



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Dobijanje ekstrakta nevena (*Calendula officinalis* L.) ugljen dioksidom pod pritiskom i njegovo mikrokapsuliranje u sistemu polimer–površinski aktivna materija

*Doktorska disertacija*

Mentor: *Prof. dr Verica Sovilj*

Kandidat: *Mr Lidija Petrović*

Novi Sad, 2010. god.



*Mojoj porodici, s ljubavlju*



*Ova doktorska disertacija urađena je u laboratoriji grupe predmeta Koloidne hemije, Katedre za primenjene i inženjerske hemije i laboratoriji za Hemiju i tehnologiju farmaceutskih proizvoda, Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo, Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.*

*Najveću zahvalnost dugujem mom mentoru, dr Verici Sovilj, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu na prenesenom znanju, nesebičnoj pomoći, savetima i podršci pruženoj u svim fazama rada na doktorskoj disertaciji.*

*Zahvaljujem se dr Žiki Lepojeviću, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na pruženoj pomoći i korisnim sugestijama u oblasti ekstrakcije ugljendioksidom i dr Veletu Teševiću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na urađenim GC/MS i GC/FID analizama etarskih ulja nevena. Takođe se zahvaljujem dr Dušanu Adamoviću na uzorcima nevena, gajenom na olednim poljima Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo iz Novog Sada.*

*Mojim kolegama, mr Jadranki Milanović i mr Jaroslavu Katoni zahvaljujem na nesebičnoj podršci.*

*Svima onima, koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije, najiskrenije se zahvaljujem.*

*Autor*



**Univerzitet u Novom Sadu**  
**Tehnološki fakultet**

Asocijacija centara za interdisciplinarne i  
multidisciplinarne studije i istraživanja – ACIMSI

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Autor: AU	Mr Lidija B. Petrović
Mentor / ko-mentor: MN	Dr Verica Sovilj, redovni profesor
Naslov rada: NR	<b>Dobijanje ekstrakta nevena (<i>Calendula officinalis</i> L.) ugljen dioksidom pod pritiskom i njegovo mikrokapsuliranje u sistemu polimer-površinski aktivna materija</b>
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srp. / Eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2010.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Tehnološki fakultet, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad.
Fizički opis rada: FO	( br. pogl. / str. /lit. citata / tabela / slika) 8 108 112 24 48
Naučna oblast: NO	Primenjene hemije, koloidna hemija
Naučna disciplina: ND	Mikrokapsulacija

Predmetna odrednica / ključne reči:  
PO

CO<sub>2</sub> ekstrakcija nevena, interakcije polimer–PAM,  
mikrokapsulacija

UDK

Čuva se:  
ČU

U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara  
Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija

Važna napomena:  
VN

Disertacija obuhvata deo rezultata istraživanja sprovedenih u okviru projekata koje je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

1. Projekat Tehnološkog razvoja (2001-2004)- Nacionalni program BIOTEHNOLOGIJA I AGROINDUSTRIJA, br. 0426: “Etarska ulja i ekstrakti lekovitog bilja (oriblete, tablete)”.

2. Projekat Tehnološkog razvoja (2005-2007) BTN-371004 B: “Nadkritični CO<sub>2</sub> ekstrakti specifičnih uljarica i lekovitog bilja kao osnova dijetetskih proizvoda i pomoćnih lekovitih sredstava”.

Izvod / abstrakt:  
IA

Savremene svetske tendencije upućuju na sve širu primenu ekstrakata lekovitog i aromatičnog bilja, kako u prehrambenim proizvodima– funkcionalna hrana, tako i u proizvodima farmaceutske i kozmetičke industrije. Ekstrakti biljnog materijala, dobijeni primenom ugljendioksida pod pritiskom, sadrže termički nepromenjene aktivne komponente, te se poslednjih godina sve više primenjuju u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Cilj ove doktorske disertacije je da se ispita mogućnost inkorporiranja ekstrakta nevena (*Calendula officinalis* L.), kao farmakološki aktivne materije, u mikrokapsule sa ciljem zaštite od spoljašnjih uticaja, produžetka njegovog delovanja i proširenja mogućnosti primene.

Za dobijanje ekstrakata nevena primenjeni su postupci ekstrakcije ugljendioksidom u tečnom i superkritičnom stanju. Definisani su uslovi pri kojima je moguće dobiti ekstrakt sa visokim sadržajem etarskog ulja, nosiocem gastro-intestinalnog delovanja (200 bar, 40°C). Totalni ekstrakt dobijen pod ovim uslovima ekstrakcije je odabran za dobijanje mikrokapsula.

Ispitivana je mogućnosti primene polimer–PAM interakcije nejonskih derivata celuloze- hidroksipropilmetil celuloze (HPMC) i anjonske PAM- natrijum dodecilsulfata (SDS), za formiranje omotača mikrokapsula. Primenom konduktometrijske i viskozimetrijske metode, određene su karakteristične koncentracije pri kojima HPMC–SDS interakcija započinje i završava se. Definisani su uticaji osobina molekula HPMC (molekulska masa, stepen supstitucije, vrsta supstituenta) i temperature na širinu intervala interakcije i objašnjeni mehanizmi njihovog povezivanja, sa osvrtom na strukturu i osobine formiranih HPMC/SDS kompleksa. Reološkim ispitivanjima pri različitim uslovima definisane su promene u ponašanju sistema u zavisnosti od HPMC–SDS interakcije.

Ispitivan je uticaj interakcije na osobine 20% emulzija suncokretovog ulja u vodi određivanjem njihovih reoloških osobina, veličina i raspodela veličina kapi i praćenjem stabilnosti. Utvrđeno je da se u oblasti najizraženije HPMC–



SDS interakcije, odnosno kada se na granici faza ulje-voda nalazi umrežen HPMC/SDS kompleks, dobijaju emulzije najveće stabilnosti, sa najmanjim srednjim prečnikom kapi.

Sušenjem emulzija, primenom *spray drying* postupka, dobijene su mikrokapsule uljnog sadržaja, stabilizovane kompleksom HPMC/SDS. Najbolje karakteristike mikrokapsula (mehanička otpornost, morfološke karakteristike, sposobnost redispersovanja, veličina i raspodela veličina čestica i količina inkapsuliranog ulja), dobijene u oblasti najizraženije interakcije.

Dodatak odabranog CO<sub>2</sub> ekstrakta nevena u uljnu fazu emulzija ne menja značajno njihove osobine, kao ni osobine iz njih dobijenih mikrokapsula.

Ispitivanja sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji pokazala su da se osobine kompleksa polimer/PAM mogu iskoristiti za mikrokapsulaciju ulja kao nosača farmakološki aktivnih materija.

Datum prihvatanja teme od strane  
NN veća:  
DP

17.07.2006. godine, na XXXII sednici Nastavno-naučnog veća  
Univerziteta u Novom Sadu

Datum odbrane:  
DO

Članovi komisije:  
KO

Predsednik: Dr Žika Lepojević, redovni profesor, Tehnološki fakultet,  
Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

Mentor: Dr Verica Sovilj, redovni profesor, Tehnološki fakultet,  
Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

Član: Dr Marija Primorac, redovni profesor, Farmaceutski fakultet,  
Univerzitet u Beogradu, Srbija



**University of Novi Sad  
Faculty of Technology**

ACIMSI

Key word documentation

Accession number:  
ANO

Identification number:  
INO

Document type: DT Monographic publication

Type of record: TR Textual material, printed

Contents code: CC Ph. D Thesis

Author: AU Lidija B. Petrović, M. sc

Mentor: MN Dr Verica Sovilj, full professor

Title: TI **Preparation of marigold (*Calendula officinalis* L.) extract using carbon dioxide under pressure and its microencapsulation in the polymer–surfactant system**

Language of text: LT Serbian

Language of abstract: LS Eng. / Serb.

Country of publication: CP Serbia

Locality of publication: LP AP Vojvodina

Publication year: PY 2010.

Publisher: PB Author's reprint

Publication place: PL Faculty of Technology, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia

Physical description: PD (Chapters / pages / ref. / tables / figures)  
8 108 112 24 48

Scientific field: SF Applied Chemistry, Colloid chemistry

Scientific discipline: SD Microencapsulation

Subject / Key words: SX CO<sub>2</sub> extraction of Marigold, polymer–surfactant interactions, microencapsulation

UC

Holding data:  
HD

Library of Faculty of Technology Novi Sad, Bulevar cara  
Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia

Note:  
N

The thesis includes a part of results obtained during investigations that took place in two projects supported by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

1. Technological development project (2001-2004) National program BIOTECHNOLOGY AND AGROINDUSTRY, No 0456: "Essential oil and extracts of medical plants (oriblets, tablets)".
2. Technological development project (2005-2007) BTN-371004B: "Supercritical CO<sub>2</sub> extracts of some specific oleaceous and medical plants for dietetic and parapharmaceutical products".

Abstract:  
AB

Contemporary global trends in food- functional food, pharmaceutical and cosmetic industry as well have been focused on a wider medical plants extracts application during the recent decade. Plant extracts obtained by means of carbon dioxide under high pressure contained all unchanged active compounds from plant, so that they have become more popular for application in food and pharmaceuticals recently.

The aim of this thesis was to investigate the possibility to incorporate marigold extract (*Calendula officinalis* L.), as a pharmacologically active compound, into microcapsules in order to protect them from surrounding medium, improve their activity and enlarge application.

Marigold extracts were obtained by means of carbon dioxide- CO<sub>2</sub> under subcritical and supercritical conditions. Extraction conditions under which obtained extract has high content of essential oil, responsible for gastrointestinal activity, were determined (200bar and 40°C). Total extract obtained under such conditions, was chosen for microcapsule preparation. Application possibility of polymer-surfactant interaction between non-ionic cellulose derivative-hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) and anionic surfactant- sodium dodecylsulfate (SDS) to microcapsule wall formation was investigated. Characteristic concentrations at which interaction starts and ends were determined by means of conductometric and viscometric measurements. The influence of HPMC molecular characteristics (molecular weight, degree of substitution and substituents kind) and temperature on interaction were determined and, considering the structure and characteristics of HPMC/SDS complexes, binding mechanism was explained. The changes in HPMC-SDS system caused by their interaction were defined by rheological investigations that took place under various conditions.

The influence of interaction on the properties of 20% sunflower oil/water emulsion was investigated by rheology measurement, particle size and particle size distribution determination and stability testing. It was provided that emulsions prepared in the region of pronounced HPMC-SDS interaction, where HPMC/SDS complex is adsorbed at the

o/w interface, have highest stability and smallest particle mean diameter.

Microcapsules were obtained by spray drying of emulsions stabilized with HPMC/SDS complex. The best characteristics (mechanical resistance, morphological characteristics, redispersing ability, particle size and particle size distribution and amount of encapsulated oil) have microcapsules obtained in the region of most pronounced interaction.

Addition of marigold CO<sub>2</sub> extract in to the oil phase of emulsions has no significant influence neither on their, nor on corresponding microcapsules characteristics

Investigations conducted in this thesis showed that characteristics of polymer/surfactant complexes can be used in microencapsulation of oil as carrier of pharmacologically active compounds.

Accepted by the Scientific Board on:

ASB

Defended on:

DE

Thesis defend board:

DB

17.07.2006. on XXXII Academic council conference of University of Novi Sad

Chairman: Dr Žika Lepojević, full professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, Serbia

Menthor Dr Verica Sovilj, full professor Faculty of Technology, University of Novi Sad, Serbia

Member: Dr Marija Primorac, full professor, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia



***Rezultati ispitivanja, sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije, objavljeni su u radovima:***

1. Sovilj V., Petrović L., Influence of molecular characteristic of nonionic cellulose ethers on their interaction with ionic surfactant investigated by conductometry, *Colloid Polymer Science*, 284, 334-339 (2005).
2. Sovilj V., Petrović L., Influence of hydroxypropylmethyl cellulose-sodium dodecylsulfate interaction on the solution conductivity and viscosity and emulsion stability, *Carbohydrate Polymers*, 64(1), 41-49 (2006).
3. Petrović L., Lepojević Ž., Sovilj V., Adamović D., Tešević V., An investigation of CO<sub>2</sub> extraction of Marigold (*Calendula officinalis* L.), *Journal of Serbian Chemical Society*, 72(4), 407-413 (2007).
4. Petrovic L., Sovilj V., Katona J., Milanovic J., Influence of polymer surfactant interactions on o/w emulsion properties and microcapsule formation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 333-339, (2010).





# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. OPŠTI DEO</b>	3
2.1. Ekstrakcija ugljendioksidom pod pritiskom	3
2.2. Neven ( <i>Calendula officinalis</i> L.)	6
2.3. Interakcije polimer–PAM	8
2.3.1. Interakcija u različitim sistemima polimer–PAM	9
2.3.2. Metode ispitivanja interakcije polimer–PAM	16
2.3.3. Interakcije u sistemu derivati celuloze–PAM	18
2.4. Uticaj interakcija na osobine emulzija	20
2.5. Etri celuloze- hidroksipropilmetil celuloza	24
2.6. Mikroapsulacija	26
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO</b>	34
3.1. Materijal	34
3.2. Uređaji	35
3.3. Metode ispitivanja	36
3.3.1. Dobijanje etarskog ulja i ekstrakata nevena	36
3.3.1.1. Određivanje sadržaja etarskog ulja nevena	36
3.3.1.2. Ekstrakcija ugljendioksidom pod visokim pritiskom	36
3.3.2. Analiza etarskog ulja nevena	37
3.3.3. Priprema rastvora	37
3.3.4. Konduktometrijska ispitivanja	38
3.3.5. Viskozimetrijska ispitivanja	39
3.3.6. Reološka ispitivanja	40
3.3.7. Priprema emulzija	41
3.3.8. Ispitivanje stabilnosti emulzija	41

3.3.9. Dobijanje mikrokapsula	42
3.3.10. Određivanje veličine i raspodele veličina čestica	42
3.3.11. Ispitivanje morfologije i sposobnosti redispergovanja mikrokapsula	43
3.3.12. Određivanje količine inkapsuliranog ulja	43
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	<b>45</b>
4.1. Ispitivanje ekstrakcije nevena ugljendioksidom pod pritiskom	46
4.2. Ispitivanje HPMC–SDS interakcije različitim metodama	52
4.2.1. Konduktometrijska ispitivanja	52
4.2.1.1. Određivanje cmc natrijumdodecil sulfata- SDS	52
4.2.1.2. Ispitivanje HPMC–SDS interakcije	53
4.2.2. Viskozimetrijska ispitivanja	59
4.2.3. Reološka ispitivanja	64
4.3. Uticaj HPMC–SDS interakcije na osobine emulzija u/v	68
4.3.1. Reološke osobine emulzija	68
4.3.2. Veličina i raspodela veličina kapi emulzija	72
4.3.3. Stabilnost emulzija	74
4.4. Mikrokapsulacija ulja u sistemu HPMC–SDS	77
4.4.1. Veličina i raspodela veličina mikrokapsula	79
4.4.2. Ispitivanje efikasnosti mikrokapsulacije	80
4.5. Dobijanje mikrokapsula sa CO <sub>2</sub> ekstraktom nevena	82
4.5.1. Uticaj uslova homogenizovanja na veličinu i raspodelu veličina kapi emulzija	83
4.5.2. Osobine emulzija sa ekstraktom nevena	84
4.5.3. Osobine mikrokapsula sa ekstraktom nevena	88
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	<b>91</b>
<b>6. PRILOG</b>	<b>95</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>101</b>
<b>8. SIMBOLI</b>	<b>108</b>

## 1. UVOD

Mikrokapsulacija je relativno nova tehnika kojom se biološki i farmakološki aktivne komponente oblažu polimernim materijama, formirajući mikrokapsule (1-1000  $\mu\text{m}$ ). Koristi se radi maskiranja neprijatnih mirisa i ukusa i inkapsuliranja osetljivih, lakoisparljivih i aromatičnih materija (vitamini, arome, biljni ekstrakti) sa ciljem njihove zaštite od okolnog medijuma. Poslednjih godina mikrokapsulacije je našla široku primenu u proizvodnji funkcionalne hrane i farmaceutskih preparata sa kontrolisanim i ciljanim oslobađanjem lekovite supstance (*controlled and target release*). Osobine formiranih mikrokapsula, kinetika i mesto otpuštanja inkapsuliranih materija u organizmu zavise, uglavnom, od osobina njihovog omotača. Regulisanje osobina omotača mikrokapsula se može postići na razne načine, pri čemu je odlučujuća interakcija komponenata koje ga formiraju. Interakcije polimer–polimer i polimer–površinski aktivna materija (PAM) mogu, u velikoj meri, uticati na formiranje i osobine omotača mikrokapsula. Zbog toga njihovo izučavanje ima veliki, kako teorijski, tako i praktičan značaj.

Savremene svetske tendencije upućuju na sve širu primenu lekovitog i aromatičnog bilja, kako u prehrambenim proizvodima, tako i u proizvodima farmaceutske i kozmetičke industrije. Veoma često se radi o primeni tečnih ekstrakata ili etarskih ulja izolovanih iz lekovitog bilja, koji su veoma osetljivi na uticaje spoljne sredine, ili su lako isparljivi, pa je jedan od načina njihove stabilizacije mikrokapsuliranje.

Ekstrakcija gasovima pod pritiskom, naročito kada se kao ekstragens koristi ugljendioksid-  $\text{CO}_2$ , intenzivno je ispitivana u poslednjoj deceniji, kako zbog njegove selektivnosti i neškodljivosti, tako i zbog relativno niske cene. Ekstrakti biljnog materijala, dobijeni primenom ove tehnike sadrže termički nepromenjene aktivne komponente, te se poslednjih godina sve više primenjuju u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Konvencionalni ekstrakti nevena- *Calendula officinalis* L., kao što su tinkture i tečni ekstrakti, se zbog svog delovanja, veoma često koriste za tretiranje dermatoloških i gastro-intestinalnih oboljenja.

Cilj ove doktorske disertacije je da se ispita mogućnost inkorporiranja ekstrakta nevena u mikrokapsule uljnog sadržaja, radi zaštite od uticaja spoljne sredine, produžnog oslobađanja i proširenja njegove primene. Za dobijanje ekstrakata nevena biće primenjen postupak ekstrakcije ugljendioksidom u tečnom i superkritičnom stanju. Variranjem pritiska i temperature ekstrakcije, biće definisani uslovi pri kojima je moguće dobiti ekstrakt nevena sa visokim sadržajem etarskog ulja, nosiocem gastrointestinalnog delovanja. Na osnovu rezultata kvalitativne i kvantitativne analize izolovanih etarskih ulja, dobijenih primenom gasne hromatografije, biće odabran ekstrakt sa najvećim sadržajem aktivnih supstanci za dobijanje mikrokapsula nevena.

Ispitaće se mogućnost primene polimer-PAM interakcije nejonskih derivata celuloze- hidroksipropilmetil celuloze (HPMC) i anjonske PAM- natrijum dodecilsulfata (SDS), za formiranje omotača mikrokapsula. Uticaj osobina molekula HPMC (molekulska masa, stepen supstitucije, vrsta supstituenta) i temperature na interval i mehanizam interakcije biće definisan primenom konduktometrije i kapilarne vikozeometrije, dok će reološka ispitivanja pri različitim uslovima omogućiti praćenje promena u sistemu HPMC-SDS u oblasti interakcije.

Uticaj interakcije na osobine 20% emulzija suncokretovog ulja u vodi, odnosno na formirani adsorpcioni sloj, biće određen ispitivanjem njihovih reoloških osobina, veličina i raspodela veličina kapi kao i praćenjem stabilnosti. Sušenjem emulzija primenom *spray drying* postupka dobiće se mikrokapsule uljnog sadržaja, a na osnovu ispitivanja njihovih osobina, veličine i raspodele veličina čestica i efikasnosti mikrokapsulacije, definisaće se uslovi pri kojima je moguće dobiti mikrokapsule najboljih osobina omotača. Mikrokapsule sa ekstraktom nevena biće dobijene inkorporiranjem odabranog CO<sub>2</sub> ekstrakta u uljnu fazu emulzija i njihovim sušenjem primenom *spray drying* postupka.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Ekstrakcija ugljendioksidom pod pritiskom

Ekstrakcija gasovima u tečnom i superkritičnom stanju je relativno nova tehnika koja je poslednjih godina našla široku primenu u hemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Primena ugljendioksida kao ekstragensa, koja zbog niza prednosti predstavlja dobru alternativu klasičnim postupcima ekstrakcije, naročito je pogodna za ekstrakciju aktivnih materija iz biljnih sirovina [1-4].

Poznato je da se povećanjem pritiska, na temperaturama ispod kritične, gasovi mogu prevesti u tečno stanje, dok se malim promenama temperature i pritiska iznad kritične tačke (superkritična oblast) može uticati na promenu osobina gasa kao ekstragensa. Povećanjem pritiska u superkritičnoj oblasti povećavaju se zapreminska masa i dielektrična konstanta, a samim tim i moć rastvaranja ekstragensa. Iz ovih razloga fluidi u superkritičnom stanju poseduju dobre osobine gasova kao ekstragensa (nizak viskozitet i veće vrednosti koeficijenta difuzije) i tečnosti (veća zapreminska masa i moć rastvaranja).

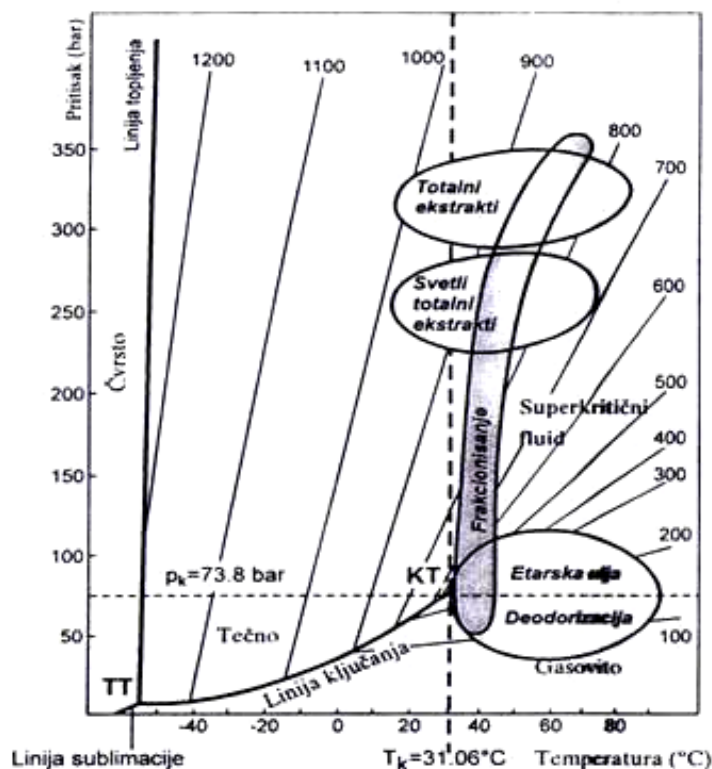
Za ekstrakciju aktivnih materija iz prirodnih sirovina najčešće se koristi ugljendioksid, zbog njegovih relativno niskih vrednosti kritičnog pritiska i temperature (73,8 bar i 31,1°C). Njegova prva primena bila je u tečnom stanju, u oblasti ispod kritičnih vrednosti pritiska (5 do 78 bar) i temperature (-55 do 31°C), koju formiraju linije ključanja, topljenja i kritičnog pritiska (**slika 1.**). U ovoj oblasti ugljendioksid se ponaša kao tečan, izrazito nepolaran rastvarač koji se dobro meša sa vodom i skoro svim tečnim rastvaračima. Njegova moć rastvaranja nije velika i, kao kod ostalih, izrazito nepolarnih tečnih rastvarača, i najčešće opada sa porastom temperature.

Ugljendioksid u gasovitom stanju ima vrlo malu zapreminsku masu, pa samim tim i malu moć rastvaranja. Povećanjem temperature, ekstrakcijom se dobija

izvestan broj komponenata u gasovitom stanju, tako da je ovaj način ekstrakcije sličniji destilaciji sa vodenom parom.

U superkritičnoj oblasti, koja se nalazi iznad kritičnih vrednosti pritiska i temperature (**slika 1.**), moć rastvaranja zavisi od primenjenog pritiska i temperature, odnosno od zapreminske mase ekstragensa. U ovoj oblasti ugljendioksid se ponaša kao tipičan nepolarni rastvarač, za koje je karakteristično da bolje rastvaraju supstance koje su po svojim fizičkim i hemijskim osobinama sličnije samom rastvaraču, da isparljivost i rasvorljivost supstanci slične polarnosti opada sa povećanjem njihove molekulske mase, kao i da je selektivnost rastvarača obrnuto proporcionalna njegovoj moći rastvaranja. Tako, povećanjem pritiska pri konstantnoj temperaturi dolazi do povećanja zapreminske mase ugljendioksida, njegove moći rastvaranja, a samim tim i smanjenja selektivnosti. Istovremeno, izoternskim smanjenjem pritiska dobijaju se ekstrakti promenjenog sastava, a izdvajanje ugljendioksida iz ekstrakta dovodi do nezatnog gubitka lako isparljivih komponenata.

