1), pri čemu opada njegov udeo u mešovitim micelama. Ova pojava je najverovatnije posledica sterne krutosti oleinskog ostatka, vezanog za polarnu glavu polisorbata 80. Naime, oleinska kiselina sadrži krutu, dvostruku vezu *cis* konfiguracije, zbog čega, verovatno, dolazi do povećanja sternih odbojnih interakcija prilikom pakovanja ugljovodoničnih lanaca polisorbata 80 u mešovite micelle, te raste i koeficijent aktivnosti ovog polisorbata u mešovitim micelama.



Slika 20. Zavisnost molskog udela surfaktanata u mešovitoj miceli (x) od udela nejonskog surfaktanta (α) u smeši polisorbata 80 i deoksiholata

5.2.3.3. Međudejstva između gradivnih jedinica mešovitih micela anjona žučnih kiselina i polisorbata 80

Međudejstva između anjona žučnih kiselina i Tween-a 80 su kvantifikovana pomoću $\beta_{1,2}$ parametra koji je računat na osnovu regular solution theory, odnosno jednačine (24).

U **Tabeli 10** su date vrednosti interakcionog parametra, za sve ispitivane sisteme anjona žučnih kiselina i polisorbata 80.

Prema regular solution theory, koja je primenjena na ove sisteme, iz **Tabele 10** se može uočiti da sa porastom udela polisorbata 80 u smeši, uglavnom raste vrednost parametra interakcije u ispitivanim sistemima što znači da dolazi do smanjenja sinergizma i povećanja antagonizma između surfaktanata u mešovitim micelama sa povećanjem molskog udela polisorbata 80 u smeši [130]. Takođe, kod određenih sistema se primećuje promena predznaka interakcionog parametra.

Tabela 10. Vrednosti interakcionog parametra ($\beta_{1,2}$) ispitivanih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 80

α [T80]	$\beta_{1,2}$							
	D	henoD	hioD	C	hioC	7OD	12OL	3,12DH
0,05	-1,53	-1,52	-2,65	-1,89	-2,1	5,15	5,15	5,72
0,1	-5,26	-2,34	-4,85	-6,69	-5,65	6,41	7,80	9,45
0,15	6,78	6,79	8,09	7,96	-3,98	7,74	8,14	10,91
0,2	7,20	7,80	8,25	8,94	-3,59	8,01	8,63	9,81
0,3	8,76	9,33	11,08	10,15	10,49	12,87	10,09	12,99
0,4	9,29	10,78	11,59	10,68	12,20	10,95	11,42	11,37
0,5	10,22	11,13	12,20	11,17	12,75	14,9	12,52	14,62

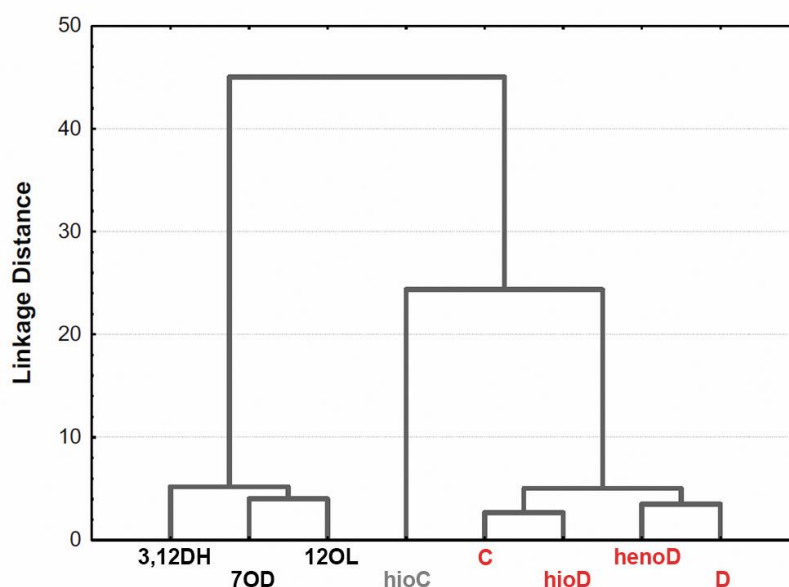
5.2.3.3.1. Analiza vrednosti interakcionog parametra

Na osnovu promene predznaka vrednosti interakcionog parametra u zavisnosti od molskog udela surfaktanta u smeši, očigledno je da se anjoni žučnih kiselina mogu podeliti na dve grupe.

Prvu grupu čine anjoni žučnih kiselina čije mešovite micelle sa polisorbatom 80 imaju negativnu vrednost interakcionog parametra pri nižim molskim udelima polisorbata 80, pri

čemu ova vrednost dobija pozitivan predznak sa povećanjem molskog udela nejonskog surfaktanta (za $\alpha > 0,1$, odnosno za $\alpha > 0,2$ za hioholat). U ovu grupu spadaju derivati 5β -holanske kiseline koji ne sadrže okso grupe vezane za steroidni skelet: D, henoD, hioD, C, i hioC. Drugu grupu čine anjoni žučnih kiselina koji u smešama sa polisorbatom 80 formiraju mešovite micelle sa pozitivnim vrednostima interakcionog parametra pri svim ispitivanim molskim odnosima surfaktanata. U ovu grupu spadaju derivati 5β -holanske kiseline koji sadrže bar jednu okso grupu: 12OL, 7OD i 3,12DH.

Kako bi se izvršila što preciznija klasifikacija anjona žučnih kiselina, konstruisan je dendrogram prema izračunatim vrednostima interakcionog parametra za sedam različitih vrednosti molskih udela polisorbata 80 u smešama surfaktanata (**Slika 21**).



Slika 21. Hijerarhijsko grupisanje ispitivanih anjona žučnih kiselina na osnovu vrednosti parametra interakcije za sedam različitih vrednosti molskih udela Tween-a 80 u smešama surfaktanata

Na osnovu **Slike 21** očigledno je da hioholat (hioC) ima slabiju vezu sa prvom grupom. To je posledica promene predznaka sistema sa anjonom hioholne kiseline pri većim vrednostima α od sistema ostalih anjona koji pripadaju prvoj grupi.

Na osnovu podataka datih u **Tabeli 10** se primećuje da ispitivani sistemi imaju vrednosti interakcionog parametra sa uglavnom pozitivnim predznakom, što prema RST najverovatnije znači da u ispitivanim sistemima uglavnom dominiraju odbojna međudejstva između gradivnih jedinica u agregatima u odnosu na njihova idealna stanja. To takođe znači da su ti sistemi manje stabilni od idealnih, što se može zaključiti i poređenjem idealnih vrednosti kmk sa eksperimentalnim vrednostima kmk (**Tabela 8**).

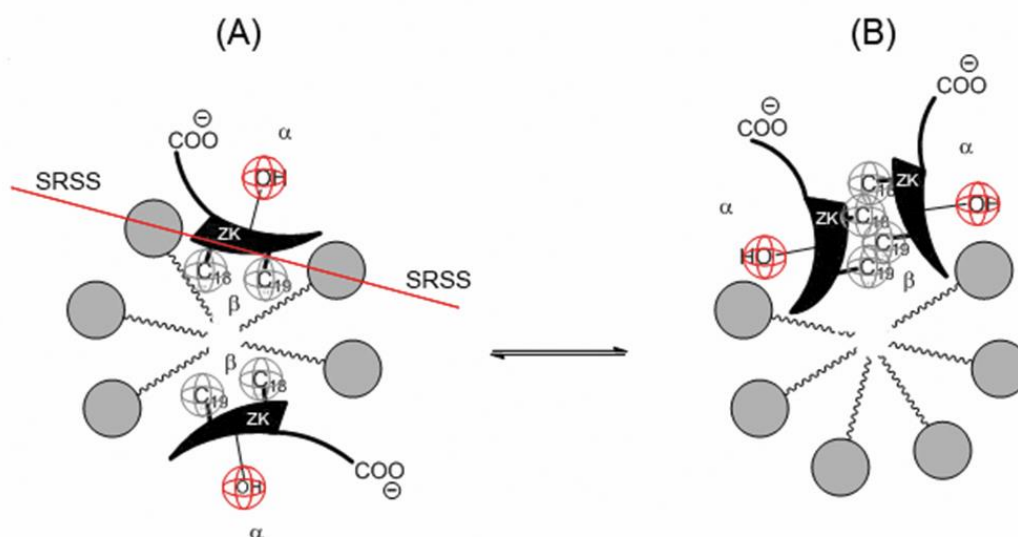
5.2.3.3.2. Uticaj strukture anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 na vrednost interakcionog parametra

U prvoj grupi, mešovite micelle imaju negativan predznak samo u sistemima u kojima je molski udeo polisorbata 80 u smeši do 0,1 (odnosno do 0,2 kod hioholata). Može se pretpostaviti da u sistemima u kojima postoje negativne vrednosti interakcionih parametara, najverovatnije dolazi do formiranja vodoničnih veza između hidrofilnih grupa anjona žučnih kiselina i oksietilenskih nizova polisorbata 80, od kojih potiču sinergistička međudejstva, isto kao i u mešovitim micelama anjona žučnih kiselina i polisorbata 40. Zbog toga se može pretpostaviti i da su u ovim sistemima anjoni žučnih kiselina tangencijalno postavljeni na površini sfernih mešovitih agregata (stanje „A“, **Slika 22**), između polarnih glava polisorbata 80, sa hidrofobnom, β stranom steroidnog skeleta okrenutom ka unutrašnjosti micelle.

Ovakva orijentacija molekula anjona žučnih kiselina je najverovatnija jer favorizuje formiranje vodoničnih veza između atomskih grupa vezanih za steroidni skelet koje sadrže atom kiseonika (posebno onih u ekvatorijalnom položaju) sa oksietilenskim grupama polisorbata 80.

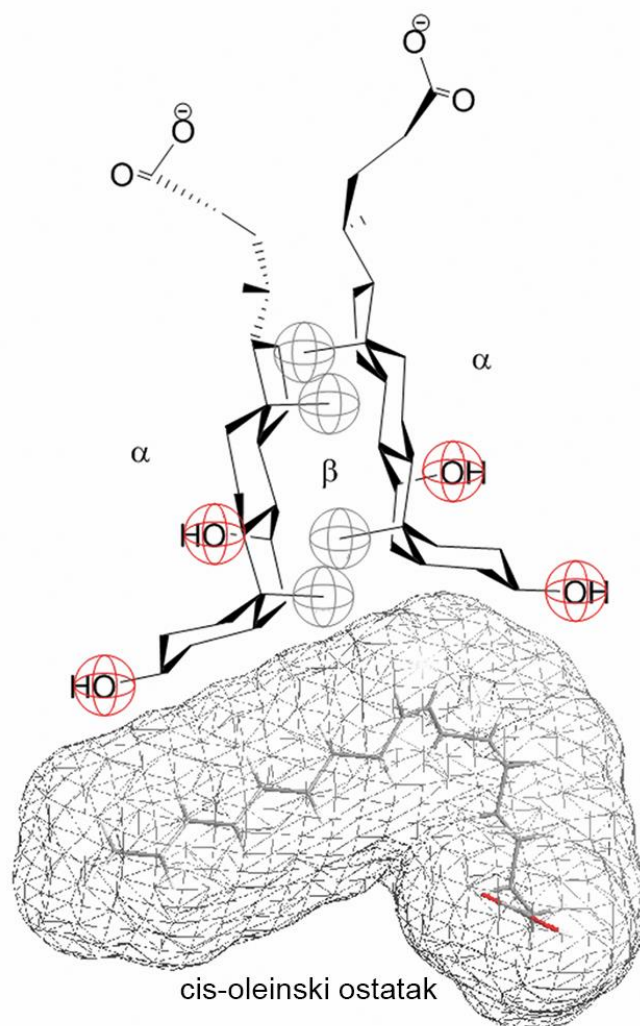
Promena predznaka interakcionog parametra sa povećanjem molskog udela polisorbata 80, verovatno označava faznu transformaciju u mešovitoj miceli. Najverovatnije dolazi do prelaska anjona žučnih kiselina iz tangencijalne u radijalnu orijentaciju, pri čemu anjoni žučnih kiselina formiraju agregate, odnosno dimere (stanje „B“, **Slika 22**). U dimerima su anjoni najverovatnije orijentisani tako da smanje izloženost hidrofobnih strana molekulima

vode. Jedni prema drugima su verovatno okrenuti hidrofobnim, β stranama, pri čemu su svojim A prstenovima orijentisani ka unutrašnjosti micela, kako bi smanjili izloženost β strane ovih prstenova molekulima vode (**Slika 22**).



Slika 22. Fazna transformacija u binarnoj micelarnoj fazi anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 (ZK=anjon žučne kiseline, SRSS= srednja ravan steroidnog skeleta).

Do ove fazne transformacije najverovatnije dolazi usled sve težeg pakovanja oleinskih lanaca polisorbata 80 u micelarnom jezgru mešovityh micela sa povećanjem njihovog molskog udela u smeši. Naime, pri manjim udelima polisorbata 80, oleinski ostaci koji sadrže sterno krutu dvostruku vezu *cis* konfiguracije, se mogu pakovati u šupljinama koje se formiraju ispod β strane tangencijalno postavljenih molekula anjona žučnih kiselina na površini mešovityh micela. Međutim, sa povećanjem udela nejonskog surfaktanta u smeši, raste i broj oleinskih lanaca u micelarnom jezgru, te verovatno dolazi do promene orijentacije anjona žučnih kiselina kako bi došlo do sterno povoljnijeg pakovanja *cis* oleinskih lanaca u mešovityj miceli. Naime, u dimerima, steroidni A prstenovi verovatno formiraju dodatni hidrofobni prostor, koji mogu popuniti oleinski lanci (**Slika 23**).



Slika 23. A prsteni steroidnog skeleta formiraju fleksibilni molekularni pokrivač za *cis* oleinske ostatke polisorbata 80.

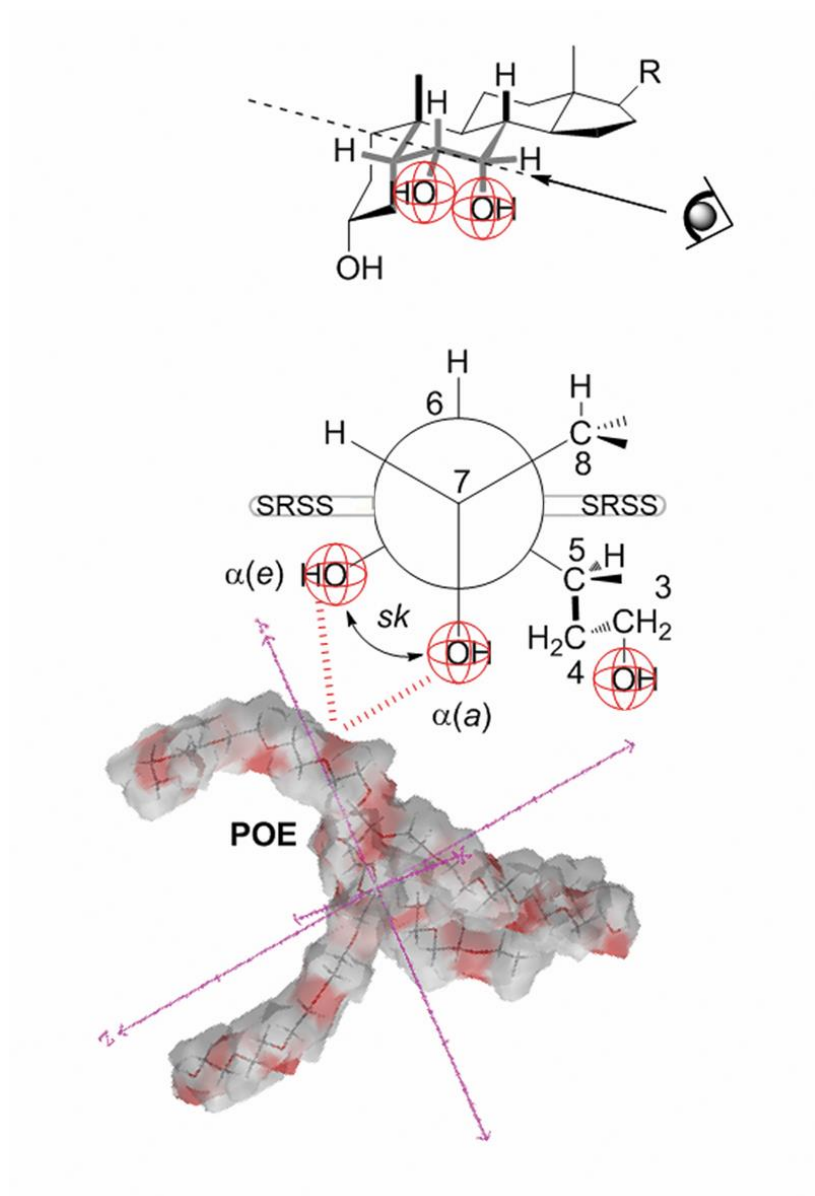
Međutim, u dimerima su karboksilatni anjoni najverovatnije na bliskom rastojanju, zbog čega se javljaju odbojne interakcije između ovih anjona, koje destabilizuju mešovite micelle. Postojanje ovih odbojnih međudejstava koja su posledica otežanog pakovanja oleinskih lanaca polisorbata 80 je najverovatnije odgovorno za pozitivan predznak interakcionog parametra mešovitih micela, za koje se pretpostavlja da su u stanju „B“ (Slika 22). Zbog toga, molekuli polisorbata u smešama sa α većim od 0,1 (odnosno većim od 0,2 za hioholat) imaju vrednosti koeficijenta aktivnosti, f_1 , veće od 1, što predstavlja odstupanje od idealnog

stanja. Takođe, i anjoni žučnih kiselina za α veće od 0,1 imaju vrednosti koeficijenta aktivnosti, f_2 , veće od 1 koje su znatno veće od f_1 , što najverovatnije ukazuje na postojanje antagonizma između anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama.

5.2.3.3.3. Uticaj vicinalnih hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra

Kod mešovitim micela hioholata, vrednost interakcionog parametra ima negativan predznak i za $0,1 < \alpha \leq 0,2$, što nije slučaj sa mešovitim micelama ostalih anjona prve grupe. Ova pojava je najverovatnije posledica prisustva dve vicinalne hidroksilne grupe u sinklinalnoj poziciji, što znači da postoji kontakt između njihovih Van der Valsovih sfera.

Naime, tangencijalno postavljeni anjoni žučnih kiselina u mešovitim micelama najverovatnije imaju povećanu pokretljivost, zbog povećane mobilnosti jezgra mešovitim micela usled rasta broja sterno krutih oleinskih lanaca polisorbata 80, sa povećanjem udela ovog nejonskog surfaktanta. Zbog povećane pokretljivosti anjona žučnih kiselina verovatno je povećana i verovatnoća raskidanja vodoničnih veza u ovim mešovitim micelama. Međutim, kod mešovitim micela anjona hioholne kiseline, nakon raskidanja vodonične veze jedne vicinalne grupe i oksietilenskog niza polisorbata 80, može se odmah potom formirati nova vodonična veza između oksietilenskog niza i druge vicinalne grupe (**Slika 24**). Prema tome, zbog prisustva dve vicinalne hidroksilne grupe u sinklinalnoj poziciji, anjoni hioholne kiseline najverovatnije imaju veću verovatnoću formiranja vodoničnih veza sa molekulima polisorbata 80 i pri vrednostima α većim od 0,1, od ostalih anjona žučnih kiselina koje sadrže samo OH grupe, pa samim tim imaju negativnu vrednost parametra interakcije i za vrednosti α 0,15 i 0,20.



Slika 24. Uticaj vicinalnih OH grupa hioholata (POE = polioksietilen)

5.2.3.3.4. Uticaj oksidacije hidroksilnih grupa na vrednost interakcionog parametra

U sistemima anjona žučnih kiselina druge grupe i polisorbata 80, vrednosti interakcionog parametra imaju pozitivan predznak pri svim ispitivanim molskim udelima polisorbata 80 u smešama.

To najverovatnije znači da se mešovite micelle ovih smeša javljaju u stanju „B“ (**Slika 22**) pri svim α . Mešovite micelle anjona koje sadrže okso grupe, se najverovatnije ne javljaju u stanju „A“ jer je formiranje vodoničnih veza između okso grupe i polioksietilenskih delova manje verovatno u ovim micelama zbog otežanog pakovanja oleinskih lanaca polisorbata 80. Naime, okso grupa je kraća od OH grupe, pa se može pretpostaviti da kiseonikov atom ove grupe ima nešto manju verovatnoću da formira vodoničnu vezu sa oksietilenskim grupama, ili to čini preko molekula vode čak i pošto je u ekvatorijalnom položaju. Međutim, u uslovima kada je pokretljivost micelnog jezgra veća zbog prisustva sterno krutih oleinskih nizova u jezgru micelle, veća je i razbacanost anjona žučnih kiselina po površini micela, pa je verovatno otežano i postavljanje anjona žučnih kiselina i oksietilenskih grupa na optimalnu udaljenost kako bi se formirale vodonične veze. Odnosno, može se pretpostaviti da je manja stabilnost i verovatnoća formiranja mešovitih micela u stanju „A“.