Izborom uslova ekstrakcije, pritiska i temperature, u superkritičnoj oblasti ekstrakcije mogu se postići željeni efekti rastvaranja i selektivnost ugljendioksida kao ekstragensa. Oblasti pritiska i temperature pogodne za različite primene prikazani su na **slici 1.**

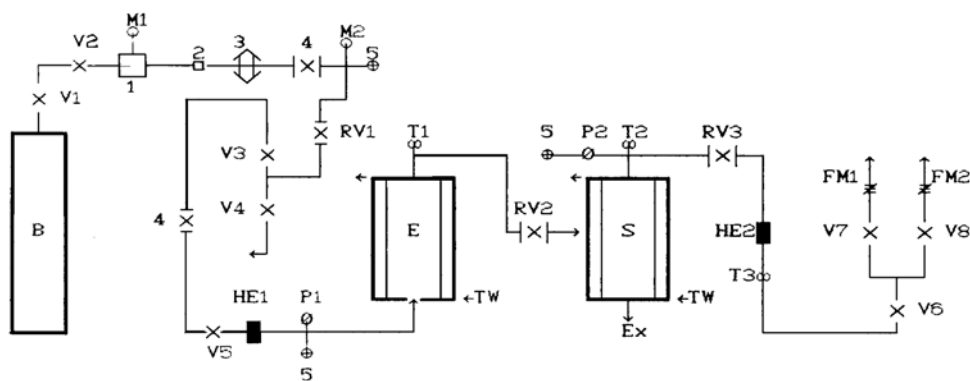


**Slika 1.** pT dijagram ugljendioksida sa označenim područjima primene.

Prednosti ugljendioksida kao ekstragensa [5] u odnosu na ostale gasove, kao i u odnosu na konvencionalne postupke ekstrakcije, uključujući i destilaciju sa vodenom parom, su:

- hemijski je inertan prirodni proizvod;
- nezapaljiv je i lak za rukovanje;
- ima relativno nisku cenu;
- omogućuje rad na relativno niskim temperaturama, što je od izuzetnog značaja kod ekstrakcije farmakološki aktivnih supstanci i aroma;
- fiziološki je neaktivan i nije štetan po ljudski organizam;
- omogućuje selektivnu ekstrakciju i frakcionisanje ekstrakta, što je od izuzetnog značaja za primenu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji;
- ne ekstrahuje pesticide koji mogu biti prisutni u većim količinama u biljnom materijalu;
- ekstrakcija ugljendioksidom spada u “čiste tehnologije” bez sekundarnih proizvoda koji zagađuju okolinu.

Uređaji za superkričnu ekstrakciju razlikuju se po nameni, veličini i kapacitetu, kao i po sastavnim delovima (broj separatora). Šema uređaja za ekstrakciju pod visokim pritiskom [6], koji je korićen u ovom radu prikazana je na **slici 2**.



**Slika 2.** Šema uređaja za ekstrakciju pod visokim pritiskom – High Pressure Extraction Plant (HPEP): (1) merni konektor; (2) filter; (3) kompresor sa dijafragmom; (4) kontrolni ventil; (5) sigurnosni ventil; RV-regulacioni ventil; V-ventil, HE-izmenjivač toplote; B-boca sa ugljendioksidom; P-merač pritiska; T-termometar; TW-ultratermostat; M-manometar; E-ekstraktor ( $V=200\text{cm}^3$ ); S-separator ( $V=200\text{cm}^3$ ); FM-merač protoka; Ex-ekstrakt.

Poslednjih godina ekstrakcija biljnog materijala tečnim i superkritičnim ugljendioksidom predstavlja područje istraživanja za koje vlada veliko interesovanje [7, 8]. Ekstrakti, dobijeni primenom ove tehnike, sadrže termički nepromenjene aktivne komponente i sve više se primenjuju u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Značajno mesto zauzimaju ispitivanja prinosa superkritične ekstrakcije i sastava dobijenih etarskih ulja različitih aromatičnih i lekovitih biljaka [9, 10].

Ekstrakcija nevena je u najvećoj meri ispitivana u superkritičnoj oblasti sa ciljem optimizacije i iznalaženja najpovoljnijih uslova ekstrakcije triterpenskog estera i oleozina odgovornih za antiinflamatorno delovanje [11, 12]. Mali broj autora [13] se bavi ispitivanjem uticaja uslova ekstrakcije na sastav etarskog ulja, naročito u oblasti gde je on u tečnom stanju. Takođe, u nama dostupnoj literaturi, nismo pronašli podatke o upoređivanju sastava etarskog ulja dobijenog destilacijom sa vodenom parom biljnog materijala i CO<sub>2</sub> ekstrakata.

## 2.2. Neven (*Calendula officinalis* L.)



Neven (*Calendula officinalis* L.) je poznata baštenska, žbunasta, jednogodišnja biljka visoka 30-60 cm. U gornjem delu neven je razgranat, na vrhovima ima krupne, usamljene glavice na dugim peteljka. Listovi su sedeći, izduženi ili lancetni, celi ili neznatno nazubljeni. Oblik listova se razlikuje u zavisnosti od njihovog položaja: gornji su duguljasti ili kopljasti, srednji najčešće obrnuto jajasti i obuhvataju stablo, a donji sa kratkom drškom. Cvetovi su sakupljeni u glavičaste, krupne cvasti, žute do narandžastožute boje i intenzivnog, slatkastog mirisa. Periferiju cvetova grade jezičasti cvetovi složeni u dva do tri reda, dok su u sredini cevasti cvetovi. Omotač cvasti čine uzani, zeleni, lepljivi i dlakama pokriveni listići. Gaji se kao ukrasna, baštenska biljka, naročito sorte sa “duplim” cvastima jako narandžaste boje. Cveta od proleća do kasno u jesen.

Kao droga se koriste suvi ili sveži cvetovi (*Calendulae flos*) koji sadrže karotenoide, flavonoide, hemolitički aktivne glikozide oleanolne kiseline-kalendulozide, triterpenske alkohole, sterole, smole, sluzi, tanine, etarsko ulje i dr. Pripisuje mu se spazmolitično, antiflogistično i dijaforetično delovanje [14, 15].

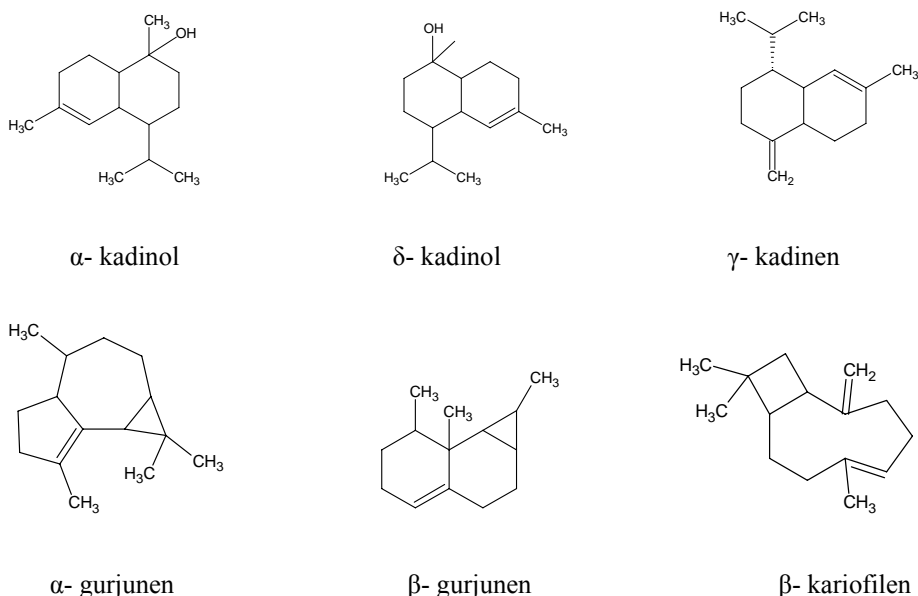


Neven nije oficinalan po Ph Jug V, ali je propisan u starijim izdanjima Nemačke i Ruske farmakopeje, kao i u dopuni Evropske farmakopeje 6.0, izdatoj 2008.

U narodnoj medicini neven se upotrebljava u obliku čaja za lečenje inflamatornih stanja unutrašnjih organa, gastrointestinalnih ulcera, diuretskih i diaforetskih konvulzija, što je poslednjih godina i naučno potvrđeno [16, 17]. Tinkture i masti nevena imaju znatno širu upotrebu. Koriste se za tretman različitih dermatoloških oboljenja, ulcera, rana, opekotina i hemoroida [18-20]. Novije farmakološke studije pokazuju da metanolni i butanolni ekstrakti nevena poseduju slabo izraženo antioksidativno delovanje [21, 22].

Farmakološko delovanje konvencionalnih ekstrakata nevena (tinkture i uljani ekstrakti) pripisuje se, uglavnom, prisutnim saponinima, seskviterpenskim glikozidima, flavonoidima i triterpenima. Veliki broj autora se bavi ispitivanjem sastava, stabilnosti i delovanja vodeno-alkoholnih, metanolnih i uljnih ekstrakata nevena [19, 23-25].

Etarsko ulje nevena, s obzirom na relativno nizak sadržaj u drogi ( $\approx 0,02\%$ ), a samim tim i sa ne tako izraženim terapijskim učinkom, privlačilo je manju pažnju naučnika. Dobijeno oficinalnim postupkom destilacije pomoću vodene pare, predstavlja bledo žutu tečnost intenzivnog, slatkastog mirisa koja u najvećoj meri sadrži seskviterpenske alkohole iz grupe muurola i kadinola, pri čemu je najzastupljeniji  $\alpha$ -kadinol [26, 27]. Za analizu kvalitativnog i kvantitativnog sastava etarskog ulja nevena, dobijenog bilo destilacijom sa vodenom parom ili primenom  $\text{CO}_2$  ekstrakcije, najčešće se primenjuje gasna hromatografija (GC) sa plamenojonizujućim (FID) ili masenim detektorom (MS) [13]. Najznačajnija jedinjenja, koja ulaze u sastav etarskog ulja nevena, prikazana su na **slici 3**.



**Slika 3.** Najznačajnije komponente etarskog ulja nevena.

Novija farmakološka ispitivanja ukazuju da se gastro-intestinalno delovanje nevena može pripisati upravo jedinjenjima iz grupe kadinola [28], prisutnim u etarskom ulju. Pošto se radi o lakoisparljivim aktivnim komponentama, mikrokapsulacija etarskog ulja, ili CO<sub>2</sub> ekstrakata nevena u kojima je prisutno etarsko ulje, predstavlja postupak izbora za njihovu stabilizaciju i zaštitu. Prema našim saznanjima, mikrokapsulacija ekstrakata nevena nije detaljno ispitivana.

### 2.3. Interakcije polimer–PAM

U vodi rastvorni polimeri i površinski aktivne materije (PAM) imaju veoma široku oblast primene. Posmatranjem sastava različitih prehrambenih, kozmetičkih, farmaceutskih i hemijskih proizvoda, može se uočiti prisustvo jednog ili više polimera zajedno sa jednom ili više PAM. Oni se najčešće dodaju radi postizanja različitih efekata: koloidne stabilnosti, emulgovanja, flokulacije, strukturacije i suspenzionih karakteristika, kao i različitih reoloških osobina proizvoda. Postizanje željenih efekata u sistemima polimer–PAM zavisi, kako od osobina i prirode molekula polimera tako i od osobina i prirode molekula PAM. Iz ovih razloga, ispitivanje interakcije polimer–PAM u vodenim sredinama postaje predmet interesovanja sve većeg broja istraživača [29-31].

Postoji veoma veliki broj različitih sistema polimer–PAM rastvornih u vodi, međutim, sa stanovišta njihove interakcije, najbolje ih je klasifikovati u odnosu na prisustvo naelektrisanih grupa u molekulu, na sisteme:

- nejonski polimer–jonska PAM;
- nejonski polimer–nejonska PAM;
- polielektrolit–suprotno naelektrisana PAM;
- polielektrolit–istoimeno naelektrisana PAM;
- protein–PAM;
- hidrofobno modifikovani polielektrolit–suprotno naelektrisana PAM.

U sistemima polimer–PAM dešavaju se različiti mehanizmi interakcije, među kojima su najznačajniji:

- hidrofobna interakcija između molekula polimera i PAM, koja je najizraženija kod blok kopolimera sa hidrofobnim segmentima i hidrofobno modifikovanih polimera;
- hidrofobna interakcija između molekula PAM;
- hidrofobna interakcija između molekula polimera;
- elektrostatička interakcija između molekula polimera;

- elektrostatička interakcija između molekula polimera i PAM, koja može dovesti do njihovog privlačenja ili odbijanja u zavisnosti od vrste naelektrisanja;
- elektrostatička interakcija između molekula PAM.

Međutim, od svih pomenutih mehanizama, dominantan uticaj na međusobno povezivanje molekula polimera i PAM ima mehanizam hidrofobne interakcije [32].

### 2.3.1. Interakcija u različitim sistemima polimer–PAM

Interakcija u sistemu **nejonski polimer–nejonska PAM** je po pravilu veoma slaba tako da u vodi rastvorni polimeri, kao što su polivinil alkohol- PVA, polivinil pirolidon-PVP i polietilen oksid- PEO, skoro da i ne stupaju u interakciju sa nejonskim emulgatorima iz grupe etilen oksida. U zavisnosti od osobina molekula polimera i PAM, ove interakcije su ipak moguće. Tako na primer, polimeri sa nešto izraženijim hidrofobnim svojstvima, kao što je polipropilen oksid- PPO, pokazuju efekte slabe interakcije sa nejonskim PAM iz grupe oktil tioglukozida- OTG [33]. Naime, iako je kritična micelarna koncentracija OTG u prisustvu polimera nepromenjena, rastvor PPO postaje transparentan dodatkom OTG. Mikrokolorimetrijskom titracijom rastvora PPO rastvorom OTG utvrđeno da je entalpija procesa endotermna, što govori u prilog postojanju slabe polimer–PAM interakcije.

Sistemi **polielektrolit–suprotno naelektrisana PAM**, intenzivno su izučavani u razblaženim rastvorima. Uzimajući u obzir jako elektrostatičko privlačenje suprotno naelektrisanih molekula polimera i PAM, interakcija započinje pri jako malim koncentracijama PAM, što onemogućuje primenu većine konvencionalnih metoda za njeno izučavanje. Međutim, razvojem elektroda osetljivih na prisustvo određene PAM (*surfactant-selective electrodes*) i primenom fluorescentne probe, ovaj problem je razrešen [34]. Najčešće ispitivani sistem je polianjon–katjonka PAM.

Treba naglasiti da, usled elektrostatičkog privlačenja polielektrolita i suprotno naelektrisanih PAM dolazi do neujednačene raspodele molekula PAM u rastvoru, odnosno joni PAM su skoncentrisani u blizini lanaca polielektrolita. Ovaj elektrostatički efekat nije u vezi sa amfifilnim svojstvima molekula PAM, ali utiče na njihovu površinsku aktivnost. Međutim, osnovni razlog povezivanja molekula PAM za suprotno naelektrisane molekule polielektrolita je elektrostatička stabilizacija micela PAM. Pri tome su osobine molekula PAM (naelektrisanje, dužina hidrofobnog ugljovodoničnog niza) i osobine polielektrolita (raspored naelektrisanih grupa, gustina naelektrisanja, prisustvo hidrofobnih grupa, fleksibilnost lanca polimera) od

presudnog značaja za formiranje kompleksa polimer/PAM [34]. Veličina micelarnih agregata PAM vezanih za polimerne lance u kompleksu polimer/PAM zavisi, takođe, od osobina svakog pojedinačnog polielektrolit–suprotno naelektrisana PAM sistema.

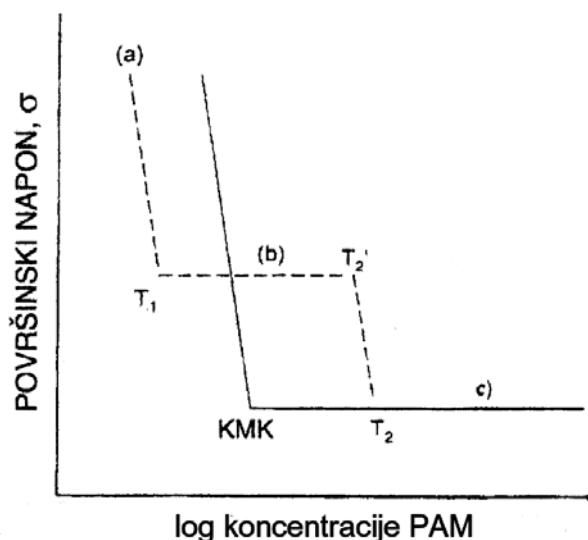
Efekat dodatka elektrolita u razblažene sisteme polielektrolit–suprotno naelektrisana PAM je veoma detaljno izučavan [35, 36]. Pokazano je da dodatak elektrolita, pri malim koncentracijama, utiče na povećanje kritične agregacione koncentracije-  $c_{ac}$  (koncentracija PAM pri kojoj započinje vezivanje za molekule polimera), odnosno dovodi do suzbijanja interakcije polimer–PAM, za razliku od prisustva elektrolita u micelarnim rastvorima čiste PAM, kod kojih dolazi do sniženja kritične micelarne koncentracije-  $c_{mc}$ . Međutim, pri većim koncentracijama elektrolita, njegovo prisustvo pospešuje interakciju. Objašnjenje ovakvog ponašanja treba tražiti u mogućim mehanizmima delovanja elektrolita. Naime, dodatak elektrolita u sistem polielektrolit–suprotno naelektrisana PAM može izazvati smanjenje elektrostatičkog privlačenja molekula polimera i PAM, što se dešava pri malim jonskim jačinama rastvora, dok pri većim jonskim jačinama rastvora elektrolit dodatno stabilizuje agregate PAM.

U sistemima polielektrolit–suprotno naelektrisana PAM često dolazi do separacije faza. Vezivanjem PAM za suprotno naelektrisani polielektrolit, naelektrisanje nastalog kompleksa se smanjuje, tako da je separacija faza očekivana promena. Do separacije faza može doći pri jako malim ili velikim koncentracijama PAM, što zavisi od vrste PAM, osobina polielektrolita, njegove koncentracije u sistemu, kao i od prisustva elektrolita. Separacija faza se može u potpunosti suzbiti u prisustvu velike koncentracije elektrolita.

S obzirom na specifičnu strukturu i građu molekula proteina, kao i na njihovu široku primenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, interakcije u sistemu **protein–PAM** su veoma detaljno izučavane. Naime, proteini sadrže nepolarne, polarne i naelektrisane segmente, tako da je interakcija sa većinom malih, amfifilnih molekula PAM, očekivana [30]. Pošto i proteini i PAM imaju amfifilna svojstva, ove interakcije imaju dosta sličnosti sa interakcijama u sistemu hidrofobno modifikovani polimer–PAM. Dominantan mehanizam pri agregaciji nejonske PAM u prisustvi proteina u rastvoru je hidrofobna interakcija ugljovodoničnog niza njegovih molekula sa hidrofobnim delovima molekula proteina. Međutim, kada se radi o jonskim PAM, i njihove naelektrisane polarne glave stupaju u interakciju sa naelektrisanim grupama proteinskih lanaca, što dovodi do ireverzibilnih promena u strukturi proteina.

Uopšteno, može se smatrati da interakcija protein–suprotno naelektrisana PAM započinje jonskim mehanizmom suprotno naelektrisanih grupa. Dalje vezivanje odvija se kombinovanim jonskim i hidrofobnim mehanizmom, s tim što kako interakcija napreduje hidrofobni mehanizam postaje sve izraženiji. Najznačajniji doprinos izučavanju interakcije protein–PAM obuhvata praćenje promene

površinskog napona rastvora proteina sa porastom koncentracije PAM, a tipičan dijagram dat je na **slici 4**.



**Slika 4.** Šematski prikaz promene površinskog napona sa koncentracijom PAM bez (—) i u prisustvu (- - -) želatina.  $T_1$  je kritična agregaciona koncentracija,  $T_2'$  kritična koncentracija zasićenja i  $T_2$  kritična micelarna koncentracija u prisustvu proteina

Interakcija želatin–suprotno naelektrisana PAM odvija se u tri stepena. U prvom (a), dolazi do jonske interakcije usled elektrostatičkog privlačenja naelektrisanih grupa na površini sklopčanog molekula želatina i suprotno naelektrisanih grupa molekula PAM. Formirani kompleks ispoljava veću površinsku aktivnost nego iste koncentracije svake od prisutnih materija– sinergistički efekat. Obrazovanje površinski aktivnog kompleksa ogleda se u opadanju površinskog napona do tačke  $T_1$ . Pri toj koncentraciji PAM, koja predstavlja kritičnu agregacionu koncentraciju- cac, na svaki, u prvom stepenu jonsko vezani molekul PAM, počinje vezivanje po jednog molekula PAM hidrofobnim privlačenjem, pri čemu dolazi do formiranja malih agregata (b).

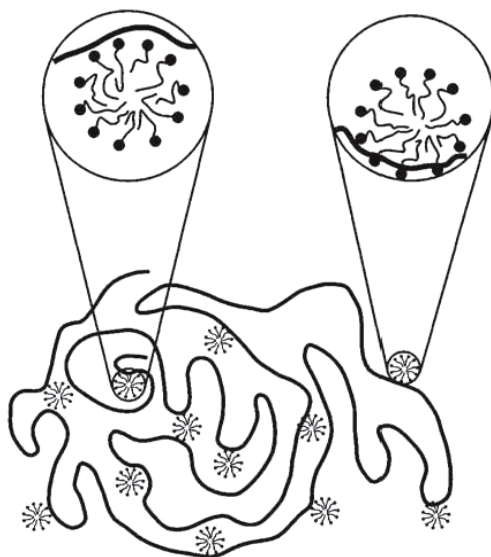
Elektrostatičko odbijanje jonskih grupa hidrofobno vezanih molekula PAM dovodi do odmotavanja lanca želatina, čime se otkrivaju nove naelektrisane grupe dostupne za jonsku interakciju sa molekulima PAM. U toku ovog procesa površinska aktivnost nastalog kompleksa se ne menja, tako da je površinski napon konstantan. Molekuli PAM učestvuju u interakciji, jer je stvaranje kompleksa protein–PAM energetski povoljnije od micelizacije, i ne obrazuju se slobodne micelle. Proces hidrofobnog i jonskog vezivanja se nastavlja sve dok se svi aktivni centri na molekulima proteina ne zasite molekulima PAM ( $T_2'$ ), tj. do kritične koncentracije zasićenja- psp. Povećanjem koncentracije slobodnih molekula PAM molekuli formiranog kompleksa na granici faza, koji više nemaju površinsku aktivnost, bivaju zamenjeni molekulima PAM, tako da površinski napon naglo opada do  $T_2$ , koja je u

stvari cmc PAM u prisustvu proteina. Tek tada počinje obrazovanje slobodnih micela PAM u rastvoru. Daljim porastom koncentracije PAM sistem se ponaša kao da molekuli proteina nisu prisutni u rastvoru (c).

Na intenzitet protein–PAM interakcije utiči mnogi faktori, kao što su priroda proteina, dužina hidrofobnog lanca PAM, pH i jonska jačina su rastvoru, temperatura i dr.

Interakcije u sistemima **polielektrolit–istoimeno naelektrisana PAM** su veoma slabe i može se reći da do njih praktično i ne dolazi, osim kada se radi o polimerima koji su delimično hidrofobni, odnosno hidrofobno modifikovani. Uvođenje poliakrilata u rasvor SDS dovodi do jako malog smanjenja cmc, odnosno u sistemu nema interakcije polimer–PAM. Isto se odnosi i na interakciju u sistemu karboksimetil celuloza–SDS [32].

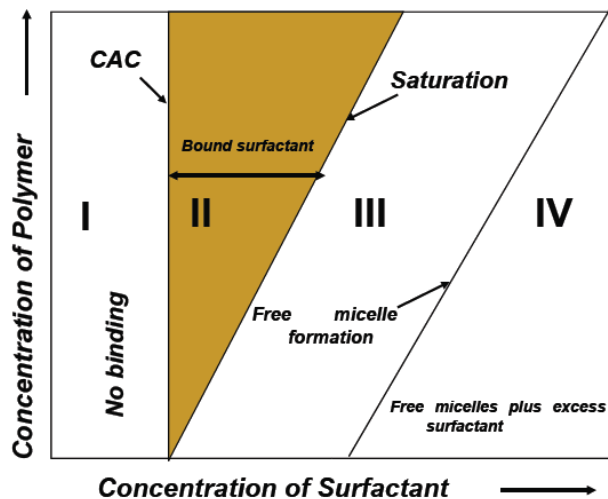
S obzirom na činjenicu da skoro svi nenaelektrisani polimeri stupaju u interakciju sa jonskim PAM, sistemi **nejonski polimer–jonska PAM** su najviše izučavani [38-45]. Oni pokazuju specifično ponašanje u vodenom rastvoru. Dominantan mehanizam pri povezivanju polimera i alkilnih ostataka molekula PAM je njihova hidrofobna interakcija. Opšte prihvaćeni model povezivanja molekula PAM [29, 30], u obliku agregata sličnih micelama, za lance polimera je model “biserne ogrlice”, koji je prikazan je na **slici 5**. Veličina i agregacioni broj formiranih agregata, identičan je sa micelama PAM u rastvoru bez prisustva polimera.



**Slika 5.** Šematski prikaz modela “biserne ogrlice” poveživanja nejonski polimer–jonska PAM.

U prisustvu polimera u rastvoru dolazi do pomeranja kritične micelarne koncentracije– cmc PAM prema nižim vrednostima [31]. Šematski prikaz interakcije dat je na **slici 6**.