5.2.3.4. Uticaj strukture anjona žučnih kiselina na termodinamičku stabilizaciju mešovitih micela

Vrednosti dodatne Gibsove energije ispitivanih sistema su izračunate i prezentovane u **Tabeli 11**.

Tabela 11. Vrednosti dodatne Gibsove energije ispitivanih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 80

α [P80]	G^E (Jmol ⁻¹)							
	D	henoD	hioD	C	hioC	7OD	12OL	3,12OD
0,05	-459,411	-365,917	-596,624	-372,14	-352,243	1618,654	3771,349	2182,03
0,1	-2489,71	-535,806	-1582,74	-3015,26	-2030,72	2157,056	4496,391	5054,471
0,15	3943,211	3732,787	4250,83	4408,618	-775,331	2976,453	4543,925	5874,994
0,2	4136,631	4421,553	4140,679	5080,63	-564,18	2955,903	5257,923	4159,205
0,3	5198,246	4254,349	6464,206	5851,614	5891,99	7225,743	6222,344	7497,383
0,4	5408,649	6530,112	6643,165	6038,577	7095,398	4964,999	7088,959	5489,564
0,5	6009,892	6658,695	6924,583	6222,109	7333,747	8570,399	8447,772	8466,327

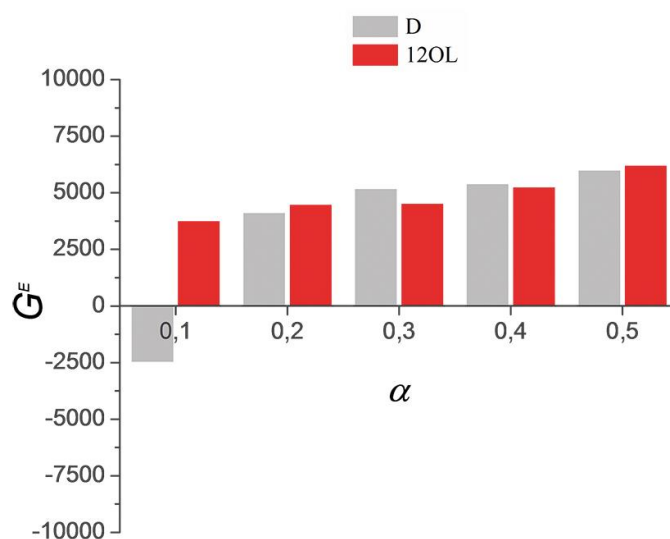
Na osnovu izračunatih vrednosti dodatne Gibsove energije, primećuje se da sistemi anjona žučnih kiselina koje ne sadrže okso grupe i polisorbata 80 za vrednosti α : 0,05 i 0,1 (odnosno za vrednosti α od 0,05 do 0,2 kod hioholata) imaju negativne vrednosti G^E , što znači da se pri ovim molskim udelima polisorbata 80, u ispitivanim smešama formiraju mešovite micelle koje su termodinamički stabilnije u odnosu na idealne mešovite micelle ovih sistema ($G^E = 0$) [130].

Takođe, uočava se da mešovite micelle anjona žučnih kiselina prve grupe, tj. mešovite micelle građene od anjona žučnih kiselina koje sadrže samo hidroksilne supstituente, za $\alpha > 0,1$ (odnosno za $\alpha > 0,2$ kod mešovityh micela građenih od hioholata), imaju $G^E > 0$. Isto tako i mešovite micelle građene od anjona žučnih kiselina sa okso grupama, za sve vrednosti α , imaju $G^E > 0$, što znači da su mešovite micelle u ovim sistemima manje stabilne od idealnih mešovityh micela [130].

Poređenjem vrednosti datih u **Tabeli 10** i **Tabeli 11**, uočava se da vrednosti interakcionog parametra i vrednosti dodatne Gibsove energije imaju isti predznak, što znači da na termodinamičku stabilizaciju mešovityh micela utiču isti faktori kao i na vrednost parametra interakcije.

Na osnovu podataka datih u **Tabeli 11**, uočava se da od anjona 5 β -holanske kiseline koji sadrže dve hidorfilne grupe vezane za steroidni skelet, 12OL ima najveće G^E vrednosti za ispitivane vrednosti α , pri čemu je ova razlika najuočljivija za vrednosti $\alpha < 0,3$. To verovatno znači da okso grupe vezane za steroidni skelet doprinose manje termodinamičkoj stabilizaciji

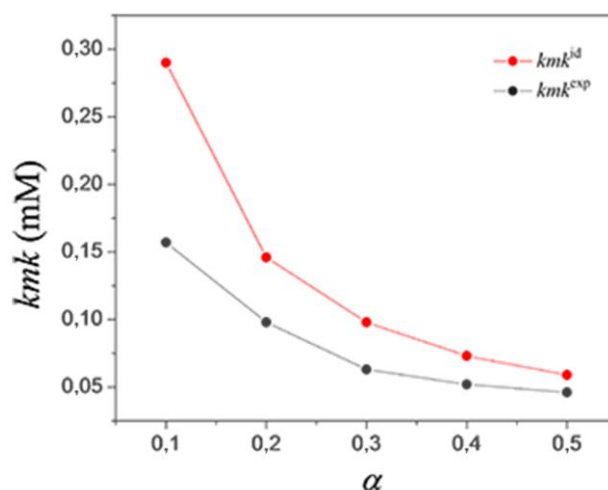
mešovitih micela, od hidroksilnih grupa. Na **Slici 25** su uporedo prikazane vrednosti G^E binarnih sistema polisorbata 80 sa deoksiholatom i 12-oksolitoholatom.



Slika 25. Zavisnost G^E mešovitih micela anjona deoksiholne i 12-oksolitoholne kiseline sa polisorbatom 80 od molskog udela nejonskog surfaktanta u smeši (α)

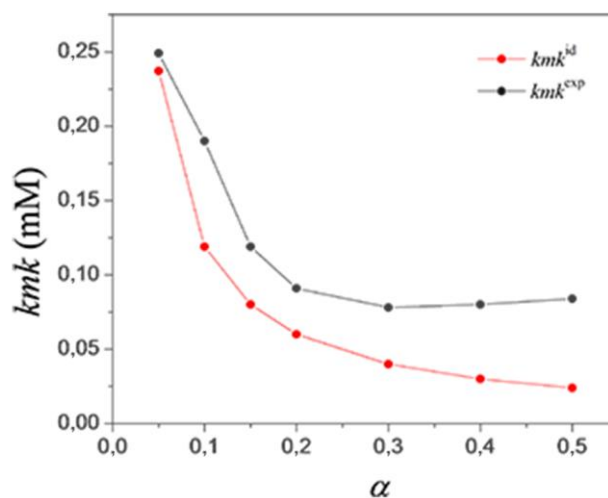
5.2.4. POREĐENJE BINARNIH SISTEMA ANJONA ŽUČNIH KISELINA I POLISORBATA 40 SA BINARNIM SISTEMIMA ANJONA ŽUČNIH KISELINA I POLISORBATA 80

Na osnovu vrednosti eksperimentalnih i idealnih kritičnih micelarnih koncentracija ispitivanih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata, datih u **Tabeli 3 i 8**, može se primetiti da je vrednost eksperimentalnih kmk binarnih smeša sa polisorbatom 40 niža od idealnih za sve vrednosti α . Na **Slici 26** je prikazana zavisnost vrednosti idealne i eksperimentalne kritične micelarne koncentracije od α , za sistem 12OL-polisorbat 40.



Slika 26. Grafik zavisnosti vrednosti idealne i eksperimentalne kritične micelarne koncentracije (kmk^{id} i kmk^{exp}) od molskog udela nejonskog surfaktanta u smešama 12OL i polisorbata 40

Suprotno tome, uočava se da smeše sa polisorbatom 80, uglavnom imaju veće kmk^{exp} od idealnih kmk vrednosti (**Slika 27**).

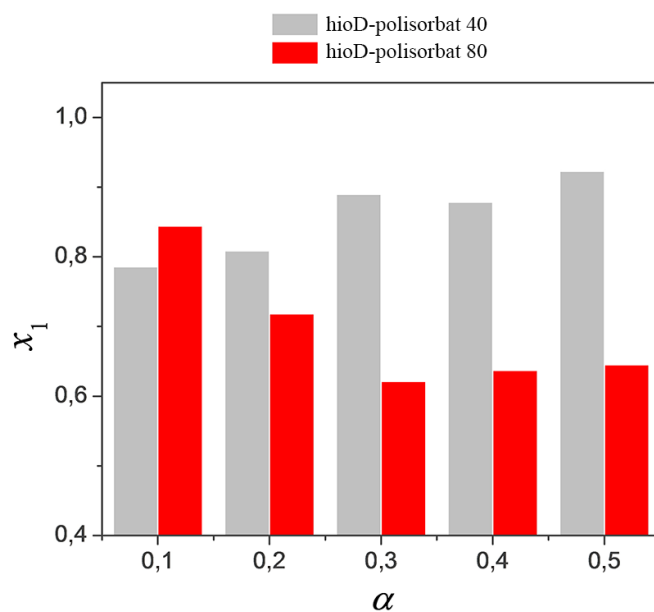


Slika 27. Grafik zavisnosti idealne i eksperimentalne kritične micelarne koncentracije (kmc^{id} i kmc^{exp}) od molskog udela nejonskog surfaktanta u smešama 12-OL i polisorbata 80

Ova pojava pokazuje da su u smešama anjona žučnih kiselina i ispitivanih polisorbata međudejstva između gradivnih jedinica uglavnom različite prirode, što je posebno izraženo pri većim molskim udelima nejonskih surfaktanata.

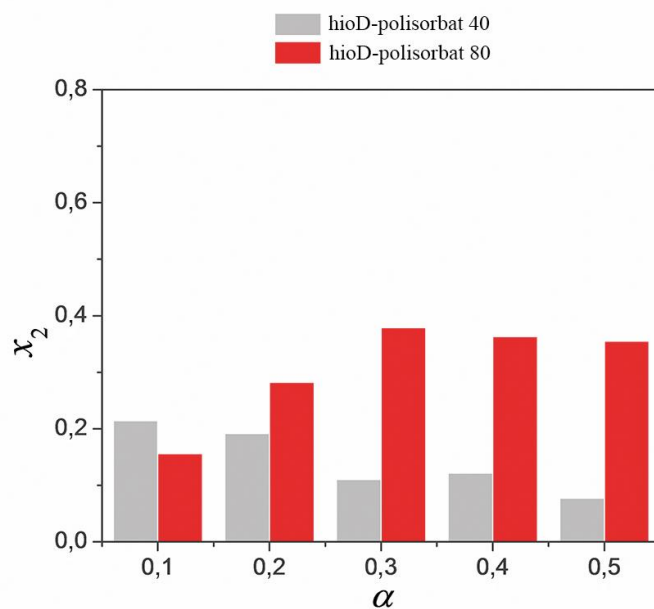
Poređenjem fizičko-hemijskih parametara ispitivanih sistema, mogu se uočiti značajne razlike u zavisnosti od nejonskog surfaktanta koji ulazi u njihov sastav.

Na osnovu podataka datih u **Tabeli 4** i **9**, primećuje se da je molski udeo polisorbata 40 u mešovitim micelama uglavnom veći od molskog udela polisorbata 80, za iste vrednosti α , kao što se može primetiti na **Slici 28**, gde su poređeni molski udeli ispitivanih polisorbata u mešovitim micelama sa hiodeoksiholatom.



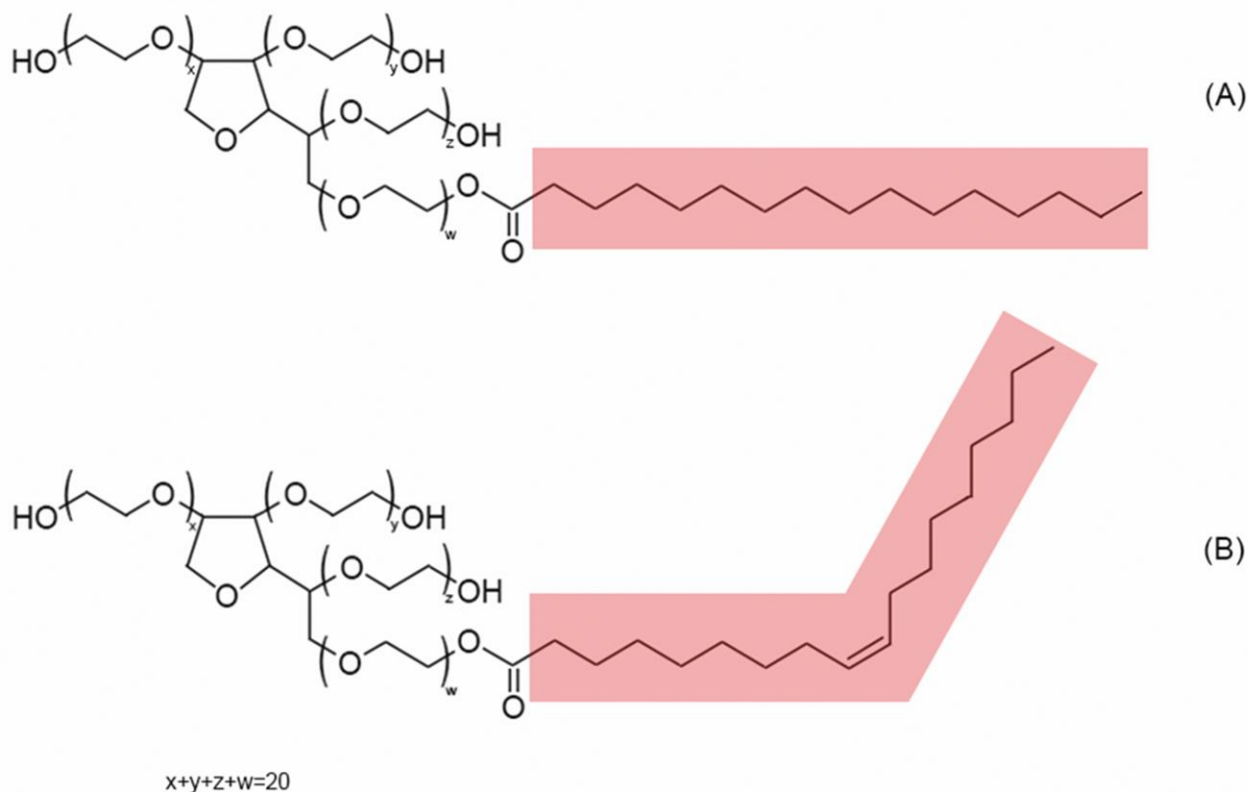
Slika 28. Zavisnost x_1 od α u sistemima hiodeoksiholata i ispitivanih polisorbata

Takođe se može primetiti da su anjoni 5β -holanske kiseline prisutni u većim udelima u mešovitim micelama sa polisorbatom 80 (**Slika 29**).



Slika 29. Zavisnost x_2 od α u sistemima hiodeoksiholata i ispitivanih polisorbata

Razlika u molskim udelima polisorbata 40 i polisorbata 80 u mešovitim micelama je najverovatnije posledica različite strukture hidrofobnog dela ispitivanih nejonskih surfaktanata (**Slika 30**) koje dovode do različitog pakovanja ugljovodoničnih nizova nejonskih surfaktanata u hidrofobno jezgro mešovitim micela.



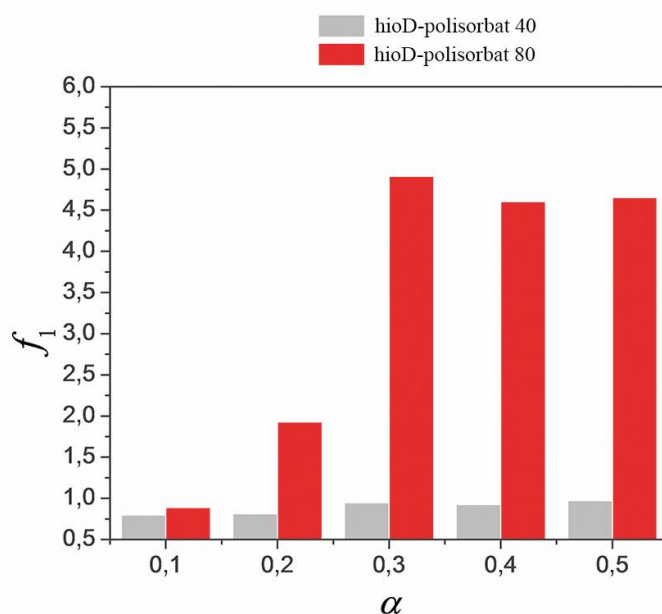
Slika 30. Razlika u strukturi polisorbata 40 (A) i polisorbata 80 (B)

Naime, zbog sterno krutih *cis* dvostrukih veza, oleinski lanci polisorbata 80 se najverovatnije teže pakuju od fleksibilnog palmitinskog ostatka polisorbata 40, u hidrofobno jezgro. Zbog toga je manji udeo molekula polisorbata u mešovitim micelama od polisorbata 40.

Na osnovu **Tabele 4 i 9** se takođe uočava da su vrednosti koeficijenata aktivnosti polisorbata 80 uglavnom znatno veće od vrednosti koeficijenata aktivnosti polisorbata 40 u mešovitim micelama. Ova pojava je takođe verovatno posledica veće krutosti dvostruke veze

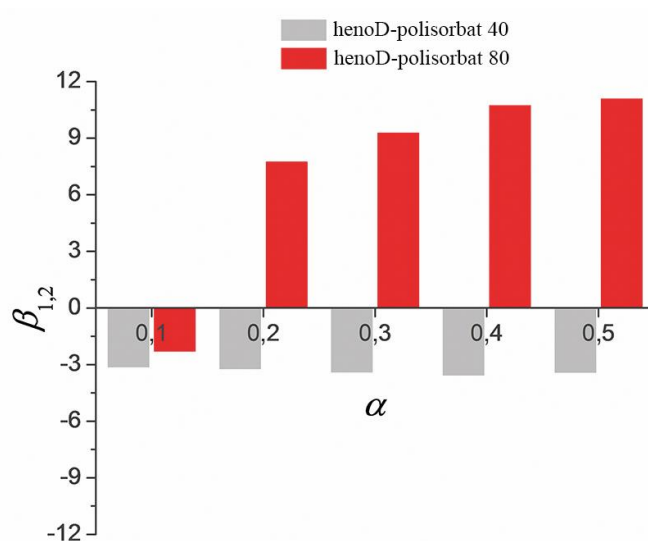
hidrofobnog repa polisorbata 80, zbog čega ovaj surfaktant verovatno ima veću ukupnu pokretljivost u mešovitim micelama od polisorbata 40.

Na **Slici 31** su upoređene vrednosti f_1 sistema polisorbata 40 i polisorbata 80 sa hiodeoksiholatom, za različite vrednosti α .



Slika 31. Zavisnost vrednosti koeficijenta aktivnosti polisorbata 40 i polisorbata 80 od α u smešama hiodeoksiholata i ispitivanih polisorbata

Na osnovu **Tabele 5** i **10** se uočava da vrednosti interakcionih parametara svih sistema polisorbata i derivata 5 β -holanske kiseline koji nemaju okso grupe vezane za steroidni skelet, kada je $\alpha \leq 0,1$ (odnosno kada je $\alpha \leq 0,2$ za hioholat), imaju iste (negativne) predznake. Međutim, sa povećanjem udela nejonskih surfaktanata u ispitivanim smešama, primećuje se da sistemi sa polisorbatom 80 menjaju predznak interakcionog parametra, što nije zapaženo u sistemima sa polisorbatom 40. Odnosno, u sistemima sa polisorbatom 80 verovatno dolazi do fazne transformacije sa povećanjem molskog udela nejonskog surfaktanta. Na **Slici 32** je prikazana zavisnost $\beta_{1,2}$ parametra od vrednosti α za sistem henoD-polisorbat 40 i henoD-polisorbat 80.



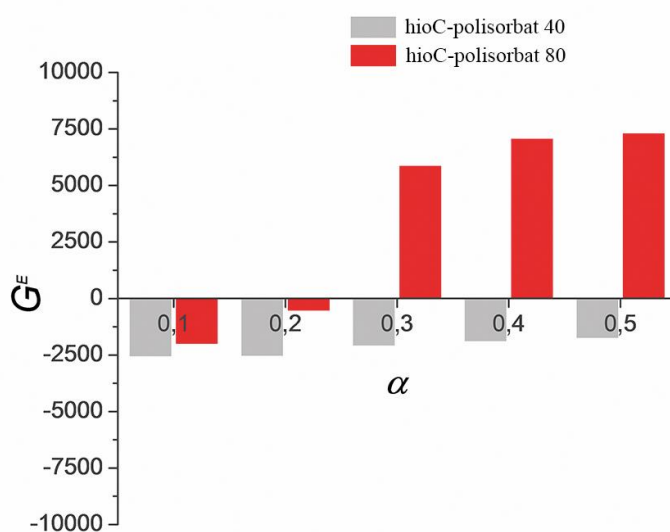
Slika 32. Zavisnost $\beta_{1,2}$ parametra od vrednosti α za sistem henoD-polisorbat 40 i henoD-polisorbat 80.