Interakcija započinje kada molekuli PAM u rastvoru dostignu kritičnu agregacionu koncentraciju (cac). Ispod ove koncentracije nema interakcije u sistemu nejonski polimer–jonska PAM (oblast I). Vrednost cac ne zavisi od koncentracije polimera i uvek je niža od kritične micelarne koncentracije PAM. Povećanjem koncentracije PAM iznad cac započinje njihovo vezivanje za lance polimera, koji postaju sve više zasićeni micelama PAM, sve do dostizanja kritične koncentracije zasićenja (psp)- oblast II. Vrednost psp linearno zavisi od koncentracije nejonskog polimera u rastvoru. Povećanjem koncentracije PAM iznad psp više nema interakcije polimer–PAM, tako da se u sistemu povećava koncentracija slobodnih molekula PAM- oblast III, sve dok koncentracija PAM ne dostigne cmc u prisustvu polimera kada dolazi do formiranja micela u rastvoru (granica između oblasti III i IV). Pri koncentracijama PAM u rastvoru u oblasti IV egzistira potpuno soljubilizovan kompleks polimer/PAM, nastao kao posledica završene interakcije, zajedno sa slobodnim micelama PAM [29, 30].



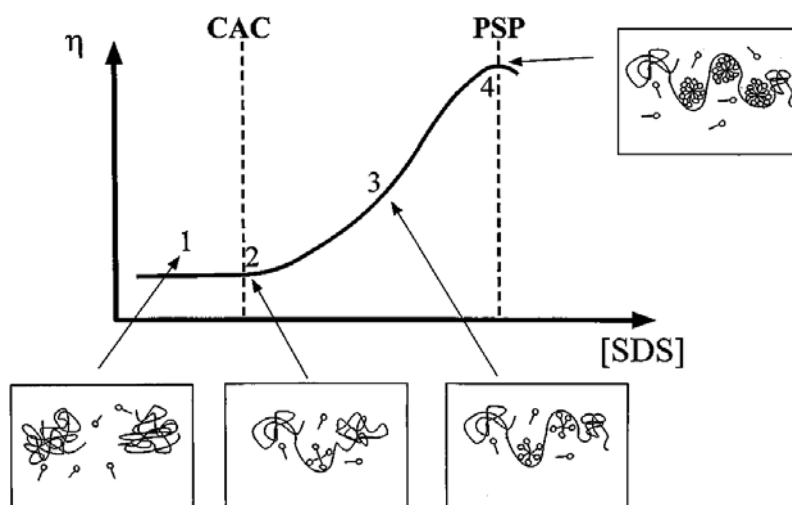
**Slika 6.** Šematski prikaz interakcije u sistemu nejonski polimer –jonska PAM  
**I-** oblast pre početka interakcije; **II-** oblast interakcije polimer– PAM;  
**III-** oblast završene interakcije u kojoj raste koncentracija pojedinačnih molekula PAM;  
**IV-** oblast u kojoj egzistira kompleks polimer/PAM, pojedinačni molekuli PAM i slobodne micelle PAM u rastvoru.

Interakcija velikog broja različitih sistema nejonski polimer–jonska PAM ispitivana je primenom različitih metoda [38-42]. Najčešće ispitivani sistem je polietilen oksid- PEO i SDS [43-45], kod kojeg je interakcija polimer–PAM ispitivana primenom konduktometrije, viskozimetrije i fluorescencije. Utvrđeno je da u prisustvu polimera dolazi do sniženja cmc SDS u rastvoru, kao i da cac ne zavisi od koncentracije polimera. Potvrđeno je da na intenzitet interakcije utiče hidrofobnost molekula PEO, dok se uticaj molekulске mase može zanemariti, kada je ona iznad

neke minimalne vrednosti. Pokazano je, takođe, da prisustvo elektrolita u maloj meri utiče na interakciju PEO–SDS.

Za razliku od interakcije sa anjonskim PAM [38-41, 43-45], nejonski polimeri pokazuju znatno manji intenzitet interakcije sa katjonskim PAM u vodenim rastvorima [42]. Jedno od mogućih objašnjenja ovakvog ponašanja je prisustvo voluminoznih polarnih glava u molekulima katjonskih PAM, u odnosu na polarne glave molekula anjonskih PAM, pa je povezivanje otežano zbog steričnih smetnji. Međutim, ovo može biti samo delimično objašnjenje, s obzirom da se u nevodnim sredinama mogu dobiti i suprotni efekti, odnosno neke katjonske PAM pokazuju intenzivnije povezivanje sa nejonskim polimerom od anjonskih. Iz ovih razloga, radi boljeg razumevanja razlika u interakciji katjonskih i anjonskih PAM sa nejonskim polimerom, potrebno je razmotriti i uticaj osobina rastvarača [32].

Konformacione promene na molekulima nejonskih polimera u prisustvu jonske PAM najčešće su ispitivane primenom viskozimetrije [31, 45]. Kod razblaženih vodenih rastvora polimera u prisustvu jonske PAM, čija je koncentracija veća od cac, dolazi do porasta viskoziteta, kako je prikazano na **slici 7**.



**Slika 7.** Promena viskoziteta rastvora nejonskog polimera sa porastom koncentracije SDS.

Naime, kod većine nejonskih polimera vezivanje micela anjonske PAM dovodi do razmotavanja lanca i ekspanzije molekula nastalog kompleksa, što ima za rezultat povećanje viskoziteta sistema [45]. Međutim, u jako razblaženim rastvorima etilhidroksietil celuloze- EHEC dodatak SDS može izazvati smanjenje viskoziteta rastvora [46], što se može pripisati intramolekulskom povezivanju delova lanaca polimera micelama SDS, a samim tim i skupljanjem molekula polimera.

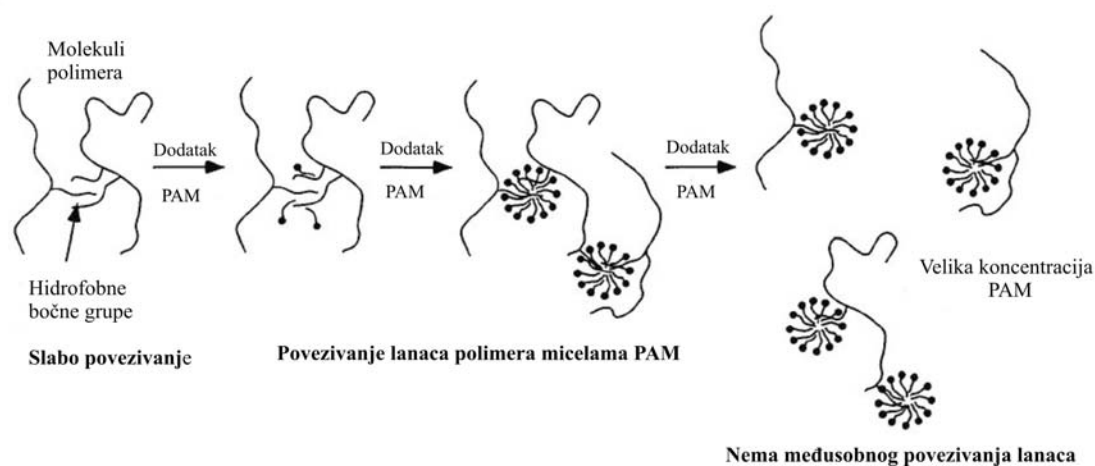
Dodatak jonske PAM u rastvor nekih nejonskog polimera, najčešće PPO i derivata celuloze, utiče na temperature zamućenja, koja predstavlja karakterističnu



temperaturu pri kojoj rastvor određene koncentracije polimera postaje mutan. Vezivanje jonske PAM za molekule ovih polimera dovodi do pomeranja temperature zamućenja ka većim vrednostima [38].

Posebna grupa sistema polimer–PAM, koja zbog svoje raširene primene privlači pažnju velikog broja istraživača, su **hidrofobno modifikovani polimer–jonska PAM** sistemi. Za hidrofobno modifikovane, u vodi rastvorne polimere karakteristično je da uvođenjem hidrofobnih supstituenata dobijaju amfifilna svojstva. Ovo, relativno slabo povezivanje hidrofobnim privlačenjem delova polimernih lanaca, dovodi do povećanja viskoziteta vodenih rastvora. Iz ovih razloga hidrofobno modifikovani polimeri, koji mogu biti jonski ili nejonski, se primenjuju kao korigensi viskoziteta [47].

Hidrofobno modifikovani polimeri pokazuju, generalno, različite interakcije sa molekulima PAM, koje mogu uticati na reološke osobine sistema u kojima se primenjuju. Mogućnost povezivanja hidrofobno modifikovanog polimera i PAM šematski je prikazano na **slici 8**.



**Slika 8.** Šematski prikaz mogućeg povezivanja hidrofobno modifikovanog polimera i PAM.

Uvođenjem molekula jonske PAM u rastvor polimera, usled izražene hidrofobne polimer–PAM interakcije, može doći do međusobnog povezivanja delova lanaca polimera micelama PAM, što za rezultat ima značajno povećanje viskoziteta sistema. Da bi se ovaj viskozni efekat postigao, potrebno je da koncentracija polimera u rastvoru bude podešena tako, da su lanci polimera u međusobnom kontaktu. Dodatkom jonske PAM započinje njihovo vezivanje za dva ili više hidrofobna centra susednih lanaca polimera, sve dok se lanci polimera potpuno ne povežu, kada viskozitet sistema ima maksimalnu vrednost. Pri veoma velikim koncentracijama PAM u rastvoru dolazi do formiranja micela oko svakog, pojedinačnog hidrofobnog centra u molekulu polimera. Usled elektrostatičkog odbijanja dolazi do međusobnog udaljavanja lanaca, što za posledicu ima smanjenje viskoziteta sistema [38, 45].

### 2.3.2. Metode ispitivanja interakcije polimer - PAM

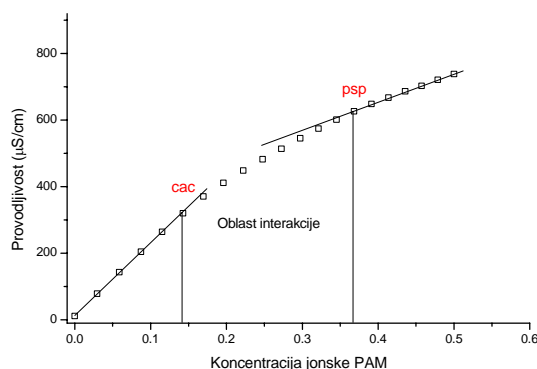
Za izučavanje polimer–jonska PAM interakcija, koje se zasniva, uglavnom, na praćenju promena osobina rastvora, mogu se koristiti različite metode. Izbor najpogodnije metode će zavisiti od osobina ispitivanog sistema polimer–PAM. Tako, za ispitivanje sistema nejonski polimer–jonska PAM najčešće se primenjuju metode merenja površinskog napona, električne provodljivosti, viskoziteta, fluorescencije, nuklearne magnetne rezonance, difrakcije X-zraka i dr. [48- 50].

**Tenziometrijska metoda** je jedna od najstarijih (Jones je primenio još 1967. god.), ali istovremeno i najelegantnijih i najjednostavnijih metoda za ispitivanje interakcije polimer–PAM. Ona se zasniva na praćenju promene površinskog napona rastvora polimera, konstantne koncentracije, sa porastom koncentracije PAM, pri čemu se dobija karakterističan dijagram, prikazan šematski na **slici 4**. Na ovom dijagramu mogu se uočiti tri karakteristične tačke:  $T_1$ , predstavlja koncentraciju PAM u rastvoru pri kojoj započinje vezivanje molekula PAM za polimerne lance- cac;  $T_2'$ , je koncentracija PAM pri kojoj su lanci polimera zasićeni micelama PAM- psp; i  $T_2$  koja predstavlja cmc PAM u prisustvu polimera u rastvoru. S obzirom da je ova metoda primenjivana za ispitivanje interakcije kod velikog broja različitih sistema nejonski polimer–jonska PAM, kao što su PPO–SDS, PVP–SDS i EHEC–SDS [39, 41], uočen je opšti model ponašanja ovih sistema:

- u prisustvu polimera  $T_1$  je uvek niže od cmc PAM;
- $T_2'$  proporcionalno raste sa porastom koncentracije polimera u rastvoru, dok  $T_1$  ostaje skoro nepromenjena;
- prisustvo soli dovodi do pomeranja  $T_1$  ka manjim vrednostima, odnosno pospešuje interakciju;
- konstantna vrednost površinskog napona, u oblasti interakcije, govori o izraženom afinitetu jonske PAM prema polimeru, i više je uočljiva kod rasvora polimera većih koncentracija.

Treba naglasiti da se tenziometrijska metoda može koristiti za ispitivanje sistema polimer–PAM kada se radi sa uzorcima PAM velike čistoće. Takođe, tumačenje dobijenih rezultata može biti otežano ukoliko se radi sa polimerom koji ima površinsku aktivnost, kao što je to slučaj sa PPO–SDS sistemom.

**Konduktometrijska metoda** ispitivanja nejonski polimer–jonska PAM je, takođe, veoma često upotrebljavana za izučavanje interakcije nejonski polimer–jonska PAM [43-45]. Na dijagramu zavisnosti specifične provodljivosti rastvora polimera od koncentracije PAM (**slika 9**.) uočavaju se dve karakteristične tačke, cac i psp, koje su u saglasnosti sa  $T_1$  i  $T_2'$  u tenziometrijskim merenjima.



Slika 9. Kriva konduktometrijske titracije sa karakterističnim koncentracijama, cac i psp.

Ispitivanja interakcije primenom ove metode, sprovedena na različitim sistemima polimer–PAM, potvrdila su da je prva karakteristična koncentracija- cac praktično neosetljiva na promenu koncentracije polimera u rastvoru, dok druga- psp, proporcionalno raste sa povećanjem koncentracije polimera. Oblast u kojoj postoji nelinearan porast specifične provodljivosti sistema predstavlja oblast polimer–PAM interakcije, a nelinearnost je objašnjena smanjenom koncentracijom molekula jonske PAM usled njihovog vezivanja za lance polimera [48]. Nakon dostizanja psp, dolazi do formiranja slobodnih micela PAM, pa je promena provodljivosti identična kao da u sistemu i nije prisutan polimer, nakon dostizanja cmc PAM.

**Viskozimetrijska metoda** je jedna od jednostavnijih metoda kojom je moguće pratiti konformacione promene na molekulima nejonskih polimera nastale kao posledica interakcije sa jonskom PAM [50]. Adsorpcijom molekula PAM hidrofobnim povezivanjem za polimerne lance, nastaje kompleks polimer/PAM koji dobija osobine polielektrolita. Iz ovih razloga, kao posledica elektrostatičkog odbijanja naelektrisanih grupa adsorbovanih molekula PAM, dolazi do promene konformacije molekula polimera i porasta specifičnog viskoziteta rastvora (**slika 7.**). Skok viskoziteta se odvija naglo i pri koncentracijama jonske PAM koje odgovaraju vrednostima  $T_1$ , određene tenziometrijski, odnosno cac određene konduktometrijski za ispitivani sistem polimer–PAM [48]. Treba naglasiti da se kritična koncentracija zasićenja- psp, odnosno koncentracija pri kojoj se interakcija završava, primenom viskozimetrijske metode ne može odrediti sa sigurnošću.

Promene u strukturi molekula polimera, nastale kao posledica vezivanja molekula PAM, mogu se pratiti primenom različitih tehnika, kao što su nuklearna magnetna rezonanca- NMR, metode merenja rasute svetlosti- *light scattering*, metoda merenja rasipanja X zraka i dr. Jedna od novijih metoda, koja je naročito pogodna za ispitivanje strukture nastalog polimer/PAM kompleksa rastvornog u vodi, je metoda merenja rasipanja zraka neutrona pod malim uglom, odnosno ***small-angle neutron scattering* (SANS)**. Naime, primenom ove metode mogu se dobiti podaci o strukturi

dve različite komponente- polimeru i PAM, koje su rastvorene u tečnoj fazi, kao što je voda. Jedna od komponenata se rastvara u vodi ( $H_2O$ ), a druga u teškoj vodi ( $D_2O$ ), čija smeša čini tečnu fazu. Odnosi u kojima se mešaju ove dve faze odaberu se tako da jedna rastvorena komponenta maskira drugu, što omogućuje ispitivanje svake, pojedinačne komponente u smeši. Ovaj princip su primenili Cabane i Duplessix [48] za detaljno ispitivanje strukture PEO/SDS kompleksa u rastvorima natrijum bromida različite jonske jačine, pri čemu je variran sastav smeše, njena koncentracija i molekulska masa PEO. Sastav smeše PEO i SDS je odabran tako da pokriva oblast od početka formiranja kompleksa PEO/SDS ( $T_1$ ) do njegovog zasićenja molekulima SDS ( $T_2$ ). Utvrđeno je da ne dolazi do promene u veličini molekula polimera ni agregata PAM u kompleksu u odnosu na njihove veličine u rastvorima čistih komponenata. Mada se ovo činilo veoma neočekivano, smatra se da je velika jonska jačina rastvora sprečila ekspanziju molekula kompleksa polimer/PAM, koji vezivanjem SDS dobija osobine polielektrolita. Dokazano je da se SDS vezuje za lance PEO u obliku agregata sličnih micelama, koji su iste veličine kao micle SDS u vodenom rastvoru male jonske jačine. Raspored agregata SDS vezanih za molekul PEO odgovara modelu "biserne ogrlice" (slika 5.), pri čemu se njihova udaljenost smanjuje sa povećanjem jonske jačine rastvora.

### 2.3.3. Interakcije u sistemu derivati celuloze–PAM

Interakcije polimer–PAM u najvećoj meri su izučavane na derivatima celuloze rastvornim u vodi, koji imaju široku primenu u mnogim proizvodima prehrambene, farmaceutske, i hemijske industrije kao ugušćivači, sredstva za vezivanje, emulgatori, stabilizatori i korektori viskoziteta [47].

Posebnu grupu u vodi rastvornih derivata celuloze čine hidrofobno modifikovani derivati, kao što su hidroksietil celuloza- HEC, hidroksipropil celuloza- HPC, metil celuloza- MC i hidroksipropilmetil celuloza- HPMC. Osobine njihovih vodenih rastvora mogu se modifikovati interakcijom sa površinski aktivnim materijama, pri čemu anjonske PAM daju najizraženije efekte. Interakcija sa katjonskim PAM je znatno slabija usled sternih smetnji polarne glave. Opšte prihvaćeni mehanizam hidrofobnog vezivanja jonske PAM za aktivne centre na molekulima hidrofobno modifikovanih polimera, koji je šematski prikazan na slici 8., u potpunosti se može primeniti i na hidrofobno modifikovane derivate celuloze

Ispitivanja interakcije nejonskih etara celuloze (MC, HPMC i etilhidroksietil celuloze) sa SDS u razblaženim vodenim rastvorima, pokazala su da se molekuli SDS vezuju za lance polimera u vidu agregata sličnih micelama [49, 52]. Pokazano je da veličina i agregacioni broj nastalih micela zavise od koncentracije polimera i SDS.

Kod jako razblaženih rastvora (čija je koncentracija ispod kritične *overlap* koncentracije –  $c^*$ ), gde su lanci polimera pojedinačno raspoređeni u rastvoru bez međusobnog kontakta, ovo povezivanje je intramolekularno – formiraju se micelle molekula SDS oko hidrofobnih supstituenata jednog polimernog molekula. To dovodi do smanjenja hidrodinamičke zapremine molekula polimera i viskoziteta sistema. Pri  $c^*$  i višim koncentracijama polimera u rastvoru, s obzirom da su polimerni lanci u međusobnom kontaktu, odnosno da se njihovi hidrodinamički radijusi preklapaju, dodatkom SDS dolazi do formiranja micelarnih agregata oko hidrofobnih delova različitih molekula polimera. One postaju tačke međusobnog povezivanja molekula polimera u trodimenzionalnu, umreženu strukturu, što dovodi do povećanja viskoziteta sistema i formiranja gel strukture. Povećanje temperature dovodi do povećanja inteziteta polimer–PAM interakcije, što se ogleda u smanjenju agregacionog broja micelarnih struktura.

Viskozimetrijska ispitivanja interakcije HPMC–SDS [53] potvrdila su razlike u ponašanju u zavisnosti od koncentracije polimera u rastvoru. Kod jako razblaženih rastvora ( $c < c^*$ ) u oblasti interakcije dolazi do smanjenja redukovano viskoziteta, dok pri koncentracijama polimera iznad  $c^*$  dolazi do njegovog značajnog povećanja, što je sa porastom koncentracije polimera sve izraženije. Nakon završene interakcije dolazi do naglog opadanja viskoziteta i, nezavisno od koncentracije polimera u rastvoru, sistemi HPMC–SDS pokazuju istu vrednost redukovano viskoziteta.

Pored promene viskoziteta, interakcija između HPMC i SDS dovodi do promene i drugih osobina sistema kao što su tačka zamućenja, koja predstavlja temperaturu pri kojoj dolazi do izdvajanja polimerne faze u rastvoru. Dodatkom male količine SDS u rastvor HPMC, u početku dolazi do blagog sniženja tačke zamućenja, ali daljim povećanjem koncentracije SDS tačka zamućenja raste i dostiže svoj maksimum ( $>100^\circ\text{C}$ ) pri koncentraciji SDS koja odgovara maksimumu viskoziteta [53].

Ispitivanjem interakcije HPMC i anjonskih PAM, čija je dužina hidrofobnog lanca različita, merenjem površinskog napona [54] rastvora različitih koncentracija HPMC, utvrđeno je da  $cac$  ima uvek niže vrednosti od  $cmc$  i da ne zavisi od koncentracije polimera. Ovo potvrđuje činjenicu da je formiranje kompleksa polimer–PAM energetski povoljnije od procesa obrazovanja micela PAM. Utvrđeno je, takođe da PAM koje imaju manje od 6 C atoma u hidrofobnom nizu ne obrazuju agregate na molekulima HPMC, kao i da povećanje dužine hidrofobnog lanca PAM dolazi do pomeranja  $cac$  ka nižim koncentracijama.

Ispitivanja interakcije HPMC i nekih anjonskih PAM rađeno je i primenom konduktometrije, fluorescencije i metode dinamičkog rasipanja svetla (*dynamic light scattering*) [55]. Nađeno je da su  $cac$  i  $cmc$  određene primenom fluorescencije u saglasnosti sa vrednostima koje su određene konduktometrijskim titracijama. Primenom metode dinamičkog rasipanja svetla utvrđeno je da i pri koncentracijama

SDS nižim od  $cac$  dolazi do formiranja unimera SDS u blizini hidrofobnih, aktivnih centara lanaca polimera. Oni predstavljaju nukleuse oko kojih se, daljim povećanjem koncentracije SDS, obrazuju agregati- micelle. Primenom ove tehnike potvrđeno je i prisustvo slobodnih micela SDS u rastvoru nakon završene polimer-PAM interakcije.

Interakcija tri nejonska derivata celuloze, HPC, HPMC i HEC sa SDS ispitivana je primenom *size exclusion* hromatografije- SEC sa *multi-angle light scattering*- MALS i *refractive index*- RI detektorima [56]. Primenom ove kombinovane tehnike sa uspehom se mogu utvrditi molekulske mase kompleksa polimer-PAM, ukoliko se on sastoji od jednog molekula polimera, molekula polimera u kompleksu, kao i količine vezanog SDS u kompleksu. Potvrđeno je da polimeri izraženije hidrofobnosti (HPC i HPMC) adsorbuju veće količine SDS od HEC, odnosno da interakcija sa SDS zavisi od strukture bočnih grupa polimera i njihove hidrofobnosti.

Mada je interakcija hidrofobno modifikovanih polimera i katjonskih PAM manje izražena, ispitivanja interakcije HPC sa heksadeciltrimetilamonijum bromidom- HTAB pokazala su da hidrofobno vezivanje katjonske PAM u obliku agregata dovodi do porasta specifičnog viskoziteta rastvora, kao i u slučaju povezivanja sa anjonskom PAM [51]. Viskozitet sistema dostiže maksimum u oblasti  $c_{mc}$  PAM, odnosno u trenutku kada su sva aktivna mesta na lancima polimera popunjena micelama PAM, tako da usled elektrostatičkog odbijanja njihovih naelektrisanih grupa dolazi do ekspanzije molekula polimera. Povećanje koncentracije HTAB dovodi do pada viskoziteta sistema HPC-HTAB, što je posledica skupljanja kompleksa polimer/PAM usled elektrostatičkog odbijanja slobodnih i adsorbovanih micela HTAB.

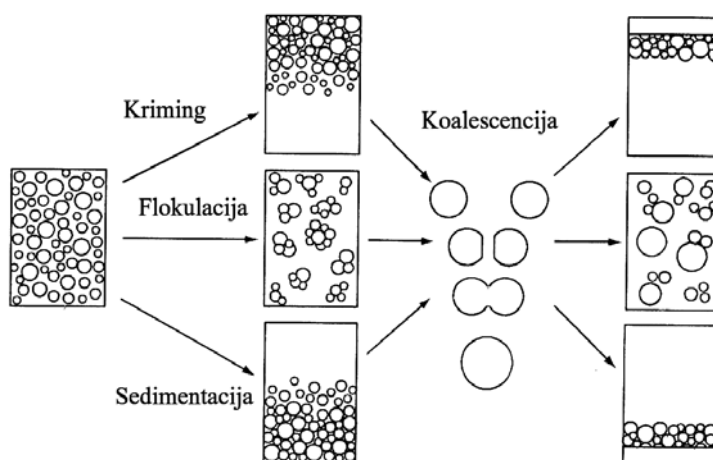
## 2.4. Uticaj interakcija na osobine emulzija

Emulzije u osnovi predstavljaju dvo ili više fazne tečne disperzne sisteme kod kojih je najmanje jedna tečnost- disperzna faza raspoređena u vidu kapljica u drugoj- kontinualna faza. U zavisnosti od toga da li je vodena ili uljna faza kontinualna, razlikuju se dva osnovna tipa emulzionih sistema: ulje-u-vodi (u/v) i voda-u-ulju (v/u). Takođe, postoje i takozvane “duple” emulzije, v/u/v i u/v/u koje imaju široku primenu kao nosači aktivnih materija u farmaceutskim preparatima [30].

Pod pojmom emulzije najčešće podrazumevamo grube disperzione sisteme kod kojih je raspodela veličina kapi disperzne faze veoma široka (0,1–100  $\mu\text{m}$ ). Ovakvi sistemi su mutni i nestabilni, a u literaturi se veoma često nazivaju i makroemulzije [57]. Za razliku od njih, mikroemulzije su bistri, izotropni sistemi izrazite termodinamičke stabilnosti, kod kojih se veličina kapljica disperzne faze

kreće u intervalu od 10 do 50 nm. Mada su po svom sastavu donekle slične makroemulzijama i veoma detaljno teoretski ispitane, mikroemulzije nisu našle široku praktičnu primenu. U novije vreme sreće se pojam miniemulzije, kod kojih se veličina kapljica disperzne faze kreće u intervalu 50-400 nm. Za njihovu stabilizaciju se koristi smeša emulgatora, od kojih je jedan alkohol dugog ugljovodoničnog niza, nerastvoran u vodi, koji dodatno stabilizuje sistem.

Kod nestabilnih, grubih emulzionih sistema, posle izvesnog vremena, dolazi do jednog od vidova nestabilnosti, što se veoma lako vizuelno uočava. Neki mehanizmi destabilizacije, koji mogu biti reverzibilni i ireverzibilni, prikazani su na **slici 10**.



**Slika 10.** Mehanizmi destabilizacije emulzija.

Kriming i sedimentacija su reverzibilni procesi koji se javljaju kao posledica razlike u gustinama dve tečne faze. Kod emulzija tipa u/v najčešće je uljna faza manje gustine, tako da je kriming mnogo češća pojava. Flokulacija je takođe jedan od reverzibilnih mehanizama destabilizacije emulzija, u toku koje dolazi do grupisanja kapljica, pri čemu one zadržavaju svoj integritet. Pošto se radi o reverzibilnim mehanizmima, početno stanje emulzije može se postići primenom sile jačeg intenziteta. Jedan od najčešće primenjivanih načina za određivanje stabilnosti emulzija u/v je određivanje kriming indeksa [58].

Koalescencija predstavlja sasvim drugačiji, ireverzibilan fenomen, pri kome dolazi do međusobnog spajanja kapljica i povećanja srednjeg prečnika kapi emulzija. Krajnji ishod ovog ireverzibilnog procesa je separacija faza.

Postoji još jedan mehanizam destabilizacije emulzija, tzv. Ostwald-ovo zrenje [58], koje ima za posledicu povećanje srednjeg prečnika kapi. U toku ovog procesa manje kapi, koje imaju jako veliku površinu u odnosu na zapreminu, gube

svoj sadržaj difuzijom ulja kroz kontinualnu fazu u veće kapi i iščezavaju, dok se zapremina većih kapi uvećava. Kod emulzija tipa u/v ovaj proces zavisi od rastvorljivosti uljne u vodenoj fazi.

Međutim, kod stabilnih emulzija, problem određivanja stabilnosti je veoma složen, jer se promene odvijaju lagano i dugotrajno. Da bi se vreme potrebno za određivanje stabilnosti ovakvih emulzija skratilo, pribegava se ubrzavanju procesa destabilizacije raznim načinima (centrifugiranje, temperaturni stress-testovi i dr.). Pri tome se mogu pratiti veličina i raspodela veličina čestica, brzina separacije faza i brzina izdvajanja kapljica [59, 60].

Termodinamička nestabilnost emulzija uzrokovana je postojanjem veoma velike međufazne površine, između dve tečnosti koje se ne mešaju, tako da se rad-  $A$  potreban za povećanje međufazne površine od  $1 \text{ cm}^2$  može izraziti kao:

$$A = \sigma_i \Delta S$$

gde je  $\sigma_i$  međupovršinski napon, a  $\Delta S$  promena međufazne površine.

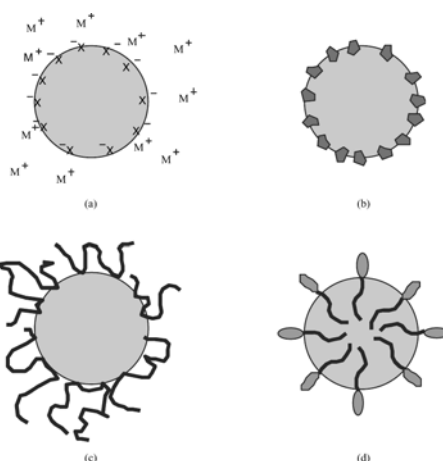
Rad utrošen za obrazovanje slobodne površine predstavlja potencijalnu energiju sistema. Pošto pri dispergovanju jedne tečnosti u drugoj dolazi do ogromnog povećanja slobodne površine dispergovane faze, emulzije imaju veoma visok sadržaj potencijalne energije. Iz ovih razloga one su termodinamički veoma nestabilne i pokazuju jaku težnju za smanjenjem potencijalne energije, odnosno za smanjenjem međufazne površine, što dovodi do brze koalescencije kapljica i smanjenja stepena disperznosti.

Stabilizovanje emulzionih sistema može se postići dodatkom različitih materija, čija je osnovna uloga smanjenje energije potrebne za formiranje kapi, odnosno međupovršinskog napona  $\sigma_i$ , na granici tečno-tečno, kao i usporavanje procesa flokulacije i koalescencije [57]. Četiri osnovna mehanizma stabilizacije emulzija prikazana su na **slici 11**.

Adsorpcija površinski neaktivnih materija na granici tečno-tečno, koje ne utiču u većoj meri na međupovršinski napon (osim što ga nekada mogu i povećati) ima mali uticaj na stabilnost emulzija. Pod određenim uslovima ove materije mogu imati slab stabilizujući efekat, nastao obrazovanjem elektrostatičke barijere između kapljica ili orijentacijom molekula rastvarača, što dovodi do promene određenih fizičkih karakteristika sistema – dielektrične konstante i viskoziteta.

Čvrste čestice koloidnih dimenzija mogu se koristiti kao stabilizatori, bez obzira što ne utiču na smanjenje površinskog napona, jer stvaraju fizičku barijeru između formiranih kapljica. Međutim, da bi ovaj efekat došao do izražaja, one moraju imati veći afinitet prema kontinualnoj fazi.





**Slika 11.** Mehhanizmi stabilizacije emulzija u/v: adsorpcijom jona i površinski neaktivnih soli (a), prisustvom čvrstih koloidnih čestica (b), adsorpcijom polimera (c) ili PAM (d).

Mehanizam stabilizacije emulzija dodatkom PAM u najvećoj meri se zasniva na efektu smanjenja međupovršinskog napona dve tečnosti [61]. Vrsta i količina emulgatora, upotrebljenog za stabilizaciju, zavisi od specifičnih karakteristika tečnih faza, tipa emulzije koji se želi dobiti, njene namene i dr. PAM mogu da formiraju i lamelarne tečne kristale na granici faza. Ovo višeslojno pakovanje PAM na granici faza omogućuje dobijanje sistema koji su stabilni u toku dužeg vremenskog perioda. Formiranje lamelarnih struktura je ponekad ključno za dobijanje emulzija uz ulaganje minimalne energije, u toku procesa “spontanog emulgovanja”.

Polimerne materije se najčešće koriste kao stabilizatori emulzionih sistema, dok u manjoj meri dolazi do izražaja njihova površinska aktivnost [62, 63]. Njihovo prisustvo može da izazove različite efekte, od sternog i elektrostatičkog odbijanja do promene međufaznog viskoziteta i elastičnosti ili povećanja viskoziteta kontinualne faze. Najčešće je to kombinacija različitih efekata [64].

Međutim, u nekim slučajevima dodatak polimera može dovesti do destabilizacije sistema, odnosno do izdvajanja flokula (tzv. kriming efekat). Flokulacija može biti depleciona, kada se radi o neadsorbujućem polimeru, pri čemu se formira tzv. deplecioni omotač oko kapi sastavljen od čiste kontinualne faze (koncentracija polimera u omotaču je jednaka nuli). Preklapanje deplecionih omotača dve kapljice dovodi do njihovog međusobnog privlačenja (efekat praznine) i do flokulacije. Kada se radi o adsorbujućem polimeru, njegovi segmenti dodatno se mogu adsorbovati na različitim kapljicama i tako izazvati povezivanje kapi preko mostova (*bridging interaction*). Do povezivanja kapljica u flokule, kod ovog tipa interakcije, može doći i usled izraženog međusobnog afiniteta bočnih grupa polimera adsorbovanih na površini kapljica.

Stabilizacija emulzija se, veoma često odvija posredstvom više različitih mehanizama. Kod mnogih sistema prisutna je elektrostatička i sterna stabilizacija, odnosno “elektrosterna” stabilizacija emulzija, prisutna u velikom broju tehničkih emulzija. Kod margarina, na primer, koji predstavljaju emulzije u/v, stabilizacija sistema odvija se posredstvom tri različita mehanizma: elektrostatička- primenom anjonskih fosfolipida, sterna- uz pomoć biopolimera, dok prisustvo kristala masti dodatno stabilizuje sistem [30].

Interakcije u sistemu polimer–PAM se poslednjih godina sve više koriste za stabilizaciju emulzionih sistema. Međutim, prisustvo polimera u emulzionim sistemima stabilizovanim PAM može dovesti i do destabilizacije sistema, što u velikoj meri zavisi od osobina polimera i PAM i mehanizma njihove interakcije [65]. Postoje različiti mehanizmi stabilizacije izazvani polimer–PAM interakcijama.

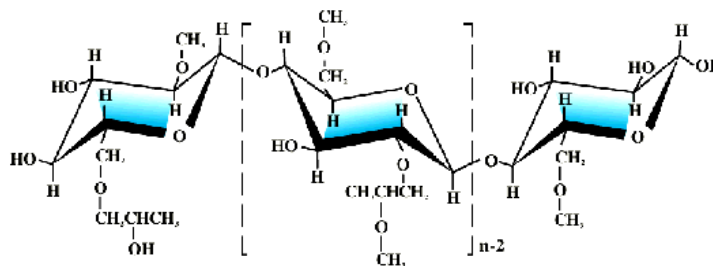
Kada se radi o emulzijama stabilizovanim jonskim PAM, dodatak suprotno naelektrisanog polimera može dodatno stabilizovati sistem. Usled elektrostatičkog privlačenja dolazi do adsorpcije molekula polimera na površini kapljica i njene delimične neutralizacije, pri čemu se mora voditi računa da ona ne bude potpuna, što može izazvati suprotan efekat.

Prisustvo nejonskog, u vodi rastvornog polimera, koji poseduje površinsku aktivnost, kao što su hidrofobno modifikovani polimeri, u emulzionim sistemima stabilizovanim jonskom PAM, može dovesti do njihove dodatne stabilizacije. Pri koncentracijama PAM bliskim cmc dolazi do hidrofobnog povezivanja molekula PAM za lanace polimera i formiranja umrežene strukture, što utiče na povećanje viskoziteta kontinualne faze, a samim tim i na povećanu stabilnost emulzija.

Međutim, pri koncentracijama PAM većim od cmc, dolazi do formiranja micela na hidrofobnim segmentima pojedinačnih lanaca polimera, njihovog razdvajanja usled elektrostatičkog odbijanja i destabilizacije sistema.

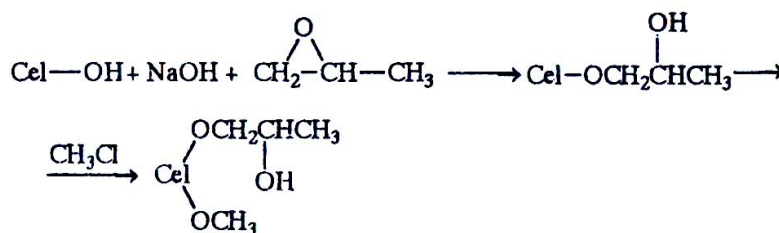
## 2.5. Etri celuloze– hidroksipropilmetil celuloza

Hidroksipropilmetil celuloza je nejonski, u vodi rastvoran, fiziološki inertan derivat celuloze (**slika 12.**), koji ima široku primenu u prehrambenim, farmaceutskim i kozmetičkom proizvodima [66, 67]. Njena upotreba je, u prvom redu bazirana na četiri ključne osobine: sposobnost ugušćavanja, površinska aktivnost, sposobnost formiranja filmova i mogućnost obrazovanja reverzibilnih gel struktura koje se hlađenjem razrušavaju.



Slika 12. Strukturna formula hidroksipropilmetil celuloze.

HPMC se dobija se dejstvom propilen oksida, a zatim metil hlorida na alkalnu celulozu, kao što je prikazano reakcijom na **slici 13**. Stepen supstitucije metoksi grupa se kreće u opsegu od 0,9–1,8, dok za hidroksipropil grupe on iznosi 0,1–1,0. U zavisnosti od broja metoksi i hidroksipropil supstituenata i njihovog međusobnog odnosa dobijaju se polimeri različitih fizičko-hemijskih osobina, a promene u rastvorljivosti i temperaturi želiranja pojedinih derivata su najizraženije [68].



Slika 13. Reakcija dobijanja hidroksipropilmetil celuloze.

HPMC je po pravilu rastvorljiva u hladnoj vodi, pri čemu je maksimum rastvorljivosti kod molekula sa ukupnim stepenom supstitucije 1,64–1,92. Derivati niskog stepena supstitucije rastvorljivi su u alkalnoj sredini, dok su visoko supstituisani proizvodi rastvorljivi samo u polarnim organskim rastvaračima.

Viskozitet HPMC je, kao i kod većine u vodi rastvornih polimera, određen dužinom polimernog lanca, srazmeran koncentraciji polimera i pri višim koncentracijama zavisi od stepena hidratacije. Rastvori HPMC pokazuju nenjutnovski tip proticanja, odnosno imaju tipične pseudoplastične osobine, ali pri koncentracijama većim od 5% može doći do pojave tiksotropije. Visoko koncentrovani geli HPMC imaju viskoelastične osobine koje se ne menjaju sa promenom pH sredine [69-72].

Povećanjem temperature viskozitet rastvora HPMC se smanjuje. Međutim, na određenoj temperaturi, čija vrednost zavisi od stepena supstitucije, dolazi do obrazovanja reverzibilnih termalnih gel struktura i separacije faza. Za različite etre celuloze temperatura želiranja se razlikuje i kreće se u opsegu od 48°C do 70°C.

Moguće objašnjenje ovog fenomena leži u samoj prirodi polimernog molekula HPMC. U vodenim rastvorima molekuli polimera su jako hidratirani i vezani, pri čemu se molekuli vode ponašaju kao lubrikansi- omogućuju da dugački lanci etara celuloze lako klize jedan preko drugog. Iz ovih razloga rastvor ima osobine viskozne tečnosti. Povećanjem temperature slabe vodonične veze, jačaju veze unutar molekula što uzrokuje opadanje viskoziteta. Daljim povećanjem temperature, lanac polimernog molekula se skuplja i polimer se, na temperaturi želiranja, izdvaja u obliku gela. Fenomen termalnog želiranja je reverzibilan, odnosno, pri hlađenju dolazi do ponovnog rastvaranja polimera.

HPMC je nejonogene prirode i kao takva nije osetljiva na prisustvo elektrolita ili drugih polimera. Međutim, pri većim koncentracijama elektrolita može doći do njenog izdvajanja iz rastvora.

Površinska aktivnost rastvora HPMC je posledica uvođenja hidrofobnih hidroksipropil i metil supstituenata u molekul celuloze, usled čega on dobija amfifilna svojstva. Iz ovih razloga se HPMC, pri niskim koncentracijama, može koristiti kao polimerni emulgator. Najčešće se koristi kao modifikator viskoziteta, emulgator, stabilizator, vezivno sredstvo i agens za suspendovanje u mnogim prehrambenim proizvodima. U farmaceutskoj industriji se koristi kao matriks za tablete, radi kontrolisanja njihovog rastvaranja, kod izrade sirupa i suspenzija. Rastvorna je u gastro-intestinalnim tečnostima, bez ukusa i mirisa, stabilna u prisustvu spoljašnjih uticaja, ne utiče na mehaničke osobine tableta kao ni na biološku raspoloživost leka.

## **2.6. Mikrokapsulacija**

Mikrokapsulacija predstavlja proces oblaganja malih (1–1000  $\mu\text{m}$ ) čvrstih čestica, kapljica tečnosti ili gasa nekom, najčešće polimernom, materijom prirodnog ili sintetskog porekla [73]. Procesi mikrokapsulacije se poslednjih tridesetak godina obilato koriste sa ciljem:

- zaštite inkapsulirane materije od okoline (temperature, vlage, UV zraka, interakcije sa drugim prisutnim materijama);
- zaštite okoline od štetnog delovanja inkapsulirane materije
- sprečavanja isparavanja inkapsulirane materije;
- prevođenja tečnosti ili lepljivih čvrstih materija u praškove lake za manipulaciju (olakšano mešanje);
- maskiranja neželjenih karakteristika aktivne materije (ukusa, mirisa, promene pH, katalitičkog delovanja);
- kontrolisanog otpuštanja inkapsulirane materije pod željenim uslovima.

Primena mikrokapsulacije u prehrambenoj industriji najčešće podrazumeva zaštitu osetljivih materija od drugih komponenata prisutnih u proizvodu, sprečavanje gubitka nutritivnih svojstava proizvoda ili čak dodatak nutritivnih materija nakon završenog procesa proizvodnje [74, 75]. Aditivi, koji se najčešće koriste u obliku mikrokapsula, su arome, konzervansi, boje, zaslađivači, enzimi, vitamini i antioksidansi. Kontrolisano otpuštanje inkapsulirane materije obezbeđuje stabilnost prehrambenih proizvoda i duže zadržavanje njegovih senzornih i nutritivnih svojstava.

Mikrokapsule su, poslednjih godina, našle veoma široku primenu i u farmaceutskoj industriji. Primenom mikrokapsula u peroralnim farmaceutskim oblicima obezbeđuje se maskiranje neprijatnog ukusa, stabilnost nekompatibilnih farmakološki aktivnih supstanci (FAS), otpornost na oksidaciju, sprečavanje isparavanja, produženo oslobađanje FAS i dr. Inkorporiranje mikrokapsula u preparate sa produženim oslobađanjem omogućuje postepeno oslobađanje leka, uz održavanje njegove konstantne koncentracije u plazmi, u toku određenog vremenskog perioda (*controlled release*). Posebnu grupu preparata čine preparati sa ciljanim (*target*) delovanjem, kod kojih je, izborom karakteristika omotača, omogućeno oslobađanje leka na tačno definisanom mestu. Primenom određenih postupaka mikrokapsulacije, uz korišćenje filmogenih materija specifičnih karakteristika, omogućeno je postizanje farmakološkog efekta pri znatno nižim koncentracijama leka, izbegavanje visoke inicijalne doze i neželjenih dejstava.

U kozmetičkoj industriji mikrokapsule se koriste u kremama, losionima i preparatima dekorativne kozmetike. Najčešće se primenjuju mikrokapsulirane lipofilne aktivne komponente, koje su tako zaštićene od štetnog uticaja okoline, ili se obezbeđuje njihovo otpuštanje u toku dužeg vremenskog perioda. Poslednjih godina se dosta radi i na mikrokapsulaciji u vodi rastvornih kozmetički aktivnih supstanci (vitamin C). U formi mikrokapsula mogu se naći i boje, pigmenti, mirisi, antiperspiransi, sredstva za beljenje itd.

Jedan od vidova mikrokapsulacije, koji nalazi široku primenu, kako u farmaciji tako i u kozmetičkoj industriji, je proizvodnja liposoma. Radi se o, najčešće, fosfolipidnim vezikulama sa dvoslojnom ili višeslojnom membranom, čija veličina može biti i nanometarskih dimenzija. Ovo je naročito značajno kod preparata za parenteralnu primenu [76]. Zbog svoje izražene biokompatibilnosti i mogućnosti inkorporiranja, kako hidrofилnih tako i hidrofobnih materija, liposomi danas imaju veoma raširenu primenu u farmaciji i kozmetici kao nosači aktivnih materija.

Izbor polimerne materije koja se može koristiti kao omotač mikrokapsula zavisi, u najvećoj meri, od fizičko-hemijskih osobina supstance koja se inkapsulira-jezgra, namene i osobina mikrokapsula, kao i od odabranog postupka. To su najčešće:

- proteini (želatin, gluten, kazein);
- ugljeni hidrati (skrob i njegovi derivati, arapska guma, ksantan, agar, dekstran, alginati);
- derivati celuloze (metilceluloza, etilceluloza, acetat celuloze, HPMC);
- lipidi i voskovi (mono- i di- gliceridi palmitinske i stearinske kiseline, cetil alkohol, pčelinji vosak);
- sintetski polimeri (polivinil alkohol, poliakrilna kiselina, polistiren, poliuretani, polisiloksani...).

Izbor postupka mikrokapsulacije zavisi od: fizičko-hemijskih osobina materije koja se inkapsulira i polimerne materije omotača, željenih osobina mikrokapsula (veličine čestica) i njihove primene, željenog mehanizma otpuštanja inkapsulirane materije i cene samog postupka. Postupci mikrokapsulacije mogu se podeliti u tri osnovne grupe [73], mada postoje i kombinovani postupci koji se ne mogu svrstati ni u jednu od njih:

- fizičko–hemijski postupci (prosta ili kompleksna koacervacija, otparavanje rastvarača, očvaršćavanje emulzija i formiranje liposoma);
- fizički postupci (sušenje raspršivanjem-*spray drying* i *spray cooling*, očvršćavanje disperzije, raspršivanje u fluidizovanom sloju-Wurster-ova aparatura, prevlačenje u centrifugama);
- hemijski postupci (međufazna polimerizacija, kapljična metoda).

Veličina, oblik i struktura mikrokapsula zavise, u najvećoj meri, od agregatnog stanja jezgra i primenjenog postupka. Na veličinu mikrokapsula utiče brzina mešanja i oblik mešalice, prisustvo i koncentracija PAM, viskozitet faza u disperziji i njihov maseni odnos, temperaturni režim i pH, kao i karakteristike samog uređaja u kome se izvodi mikrokapsulacija [77-79]. Kada je inkapsulirana materija tečna dobijene mikrokapsule su sfernog oblika, dok kada se radi o čvrstoj inkapsuliranoj materiji, one poprimaju oblik jezgra.

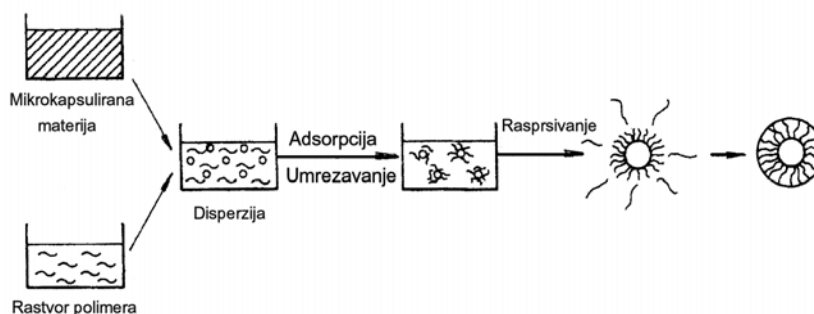
Struktura mikrokapsula zavisi od načina na koji je inkapsulirana materija raspoređena unutar mikrokapsule, tako da razlikujemo dva osnovna tipa:

- mikrokapsule u kojima je materija jezgra raspoređena u centru kapsule i obavijena kontinualnim slojem polimerne, filmogene materije – rezervoar tip;
- mikrokapsule (mikrosfere) u kojima je materija jezgra ravnomerno raspoređena po celoj zapremini kapsule – matriks tip.

Mikrokapsule oba tipa mogu biti različite strukture u zavisnosti od agregatnog stanja jezgra i njegove distribucije unutar kapsule [80]. Najsloženiju strukturu imaju mikrokapsule mešovito tipa, kod kojih je materija jezgra dispergovana i raspoređena u centralnom delu kapsule i okružena debljim omotačem

filmogene materije. Kod mikrokapsula tipa rezervoara i mešovito tipa se, održavanjem osobina omotača nepromenjenim pri određenim uslovima sredine, omogućuje kontinuirano otpuštanje inkapsulirane materije. Iz ovih razloga se mikrokapsule ovakve strukture mogu koristiti za izradu lekova sa produženim delovanjem.

**Spray drying postupak** podrazumeva brzo isparavanje rastvarača u struji toplog vazduha u toku kratkotrajnog (nekoliko delova sekundi) izlaganja materije visokoj temperaturi, te se iz ovih razloga veoma često upotrebljava za sušenje termolabilnih prehrambenih i farmaceutskih materija. Najčešće se smatra dehidratacionim postupkom, mada poslednjih godina nalazi sve veću primenu kao jedna od jednostavnijih, kontinualnih metoda mikrokapsulacije, naročito pogodna za inkapsuliranje lakoisparljivih materija i FAS [81].



**Slika 14.** Proces mikrokapsulacije *spray drying* postupkom.

Osnovni princip mikrokapsulacije *spray drying* metodom prikazan je na **slici 14**. Materija koja se inkapsulira disperguje se u rastvoru filmogene, najčešće polimerne, materije uz homogenizovanje, sa ciljem dobijanja određene veličine čestica. Pri izboru rastvarača polimerne materije treba voditi računa da se materija jezgra (čvrsta) u njemu ne rastvara ili sa njim ne meša (tečna). Kod rezervoar tipa mikrokapsula pre raspršivanja disperzije potrebno je obezbediti adsorpciju polimerne materije na graničnu površinu čestica (kapljica) jezgra, što se postiže izborom pogodne filmogene materije, pomoću površinski aktivnih materija, ili promenom uslova sredine. Veoma često se u disperziju dodaje i sredstvo za umrežavanje.