Sistemi polisorbata 40 i polisorbata 80 i anjona okso derivata 5β -holanske kiseline, imaju različite predznake interakcionog parametra za sve ispitivane α . Uočene razlike u vrednostima interakcionih parametara su, takođe, najverovatnije posledica različite strukture hidrofobnog dela ispitivanih nejonskih surfaktanata.

Zbog sterno krutih dvostrukih veza, oleinski lanci polisorbata 80 se najverovatnije teže ugrađuju u jezgro mešovutih micela od fleksibilnog palmitinskog ostatka, što se najverovatnije odražava i na različit položaj anjona žučnih kiselina u mešovitim micelama polisorbata 40 i polisorbata 80, a samim tim i na međudejstva u hidrofilnom sloju mešovutih micela. Prema tome, prisustvo *cis* dvostruke veze u hidrofobnom repu nejonskog surfaktanta, verovatno indirektno povećava odbojne interakcije u hidrofilnom sloju mešovutih micela.

Poređenjem vrednosti dodatne Gibsove energije ispitivanih sistema, koja pokazuje da li se i u kojoj meri mešovite micelle formiraju spontanije od idealnih [130], primećuju se, takođe, znatne razlike. Sistemi sa polisorbatom 40 imaju uglavnom niže vrednosti G^E od sistema sa polisorbatom 80. Pored toga, G^E vrednosti sistema sa polisorbatom 40 su negativne za sve ispitivane vrednosti α , dok su G^E vrednosti sistema sa polisorbatom 80 uglavnom pozitivne.

To znači da se mešovite micelle formiraju uz veću termodinamičku stabilizaciju u odnosu na idealne mešovite micelle, kada je u smeši prisutan polisorbata sa palmitinskim, fleksibilnim, hidrofobnim repom, nego polisorbata sa dvostrukom vezom *cis* konfiguracije u ugljovodoničnom nizu. Na **Slici 33** je prikazana razlika između vrednosti G^E sistema hioC-polisorbata 40 i hioC-polisorbata 80.



Slika 33. Zavisnost vrednosti G^E od α za sistem hioC - polisorbata 40 i hioC - polisorbata 80.

6. ZAKLJUČAK

Utvrđeno je da smeše anjona žučnih kiselina sa polisorbatom 40 i polisorbatom 80 imaju znatno niže vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija od čistih anjona žučnih kiselina. Dobijene *kmk* vrednosti ispitivanih smeša su bliže vrednostima nejonskih surfaktanata.

Eksperimentalne vrednosti *kmk* smeša anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 su niže od vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija njihovih idealnih smeša, računatih po Klintu, za razliku od smeša anjona žučnih kiselina i polisorbata 80, kod kojih su dobijene eksperimentalne vrednosti uglavnom veće od idealnih kritičnih micelarnih koncentracija. To znači da se u smešama sa polisorbatom 40 najverovatnije formiraju mešovite micelle stabilnije od idealnih mešovitih micela, odnosno u ovim micelama se javljaju dodatna privlačna međudejstva, tj. sinergističke interakcije, između molekula nejonskog surfaktanta i anjona žučnih kiselina. Suprotno tome, u mešovitim micelama anjona žučnih kiselina i polisorbata 80, verovatno se javljaju i odbojna međudejstva, zbog čega su ove mešovite micelle uglavnom manje stabilne od idealnih.

Primenom regular solution theory, određene su fizičko-hemijske karakteristike mešovitih micela. Izračunate vrednosti interakcionog parametra mešovitih micela anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 imaju negativne vrednosti za sve ispitivane vrednosti molskog udela nejonskog surfaktanta u smešama i pokazuju da postoji sinergizam između surfaktanata u mešovitim micelama.

Međutim, vrednosti interakcionog parametra ispitivanih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 imaju uglavnom pozitivne vrednosti i pokazuju da u mešovitim micelama ovih sistema postoje odbojna, antagonistička, međudejstva. Negativne vrednosti imaju sistemi polisorbata 80 i anjona žučnih kiselina koje ne sadrže okso grupe, kada su vrednosti molskog udela nejonskog surfaktanta u smešama 0,05 i 0,01. Izuzetak je sistem anjona hioholne kiseline i polisorbata 80 koji ima negativnu vrednost parametra interakcije za vrednosti molskog udela nejonskog surfaktanta u smeši od 0,05, 0,1, 0,15 i 0,2. Sistemi okso derivata anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 imaju pozitivne vrednosti interakcionog parametra za sve ispitivane vrednosti α .

Ova pojava je najverovatnije posledica sterne krutosti oleinskog lanca polisorbata 80. Zbog krute *cis* dvostruke veze, pakovanje hidrofobnih lanaca polisorbata 80 u mešovitim micelama je otežano, što se odražava i na interakcije u hidrofilnom sloju mešovitih micela, odnosno na vrednost interakcionog parametra.

Poređenjem fizičko-hemijskih svojstava mešovitih micela ispitivan je uticaj hemijske strukture ispitivanih surfaktanata na vrednosti fizičko-hemijskih parametara mešovitih micela.

Komparacijom vrednosti interakcionog parametra ispitivanih sistema anjona žučnih kiselina i polisorbata 40, utvrđeno je da vrednost interakcionog parametra zavisi od broja, orijentacije i pozicije hidrofilnih grupa na steroidnom nukleusu. Pri tome, utvrđeno je da je sinergizam najverovatnije posledica formiranja vodoničnih veza između anjonskog i nejonskog surfaktanta u mešovitim micelama. Naime, anjoni žučnih kiselina koji sadrže veći broj ekvatorijalno orijentisanih hidrofilnih grupa (hidroksilne i okso grupe) imaju negativnije vrednosti interakcionog parametra, što znači da najverovatnije formiraju veći broj vodoničnih veza sa oksietilenskim grupama polisorbata 40. Ova pojava je najverovatnije posledica određene orijentacije ispitivanih anjona žučnih kiselina na površini mešovitih micela. Naime, pretpostavlja se da su mešovite micelle u okolini *kmk* najverovatnije sfernog oblika, pri čemu su anjoni žučnih kiselina najverovatnije tangencijalno postavljeni na površini ovih micela. To znači da srednja ravan steroidnog skeleta zauzima ugao od 90° sa prečnikom sfere mešovitih micela. Hidrofobni deo anjona je okrenut ka unutrašnjosti agregata, dok je hidrofilni deo orijentisan najverovatnije ka vodenoj fazi. Ukoliko se pretpostavi i da su oksietilenski nizovi polisorbata 40 takođe tangencijalno orijentisani na površini micela (kako bi hidrofobno jezgro bilo manje izloženo molekulima vode), tada hidrofilni delovi nejonskog surfaktanta imaju najveću verovatnoću formiranja vodoničnih veza sa ekvatorijalno orijentisanim atomima kiseonika steroidnog skeleta anjona žučnih kiselina, zbog njihove veće blizine oksietilenskim nizovima, od aksijalno orijentisanih hidrofilnih grupa.

Poređenjem fizičko-hemijskih parametara utvrđeno je i da sistemi polisorbata 40 i anjona žučnih kiselina koji sadrže jednu ili više okso grupa imaju veći sinergizam od sistema koji sadrže anjone žučnih kiselina bez atoma kiseonika vezanog za steroidni skelet dvostrukom vezom. Pošto prevođenjem hidroksilnih aksijalnih grupa u okso grupe atom kiseonika postaje

ekvatorijalno orijentisan, anjoni okso derivata žučnih kiselina imaju veću verovatnoću formiranja vodoničnih veza zbog većeg broja ekvatorijalno orijentisanih atoma kiseonika. Samim tim, u mešovitim micelama anjona okso derivata žučnih kiselina i polisorbata 40 postoji veći sinergizam.

U smešama anjona žučnih kiselina i polisorbata 80 sa porastom udela nejonskog surfaktanta u smešama uglavnom raste vrednost interakcionog parametra u ispitivanim sistemima, što znači da se smanjuje sinergizam, odnosno povećava antagonizam u mešovitim micelama.

U sistemima koji sadrže anjone žučnih kiselina bez okso grupa, vrednost interakcionog parametra ima negativne vrednosti pri manjim molskim udelima polisorbata 80 u smešama, što ukazuje na postojanje sinergizma. Pretpostavlja se da su anjoni žučnih kiselina, kao i u smešama sa polisorbatom 40 tangencijalno postavljeni na površini mešovitih micela. Međutim, pri većim vrednostima α , vrednost interakcionog parametra ima pozitivan predznak, što ukazuje na postojanje antagonizma. Ovaj antagonizam se najverovatnije javlja zbog otežanog pakovanja sterno krutih oleinskih lanaca polisorbata 80 u jezgru mešovitih micela, zbog čega su anjoni žučnih kiselina prinuđeni da se drugačije orijentišu u mešovitim micelama. Naime, verovatno dolazi do formiranja dimera anjona žučnih kiselina, čime se formira veća hidrofobna šupljina, odnosno više prostora za pakovanje sterno krutih oleinskih lanaca. Međutim, u dimerima se karboksilatne grupe anjona žučnih kiselina, zbog svoje blizine međusobno odbijaju, čime dolazi do destabilizacije mešovitih micela.

Takođe je utvrđeno da u mešovitim micelama polisorbata 80 i anjona žučnih kiselina koje sadrže okso grupe postoje slabije privlačne interakcije, odnosno postoji veći antagonizam, nego u sistemima sa anjonima žučnih kiselina koje ne sadrže okso grupe. Pretpostavlja se da je ovo verovatno posledica kraće dužine dvostruke veze okso grupe, pa je manja verovatnoća formiranja vodoničnih veza sa oksietilenskim nizovima, uzimajući u obzir veću pokretljivost anjona žučnih kiselina po površini, kada su u jezgru micela prisutni pokretljivi oleinski ostaci polisorbata 80. Odnosno, pretpostavlja se da se anjoni okso derivata žučnih kiselina nalaze samo u obliku dimera u mešovitim micelama.

Na osnovu izračunatih vrednosti dodatne Gibsove energije, G^E , utvrđeno je da se u smešama anjona žučnih kiselina i polisorbata 40 formiraju mešovite micide stabilnije od idealnih, najverovatnije zbog formiranja privlačnih, vodoničnih, veza u micelama, dok su u smešama anjona žučnih kiselina i polisorbata 80, mešovite micide uglavnom manje stabilne od

njihovog idealnog stanja, što je najverovatnije posledica postojanja stereo krute *cis* dvostruke veze u oleinskom ostatku polisorbata 80.

Pored toga, utvrđeno je da mešovite micelle polisorbata 40 i anjona okso derivata žučnih kiselina imaju manju (više negativnu) vrednost dodatne Gibsove energije od mešovitih micela građenih od anjona žučnih kiselina koje ne sadrže okso grupe. To znači da su mešovite micelle anjona okso derivata žučnih kiselina i polisorbata 40 stabilnije u većoj meri u odnosu na idealne mešovite micelle, nego mešovite micelle anjona žučnih kiselina bez okso grupa. Izraženija stabilizacija se javlja kao rezultat veće verovatnoće formiranja vodoničnih veza prilikom formiranja mešovitih micela polisorbata 40 sa anjonima okso derivata žučnih kiselina.

Međutim, utvrđeno je i da mešovite micelle polisorbata 80 i anjona okso derivata žučnih kiselina imaju veću vrednost dodatne Gibsove energije od mešovitih micela građenih od polisorbata 80 i anjona žučnih kiselina koje ne sadrže okso grupe. Ovo znači da su mešovite micelle anjona okso derivata žučnih kiselina i polisorbata 80 nestabilnije u odnosu na idealne mešovite micelle, u većoj meri, nego mešovite micelle polisorbata 80 i anjona žučnih kiselina koje ne sadrže okso grupe. Ova pojava je najverovatnije posledica manje verovatnoće formiranja vodoničnih veza između anjona okso derivata žučnih kiselina i oksietilenskih nizova, kada je u mešovitim micelama prisutan polisorbit 80.

7. LITERATURA

1. Saveyn P, Cocquyt E, Zhu W, Sinnaeve D, Haustraete K, Martins JC, Van der Meeren P. Solubilization of flurbiprofen within non-ionic Tween 20 surfactant micelles: a ¹⁹F and ¹H NMR study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009;11(26):5462-8.
2. Ribeiro ME, de Moura CL, Vieira MG, Gramosa NV, Chaibundit C, de Mattos MC, Attwood D, Yeates SG, Nixon SK, Ricardo NM. Solubilisation capacity of Brij surfactants. *Int. J. Pharm.* 2012;436:631-5.
3. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *Int. J. Pharm.* 2002;235:179-92.
4. Product Information (Roche Australia). Konakion MM[®]. [Online]. [cited 2014 August]; Available from: URL: http://www.roche-australia.com/content/dam/internet/corporate/roche/en_AU/files/miscellaneous/konakion-mm-pi.pdf
5. Guentert TW, Oie S, Paalzow L, Frey BM, Brandt R, Aarons LJ, Rowland M. Interaction of mixed micelles formed from glycocholic acid and lecithin with the protein binding of various drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1987;23:569-77.
6. Gordon GS, Moses AC, Silver RD, Flier JS, Carey MC. Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1985;82(21):7419-423.
7. Hirai S, Yashiki T, Mima H. Effect of surfactants on the nasal absorption of insulin in rats. *Int. J. Pharm.* 1981;9:165- 72.
8. Hoogstraate AJ, Verhoef JC, Tuk B, Pijpers A, Van Leengoed LAMG, Vheijden JHM, Junjinger HE, Bodde HE. Buccal delivery of fluorescein isothiocyanate-dextran 4400 and the peptide drug buserelin with glycodeoxycholate as an absorption enhancer in pigs. *J. Control. Rel.* 1996;41:77-84.

9. Hoogstraate AJ, Senel S, Cullander C, Verhoef J, Junginger HE, Bodde HE. Effects of bile salts on transport rates and routes of FTIC-labelled compounds across porcine buccal epithelium in vitro. *J. Control. Rel.* 1996;40:211-21.
10. Small DM, Penkett SA, Chapman D. Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids and Lipid Metabolism.* 1969;176:178–89.
11. Nakamura H, Sano A, Matsuura K. Determination of critical micelle concentration of anionic surfactants by capillary electrophoresis using 2-naphthalenemethanol as a marker for micelle formation. *Anal. Sci.* 1998;14:379-82.
12. Hait SK, Moulik SP. Determination of critical micelle concentration (CMC) of nonionic surfactants by donor-acceptor interaction with iodine and correlation of CMC with hydrophile-lipophile balance and other parameters of the surfactants. *J. Surfactants Deterg.* 2001;4:303-9.
13. Cui X, Jiang Y, Yang C, Lu X, Chen H, Mao S, Liu M, Yuan H, Luo P, Du Y. Mechanism of The mixed surfactant micelle formation. *J. Phys. Chem. B.* 2010;114:7808-16.
14. Wang TZ, MaoSZ, Miao XJ, Zhao S, Yu JY. H NMR study of mixed micellization of sodium dodecyl sulfate and Triton X-100. *J. Colloid Interface Sci.* 2001;241:465-8.
15. Patel T, Ghosh G, Aswal V, Bahadur P. Micellization of sodium dodecyl sulfate and polyoxyethylene dodecyl ethers in solution. *Colloid. Polym. Sci.* 2009; 287, 1175-81.
16. Haque ME, Das AR, Moulik SP. Behaviors of sodium deoxycholate (NaDC) and polyoxyethylene tert-octylphenyl ether (Triton X-100) at the air/water interface and in the bulk. *J. Phys. Chem.* 1995;99:14032-38.
17. Ghosh S, Moulik SP. Interfacial and micellization behaviors of binary and ternary mixtures of amphiphiles (Tween-20, Brij-35, and sodium dodecyl sulfate) in aqueous medium. *J. Colloid Interface Sci.* 357;1998:357 – 66.

18. Vora S, George A, Desai H, Bahadur P. Mixed micelles of some anionic–anionic, cationic–cationic, and ionic–nonionic surfactants in aqueous media. *J. Surfactants Deterg.* 1999;2: 213-21.
19. Owoyomi O, Jide I, Akanni MS, Soriyan OO, Morakinyo MK. Interactions Between Sodium Dodecylsulphate and Triton X-100: Molecular properties and kinetics investigations. *J. Applied Sci.* 2005;5:729-34.
20. Hammad MA, Müller BW. Increasing drug Solubility by means of bile salt-phosphatidylcholine-based mixed micelles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998;46:361-7.
21. Hammad MA, Müller BW. Solubility and stability of tetrazepam in mixed micelles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1998;7(1):49-55.
22. Zhu L, Feng S. Synergistic solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by mixed anionic-nonionic surfactants. *Chemosphere.* 2003;53(5):459-67.
23. Zhu LZ, Chiou CT. Water solubility enhancements of pyrene by single and mixed surfactant solutions. *J. Environ. Sci. (China).* 2001;13(4):491-6.
24. Zhou W, Zhu L. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by anionic–nonionic mixed surfactant. *Colloids Surf., A.* 2005;255:145-52.
25. Wei J, Huang G, Zhu L, Zhao S, An C, Fan Y. Enhanced aqueous solubility of naphthalene and pyrene by binary and ternary Gemini cationic and conventional nonionic surfactants. *Chemosphere.* 2012;89(11):1347-53.
26. Yu JN, Zhu Y, Wang L, Peng M, Tong SS, Cao X, Qiu H, Xu XM. Enhancement of oral bioavailability of the poorly water-soluble drug silybin by sodium cholate/phospholipid-mixed micelles. *Acta Pharmacol. Sin.* 2010;31:759-64.
27. Jin S, Fu S, Han J, Jin S, Lv Q, Lu Y, Qi J, Wu W, Yuan H. Improvement of oral bioavailability of glycyrrhizin by sodium deoxycholate/phospholipid-mixed nanomicelles. *J Drug Target.* 2012;7:615-22.

28. Dong F, Xie Y, Qi J, Hu F, Lu Y, Li S, Wu W. Bile salt/phospholipid mixed micelle precursor pellets prepared by fluid-bed coating. *Int. J. Nanomedicine*. 2013;8:1653-63.
29. Poša M, Tepavčević V. Mixed micelles of 7,12-dioxolithocholic acid and selected hydrophobic bile acids: Interaction parameter, partition coefficient of nitrazepam and mixed micelles haemolytic potential. *Colloids Surf., B*. 2011;86:285–91.
30. Small DM. Physicochemical studies of cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology*. 1967;52:607–10.
31. Smith A, Lough AK. Micellar solubilization of fatty acids in aqueous media containing bile salts and phospholipids. *Br. J. Nutr.* 1976;35(1):77-87.
32. Mazer NA, Benedek GB, Carey MC. Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. *Biochemistry*. 1980;19(4):601–15.
33. Shankland W. The equilibrium and structure of lecithin-choleate mixed micelles. *Chem. Phys. Lipids*. 1970;4:109-30.
34. Ulmius J, Lindman B, Wennerström H, Johansson LB, Fontell K, Söderman O, Arvidson G. Molecular organization in the liquid-crystalline phases of lecithin-sodium cholate-water systems studied by nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*. 1982;21:1553-60.
35. Nichols JW, Ozarowski J. Sizing of lecithin-bile salt mixed micelles by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Biochemistry*. 1990;29:4600-6.
36. Hjelm RP, Thiyagarajan P, Alkan-Onyukse H. Organization of phosphatidylcholine and bile salt in rodlike mixed micelles. *J. Phys. Chem.* 1992;96:8653-61.
37. Roda A, Hofmann AF, Mysels KJ. The influence of bile salts structure on selfassociation in aqueous solution. *J. Biol. Chem.* 1983;258:6362-70.
38. Bloch K, Berg BN, Rittenberg D. The biological conversion of cholesterol to cholic acid. *J. Biol. Chem.* 1943;149:511-17.

39. Wang DQH, Neuschwander-Tetri BA, Portincas P. *The Biliary System*. San Rafael CA: Morgan and Claypool Publishers; 2012.
40. Bergström S, Borgström B. The intestinal absorption of fats. *Progr. Chem. Fats & Lipids*. 1955;3:351-8.
41. Hofmann AF. The function of bile salts in fat absorption. *Biochem. J*. 1963;89:57-68.
42. Tomida S, Abei M, Yamaguchi T, Matsuzaki Y, Shoda J, Tanaka N, Osuga T. Long-term ursodeoxycholic acid therapy is associated with reduced risk of biliary pain and acute cholecystitis in patients with gallbladder stones: a cohort analysis. *Hepatology*. 1999;30(1):6-13.
43. Frelichowska J, Bolzinger MA, Pelletier J, Valour JP, Chevalier Y. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w pickering emulsions. *Int. J. Pharm.* 2009;371(1-2):56-63.
44. Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006;29(3-4):278-87.
45. Trotta M, Gallarate M, Pattarino F, Morel S. Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions. *J. Control. Release*. 2001;76(1-2):119-28.
46. Kan P, Chen ZB, Lee CJ, Chu IM. Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. *J. Control. Release*. 1999;58(3):271-8.
47. Bhattacharjee J, Verma G, Aswal VK, Date AA, Nagarsenker MS, Hassan PA. Tween 80-sodium deoxycholate mixed micelles: structural characterization and application in doxorubicin delivery. *J. Phys. Chem. B*. 2010;114(49):16414-21.
48. Dimitijevic D, Shaw JA, Florence AT. Effects of some non-ionic surfactants on transepithelial permeability in Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000;52:157-162.