Ovako pripremljena disperzija se pomoću pumpe uvodi u uređaj za sušenje u struji toplog vazduha- *spray dryer*. Na povišenoj temperaturi, koja mora biti viša od temperature isparavanja rastvarača, on otparava formirajući omotač oko jezgra. Nošene strujom toplog vazduha, formirane, suve mikrokapsule veličine 1-100  $\mu\text{m}$ , ulaze u ciklon i sakupljaju se u kolektorskoj posudi u vidu suvog praha. Uređaji za mikrokapsulaciju mogu biti različite konstrukcije u zavisnosti od njihove namene i kapaciteta. Na **slici 15**. prikazan je *spray dryer* koji je korišćen u ovom radu.



Slika 15. Laboratorijski *spray dryer*.

S obzirom da je kontakt mikrokapsula sa strujom toplog vazduha kratkotrajan, ova metoda pogodna je i za mikrokapsulaciju lako isparljivih supstanci, enzima i bakterija bez opasnosti od inaktivacije.

Na osobine mikrokapsula i njihovu stabilnost utiču mnogi faktori, od kojih su među značajnijim [82]:

- osobine filmogene materije;
- osobine materije koja se inkapsulira;
- osobine emulzije (viskozitet, raspodela veličina kapi);
- uslovi sušenja (veličina raspršenih kapi, ulazna i izlazna temperatura, kapacitet aspiratora, vlažnost vazduha...);
- morfologija formiranih mikrokapsula (oblik, veličina i poroznost).

Izbor filmogene materije ima najznačajniji uticaj na osobine mikrokapsula dobijenih spray drying postupkom. Odabrana polimerna materija treba da ima dobru rastvorljivost u disperznom sredstvu, dobra emulgujuća svojstva, dobru sposobnost formiranja filmova, kao i nizak viskozitet pri višim koncentracijama. S obzirom na činjenicu da se kod *spray drying* postupaka mikrokapsulacije aktivnih materija prehrambene i farmaceutske industrije najčešće koristi voda kao disperzno sredstvo, to u mnogome sužava izbor polimernih filmogenih materija. Najčešće se upotrebljavaju arapska guma, maltodekstrini, hidrofobno modifikovani skrobovi i njihove smeše. Upotreba drugih polisaharida (alginati, guar guma, natrijumkarboksimetil celuloza) i proteina (soja proteini, natrijum kazeinat), koji formiraju filmove dobrih karakteristika, je ograničena njihovom slabom rastvorljivošću u vodi. Međutim, dodatak ovih hidrokoloida niske rastvorljivosti u manjoj količini, može uticati na povećanje stabilnosti dobijenih mikrokapsula [83, 84]. Jedna od češće upotrebljivanih filmogenih materija, čije se osobine i poroznost



mogu modifikovati umrežavanjem, je želatin. Naročito je raširena njegova primena za dobijanje preparata sa produženim delovanjem. Kao filmogene materije u farmaceutskoj industriji sve veću primenu imaju derivati celuloze [85, 86], kao i biodegradabilni i biokompatibilni polimeri [87].

Priroda inkapsulirane materije, naročito kada se radi o lakoisparljivoj supstanci, u mnogome utiče na osobine mikrokapsula [73]. Iz ovih razloga se mora voditi računa o masenom odnosu filmogene materije i materije jezgra. Za većinu ispitivanih sistema stabilne mikrokapsule se dobijaju pri odnosu 4:1. Na procenat mikrokapsulacije utiču molekulska masa i isparljivost materije koja se inkapsulira.

Osobine emulzija, kao što su viskozitet i veličina kapljica, takođe utiču na osobine mikrokapsula. Povećanje viskoziteta smanjuje pokretljivost i povećava efikasnost mikrokapsulacije, ali se mora voditi računa da je kod previše viskoznih emulzija otežano raspršivanje. Kod kapljica emulzija većih prečnika potrebno je duže vreme za formiranje stabilnog omotača, napon pare je veći, pa može doći do pucanja mikrokapsula. Istovremeno, kada su mikrokapsule formirane sa ciljem zaštite jezgra od uticaja sredine, može se reći da je kod većih kapsula ona bolja, zbog manje površine u odnosu na zapreminu jezgra.

Na stabilnost mikrokapsula utiču i parametri samog procesa sušenja. Ulazna temperatura vazduha mora biti nekoliko stepeni viša od temperature ključanja disperznog sredstva – što je temperatura viša utoliko se omotač brže formira. Da bi se sprečilo isparavanje inkapsulirane materije pri jako visokim temperaturama, regulisanjem kapaciteta aspiracije podešava se kratko vreme zadržavanja uzorka, koje će pri tome biti dovoljno dugo da se dobiju mikrokapsule u obliku suvog praška.

S obzirom na činjenicu da većina filmogenih materija nema izraženu površinsku aktivnost, dobijanje stabilnih mikrokapsula veoma često nije moguće bez dodatka PAM. Pored toga što omogućuju formiranje stabilnih emulzionih sistema, PAM mogu bitno da utiču na adsorpciju filmogene polimerne materije. Ukoliko postoji interakcija polimer–PAM, koja može da menja strukturu adsorpcionog sloja, tada prisustvo PAM može da ima i negativan uticaj na stabilnost mikrokapsula. Interakcija protein–suprotno naelektrisan PAM, koje se često koriste u procesima mikrokapsulacije, predstavlja jedan od komplikovanijih sistema kod kojeg postoje dva osnovna mehanizama interakcije – hidrofobni i jonski. U zavisnosti od mehanizma interakcije, nastali kompleks protein/PAM može značajno da utiče na adsorpciju na granici faza, kao i na strukturu i poroznost nastalih omotača [88, 89].

Inkapsulirana materija se u toku primene mikrokapsula može oslobađati trenutno i u potpunosti, na jedan od navedenih načina:

- rastvaranjem, kada se mikrokapsula stavi u sredinu koja predstavlja rastvarač za filmogenu materiju i nakon rastvaranja omotača dolazi do oslobađanja inkapsulirane materije;

- termalno, povećanjem temperature topi se omotač i inkapsulirana materija se oslobađa iz mikrokapsula;
- mehanički, kada pritiskanjem udarom ili smicanjem dolazi do pucanja omotača.
- desorpcijom, ukoliko je aktivna materija površinski vezana.

Mehanizmi oslobađanja aktivne materije iz mikrokapsula mogu biti:

- difuzijom materije jezgra kroz polupropustljivi polimerni omotač i kroz polimerni matriks [90, 91];
- biodegradacijom, kada pod uticajem enzima ili biohemijskih procesa u organizmu dolazi do razgradnje omotača i oslobađanja sadržaja;
- kombinovano – difuzijom i biodegradacijom, kada prvo dolazi do difuzije sadržaja mikrokapsula kroz polimerni omotač, a zatim do biodegradacije omotača.

Brzina oslobađanja materije jezgra je jedna od neophodnih provera osobina dobijenih mikrokapsula. Iz ovih razloga razvijen je veliki broj metoda određivanja, prilagođen različitim mikrokapsuliranim sistemima. Pri odabiru metode treba voditi računa o tome da ona omogućuje određivanje prividnog koeficijenta difuzije kroz omotač. Takođe, treba eliminisati sve faktore koji mogu uticati na brzinu oslobađanja inkapsulirane materije, a nisu vezani za propustljivost omotača (zapremina i temperatura medijuma, brzina i način mešanja, oblik posude i mešalice, količina i starost uzorka, vreme trajanja eksperimenta...). Postoje četiri osnovne grupe metoda određivanja:

**Metoda difuzije kroz membranu** [92], kod koje je uzorak mikrokapsula rastvoren u maloj količini medijuma i odvojen polupropustljivom membranom od ostale, veće količine medijuma. Membrana mora biti propustljiva za materiju jezgra koja, u toku određenog vremena, difunduje kroz mikrokapsulu i membranu u medijum u kome se, u određenim vremenskim intervalima i određuje.

**Metoda uzorkovanja i odvajanja** [93, 94] podrazumeva dispergovanje uzorka mikrokapsula u određenoj, po pravilu nekoliko puta većoj, količini medijuma i može se primenjivati kada se mikrokapsule mogu lako izdvojiti iz medijuma. U određenim vremenskim intervalima se uzima uzorak medijuma, mikrokapsule odvoje filtracijom ili centrifugiranjem i u filtratu određuje količina prodifundovane materije jezgra. Ova metoda, koja je pogodna i za određivanje ukupne inkapsulirane količine materije jezgra, korišćena je u ovoj disertaciji.

**“In situ” metoda** se primenjuje kada se mikrokapsule ne mogu izdvojiti iz medijuma, pa se sadržaj materije jezgra određuje u uzetom alikvotu medijuma metodama koje su osetljive samo na prisutnu materiju jezgra. Pri tome se uzorak mikrokapsula disperguje u višestruko većoj zapremini medijuma.

**Kontinualna metoda** [89], kao jedna od najčešće primenjivanih, podrazumeva dispergovanje uzorka mikrokapsula u maloj količini medijuma i

postavljanje u ćeliju za filtraciju, pri čemu treba voditi računa da ne dođe do taloženja mikrokapsula na membrani (mešanje). Svež medijum protiče malom, konstantnom brzinom kroz ćeliju za filtraciju, a sadržaj prodifundovane materije jezgra se kontinuirano prati u medijumu koji izlazi iz ćelije. Za detekciju materije jezgra najčešće se koriste UV/VIS spektrofotometri. Koncentracija materije jezgra proporcionalna je njenoj brzini izlaženja što, pored preciznosti u određivanju malih količina prisutnih materija jezgra u medijumu, predstavlja prednost ove u odnosu na diskontinualne metode.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Materijal

U ispitivanjima obuhvaćenim ovom tezom korišćen je cvet nevena (*Calendula officinalis* L.) proizveden 2000. godine na poljima Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Srbija.

Komercijalni ugljendioksid (Tehno-gas, Novi Sad, Srbija) je korišćen za CO<sub>2</sub> ekstrakciju nevena.

Za formiranje mikrokapsula korišćeni su uzorci hidroksipropilmetil celuloze (HPMC) različite molekulske mase i stepena supstitucije (Colorcon Ltd, Engleska), čije su osnovne karakteristike date u **tabeli 1**.

**Tabela 1.** Fizičko- hemijske karakteristike korišćenih uzoraka hidroksipropilmetil celuloze.

Naziv-oznaka	Molek. masa (g/mol)*	Sadržaj vlage (%)	Unutr. visk. [η] na 20°C	Stepen supst.-DS (%)	Sadržaj pojedinih supst. (%)	
					metoksi	hidroksipropil
Methocel K4 M- <b>HPMC1</b>	92.000	1,7	7,88	31,6	22,7	8,9
Methocel K100 M- <b>HPMC3</b>	155.000	1,8	12,52	33,7	23,0	10,7
Methocel K100 LV- <b>HPMC4</b>	30.000	2,1	2,92	32,0	22,3	9,7
Methocel E3 LV- <b>HPMC5</b>	5.000	2,6	0,60	37,8	28,9	8,9

\* određena viskozimetrijski

U ispitivanjima je korišćen uzorak anjonske PAM- natrijum dodecilsulfat (SDS), čistoće >99% (Merck, Nemačka).

Za dobijanje emulzija u/v korišćen je komercijalni uzorak ulja suncokreta (Sunce, Sombor, Srbija).

Za ekstrakciju ulja iz mikrokapsula korišćen je cikloheksan, čistoće p.a. (Lach-Ner, Češka Republika).

U svim ispitivanjima je korišćena bidestilovana voda kao rastvarač.

Sve ostale hemikalije bile su stepena čistoće p.a., ukoliko nije drugačije naglašeno.

### **3.2. Uređaji**

Mlevenje biljnog materijala izvršeno je u električnom mlinu.

Za ispitivanje granulometrijskog sastava samlevenog biljnog materijala korišćen je set sita (Erveka, Nemačka).

Ekstrakcija ugljendioksidom vršena je na uređaju za ekstrakciju pod visokim pritiskom High Pressure Extraction Plant–HPEP (Nova-Swiss, Švajcarska), koji je modifikovan zamenom posrojećeg separatora novim, pri čemu je omogućeno jednostavnije merenje količine izdvojenog ekstrakta (ekstrakt rastvoren u ugljen dioksidu direktno se uvodi u staklenu kivetu).

Sadržaj etarskog ulja u biljnom materijalu i dobijenim CO<sub>2</sub> ekstraktima određen je u aparaturi i po postupku koji propisuje nemačka farmakopeja DAB-8 [26].

Analiza sastava etarskih ulja rađena je na gasnom hromatografu Varian 3400 u kombinaciji sa plameno–jonizujućim detektorom (GC/FID) i gasnom hromatografu Agilent 6890 u kombinaciji sa Agilent 5973 masenim detektorom (GC/MS).

Konduktometrijska ispitivanja izvođena su na mikroprocesorskom konduktometru Model MA 5964 (Iskra, Slovenija).

Emulzije su pripremane pomoću rotor–stator homogenizera Ultraturax T–25 (Janke & Kunkel, Nemačka) na 20°C.

Merenja viskoziteta razblaženih rastvora HPMC, SDS i njihovih smeša rađena su na Ubbelohde kapilarnom viskozimetru, čija je vodena vrednost na 30°C 196,5 s.

Sva reološka merenja izvođena su na rotacionom viskozimetru RV 20 (Haake, Nemačka) na 20°C.

Veličina i raspodela veličina kapljica ispitivanih emulzija i mikrokapsula određena je obradom mikrofotografija dobijenih na mikroskopu Carl Zeiss (Nemačka) uz pomoć fotoaparata Cannon C50. Za analizu slike korišćen je Qwin softver.

Mikrokapsule su dobijene pomoću Mini Spray Dryer uređaja (Büchi 190, Švajcarska).

Morfologija dobijenih mikrokapsula ispitana je primenom elektronskog mikroskopa *Scanning electron microscope* (SEM) JEOL JSM 6460 LV.

Sadržaj inkapsuliranog ulja određen je ekstrakcijom sa cikloheksanom, i merenjem apsorbance primenom Hewlett Packard 8452 A Diode Array spektrofotometra.

### **3.3. Metode ispitivanja**

#### **3.3.1. Dobijanje etarskog ulja i ekstrakata nevena**

##### **3.3.1.1. Određivanje sadržaja etarskog ulja nevena**

Izolovanje i određivanje sadržaja etarskog ulja nevena izvršeno je prema postupku koji propisuje nemačka farmakopeja DAB 8 [26]. Droga stepena usitnjenosti  $0,703 \cdot 10^{-3}$  m (50 g) se prenese u balon ( $1000 \text{ cm}^3$ ), doda voda ( $400 \text{ cm}^3$ ), u graduisanu cev aparature za određivanje etarskog ulja unese voda i petroletar ( $2-3 \text{ cm}^3$ ) i sadržaj balona zagreje do ključanja. Destilacija se vrši u toku 3 sata. Nakon hlađenja (30 min) petroletarski rastvor izolovanog ulja se ispusti u čašu ( $50 \text{ cm}^3$ ), osuši bezvodnim natrijum sulfatom i rastvarač otpari na vodenom kupatilu. Masa izolovanog etarskog ulja se izmeri, a sadržaj u drogi se izrazi u % (m/m).

##### **3.3.1.2. Ekstrakcija nevena ugljendioksidom pod visokim pritiskom**

Ekstrakcija nevena je rađena u tečnoj (60, 90 i 120 bar;  $15^\circ\text{C}$ ) i superkritičnoj oblasti (100, 200 i 300 bar;  $40^\circ\text{C}$ ) pri protoku ugljen dioksida 0,19 kg/h. Uslovi separacije ekstrakta su bili:  $p = 25 \text{ bar}$   $T = 25^\circ\text{C}$ .

Droga stepena usitnjenosti  $0,703 \cdot 10^{-3}$  m (50 g) se unese u ekstraktor i kroz nju propušta ugljendioksid u gasovitom stanju u toku 5 min. Zatim se ekstrakcija vrši na zadatom pritisku, temperaturi i protoku ugljendioksida u toku određenog vremena. Ekstrakcija se prekida zatvaranjem veze između ekstraktora i separatora i ispuštanjem ugljendioksida iz separatora. Izdvojena masa ekstrakta u kiveti se meri i izračunava prinos ekstrakcije. Radi ispitivanja kinetike ekstrakcije, ekstrakcija se na kratko prekida radi merenja mase izdvojenog ekstrakta, a zatim ponovo nastavlja do sledeće kinetičke tačke, kada se postupak merenja i ekstrakcije nastavlja.

Sadržaj etarskog ulja u dobijenim ekstraktima određivan je prema postupku koji je detaljno opisan u delu 3.3.1.1., s tim da se za analizu, umesto droge, uzima 1,00 g ispitivanog ekstrakta.

### 3.3.2. Analiza etarskog ulja nevena

Kvalitativna analiza svih ispitivanih uzoraka etarskog ulja nevena rađena je na gasnom hromatografu u kombinaciji sa masenim detektorom GC/MS, na Agilent 19091S–433 HP–5MS *fused silica* kapilarnoj koloni (30 m x 0,25 mm, debljine filma 0,25 µm). Uzorci su rastvarani u metilen hloridu (1 µl/ml), a injektovana zapremina bila je 1 µl. Temperaturni porast od početne temperature – 60°C (6min) do završne – 285°C iznosio je 4,3°/min., a kao gas nosač korišćen je helijum. Temperatura injektora bila je 250°C, a MS detektora 200°C. Komponente etarskih ulja identifikovane su upoređivanjem dobijenih masenih spektara sa spektrima u bankama podataka Wiley i NIST.

Za kvantitativnu analizu korišćen je gasni hromatograf sa plameno jonizujućim detektorom GC/FID i *split/splitless* injektorom na DB–5 (5% *diphenyl* i 95% *dimethylpolysiloxane*) *fused silica* kapilarnoj koloni (30 m x 0,25 mm, debljine filma 0,25 µm). Uzorci etarskih ulja su pripremani kao kod analize na GC/MS. Temperaturni porast od početne temperature – 50°C (6min) do završne – 285°C iznosio je 4,3°/min, a kao gas nosač korišćen je vodonik. Sadržaj pojedinih komponenata etarskih ulja računat je kao relativni procenat na osnovu površine pika.

### 3.3.3. Priprema rastvora

Rastvori uzoraka HPMC pripremani su dispergovanjem potrebne količine HPMC u bidestilovanoj vodi, prethodno zagrejanom na temperaturi > 70°C- iznad temperature želiranja [68], uz mešanje. Korišćeni su nakon stajanja u toku 24<sup>h</sup> na sobnoj temperaturi. Kod razblaženih rastvora (do 1%), koncentracija je izražena u % (m/v), dok je kod većih koncentracija izražena u % (m/m).

Osnovni rastvor SDS (3%; m/v) dobijen je rastvaranjem potrebne količine SDS u bidestilovanoj vodi uz zagrevanje.

U konduktometrijskim ispitivanjima korišćeni su vodeni rastvori uzoraka HPMC, koji su titrisani osnovnim rastvorom SDS. Pripremani su sledeći rastvori HPMC:

HPMC1 (0,05; 0,10; 0,20; 0,35 i 0,50%)

HPMC3 (0,050; 0,075, 0,100, 0,150, 0,200 i 0,225%)

HPMC4 (0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,35 i 0,50%) i

HPMC5 (0,05; 0,10; 0,15; 0,20 i 0,35%).

Za viskozimetrijska merenja korišćeni su rastvori HPMC1, koncentracija 0,00; 0,100; 0,125; 0,150; 0,200; 0,225; 0,250; 0,275 i 0,350% i rastvori HPMC4 koncentracija 0,20; 0,40 i 0,45%. Merenja su izvođena na kapilarnom viskozimetru Ubbelohde. Zapremini od 15 ml rastvora HPMC, direktno u viskozimetar, dodavana je potrebna zapremina osnovnog rastvora SDS (3%), sa ciljem dobijanja željenih koncentracija SDS.

Za reološka merenja korišćeni su vodeni rastvori 1% HPMC1 sa različitim sadržajem SDS. Priprema rastvora podrazumevala je mešanje osnovnog rastvora HPMC1 (2%) sa osnovnim rastvorom SDS (3%) i vodom do postizanja željene koncentracije SDS, tako da koncentracija HPMC1 bude 1%. Pripremani su rastvori sledećih koncentracija SDS: 0,00; 0,06; 0,15; 0,20; 0,25; 0,35; 0,45; 0,65; 0,75; 0,85; 1,00; 1,25; 1,50 i 2,00%.

Za pripremu kontinualne faze emulzija korišćeni su osnovni rastvori uzoraka HPMC1 i HPMC4 (2%), koji su pomešani sa određenom zapreminom osnovnog rastvora SDS (3%) i vode, do postizanja željene koncentracije SDS, tako da koncentracija HPMC u kontinualnoj fazi bude 1% (m/m). Koncentracije SDS u kontinualnoj fazi iznosile su: 0,15; 0,25; 0,35; 0,45; 0,55; 0,75; 1,00; 1,50 i 2,00%. Nakon stajanja na sobnoj temperaturi u toku 24<sup>h</sup>, vršeno je emulgovanje.

### 3.3.4. Konduktometrijska ispitivanja

Konduktometrijskim titracijama određena je kritična micelarna koncentracija- cmc natrijumdodecil sulfata (SDS) i definisani su intervali HPMC–SDS interakcije za različite uzorke HPMC.

Kritična micelarna koncentracija SDS određena je konduktometrijskom titracijom vode (50ml) sa osnovnim rastvorom SDS (3%) na temperaturama 20, 30 i 40°C, pri čemu su inkrementi dodatog rastvora iznosili: po 0,2 ml do 2 ml, po 0,5 ml do 10 ml i po 1 ml do 20 ml ukupno dodate zapremine.

Konduktometrijske titracije vodenih rastvora uzoraka HPMC osnovnim rastvorom SDS (3%) rađene su na 20, 30 i 40°C. Zapremina titranda bila je 50 ml, a inkrementi titranta isti kao kod određivanja cmc.



### 3.3.5. Viskozimetrijska ispitivanja

Viskozimetrijska merenja serija razblaženih rastvora HPMC1 i HPMC4, sa različitim koncentracijama SDS, izvođena su na temperaturama 20 i 30°C na Ubbelohde- ovom kapilarnom viskozimetru. Vreme isticanja rastvora  $t$  (s), izraženo je kao srednja vrednost 3–5 merenja. Rezultati su iskazani kao specifični ( $\eta_{sp}$ ), redukovani ( $\eta_{red}$ ) i unutrašnji ( $[\eta]$ ) viskozitet.

Specifični viskozitet:

$$\eta_{sp} = \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} \approx \frac{(t - t_0)}{t_0} \quad (1)$$

gde su  $\eta$  i  $\eta_0$  viskoziteti rastvora i rastvarača, odnosno  $t$  i  $t_0$  vremena isticanja rastvora i rastvarača.

Redukovani viskozitet:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (2)$$

gde je  $c$  koncentracija HPMC (%).

Unutrašnji viskozitet predstavlja graničnu vrednost redukovanog viskoziteta, kada koncentracija teži 0:

$$[\eta] = \left( \frac{\eta_{sp}}{c} \right)_{c=0} \quad (3)$$

Ekstrapolacijom na nulu koncentracije, primenom standardnog Huggins-ovog postupka, određena je vrednost  $[\eta]$ . Prosečna molekulska masa polimera, tj. viskozimetrijski prosek, izračunata je iz određene vrednostina  $[\eta]$  na osnovu Mark-Houwink-ove jednačine:

$$[\eta] = KM_v^a \quad (4)$$

gde je  $M_v$  prosečna molekulska masa, a  $K$  i  $a$  konstante koje zavise od vrste rastvarača i temperature. Za HPMC u vodi i na 20°C  $K = 3,39 \cdot 10^{-4} \text{ 100 cm}^3/\text{g}$  i  $a = 0,88$  [71].

### 3.3.6. Reološka ispitivanja

Sva reološka merenja rađena su na temperaturi 20°C uz primenu SVI mernog pribora. Krive proticanja ispitivanih kontinualnih faza snimane su 24<sup>h</sup> nakon njihove pripreme dok su emulzije ispitivane neposredno nakon pripreme.

Primenjen je histerezisni postupak [95] po kome se meri napon smicanja  $\tau$  (Pa) uzorka pri kontinualnom povećanju brzine smicanja  $D$  ( $s^{-1}$ ) od nule do maksimalne vrednosti (uzlazna kriva) i nazad (povratna kriva), nakon razrušavanja pri  $D_{max}$  do postizanja ravnoteže (2 min.). Ubrzanje rotora viskozimetra iznosilo je 400  $min^{-2}$ , a maksimalna brzina smicanja 365  $s^{-1}$ , koja je odabrana tako da se izbegne Weissenberg-ov efekat.

Prividni viskozitet je izražen kao:

$$\eta_a = \frac{\tau}{D} \quad (\text{Pas}) \quad (6)$$

S obzirom da dobijene krive proticanja uzoraka ispitivanih kontinualnih faza ukazuju na nenjutnovsko pseudoplastično ponašanje, eksperimentalne vrednosti su fitovane jednačinom Ostwald-Reiner-a:

$$\tau = A D^n \quad (\text{Pa}) \quad (7)$$

$$\eta_a = A D^{n-1} \quad (\text{Pas}) \quad (8)$$

gde je koeficijent  $A$  mera konzistencije sistema, a  $n$  ( $0 < n < 1$ ) stepen nenjutnovskog ponašanja. Manja vrednost  $n$  ukazuje na više izraženo nenjutnovsko ponašanje [96].

Kod pojedinih uzoraka ispitivanih emulzija uočeno je tiksotropno ponašanje, tako da je koeficijent tiksotropije  $K$  korišćen kao mera dobijene tiksotropne petlje:

$$K = \frac{1}{n} \sum_1^n \tau' - \tau'' \quad (\text{Pa}) \quad (9)$$

gde je  $K$  redukovana tiksotropna površina (izražena po jedinici  $D$ ), a  $n$  broj razlika napona smicanja  $\Delta\tau = \tau' - \tau''$  za uzlazne ( $\tau'$ ), odnosno povratne ( $\tau''$ ) krive i zadate  $Di$  vrednosti. U našim određivanjima  $n = 11$ , odnosno  $\Delta Di = 35,6 s^{-1}$ .

### 3.3.7. Priprema emulzija

Pripremane su 20% emulzije ulja u vodi (u/v). Emulgovanje je izvođeno u čaši (150ml), tako što je u kontinualnu fazu (80 g) dodata uljna faza- suncokretovo ulje (20g) i ručno mešano u toku 1min. Nakon toga, homogenizovanje je izvođeno na temperaturi 20°C uz pomoć rotor–stator homogenizera Ultraturrax T–25.

Podešavanje uslova homogenizovanja rađeno je emulgovanjem suncokretovog ulja (20g) u kontinualnim fazama sa različitom koncentracijom uzorka HPMC4 (1 i 3%, m/m). Variran je broj obrtaja homogenizera (4700 i 6000 o/min) i vreme trajanja homogenizovanja (3 i 15 min).

Sve ostale ispitivane emulzije pripremane su pri odabranim uslovima homogenizovanja, dispergovanjem 20 g suncokretovog ulja u kontinualnu fazu (80 g) koja je sadržala 1% (m/m) polimera (HPMC1 ili HPMC4) i različitu koncentraciju SDS. Nakon ručnog mešanja u toku 1 min., emulzije su homogenizovane uz pomoć rotor–stator homogenizera na temperaturi 20°C u toku u toku 3 min pri broju obrtaja 4700 o/min.

Za pripremu emulzija sa aktivnom komponentom, u suncokretovo ulje je dodato 1%, m/m odabranog CO<sub>2</sub> ekstrakta nevena, računato na masu ulja.

### 3.3.8. Ispitivanje stabilnosti emulzija

Emulzije su, odmah nakon pripreme, sipane u graduisane cilindre sa šlifom (10 ml) i ostavljene da stoje na sobnoj temperaturi u toku 60 dana. Tokom ovog perioda vizuelno je praćena promena visine izdvojene kontinualne faze ( $H_S$ ) u odnosu na ukupnu visinu stuba emulzije ( $H_E$ ), odnosno, kriming indeks H:

$$H = \frac{H_S}{H_E} \cdot 100 \quad (\%) \quad (5)$$

Veće vrednosti kriming indeksa ukazuju na manju stabilnost emulzija [65].

### 3.3.9. Dobijanje mikrokapsula

Mikrokapsule su dobijene *spray drying* postupkom mikrokapsulacije, raspršivanjem emulzije u struji toplog vazduha. Optimalni uslovi sušenja, koji obezbeđuju relativno visok prinos mikrokapsula, utvrđeni su na osnovu prethodnih ispitivanja. Parametri sušenja, kao što su protok vazduha, aspiracija i protok emulzije, praćeni su i regulisani za vreme sušenja tako da je ulazna temperatura emulzije iznosila 150°C, a izlazna 90°C.

### 3.3.10. Određivanje veličine i raspodele veličina čestica

Veličina i raspodela veličina čestica emulzija i suspenzija mikrokapsula dispergovanih u vodi određena je primenom Qwin softvera. Obradom mikrofotografije određen je broj čestica, koji se za svaki ispitivani kretao u intervalu 800-1500, njihov ekvivalentni prečnik (određen preko površine kruga) i histogram raspodele prečnika čestica. Na osnovu dobijenih podataka, obradom uz pomoć Excel računarskog programa, određena je površinska raspodela veličina čestica, koja je u programu Origin fitovana krivom raspodele oblika:

$$Y_p = G \cdot x^m e^{(-ax)} \quad (10)$$

Na osnovu određenih koeficijenata krive raspodele ( $G$ ,  $m$ ,  $a$ ) izračunati su statistički parametri odgovarajuće raspodele: srednji prečnik ( $d_{vs}$ ), standardna devijacija ( $\sigma$ ), asimetrija ( $\beta_1$ ) i spljoštenost ( $\beta_2$ ), koji su prikazani u tabelama datim u prilogu. Isti parametri odedeni su na osnovu eksperimentalnih podataka primenom Mathcad programa.

Prečnik čestica je izražen kao zapreminsko površinski srednji prečnik:

$$d_{vs} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (\mu\text{m}) \quad (11)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum n_i (d_i - d_{vs})^2}{\sum n_i}} \quad (\mu\text{m}) \quad (12)$$

Sa maksimuma krive raspodele očitavan je najverovatniji prečnik  $X$  ( $\mu\text{m}$ ), a specifična površina ( $S$ ) izračunavana iz izraza:

$$S = \frac{6}{d_{vs}} \quad (\text{m}^2/\text{cm}^3) \quad (13)$$

### **3.3.11. Ispitivanje morfologije i sposobnosti redispergovanja mikro kapsula**

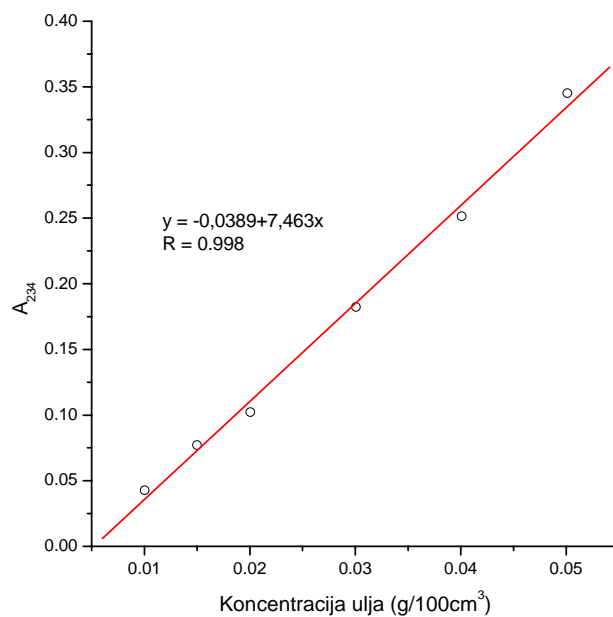
Morfologija dobijenih mikro kapsula ispitana je primenom elektronskog mikroskopa. Mikro kapsule, u formi praška, su postavljene na nosač, prevučene platinom i ispitivane na uvećanju od 3000 puta.

Za ispitivanje sposobnosti redispergovanja korišćen je optički mikroskop. Mikro kapsule, dobijene u praškastoj formi, bile su u obliku agregata. Dodatkom vode, pod mikroskopom je posmatrana njihova redisperzibilnost, odnosno sposobnost dezagregacije.

### **3.3.12. Određivanje količine inkapsuliranog ulja**

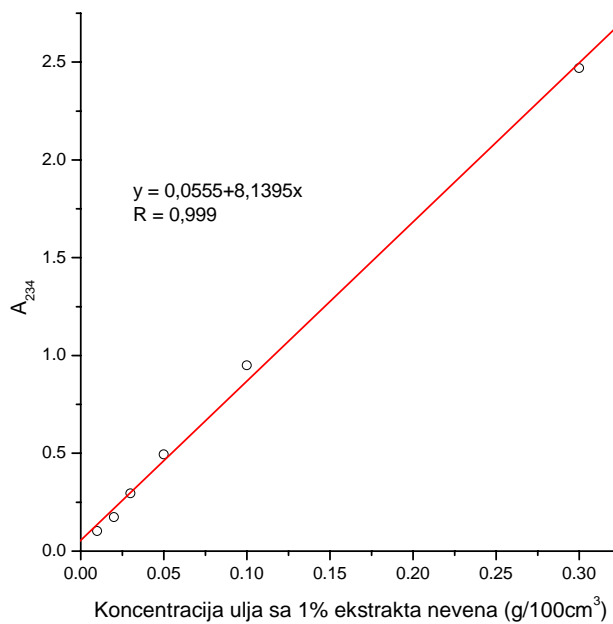
Za određivanje efikasnosti mikro kapsulacije korišćena je diskontinualna metoda uzorkovanja i odvajanja.

Mikro kapsule (1 g) se prenesu u erlenmajer (200 ml) i ekstrahuju, na sobnoj temperaturi, cikloheksanom (100 ml) uz mešanje na magnetnoj mešalici u toku 60 min. U prethodno definisanim vremenskim intervalima uzimaju se uzorci (2 ml) za analizu sadržaja ulja, a u erlenmajer doda ista zapremina rastvarača radi održavanja konstantne zapremine. Uzorci se filtriraju preko filter papira, filtrati (po 0,5 ili 1,0 ml) prenesu u normalne sudove (5 ml) i dopune cikloheksanom. Sadržaj ulja se odredi spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 234 nm i očitavanjem sa kalibracionog dijagrama, dobijenog određivanjem zavisnosti apsorbancije od poznate koncentracije ulja u rastvoru.



Slika 16. Kalibracioni dijagram suncokretovog ulja.

Za izradu kalibracionog dijagrama (**slika 16.**) korišćen je osnovni rastvor ulja (0,5%) u cikloheksanu, a kocentracije su podešene razblaživanjem, tako da postoji linearna zavisnost apsorbancije od koncentracije ulja. Kalibracioni dijagram, određen na isti način, za suncokretovo ulje sa 1% ekstrakta nevena, prikazan je na **slici 17.**



Slika 17. Kalibracioni dijagram suncokretovog ulja sa 1% ekstrakta nevena.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

Prva faza ispitivanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije obuhvatila je ispitivanje uslova ekstrakcije nevena ugljendioksidom pod pritiskom, sa ciljem dobijanja ekstrakata sa visokim sadržajem FAS. Izvršena je karakterizacija polazne biljne sirovine, cveta nevena (*Calendula officinalis* L.), što je obuhvatilo određivanje sadržaja etarskog ulja i njegovog kvalitativnog i kvantitativnog sastava.

Ekstrakcija ugljendioksidom ispitivana je u tečnoj i superkritičnoj oblasti izotermskom promenom pritiska. Određeni su prinosi ekstrakcije, sadržaj i sastav etarskog ulja prisutnog u ekstraktima. Na osnovu dobijenih rezultata odabrani su najpovoljniji uslovi ekstrakcije nevena, pri kojima je ispitivana kinetika ekstrakcije praćenjem prinosa totalnog ekstrakta.

Usledila su ispitivanja HPMC–SDS interakcije primenom konduktometrijske, viskozimetrijske i reološke metode. Određene su karakteristične koncentracije SDS, koje definišu početak i kraj interakcije, tj. kritična agregaciona koncentracija-  $c_{ac}$  i kritična koncentracija zasićenja-  $c_{psp}$ , i objašnjeni mehanizmi vezivanja SDS za aktivne centre na molekulu polimera. Ispitan je uticaj karakteristika molekula HPMC (koncentracije, molekulske mase, DS i osobina supstituenata) i temperature na interakciju sa SDS i objašnjen mehanizam njihovog vezivanja.

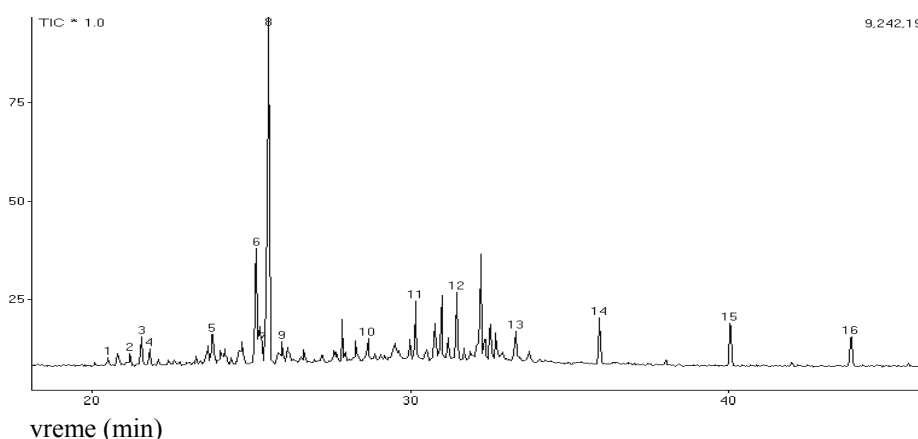
U sledećoj fazi ispitivana je mogućnost dobijanja stabilnih emulzija suncokretovog ulja u smeši HPMC–SDS. Na osnovu rezultata ispitivanja reoloških karakteristika, veličina i raspodela veličina čestica i stabilnosti emulzija u toku dva meseca, odabran je najpogodniji sistem HPMC-SDS za dobijanje mikrokapsula primenom *spray drying* postupka.

Završna faza ove disertacije odnosila se na ispitivanje osobina mikrokapsula uljnog sadržaja, dobijenih u sistemu HPMC–SDS, čije su koncentracije odabrane tako da pokrivaju oblast pre, u toku i nakon završene interakcije. Ispitan je dodatak odabranog CO<sub>2</sub> ekstrakta nevena u uljnu fazu emulzija na osobine dobijenih mikrokapsula (veličina i raspodela veličina čestica, redisperzibilnost, osobine omotača i količina inkapsuliranog ulja).

#### 4.1. Ispitivanje ekstrakcije nevena ugljendioksidom pod pritiskom

Sadržaj etarskog ulja u drogi, stepena usitnjenosti  $0,703 \cdot 10^{-3}$  m, određen je postupkom destilacije pomoću vodene pare, propisanom od strane nemačke farmakopeje [26], koji je iznosio 0,050%. S obzirom da je, prema literaturnim podacima, njegov uobičajen sadržaj u drogi 0,02% [14], može se zaključiti da se radi o veoma kvalitetnom biljnom materijalu, sa visokim sadržajem etarskog ulja.

Primenom GC/MS i GC/FID određen je kvalitativan i kvantitativan sastav dobijenog etarskog ulja, čiji je hromatogram prikazan na **slici 18**.



**Slika 18.** GC hromatogram etarskog ulja nevena.

Razmatranjem rezultata kvalitativne i kvantitativne analize etarskog ulja nevena, datih u **tabeli 2.**, uočava se da su najzastupljenije komponente:  $\alpha$ -kadinol (26,54%), T-kadinol i T-muurolol (9,80%), koji pri datim uslovima određivanja nisu u potpunosti razdvojeni te imaju isto retenciono vreme- RT,  $\gamma$ -kadinen (2,99%), heksadekanska kiselina (2,95%), ledan (2,45%), leden (1,63%) i  $\alpha$ -muurolen (1,18%). Prethodna ispitivanja sastava etarskog ulja cvetova *Calendula officinalis* L., dobijenog destilacijom sa vodenom parom, koja su sproveli Chalchat, Garry & Michet [27], pokazala su da ono sadrži uglavnom seskviterpenske alkohole iz grupe muurolole i kadinola (najzastupljenija komponenta je  $\alpha$ -kadinol), što je u saglasnosti sa našim rezultatima [97, 98]. Gastro-intestinalno delovanje ekstrakta nevena pripisuje se upravo ovoj grupi jedinjenja, koja deluju kao antagonisti kalcijuma, a novija istraživanja ukazuju i na njihovo delovanje kao imunomodulatora [28]. Iz ovih razloga, jedan od kriterijuma za izbor ekstrakta koji će biti korišćen u procesu mikrokapsulacije, biće i sadržaj jedinjenja iz grupe kadinola u etarskom ulju izolovanom iz ekstrakta.



**Tabela 2.** Rezultati analize etarskog ulja nevena.

RT (min)	Komponenta	Sadržaj (%)
24,2	$\gamma$ -Muurolen	0,72
24,7	Leden	1,63
24,9	$\alpha$ -Muurolen	1,18
25,4	$\gamma$ -Kadinen	2,99
27,7	Ledan	2,45
27,9	Ledol	0,72
28,6	Kubenol	1,38
29,0	T-Kadinol + T-Muurolol	9,8
29,1	$\beta$ -Eudezmol	1,58
29,5	$\alpha$ -Kadinol	26,54
33,5	Heksadekanska kiselina	2,95
33,7	n.i.	2,95
34,1	2-Pentadekanon	1,67
34,3	n.i.	1,95
35,0	n.i.	1,86
35,2	n.i.	2,87
35,4	n.i.	1,50
35,5	Heptadekan	1,50
35,6	n.i.	1,70
35,7	n.i.	1,73
36,5	n.i.	4,55
36,7	n.i.	2,09
37,2	n.i.	2,80
37,5	Octadekan	0,85
40,2	Nonadekan	1,88
44,5	n-Eikozan	1,15

\* neidentifikovane komponente manje od 1,0 % nisu prikazane

Sa ciljem ispitivanja uticaja uslova ekstrakcije ugljendioksidom u tečnoj i superkritičnoj oblasti, na prinos, sprovedeno je izotermno povećanje pritiska u ovim oblastima ekstrakcije. Ekstrakcija u superkritičnoj oblasti rađena je na 40°C pri različitim pritiscima (100, 200 i 300 bar), dok su u tečnoj oblasti ekstrakcije, na 15°C, primenjeni pritisci od 60, 90 i 120 bar. Vreme trajanja ekstrakcije bilo je tri sata, a korišćeni biljni materijal, cvet nevena, istog stepena usitnjenosti kao kod određivanja sadržaja etarskog ulja u drogi ( $0,703 \cdot 10^{-3}$  m). Sadržaj etarskog ulja u dobijenim ekstraktima određen je destilacijom sa vodenom parom [26] i izražen u % u odnosu na ekstrakt, odnosno u odnosu na drogu. Rezultati ovih ispitivanja dati su u **tabeli 3**.

**Tabela 3.** Prinosi ekstrakcije i etarskog ulja nevena dobijenih u superkritičnoj i tečnoj oblasti ekstrakcije na različitim pritiscima.

Pritisak/temp. (bar/°C)	Prinos ekstrakcije (%)	Sadržaj etarskog ulja (%) u odnosu na	
		ekstrakt	drogu
100/40	0,56	13,44	0,076
200/40	3,69	3,72	0,124
300/40	4,27	2,94	0,126
60/15	1,47	8,07	0,119
90/15	1,87	7,23	0,135
120/15	2,03	5,55	0,113

Na osnovu prikazanih rezultata može se uočiti da povećanje pritiska u superkritičnoj oblasti u znatnoj meri utiče na prinos ekstrakcije, odnosno dovodi do njegovog porasta [97]. Poznato je, da pri višim vrednostima pritiska ugljendioksid u superkritičnoj oblasti ekstrakcije ima veću zapreminsku masu, a samim tim i veću moć rastvaranja. Iz ovih razloga se, pri većim pritiscima, u većoj količini rastvaraju visokomolekularna jedinjenja, masna ulja, kutikularni voskovi i smole, što utiče na povećanje prinosa ekstrakcije, ali i na smanjenu selektivnost ekstragensa. Ovaj uticaj je manje izražen pri ekstrakciji sa tečnim CO<sub>2</sub>, gde povećanjem pritiska ne dolazi do značajne promene prinosa.

Ukoliko se posmatra sadržaj etarskog ulja u ispitivanim ekstraktima, izražen u odnosu na drogu, može se uočiti da je on 1,52 –2,70 puta veći nego njegov sadržaj u biljnom materijalu određen oficinalnim postupkom (0,050%). Objašnjenje ove pojave se može tražiti u činjenici da cvet nevena, pored “slobodnog” etarskog ulja, sadrži i masna ulja, voskove i smole, u kojima je rastvoren jedan deo etarskog ulja. Postupkom destilacije sa vodenom parom, koji, za određivanje sadržaja etarskog ulja u drogi propisuju sve svetske farmakopeje, izdvaja se, po svemu sudeći, samo “slobodno” etarsko ulje koje je dostupno vodenoj pari. Ekstrakcijom cveta nevena ugljendioksidom pod pritiskom, pored “slobodnog” etarskog ulja ekstrahuju se i masna ulja, voskovi i smole, kao i u njima rastvoreno etarsko ulje. Kada se CO<sub>2</sub> ekstrakti, radi određivanja sadržaja etarskog ulja, podvrgnu destilaciji sa vodenom parom, razumljivo je da će dobijene vrednosti biti veće od sadržaja etarskog ulja u drogi određenog oficinalnim postupkom [97].

Tendencija povećanja količine (mase) ekstrahovanog ulja od nižih ka višim primenjenim pritiscima, može se objasniti povećanjem prinosa ekstrakcije (od 0,56–4,57%), odnosno povećanjem količine (mase) ekstrahovanih masnih ulja, smola i voskova prisutnih u ekstraktima. Ekstrakcijom u tečnoj oblasti dobijaju se manji prinosi ekstrakcije i ne ekstrahuje se celokupno ulje prisutno u biljnom materijalu.

Primenom pritiska od 300 bar u superkritičnoj oblasti ekstrakcije, nakon tri sata ekstrakcije, dobijen je najveći prinos, ali je ukupni sadržaj etarskog ulja, izražen u

odnosu na drogu, približno jednak sadržaju u ekstraktu dobijenom na 200 bar. Ovo ukazuje da se pri pritisku 200 bar, u toku 3 sata, ekstrahuje skoro cela količina etarskog ulja prisutnog u biljnom materijalu, kako “slobodnog” tako i rastvorenog u voskovima, odnosno da se daljim povećanjem pritiska favorizuje ekstrakcija smola, voskova i masnih ulja koji u sebi ne sadrže značajne količine rastvorenog etarskog ulja.

Sastav etarskih ulja dobijenih destilacijom sa vodenom parom iz CO<sub>2</sub> ekstrakata nevena prikazan je u **tabeli 4**. Može se uočiti da su ova etarska ulja, generalno, kompleksnijeg sastava od etarskog ulja dobijenog oficinalnim postupkom destilacije, odnosno da je detektovan veći broj komponenata [97].

Iz rezultata prikazanih u **tabeli 4**, vidi se da su, i u etarskim uljima izolovanim iz CO<sub>2</sub> ekstrakata, najzastupljenija jedinjenja iz grupe kadinola, pored  $\alpha$ -kadinola, T-kadinola i T-muurolole,  $\gamma$ -kadinena i dr. prisutan je i  $\delta$ -kadinen (6,50-19,87% u uljima dobijenim u superkritičnoj i 16,09-19,41% u tečnoj oblasti ekstrakcije). Ova grupa jedinjenja zastupljena je u znatno većem procentu (39,33-60,12%) u odnosu na etarsko ulje izolovano iz droge (28,82%). S obzirom da se farmakološka svojstva pripisuju upravo jedinjenjima iz grupe kadinola, veći sadržaj u etarskim uljima izolovanim iz CO<sub>2</sub> ekstrakata ukazuje na njihov bolji farmakološki učinak.

Pored navedenih, etarska ulja iz CO<sub>2</sub> ekstrakata sadrže, u manjoj količini i grupu lakoisparljivih komponenata (<1,00%), nižih vrednosti RT ( $\alpha$ -humulen,  $\beta$ -kariofilen,  $\alpha$ -kopaen itd.) koja nije nađena u uzorku etarskog ulja izolovanog iz droge destilacijom sa vodenom parom.

Posmatranjem sadržaja neidentifikovanih komponenata etarskog ulja dobijenog destilacijom biljnog materijala i njihovog sadržaja u etarskim uljima izolovanim iz CO<sub>2</sub> ekstrakata, uočavaju se izvesne razlike. U etarskom ulju dobijenom destilacijom droge prisutne su dve grupe neidentifikovanih komponenata, sa nižim RT (34,3-35,4 min) i višim RT (35,6-36,7 min), koje nisu prisutne u etarskim uljima izolovanim iz CO<sub>2</sub> ekstrakata. Istovremeno, ulja izolovana iz CO<sub>2</sub> ekstrakata sadrže veću količinu jedinjenja viših vrednosti RT (37,2 min i više), odnosno komponente veće molekulske mase– ugljovodonike, što je očekivano, s obzirom na osobine ugljendioksida kao ekstragensa.

Sagledavanjem uticaja izoternskog povećanja pritiska u superkritičnoj i tečnoj oblasti ekstrakcije na sastav dobijenog etarskog ulja, uočava se da njegovo povećanje utiče na kompleksnost sastava dobijenog etarskog ulja samo u oblasti superkritične ekstrakcije, što je u skladu sa teorijskim očekivanjima. Naime, povećanjem pritiska u ovoj oblasti ekstrakcije dolazi do povećanja zapreminske mase ugljendioksida, a samim tim i njegove moći rastvaranja, tako da se pri višim pritiscima ekstrahuje veći broj komponenata prisutnih u biljnom materijalu.

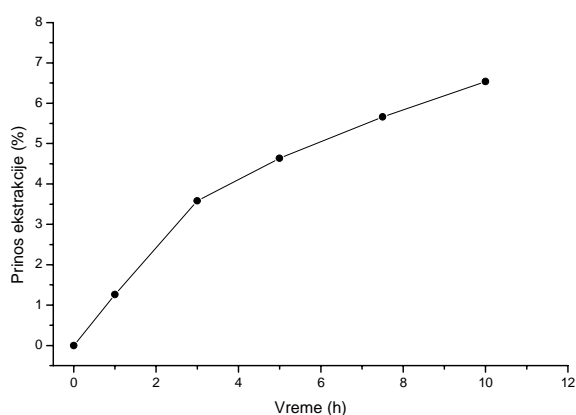
**Tabela 4.** Rezultati analize etarskih ulja dobijenih destilacijom sa vodenom parom iz CO<sub>2</sub> ekstraktata superkritične i tečne ekstrakcije nevena.