49. Li M, Si L, Pan H, Rabba AK, Yan F, Qiu J, Li G. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp Inhibition: Assessed in vitro by everted gut sac and in situ by improved intestinal perfusion. *Int. J. Pharm.* 2011;403:37-45.
50. Yamagata T, Kusuhara H, Morishita M, Takayama K, Benameur H, Sugiyama Y. Effect of excipients on breast cancer resistance protein substrate uptake activity. *J. Control. Release* 2007;124:1-5.
51. Đaković Lj. Koloidna hemija. 4th ed. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2006.
52. Tadros TF. Applied surfactants. Principles and applications. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.
53. Rosen MJ. Surfactants and interfacial phenomena. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons; 2004.
54. Armstrong MJ, Carey MC. The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *J. Lipid Res.* 1982;23(1):70-80.
55. Stillinger FH. Water revisited. *Science.* 1980;209(4455):451-7.
56. Shimizu S, Pires P, Loh W, Seoud O. Thermodynamics of micellization of cationic surfactants in aqueous solutions: consequences of the presence of the 2-acylaminoethyl moiety in the surfactant head group. *Colloid Polym. Sci.* 2004;282:1026-32.
57. Balducci R, Roda A, Pearlman RS. A theoretical model for the critical micelle concentration of bile salts. *J. Solution Chem.* 1989;18:355-368.
58. Poša M. Fizičko-hemijske osobine žučnih kiselina sa osvrtom na okso derivate 5 β -holanske kiseline. Novi Sad: Ortomedics; 2011.
59. Tanford C. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science.* 1978;200(4345):1012-8.

60. Girard-Egrot A, Blum L, Richter R, Brisson A. Protein-lipid assembly and biomimetic nanostructures. In: Boisseau P, Lahmani M, editors. Nanoscience: nanobiotechnology and nanobiology. New York: Springer; 2009. p. 29-101.
61. Makurjee P, Mysels KJ. Critical Micelle Concentrations of aqueous surfactant systems. *J Pharm. Sci.* 1972;61(2):319-65.
62. Dai C, Du M, Zhao M, You Q, Guan B, Wang X, Liu P. Study of micelle formation by fluorocarbon surfactant *N*-(2-hydroxypropyl)perfluorooctane amide in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B.* 2013;117(34):9922–8.
63. De Guertechin LO. Surfactants: Classification. In: Barel AO, Paye M, Maibach HI, editors. Handbook of Cosmetic Science and Technology. New York: Informa HealthCare; 2009. p. 769-86.
64. Paye M. Mechanism of skin irritation by surfactants and anti-irritants for surfactant-based products. In: Barel AO, Paye M, Maibach HI, editors. Handbook of Cosmetic Science and Technology. New York: Informa HealthCare; 2009. p. 455-70.
65. Pharmacopea Jugoslavica V. Beograd: Savremena administracija; 2000.
66. Jiao J, Burgess DJ. Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. *AAPS PharmSci.* 2003;5(1):1-12.
67. Dokić P, Sherman P. Study on thermal induced phase inversion of concentrated O/W emulsions stabilized by various tween emulsifiers. *Colloid Polym. Sci.* 1980;258(10):1159-63.
68. Christov NC, Ganchev DN, Vassileva ND, Denkov ND, Danov KD, Kralchevsky PA. Capillary mechanisms in membrane emulsification: oil-in-water emulsions stabilized by Tween 20 and milk proteins. *J. Control. Rel.* 2002;209:83–104.
69. Midmore BR. Synergy between silica and polyoxyethylene surfactants in the formation of O/W emulsions. *Colloids Surf., A.* 1998;145:133-43.

70. Pichot R, Spyropoulos F, Norton IT. O/W emulsions stabilised by both low molecular weight surfactants and colloidal particles: The effect of surfactant type and concentration. *J. Colloid Interface Sci.* 2010;352(1):128-35.
71. Yilmazer G, Kokini JL. Effect of Polysorbate 60 on the stability of O/W emulsions stabilized by propylene glycol alginate and xanthan gum. *J. Texture Stud.* 1991;22(3):289–301.
72. Lin Y, Shen Q, Katsumi H, Okada N, Fujita T, Jiang X, Yamamoto A. Effects of Labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamine123, a P-glycoprotein substrate, in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2007;30(7):1301-7.
73. Siegel IA, Gordon HP. Surfactant-induced increase of permeability of rat oral mucosa to non-electrolytes in vivo. *Arch. Oral Biol.* 1985;30:43-7.
74. Siegel IA, Gordon HP. Effects of surfactants on the permeability of canine oral mucosa in vitro. *Tox. Lett.* 1985;26:153-7.
75. Steward A, Bayley DL, Howes C. The effect of enhancers on the buccal absorption of hybrid (BDBB) alpha-interferon. *Int. J. Pharm.* 1994;104:145-9.
76. Aungst BJ, Rogers NJ. Comparison of the effects of various transmucosal absorption promoters on buccal insulin delivery. *Int. J. Pharm.* 1989;53:227-35.
77. Gandhi R, Robinson J. Mechanisms of penetration enhancement for transbuccal delivery of salicylic acid. *Int. J. Pharm.* 1992;85:129-40.
78. Senel S, Hoogstraate AJ, Spies F, Verhoef JC, Bos-van Geest A, Junginger HE, Bodde HE. Enhancement of in vitro permeability of porcine buccal mucosa by bile salts: kinetic and histological studies. *J. Control. Rel.* 1994;32:45-56.
79. Zhang J, Niu S, Ebert C, Stanley TH. An in vivo dog model for studying recovery kinetics of the buccal mucosa permeation barrier after exposure to permeation enhancers: apparent evidence of effective enhancement without tissue damage. *Int. J. Pharm.* 1994;101:15-22.

80. Carey MC. Physical-chemical properties of bile acids and their salts. In: Danielsson H, Sjövall Y, editors. *Sterols and bile acids*. Amsterdam: Elsevier; 1985. p. 345-403.
81. Poša M, Kuhajda K. Hydrophobicity and haemolytic potential of oxo derivatives of cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic acids. *Steroids*. 2010;75:424-31.
82. Poša M, Pilipović A, Lalić M, Popović J. Hydrophobicity and retention coefficient of selected bile acid oxo derivatives. *Acta Chim. Slov.* 2010;57:828-35.
83. Barnes S, Geckle JM. High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of bile salts: individual proton assignments for sodium cholates in aqueous solution at 400 MHz. *J. Lipid Res.* 1982;23(1):161-70.
84. Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65:2461-83.
85. Hofmann AF, Hagey LR, Krasowski MD. Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *J. Lipid Res.* 2010;51(2):226-46.
86. Elliott WH, Hyde PM. Metabolic pathways of bile acid synthesis. *Am. J. Med.* 1971;51(5):568-79.
87. Lindstedt S. The Formation of bile acids from 7 alpha-hydroxycholesterol in the rat. *Acta. Chem. Scand.* 1957;11:417-20.
88. Danielsson H, Einarsson K, Johansson G. Effect of biliary drainage on individual reactions in the conversion of cholesterol to taurocholic acid. *European J. Biochem.* 1967;2:44-49.
89. Senior JR. Intestinal absorption of fats. *J. Lipid Res.* 1964;5(4):495-21.
90. Elliot WH. Metabolism of bile acids in liver and extrahepatic tissues. In: Danielsson H, Sjövall J, editors. *Sterols and bile acids*. Amsterdam: Elsevier; 1985. p. 303-29.
91. Suchy FJ, Sippel CJ, Ananthanarayanan M. Bile acid transport across the hepatocyte canalicular membrane. *FASEB J.* 1997;11:199-205.

92. Small DM, Bourgès MC, Dervichian DG. The biophysics of lipidic associations: I. The ternary systems lecithin-bile salt-water. *Biochim. Biophys. Acta.* 1966;125(3):563-80.
93. Hoffman NE, Simmonds WJ, Morgan RG. A comparison of absorption of free fatty acid and alpha-glyceryl ether in the presence and absence of a micellar phase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1971;231(3):487-95.
94. Carey MC, Small DM. The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. *Am. J. Med.* 1970;49:590-608.
95. Simmonds WJ. The role of micellar solubilization in lipid absorption. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1972;50(4):403-21.
96. Borgström B, Dahlqvist A, Lundh G, Sjövall J. Studies of intestinal digestion and absorption in the human. *J. Clin. Invest.* 1957;36:1521-36.
97. Hylemon PB. Metabolism of bile acids in intestinal microflora. In: Danielsson H, Sjövall J, editors. *Sterols and bile acids.* Amsterdam: Elsevier; 1985. p. 331-44.
98. Eneroth P, Gordon B, Sjövall J. Characterization of trisubstituted cholanoic acids in human feces. *J. Lipid Res.* 1966;7(4):524-30.
99. Eneroth P, Gordon B, Ryhage R, Sjövall J. Identification of mono- and dihydroxy bile acids in human feces by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 1966;7:511-23.
100. Subbiah MT, Tyler NE, Buscaglia MD, Marai L. Estimation of bile acid excretion in man: comparison of isotopic turnover and fecal excretion methods. *J. Lipid Res.* 1976;17(1) 78-84.
101. Setchell KD, Lawson AM, Tanida N, Sjövall J. General methods for the analysis of metabolic profiles of bile acids and related compounds in feces. *J. Lipid Res.* 1983;24(8):1085-100.