RT (min)	Komponenta	Sadržaj (%)					
		superkritična oblast (40°C)			tečna oblast (15°C)		
		100 bar	200 bar	300 bar	60 bar	90 bar	120 bar
18,5	Timol		0,65	0,57			
20,3	$\alpha$ -Kubeben			0,35	0,32	0,33	
21,2	$\alpha$ -Kopaen			0,56	0,58	0,61	0,52
22,5	(-)- $\alpha$ -Grujunen					0,44	
22,6	$\beta$ -Kariofilen			0,44	0,31		
22,9	$\beta$ -Grujunen					0,30	
23,4	$\alpha$ -Humulen	0,66	0,95	0,87	0,30	0,34	0,56
23,7	5-dien cis-Muurola-4 (14)					0,30	
23,8	n.i*		0,68	0,66	1,00	0,58	0,67
24,2	$\gamma$ -Muurolen		1,09	1,52	0,48	1,42	1,44
24,3	D-Germakren	0,67	1,44		1,41		
24,4	$\beta$ -Jonon	0,71	1,03	1,66	1,39	1,03	1,26
24,7	Leden	1,04	3,28	3,36	1,88	2,11	2,32
24,9	$\alpha$ -Muurolen	1,08	3,36	3,04	3,56	3,51	3,84
25,4	$\gamma$ -Kadinen	2,05	7,24	9,55	11,28	11,43	10,69
25,6	$\delta$ -Kadinen	6,50	19,87	15,69	19,36	19,41	16,09
25,8	Kadina-1,4-dien			0,58	0,80	0,90	0,45
26,0	$\alpha$ -Kadinen	0,56	1,50	1,58	2,06	1,99	1,90
26,4	$\alpha$ -Kalakoren			0,40		0,27	0,38
27,7	Ledan	1,75	3,54	3,81	1,50	1,80	2,97
27,9	Ledol		0,96	1,00	0,41	0,38	0,83
28,6	Kubenol	0,48	0,85	0,87	0,56	0,58	0,76
29,0	T-Kadinol + T-Muurolol	4,87	8,36	8,17	7,60	7,61	8,54
29,1	$\beta$ -Eudezmol	0,79	0,83				0,79
29,5	$\alpha$ -Kadinol	14,84	22,41	19,10	16,95	17,62	22,45
33,5	Heksadekanska kiselina			0,28			
33,7	n.i.						t
34,1	2-Pentadekanon	1,53	0,87	0,45	0,40	0,76	0,67
34,3	n.i.			t	t	t	
35,5	Heptadekan	5,43	2,88	2,55	2,68	2,67	2,34
37,2	n.i.	4,53	1,73	2,61	3,87	6,84	3,01
37,4	n.i.	4,56	2,65	1,17	2,02		1,05
37,5	Octadekan	2,08	1,58	1,05	1,16	1,20	0,93
40,2	Nonadekan	7,11	2,79	1,81	3,26	2,73	2,24
41,4	n.i.	2,47	t	t	1,19	t	
44,5	n-Eikozan	2,51	1,95	1,18	2,66	2,16	1,89
44,7	n.i.	8,56				t	
46,6	n.i.	1,03					
48,7	n.i.	5,87	t	t	1,48	1,05	1,18

\* neidentifikovane komponente manje od 1,0 % nisu prikazane

t– komponente prisutne manje od 0,1%

Na osnovu svega izloženog, može se zaključiti da se CO<sub>2</sub> ekstrakcijom u superkritičnoj oblasti, na pritisku 200 bar, dobija ekstrakt koji sadrži maksimalnu količinu etarskog ulja koja se može izolovati iz droge u toku tri sata. Takođe, etarsko ulje izolovano iz ovog ekstrakta sadrži veliku količinu jedinjenja iz grupe kadinola (59,38%), što ukazuje na jače izraženo farmakološko delovanje. Istovremeno, uslovi ekstrakcije na pritisku 200 bar se znatno lakše postižu i održavaju u aparaturi za ekstrakciju u odnosu na pritisak 300 bar, gde je prinos ekstrakcije nešto veći ali sadržaj i sastav etarskog ulja približno isti. Iz ovih razloga ispitivanje kinetike rađeno je u superkritičnoj oblasti ekstrakcije na 200 bar i 40°C. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na **slici 19**.



**Slika 19.** Kriva kinetike ekstrakcije nevena ugljen dioksidom na 200 bar i 40°C.

Produžavanje vremena trajanja ekstrakcije dovodi do povećanja prinosa ekstrakta. Totalni ekstrakt dobijen nakon 10 sati ekstrakcije iznosi 6,54%, dok je sadržaj etarskog ulja u njemu 3,194%. Sadržaj etarskog ulja u totalnom ekstraktu, izražen u odnosu na biljni materijal, iznosi 0,203 %, što je 1,67 puta više u odnosu na njegov sadržaj u ekstraktu nakon 3 sata ekstrakcije pod istim uslovima, a 4,16 puta više nego što je nađeno u biljnom materijalu primenom oficinalnog postupka. Može se smatrati da je nakon 10 sati ekstrakcije na 200 bar i 40°C izolovana cela količina etarskog ulja prisutnog u drogi, kao i da dalje produžavanje vremena trajanja ekstrakcije ne bi značajno uticalo na prinos i promenu sastava ekstrakta.

Na osnovu sprovedenih ispitivanja, kao najpogodniji za dobijanje mikrokapsula sa farmakološkim delovanjem, odabran je totalni ekstrakt cveta nevena, dobijen superkritičnom ekstrakcijom na 200 bar i 40°C u toku 10 sati.

## 4.2. Ispitivanje HPMC–SDS interakcije različitim metodama

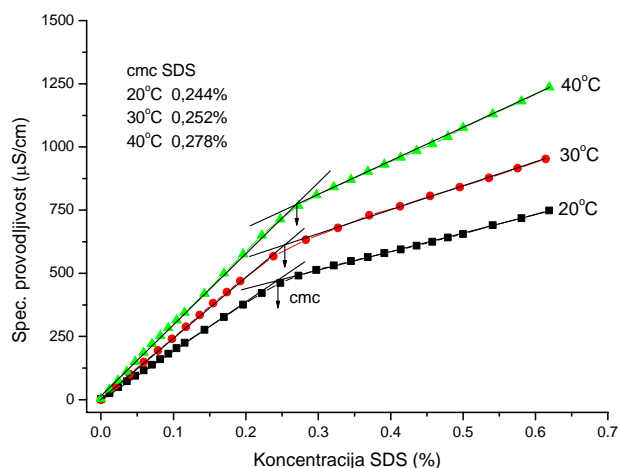
Interakcije nejonski polimer–jonska PAM u vodenim rastvorima, u velikoj meri utiču na fizičko-hemijske karakteristike sistema, što određuje njihovu primenu [29, 30, 65]. U zavisnosti od osobina molekula polimera i PAM, može doći do formiranja kompleksa polimer/PAM, koji utiče na viskozitet, emulgujuća svojstva, mogućnost formiranja gela i stabilnost sistema. Adsorpciona svojstava formiranog kompleksa na granici faza u/v, a samim tim i mogućnost formiranja stabilnih filmova, određuju osobine dobijenih mikrokapsula uljnog sadržaja. Iz ovih razloga ispitivanje interakcije polimer–PAM predstavlja prvi korak ka definisanju uslova za dobijanje mikrokapsula željenih karakteristika omotača.

Ispitivanja interakcija između nejonskog polimera- HPMC različitih karakteristika (molekulska masa, stepen supstitucije) i anjonske PAM- SDS u vodenim rastvorima su sprovedena primenom različitih metoda: konduktometrije, viskozimetrije i reologije. Na osnovu tih ispitivanja definisane su oblasti interakcije, objašnjeni mehanizmi povezivanja, i uticaj na strukturu nastalog kompleksa HPMC/SDS.

### 4.2.1. Konduktometrijska ispitivanja

#### 4.2.1.1. Određivanje cmc natrijumdodecil sulfata- SDS

Konduktometrijska titracija je jedna od najčešće primenjivanih tehnika, kako za određivanje kritične micelarne koncentracije jonskih PAM, tako i za ispitivanje interakcije nejonski polimer-jonska PAM u vodenim rastvorima [42-44, 99]. Povećanje koncentracije jonskih PAM u vodi dovodi do linearnog porasta specifične provodljivosti rastvora sve dok se ne dostigne koncentracija pri kojoj započinje formiranje micela, odnosno kritična micelarna koncentracija- cmc. Daljim povećanjem koncentracije PAM specifična provodljivost nastavlja sa linearnim porastom, ali sa manjim nagibom usled manje pokretljivosti nastalih micelarnih struktura. Prelomna tačka na dijagramu zavisnosti specifične provodljivosti od koncentracije predstavlja cmc ispitivane PAM. Rezultati određivanja cmc SDS konduktometrijskim titracijama, sprovedenim na različitim temperaturama, prikazani su na **slici 20**.



**Slika 20.** Rezultati konduktometrijskog određivanja cmc SDS na različitim temperaturama.

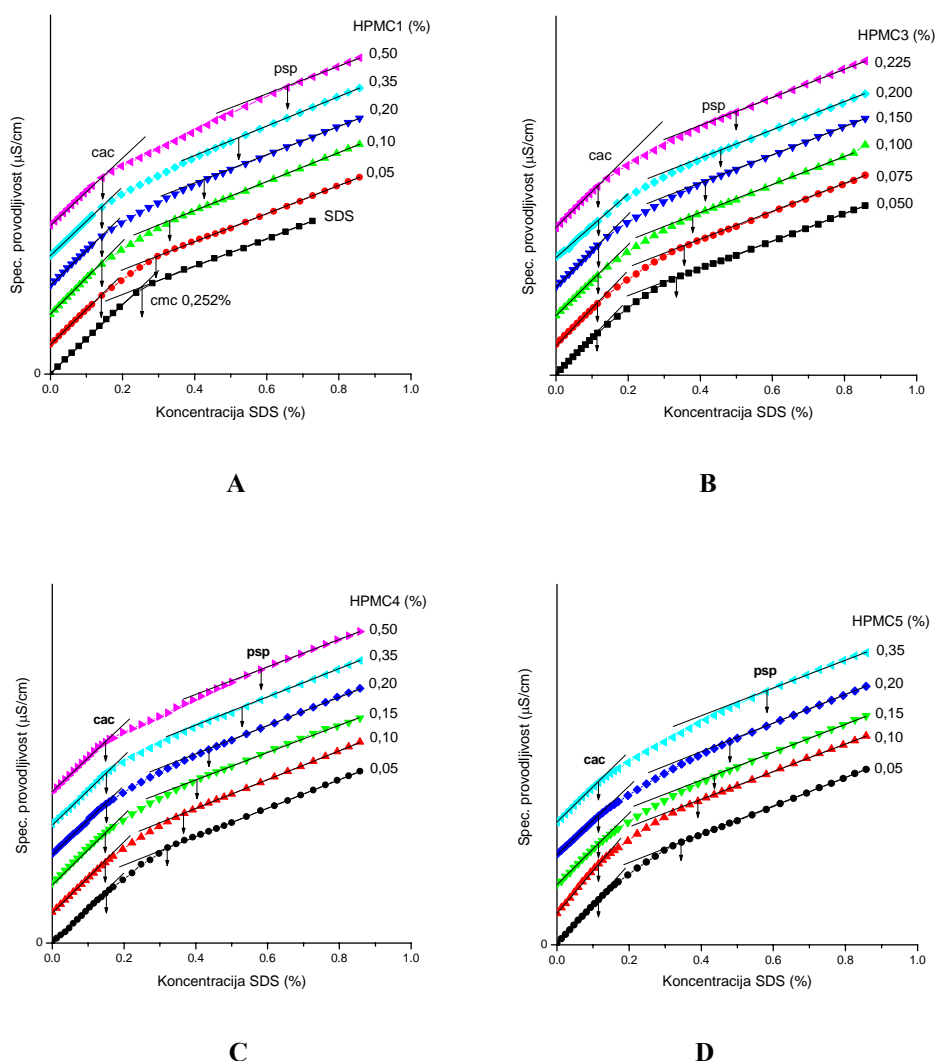
Uočava se da porast temperature utiče na pomeranje cmc prema većim koncentracijama, što je u skladu sa literaturnim podacima [40, 100]. Naime, povećanjem temperature dolazi do povećanja elektrostatičkog odbijanja jonogenih grupa molekula PAM, tako da su za formiranje micelarnih agregata potrebne veće koncentracije u rastvoru.

#### 4.2.1.2. Ispitivanje HPMC–SDS interakcije

Ispitivanje interakcije HPMC–SDS primenom konduktometrijske metode rađeno je sa ciljem definisanja uslova pri kojima dolazi do formiranja kompleksa polimer/PAM. Ispitan je uticaj osobina molekula polimera, molekulske mase i stepena substitucije, kao i temperature na interval interakcije.

Zavisnost specifične provodljivosti rastvora na 30°C od koncentracije SDS, za različite uzorke HPMC, prikazana je na **slici 21**. Na **slici 21. A** su, radi poređenja, prikazani i rezultati određivanja cmc SDS na 30°C.

Na prikazanim dijagramima se mogu uočiti dve prelomne tačke koje određuju oblast nelinearne zavisnosti specifične provodljivosti rastvora od koncentracije SDS. Ovakav izgled konduktometrijskih krivih je karakterističan za većinu ispitanih sistema nejonski polimer–jonska PAM [43-45]. Prva prelomna tačka je kritična agregaciona koncentracija- cac, pri kojoj započinje vezivanje molekula PAM za hidrofobne centre na molekulima polimera, a druga je kritična koncentracija zasićenja- psp, pri kojoj su aktivni centri molekula polimera u potpunosti zasićeni molekulima PAM. Oblast nelinearne zavisnosti specifične provodljivosti od koncentracije PAM je oblast interakcije [32, 48].



**Slika 21.** Promne specifične provodljivosti sa koncentracijom SDS za rastvore različitih koncentracija polimera: (A) HPMC1, (B) HPMC3; (C) HPMC4 i (D) HPMC5.

Cac je, kod svih ispitivanih uzoraka HPMC, niža od cmc, što ukazuje da je formiranje HPMC/SDS kompleksa energetski povoljnije od formiranja slobodnih micela SDS. Naime, usled izraženog hidrofobnog privlačenja molekula SDS i hidrofobnih delova lanaca HPMC [32], koncentracija SDS u blizini molekula HPMC je veća nego u rastvoru. Iz ovih razloga agregacija molekula SDS oko aktivnih, hidrofobnih centara molekula HPMC, započinje pri ukupnoj koncentraciji SDS u rastvoru nižoj od cmc.

Povećanje koncentracije SDS do cac, u svim ispitivanim rastvorima HPMC, dovodi do linearnog porasta specifične provodljivosti sa istim nagibom kao da polimer nije prisutan u rastvoru. Ovo ukazuje da ispod cac ne dolazi do HPMC–SDS interakcije. Dalji porast koncentracije SDS izaziva nelinearan rast provodljivosti, koji se može objasniti smanjenom koncentracijom slobodnih molekula SDS, usled



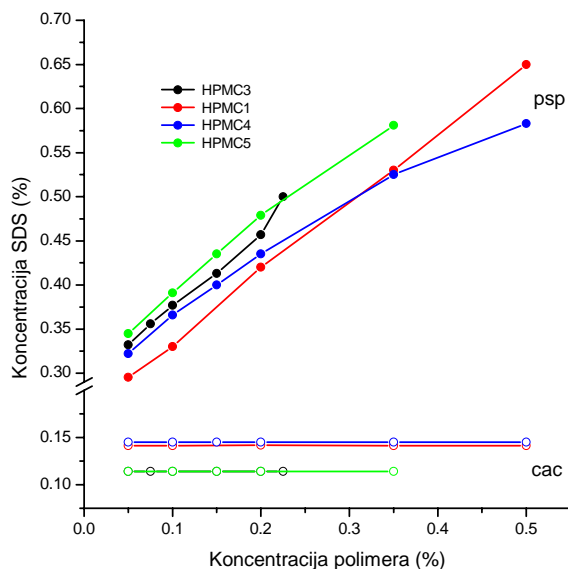
njihovog vezivanja za lance polimera, bilo adsorpcijom pojedinačnih molekula ili formiranjem micela. Vezivanje se nastavlja do potpunog zasićenja svih aktivnih centara na molekulima HPMC, odnosno do postizanja psp. Porast koncentracije SDS iznad psp dovodi do ponovnog linearnog rasta specifične provodljivosti (sistem se ponaša kao kada u rastvoru nije prisutan polimer) i nagib dobijene prave je isti kao za rastvor SDS nakon dostizanja cmc (**slika 21 A**). Oblast nelinearnosti predstavlja oblast HPMC–SDS interakcije i može se objasniti mehanizmom vezivanja molekula PAM za molekule polimera [43].

Neposredno nakon dostizanja cac, na početku interakcije, dolazi do vezivanja pojedinačnih molekula ili micela sa malim agregacionim brojem, dimera, za hidrofobne supstituente molekula HPMC, a zatim, postepeno, do formiranja micela većeg agregacionog broja. Nakon postizanja psp u rastvoru se formiraju slobodne micelle uobičajenog agregacionog broja [43, 48], što ne isključuje mogućnost njihovog formiranja i pri koncentracijama nižim od psp [41]. Nelinearnost u oblasti interakcije se menja u zavisnosti od koncentracije HPMC. Pri koncentracijama polimera nižim od kritične *overlap* koncentracije-  $c^*$  prelom u psp je više izražen, dok je pri koncentracijama iznad  $c^*$  izraženiji prelom u cac. Kritične *overlap* koncentracije, izračunate kao recipročne vrednosti unutrašnjih viskoziteta uzoraka HPMC određenih na 30°C [51], date su u **tabeli P 1.**, u prilogu.

Kada je koncentracija HPMC u rastvoru ispod  $c^*$ , interakcija se odvija na molekularnom nivou, odnosno nema međumolekulskog povezivanja susednih lanaca polimera micelama SDS. Dostizanjem cac započinje vezivanje pojedinačnih molekula SDS za hidrofobne aktivne centre na molekulima HPMC, pri čemu se formiraju strukture slične micelama oko centara svakog, pojedinačnog molekula polimera [101, 102]. Molekuli SDS, koji se nalaze vezani hidrofobnim vezama za polimerne lance, su u ravnoteži sa molekulima prisutnim u rastvoru. Pokretljivost jona SDS je u početku nezatno smanjena, a samim tim i specifična provodljivost. Povećanjem koncentracije SDS dolazi do formiranja micelarnih struktura sa većim agregacionim brojem, intramolekulskog povezivanja lanaca polimera i mobilnost jona u rastvoru značajno opada. Iz ovih razloga je prelomna tačka u psp više izražena.

Pri koncentracijama polimera u rastvoru većim od  $c^*$ , nakon postizanja cac dolazi do formiranja micelarnih agregata oko dva ili više supstituenta susednih lanaca HPMC. Ovakvo povezivanje ima za posledicu formiranje umrežene strukture nastalog kompleksa HPMC/SDS, usled čega je pokretljivost jona SDS, a samim tim i provodljivost rastvora, značajno smanjena, pa je prelom u cac jače izražen. Porastom SDS koncentracije dolazi do formiranja micela oko svakog, pojedinačnog aktivnog centra na molekulima HPMC, naelektrisanane polarne grupe SDS molekula se odbijaju, što ima za posledicu postepeno razrušavanje mrežaste strukture. Pokretljivost jona u ovim uslovima nije značajno smanjena, pa je tako i prelomna tačka u psp manje izražena.

Na krivama konduktometrijskih titracija (**slika 21.**) svih ispitivanih HPMC uzoraka različitih koncentracija, sa SDS-om, mogu se uočiti dve prelomne tačke, cac i psp, koje definišu oblast njihove interakcije. Zavisnost cac i psp od koncentracije polimera prikazana je na **slici 22.**



**Slika 22.** Zavisnost karakterističnih tačaka, cac i psp, određenih konduktometrijskim titracijama, od koncentracije HPMC.

Sa dijagrama prikazanog na **slici 22.** može se uočiti da porast koncentracije polimera, kod svih ispitivanih uzoraka HPMC, praktično ne utiče na cac, koja je uvek niža od cmc. Istovremeno, psp linearno raste sa povećanjem koncentracije polimera. Ovakvo ponašanje je karakteristično za većinu nejonski polimer–jonska PAM sistema [43, 48]. Vrednosti cac i parametri linearne zavisnosti psp od koncentracije HPMC, za ispitivane uzorke HPMC, dati su u **tabeli 5.**

**Tabela 5.** Vrednosti cac i parametri linearne zavisnosti psp od koncentracije HPMC.

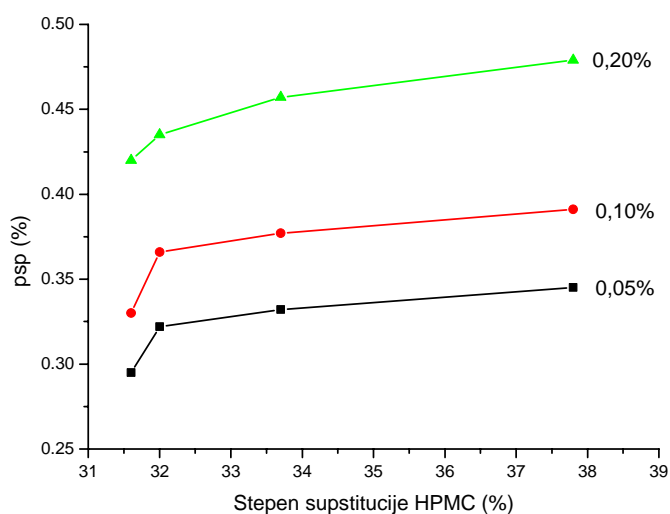
Uzorak	cac (%)	Parametri $psp=A+B c_{HPMC}$		
		A	B	$r^2$
HPMC5	0,114	0,301	0,892	0,9994
HPMC3	0,114	0,293	0,815	0,9990
HPMC1	0,141	0,255	0,792	0,9996
HPMC4	0,145	0,295	0,675	0,9973

Cac predstavlja koncentraciju pri kojoj započinje interakcija i ona ima vrednost karakterističnu za svaki uzorak HPMC, odnosno zavisi od osobina molekula

polimera. Razlike u vrednosti cac različitih uzoraka HPMC mogu se objasniti njihovim različitim fizičko-hemijskim karakteristikama, odnosno stepenom supstitucije- DS, i udelom pojedinih supstituenata, koji su dati u **tabeli 1.** u eksperimentalnom delu. Uočava se da uzorak HPMC5, sa najvećim DS (37,8), ima i najnižu vrednost cac– 0,114%, što se može objasniti prisustvom najvećeg broja aktivnih centara u molekulu dostupnim za vezivanje SDS. Ovaj uzorak ima i najveći udeo metoksi supstituenata (28,8%), koji utiče na povećanu hidrofobnost molekula, tako da vezivanje SDS započinje pri nižim koncentracijama. Smanjenje DS HPMC, kao i udela hidrofobnih metoksi supstituenata, dovodi do povećanja cac. Uzorak HPMC1, koji ima približno isti stepen supstitucije kao HPMC4, ali veći udeo metoksi grupa (22,7%), ima i nešto nižu vrednost cac (0,141%). Rezultati ovih ispitivanja ukazuju da na vrednost cac, pored stepena supstitucije polimera, utiče i vrsta supstituenata, odnosno njihov hidrofobni karakter [101].

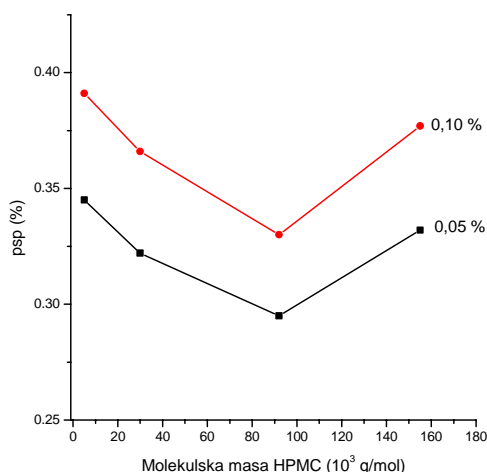
Na osnovu parametara linearne zavisnosti psp od koncentracije HPMC, datih u **tabeli 5.**, moguće je izračunati vrednost psp, izraženu u % SDS, za bilo koju koncentraciju HPMC. Takođe, moguće je izračunati i koncentraciju SDS potrebnu za postizanje željenih uslova interakcije, koja obuhvata interval između cac i psp. Parametar B, određen iz nagiba krive, predstavlja grame SDS vezane po gramu uzorka HPMC [99], odnosno kapacitet polimera da veže određenu količinu PAM.

Zavisnost psp od stepena supstitucije HPMC, za tri različite koncentracije polimera, prikazana je na **slici 23.** Uočava se nelinearan porast psp sa porastom DS, tako da uzorak najvećeg stepena supstitucije (37,8%) ima najvišu vrednost psp, odnosno najširi interval interakcije. Ovakvo ponašanje je više izraženo pri većim koncentracijama polimera u rastvoru.