102. Youssry M, Coppola L, Marques EF, Nicotera I. Unravelling micellar structure and dynamics in an unusually extensive DDAB/bile salt catanionic solution by rheology and NMR-diffusometry. *J. Colloid Interface Sci.*, 2008;324:192–8.
103. Chakrabarty D, Hazra P, Sarkar N. Solvation dynamics of coumarin 480 in TritonX-100 (TX-100) and bile salt mixed micelles. *J. Phys. Chem. A.* 2003;107:5887-93.
104. Bukiya AN, McMillan J, Parrill AL, Dopico AM. Structural determinants of monohydroxylated bile acids to activate b1 subunit-containing BK channels. *J. Lipid Res.* 2008;49:2441-51.
105. Poša M, Kevrešan S, Mikov M, Ćirin-Novta V, Sârbu S, Kuhajda K. Determination of critical micellar concentrations of cholic acid and its keto derivatives. *Colloids Surf., A.* 2007;59:179-83.
106. Matsuoka K, Suzuki M, Honda C, Endo K, Moroi Y. Micellization of conjugated chenodeoxy- and ursodeoxycholates and solubilization of cholesterol into their micelles: comparison with other four conjugated bile salts species. *Chem. Phys. Lipids.* 2006;139:1-10.
107. Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med. Hypotheses.* 1986;19(1):57-69.
108. Clint JH. Micellization of Mixed nonionic Surface Active Agents. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1.* 1975;71:1327-34.
109. Holland PM, Rubingh DN. Nonideal multicomponent mixed micelle model. *J. Phys. Chem.* 1983;87(11):1984–90.
110. Gao B, Sharma MM. A family of alkyl sulfate gemini surfactants. 1. Characterization of surface properties. *J. Colloid Interface Sci.* 2013;404:80-4.
111. Barry BW, Morrison JC, Russell GFJ. Prediction of the critical micelle concentration of mixtures of alkyltrimethylammonium salts. *J. Colloid Interface Sci.* 1970;33:554-61.

112. Aguiar J, Carpena P, Molina-Bolívar JA, Ruiz CC. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *J. Colloid Interface Sci.*, 2003;258:116–22.
113. Goddard ED, Turro NJ, Kuo PL, Ananthapadmanabhan KP. Fluorescence probes for critical micelle concentration. *Langmuir*. 1985;1:352–55.
114. Khan AM, Shah SS. Determination of critical micelle concentration (cmc) of sodium dodecyl sulphate (SDS) and the effect of low concentration of pyrene on its cmc using Origin software. *J. Chem. Soc. Pak.* 2008;30,186-91.
115. Lange H, Beck KH. Zur Mizellbildung in Mischlösungen homologer und nichthomologer Tenside. *Kolloid Z. Z. Polym.* 1973;251(6):424-31.
116. Shinoda K. The critical micelle concentration of soap mixtures (two-component mixture). *J. Phys. Chem.* 1954;58:541-4.
117. Esposito G, Zanobi A, Giglio E, Pavel NV, Campbell ID. Intermolecular interactions in sodium deoxycholate micelles: An NMR study involving a spin-labeled cholestane. *J. Phys. Chem.* 1987;91(1):83–9.
118. Conte G, Di Blasi R, Giglio E, Parretta A, Pavel NV. Nuclear magnetic resonance and X-ray studies on micellar aggregates of sodium deoxycholate. *J. Phys. Chem.* 1984;88:5120-4.
119. Ishikawa T, Ogawa M, Esumi K, Meguro K. Interactions between betaine-type zwitterionic and anionic surfactants in mixed micelles. *Langmuir*. 1991;7:30-5.
120. Small DM. Size and structure of bile salt micelles. Influence of structure, concentration, counterion concentration, pH, and temperature. *Adv. Chem.* 1968;84:31-52.
121. Kawamura H, Murata Y, Ymaguchi T, Igimi H, Tanaka M, Sugihara G, Kratochvil JP. Spin-label studies of bile salt micelles. *J. Phys. Chem.* 1989;93:3321-6.
122. Oakenfull DG, Fisher LR. The role of hydrogen bonding in the formation of bile salt micelles. *J. Phys. Chem.* 1977;81:1838-41.

123. Fisher LR, Oakenfull DG. The role of hydrogen bonding in the formation of bile salt micelles. 2. A demonstration of geometric effects on the stabilizing role of hydrogen bonding. *J. Phys. Chem.* 1980;84:936-7.
124. Marrink SJ, Mark AE. Molecular dynamics simulation of mixed micelles modeling human bile. *Biochemistry.* 2002;41(17):5375-82.
125. Turner DC, Yin F, Kindt JT, Zhang H. Molecular dynamics simulations of glycocholate–oleic acid mixed micelle assembly. *Langmuir.* 2010;26(7):4687–92.
126. Prakash P, Sayyed-Ahmad A, Zhou Y, Volk DE, Gorenstein DG, Dial E, Lichtenberger LM, Gorfe AA. Aggregation behavior of ibuprofen, cholic acid and dodecylphosphocholine micelles. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1818:3040-7.
127. Tehrani-Bagha AR, Singh RG, Holmberg K. Solubilization of two organic dyes by cationic ester-containing gemini surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* 2012;376(1):112-8.
128. Muñoz M, Rodríguez A, Graciani Mdel M, Moyá ML. Conductometric, surface tension, and kinetic studies in mixed SDS-Tween 20 and SDS-SB3-12 micellar solutions. *Langmuir.* 2004;20(25):10858-67.
129. Holland PM, Rubingh DN. Mixed Surfactant Systems. An Overview. In: Holland PM, Rubingh DN, editors. *Mixed Surfactant Systems.* ACS Symposium Series. Washington DC: American Chemical Society; 1992. p. 2-30.
130. Poša M, Vapa I, Ćirin D. Influence of surfactant hydrophobic segment length on the thermodynamic parameters of binary mixed micelles of homologues polysorbates and Triton X-100. *Fluid Phase Equilib.* 2014;376:124-31.
131. Holland PM. Nonideal mixed micellar solutions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1986;26:111–29.
132. Ćirin D, Poša M, Krstonošić V, Milanović M. Conductometric study of sodium dodecyl sulfate - nonionic surfactant (Triton X-100, Tween 20, Tween 60, Tween 80 or Tween 85) mixed micelles in aqueous solution. *Hem. Ind.* 2012;66(1):21-8.

133. Ćirin D, Poša M, Krstonošić V. Interactions between sodium cholate or sodium deoxycholate and nonionic surfactant (Tween 20 or Tween 60) in aqueous solution. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2012;51:3670–6.
134. Ćirin D, Poša M, Krstonošić V. Interactions between selected bile salts and Triton X-100 or sodium lauryl ether sulfate. *Chem. Cent. J.* 2011;5:89.
135. Lu S, Wu J, Somasundaran P. Micellar evolution in mixed nonionic/anionic surfactant systems. *J. Colloid Interface Sci.* 2012;367(1):272-9.
136. Vautier-Giongo C, Bakshi MS, Singh J, Ranganathan R, Hajdu J, Bales BL. Effects of interactions on the formation of mixed micelles of 1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine with sodium dodecyl sulfate and dodecyltrimethylammonium bromide. *J. Colloid Interface Sci.* 2005;282(1):149-55.
137. Nagata M, Yotsuyanagi T, Ikeda K. Solubilization of Vitamin K1 by bile salts and phosphatidylcholine-bile salts mixed micelles. *J. Pharm. Pharmacol.* 1988;40(2):85-8.
138. Yang Y, McClements DJ. Vitamin E and vitamin E acetate solubilization in mixed micelles: physicochemical basis of bioaccessibility. *J. Colloid Interface Sci.* 2013;405:312-21.
139. Shinichiro H, Takatsuka Y, Hiroyuki M. Mechanisms for the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants. *Int. J. Pharm.* 1981;9(2):173–84.
140. Gad SC. Safety assessment of therapeutic agents administered by the respiratory route. In: Gardner DE, editor. *Toxicology of the Lung*. Fourth Edition. Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2006. P. 232-295.
141. Shinoda K, Hutchinson E. Pseudo-phase separation model for thermodynamic calculations on micellar solutions. *J. Phys. Chem.* 1962;66:577-82.
142. Huang L, Somasundaran P. Theoretical model and phase behaviour for binary surfactant mixtures. *Langmuir.* 1997;13:6683-8.

143. Aoudia M, Al-Maamari T, Al-Salmi F. Intramolecular and intermolecular ion- dipole interactions in sodium lauryl ether sulfates (SLES) selfaggregation and mixed micellization with Triton X-100. *Colloids Surf., A*. 2009;335:55-61.
144. Vora S, George A, Desai H, Bahadur P. Mixed micelles of some anionic–anionic, cationic–cationic, and ionic–nonionic surfactants in aqueous media *J. Surfactants Deterg.* 1999;2:213-21.
145. Owoyomi O, Jide I, Akanni MS, Soriyan OO, Morakinyo MK. Interactions between sodium dodecylsulphate and Triton X-100: Molecular properties and kinetics investigations. *J. Applied Sci.* 2005;5:729-34.
146. Varade D, Patel V, Bahadur A, Bahadur P, Vethamuthu MS. Mixed micelles of cationic surfactants and sodium cholate in water. *Indian J. Biochem. Biophys.* 2004;41:107-12.
147. Miljković D, Kuhajda K, Hranisavljević J. Selective C-12 Oxidation of Cholic Acid. *J. Chem. Res. Synop.* 1996;2:106-7.
148. Tullar BF, inventor; Sterling Drug Inc., assignee. Hemi-diethylene glycol adduct of 3,12-Dihydroxy-7-ketoholanoic acid and preparation thereof. United States patent US 2549947. 1951 Apr 24.
149. Fieser LF, Rajagopalan S. Oxidation of Steroids III. Selective oxidations and acylations in bile acid series. *J. Am. Chem. Soc.* 1950;72:5530-6.
150. Williams RJ, Phillips JN, Mysels KJ. The critical micelle concentration of sodium lauryl sulphate at 25° C. *Trans. Faraday Soc.* 1955;51:728-37.
151. Phillips JN. Energetics of Micelle Formation. *Trans. Faraday Soc.* 1955;51:561-9.
152. Perez-Rodriguez M, Prieto G, Rega C, Varela LM, Sarmiento F, Mosquera V. A comparative study of the determination of the critical micelle concentration by conductivity and dielectric constant measurements. *Langmuir.* 1998;14(16):4422–6.
153. Dong DC, Winnik M. The Py scale of solvent polarities. *Can. J. Chem.* 1984; 62:2560-5.

154. Basu Ray G, Chakraborty I, Moulik SP. Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. *J. Colloid Interface Sci.* 2006;294:248–54.
155. Vasilescu M, Bandula R, Lemmetyinen H. Micropolarity and microviscosity of Pluronics L62 and L64 core–shell aggregates in water at various concentrations and additives examined by absorption and fluorescence probes. *Colloid Polym. Sci.* 2010;288:1173–84.
156. Patel V, Dey J, Ganguly R, Kumar S, Nath S, Aswal VK, Bahadur P. Solubilization of hydrophobic alcohols in aqueous Pluronic solutions: investigating the role of dehydration of the micellar core in tuning the restructuring and growth of Pluronic micelles. *Soft Matter* 2013;9:7583-91.