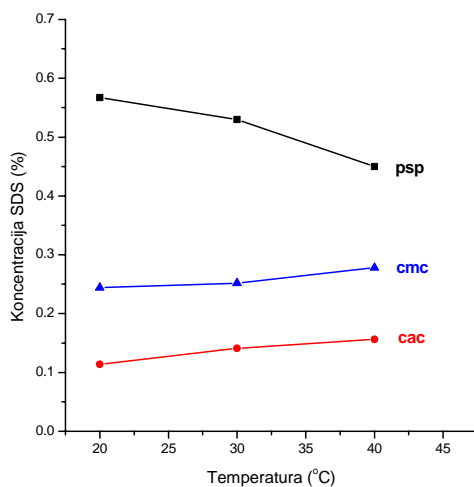
**Slika 23.** Promene psp sa stepenom supstitucije uzoraka HPMC pri različitim koncentracijama polimera.

Zavisnost psp od molekulske mase HPMC (**tabela 1.**) prikazana je na **slici 24.** Može se uočiti da ne postoji veza između psp i molekulske mase polimera. Naime, uzorci HPMC4 i HPMC3, koji imaju slične vrednosti DS a veoma različite molekulske mase (30.000 i 155.000 g/mol) imaju i približno iste vrednosti psp, što potvrđuje predominantan uticaj stepena supstitucije polimera na interakciju.



**Slika 24.** Promena psp u zavisnosti od molekulske mase HPMC.

Uticaj temperature na HPMC–SDS interakciju ispitan je konduktometrijskim titracijama 0,35% rastvora HPMC1 rastvorom SDS, koje su rađene na različitim temperaturama (20, 30 i 40°C). Na osnovu konduktometrijskih krivih određene su karakteristične koncentracije SDS, odnosno intervali interakcije, a njihova zavisnost od temperature prikazana je na **slici 25.** Na istom dijagramu, radi upoređenja, prikazana je i promena cmc SDS sa temperaturom.



**Slika 25.** Promena cmc SDS, psp i cac 0,35% rastvora HPMC1 sa temperaturom.

Uočava se da su vrednosti  $cac$  na svim ispitanim temperaturama ispod  $cmc$  SDS, što ukazuje na grupisanje molekula SDS u blizini lanaca HPMC, odnosno na početak njihovog hidrofobnog povezivanja. Porast temperature dovodi do skoro linearnog porasta  $cac$ , i to istim nagibom kao kod promene kritične micelarne koncentracije SDS. Ovo ukazuje da je mehanizam vezivanja molekula SDS za aktivne centre lanca polimera, identičan mehanizmu formiranja micela SDS, odnosno da se on vezuje u obliku agregata sličnih micelama. Istovremeno, povećanje temperature dovodi do snižavanja  $psp$ , što za rezultat ima sužavanje intervala HPMC–SDS interakcije. Objašnjenje ove pojave treba tražiti u činjenici da se, povećanjem temperature, rastvoljivost HPMC u vodi smanjuje [68], tako da njegovi molekuli postaju sve više sklupčani, a hidrofobni, aktivni centri manje dostupni molekulima SDS. Iz ovih razloga, povećanjem temperature sistema, dolazi do suženja oblasti HPMC–SDS interakcije.

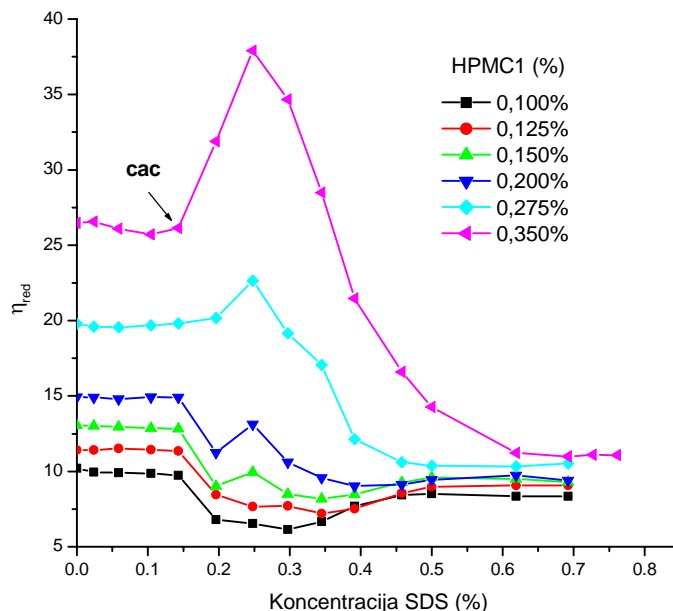
#### 4.2.2. Viskozimetrijska ispitivanja

Sa ciljem utvrđivanja konformacionih promena u sistemu HPMC–SDS i objašnjenja mehanizma njihove interakcije, primenjena su viskozimetrijska merenja razblaženih rastvora HPMC sa različitim koncentracijama SDS. Određivani su redukovani viskoziteti serije rastvora različitih koncentracija uzoraka HPMC1 sa povećanjem koncentracije SDS. Koncentracija polimera je održavana konstantnom, pri svakom pojedinačnom merenju viskoziteta rastvora, dok je koncentracija SDS varirana, čime su obezbeđeni isti uslovi interakcije kao kod konduktometrijskih merenja. Rezultati viskozimetrijskih ispitivanja interakcije HPMC1–SDS, na 30°C prikazani su na **slici 26**.

Sa dijagrama se jasno uočava da kod svih ispitivanih koncentracija rastvora HPMC1, povećanje koncentracije SDS do 0,141%, ne utiče na promenu redukovanog viskoziteta-  $\eta_{red}$ , odnosno ne dolazi do njihove interakcije. Vrednost  $cac$  određena viskozimetrijski (0,141% SDS) u saglasnosti je sa  $cac$  određenom primenom konduktometrijske metode. Nakon postizanja  $cac$ , redukovani viskozitet je vrlo osetljiv na dalje povećanje koncentracije SDS, a njegove promene zavise od kritične *overlap* koncentracije polimera,  $c^*$ , koja za uzorak HPMC1, na 30°C iznosi 0,152%.

Pri koncentracijama HPMC ispod  $c^*$ , povećanje koncentracije SDS, nakon postizanja  $cac$ , izaziva smanjenje  $\eta_{red}$ , do postizanja minimuma u oblasti kritične micelarne koncentracije SDS. Pri koncentracijama iznad  $c^*$ , u blizini  $cmc$  SDS, javlja se maksimum  $\eta_{red}$ , koji je više izražen kod rastvora viših koncentracija HPMC. Pri koncentracijama SDS od 0,60% i više,  $\eta_{red}$  ima konstantnu vrednost, kod svih ispitivanih koncentracija HPMC, koja je niža nego pre postizanja  $cac$ . Ove promene

redukovanog viskoziteta uslovljene su promenama konformacije molekula HPMC, izazvanim različitim mehanizmima vezivanja molekula SDS [53].



**Slika 26.** Zavisnost redukovanog viskoziteta,  $\eta_{red}$ , rastvora HPMC1 od koncentracije SDS na 30°C, za različite koncentracije polimera.

Pri koncentracijama HPMC ispod  $c^*$  mehanizam interakcije je, po prirodi intamolekulski. Postizanjem  $cac$  započinje vezivanje molekula SDS, u obliku agregata malih micela, za aktivne centre na molekulu HPMC. Pošto je koncentracija ispod  $c^*$ , lanci polimera su na dovoljnoj udaljenosti, tako da ne dolazi do njihovog međusobnog povezivanja. Međutim, micelle SDS mogu da povežu dva, ili više aktivna centra istog molekula HPMC, što dovodi do sklupčavanja molekula polimera, a samim tim i do opadanja redukovanog viskoziteta. Nakon postizanja minimuma, povećavanje koncentracije SDS dovodi do promene u raspoređivanju molekula SDS oko aktivnih centara HPMC, obrazuju se micelle većeg agregacionog broja, koje se postepeno formiraju oko svakog, pojedinačnog aktivnog centra. Intramolekulska struktura se lagano gubi, što dovodi do ekspanzije molekula polimera i porasta  $\eta_{red}$ . Postizanjem kritične koncentracije zasićenja,  $psp$ , svi hidrofobni supstituenti molekula HPMC su pojedinačno soljubilizovani micelama SDS uobičajene veličine,  $\eta_{red}$  ne zavisi od daljeg povećanja koncentracije SDS, pa dolazi do formiranja slobodnih micela SDS u rastvoru.

Pri koncentracijama HPMC višim od  $c^*$  interakcija je po svojoj prirodi intermolekulska. Nakon dostizanja  $cac$ , dolazi do formiranja micela SDS oko aktivnih centara dva, ili više, molekula HPMC i obrazovanja trodimenzionalne mrežaste

strukture, što se ogleda u povećanju redukovano viskoziteta rastvora. Daljim povećanjem koncentracije SDS, nakon postizanja maksimuma  $\eta_{red}$ , hidrofobni centri bliskih lanaca polimera bivaju sve više pojedinačno soljubilizovani, pri čemu se trodimenzionalna struktura polako gubi. Redukovani viskozitet opada, do postizanja konstantne vrednosti, kada su molekuli HPMC potpuno zasićeni molekulima SDS. Vrednost  $\eta_{red}$ , nakon zasićenja polimera, ne zavisi od daljeg povećanja koncentracije SDS, niti značajno od koncentracije HPMC.

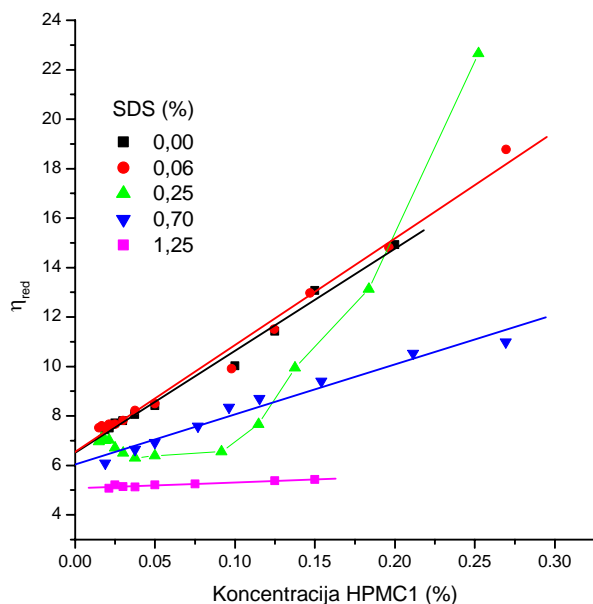
Na **slici 26.** se može uočiti da povećanje koncentracije HPMC utiče na povećanje širine oblasti povećanog redukovano viskoziteta rastvora, odnosno na proširenje intervala interakcije. Ova pojava se može objasniti činjenicom da, veća koncentracija molekula HPMC dovodi do uspostavljanja većeg broja intermolekulskih veza, tako da su potrebne više koncentracije SDS za njihovu soljubilizaciju, odnosno za razbijanje mrežaste strukture. Takođe, uočava se da je pad redukovano viskoziteta u sistemu nakon završene interakcije, u odnosu na njegovu vrednost pre interakcije, jače izražen kod rastvora kod kojih je HPMC koncentracija iznad  $c^*$ . Objasnjenje ove pojave može se tražiti u činjenici da se lanci molekula HPMC u rastvorima čija je koncentracija iznad  $c^*$ , nalaze na veoma maloj udaljenosti tako da dolazi do hidrofobnog privlačenja njihovih supstituenata i obrazovanja unutrašnje strukture, što ima za posledicu veće vrednosti  $\eta_{red}$ . Nakon završene interakcije, usled elektrostatičkog odbijanja, gubi se međumolekulsko delstvo lanaca polimera i  $\eta_{red}$  ima značajno manje vrednosti. U rastvorima kod kojih je koncentracija HPMC manja od  $c^*$ , pre početka interakcije nema međudejstva između lanaca HPMC, tako da nakon završene interakcije pad redukovano viskoziteta manje izražen.

S obzirom na činjenicu da HPMC–SDS interakcija dovodi do konformacionih promena u molekulu polimera, bilo je potrebno ispitati promene unutrašnjeg viskoziteta rastvora HPMC na karakterističnim koncentracijama SDS. Promena  $\eta_{red}$  rastvora HPMC1 različitim koncentracijama bez SDS i pri karakterističnim koncentracijama SDS, prikazana je na **slici 27.**

Pri koncentraciji SDS 0,06%, uočava se linearna zavisnost  $\eta_{red}$  od koncentracije HPMC, koja se poklapa sa vrednostima dobijenim za HPMC bez SDS i unutrašnji viskozitet ima istu vrednost ( $[\eta]=6,57$  100g/g), što potvrđuje činjenicu da ispod  $cac$  nema interakcije.

Kada je SDS koncentracija u rastvoru HPMC 0,25%, odnosno kada promene dostižu svoj maksimum, uočava se nelinearna zavisnost  $\eta_{red}$  od koncentracije HPMC. Ova nelinearnost ukazuje da se HPMC/SDS kompleks ponaša kao polielektrolit [48, 103]. U početku, smanjenjem koncentracije HPMC, dolazi do opadanja  $\eta_{red}$ , kao posledica raskidanja međumolekulskih veza i razrušavanja trodimenzionalne mrežaste strukture. Dalje smanjenje koncentracije dovodi do porasta redukovano viskoziteta, izazvanog elektrostatičkim odbijanjem istoimeno naelektrisanih, polarnih grupa SDS

vezanih za aktivne centre molekula HPMC i razmotavanja molekula, što je karakteristično za sve polielektrolite pri velikom razblaženju [104].



**Slika 27.** Zavisnost redukovanog viskoziteta rastvora HPMC1–SDS od koncentracije HPMC1 na različitim SDS koncentracijama i 30°C.

Pri koncentraciji SDS 0,70%, odnosno nakon završene interakcije, ponovo se uspostavlja linearna zavisnost  $\eta_{red}$  od koncentracije HPMC. Unutrašnji viskozitet nastalog HPMC/SDS kompleksa, ima manju vrednost nego pre interakcije ( $[\eta]=6,04$  100g/g), što ukazuje na veću zbijenost molekula HPMC. Naime, nakon završene interakcije, HPMC/SDS kompleks je potpuno soljubilizovan micelama SDS, a elektrostatičko odbijanje između kompleksa i slobodnih micela SDS, prisutnih u rastvoru, dovodi do njegovog sklupčavanja. Istovremeno, povećanje koncentracije slobodnih jona natrijuma, maskira negativno naelektrisanje kompleksa, pa se gubi efekat polielektrolita. Linearna zavisnost  $\eta_{red}$  od koncentracije HPMC ukazuje da su intramolekulske veze još uvek prisutne.

Daljim povećanjem koncentracije SDS, HPMC/SDS kompleks postaje sve više sklupčan, tako da pri dovoljno velikoj SDS koncentraciji, redukovani viskozitet postaje konstantan, odnosno ne zavisi od koncentracije HPMC. Pri koncentraciji SDS od 1,25% redukovani viskozitet i unutrašnji viskozitet imaju iste vrednosti ( $[\eta]=5,04$  100g/g).

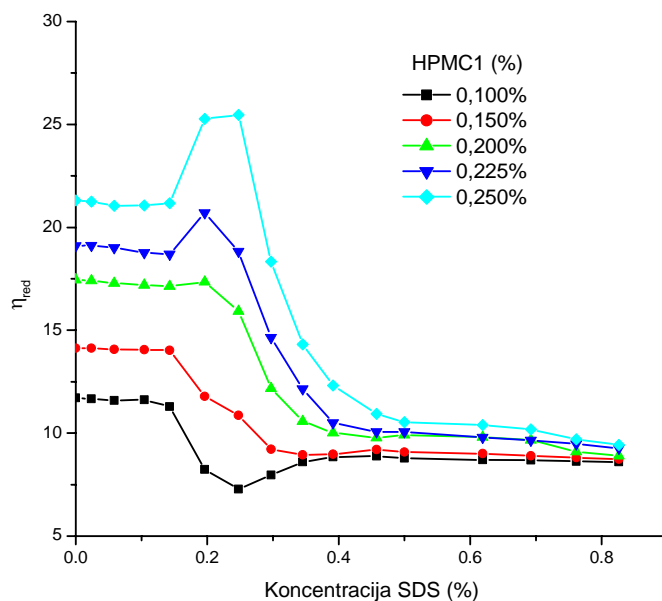
Promene u konformaciji lanaca polimera, nakon završene interakcije mogu da se izraze su preko molekularnog ekspanzionog faktora  $\alpha$ , izračunatog kao količnik unutrašnjeg viskoziteta HPMC u prisustvu SDS ( $[\eta]_{SDS}$ ) i unutrašnjeg viskoziteta



HPMC bez prisustva molekula SDS ( $[\eta]$ ). U rastvorima HPMC sa koncentracijom SDS 0,70 i 1,25%,  $\alpha$  ima vrednost 0,913, odnosno 0,773, što potvrđuje da su molekuli HPMC/SDS kompleksa, nakon završene interakcije, sklupčani [102].

Viskozimetrijska ispitivanja doprinela su boljem razumevanju mehanizma HPMC–SDS interakcije i konformacionih promena u molekulu HPMC izazvanih interakcijom, i potvrdila da interakcija ne započinje ispod cac, koja, za uzorak HPMC1 na 30°C iznosi 0,141% SDS. Međutim, primenom ove metode ne može se sa sigurnošću odrediti koncentracija na kojoj se interakcija završava, psp.

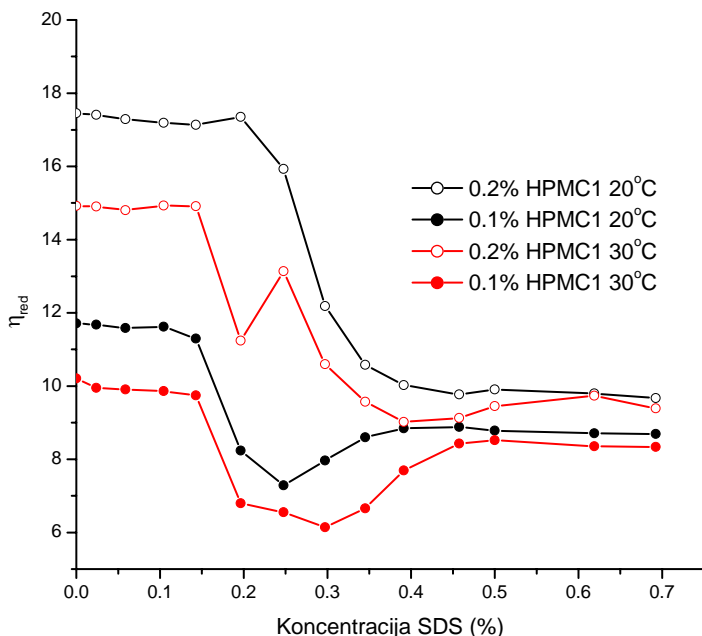
Ispitivanja HPMC–SDS interakcije na 20°C pokazala su slične promene redukovanog viskoziteta rastvora HPMC1 od koncentracije SDS, u zavisnosti od koncentracije polimera (**slika 28.**). Pri koncentracijama HPMC ispod  $c^*$  dolazi do smanjenja  $\eta_{red}$  do minimalne vrednosti (oko cmc SDS), dok je za koncentracije HPMC iznad  $c^*$  karakterističan porast  $\eta_{red}$  sa maksimumom pri cmc, što ukazuje na činjenicu da se konformacione promene u sistemu dešavaju istim mehanizmima kao na 30°C.



**Slika 28.** Zavisnost redukovanog viskoziteta,  $\eta_{red}$ , rastvora HPMC1–SDS od koncentracije SDS na 20°C, za različite koncentracije polimera.

Krive zavisnosti redukovanog viskoziteta rastvora HPMC1, određenog na 20 i 30°C, od koncentracije SDS, za koncentracije polimera 0,10 i 0,20%, prikazane su na **slici 29.** Može se uočiti da je tok krivih pri koncentracijama HPMC 0,10 %, koja je ispod  $c^*$  za obe radne temperature, veoma sličan. Međutim, ako posmatramo tok krivih pri koncentraciji HPMC 0,20%, mogu se uočiti izvesne razlike: kriva dobijena

na 30°C ima minimum u oblasti interakcije, dok se kod krive dobijene na 20°C javlja blago izražen porast  $\eta_{red}$ .



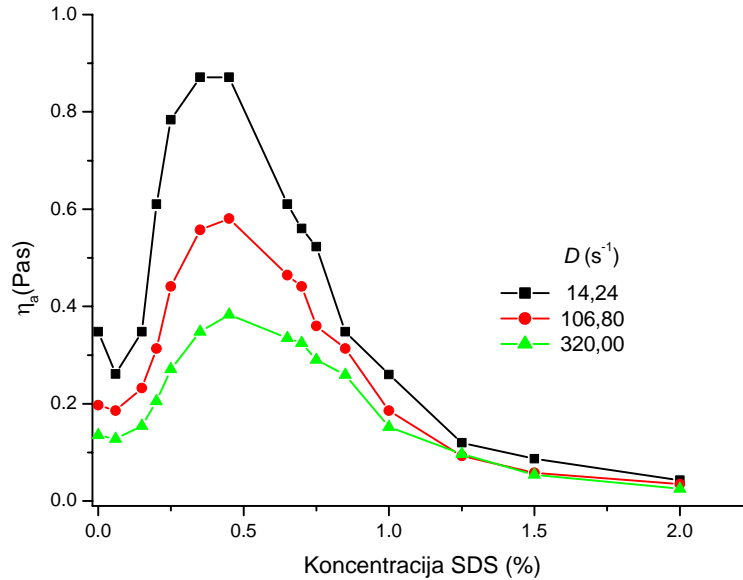
**Slika 29.** Zavisnost redukovanog viskoziteta,  $\eta_{red}$ , rastvora HPMC1–SDS od koncentracije SDS na 20 i 30°C, za koncentracije polimera 0,10 i 0,20%.

Ove razlike mogu se objasniti razlikama u  $c^*$  HPMC1 na primenjenim temperaturama. S obzirom da  $c^*$  na 20°C (0,127 %) ima nižu vrednost od  $c^*$  na 30°C (0,152%), može se pretpostaviti da je intermolekulsko povezivanje molekula HPMC sa molekulima SDS, pri njegovoj koncentraciji 0,20%, na nižoj temperaturi izraženije, a nastali HPMC/SDS kompleks više umrežen, pa je iz tih razloga prisutan porast  $\eta_{red}$ , sa blago izraženim maksimumom.

### 4.2.3. Reološka ispitivanja

Uzimajući u obzir činjenicu da mehanizmi HPMC–SDS interakcije u razblaženim rastvorima značajno utiču na konformacione promene molekula HPMC, može se očekivati da će nastali kompleksi HPMC/SDS uticati i na promene reoloških osobina rastvora većih koncentracija polimera. Uticaj interakcije na reološko ponašanje sistema ispitan je primenom rotacionog viskozimetra, a merenja su rađena sa serijom rastvora uzorka HPMC1, čija je koncentracija 1,00%, pri različitim

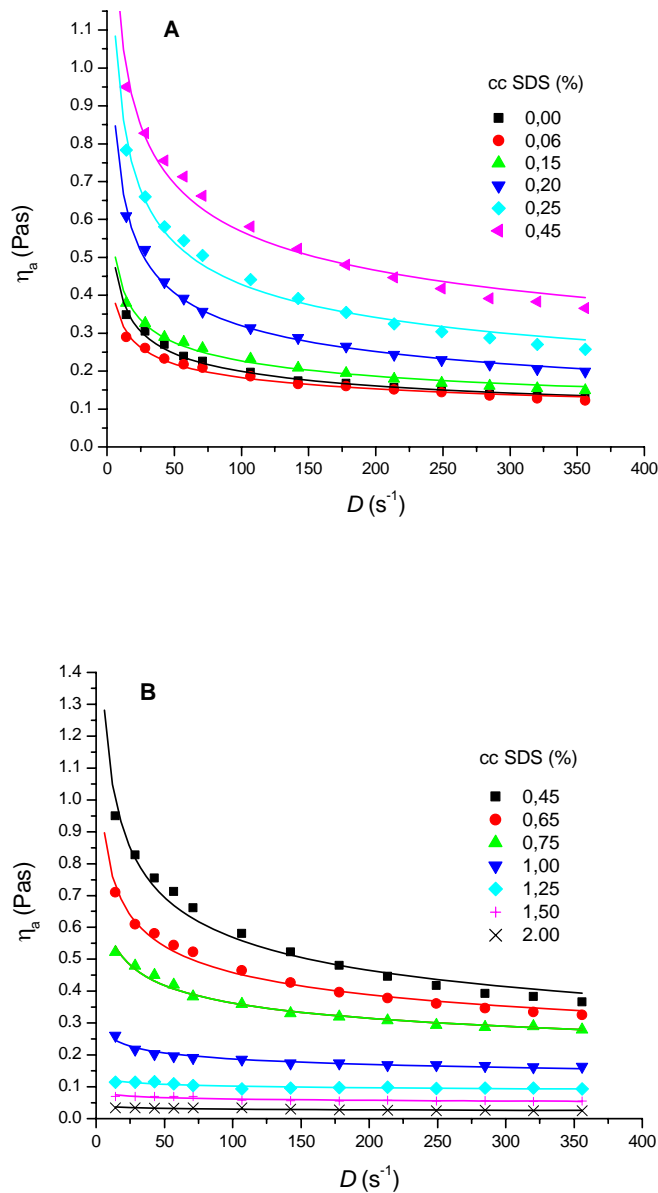
koncentracijama SDS. Promene prividnog viskoziteta-  $\eta_a$  sa koncentracijom SDS, dobijene pri različitim brzinama smicanja, prikazane su na **slici 30**.



**Slika 30.** Promene prividnog viskoziteta,  $\eta_a$ , 1,00% rasvora HPMC1 sai različitim koncentracijama SDS, pri različitim brzinama smicanja na 30°C.

Sa dijagrama se može se uočiti da prividni viskozitet rastvora raste sa povećanjem koncentracije SDS, počevši od 0,15%, pri svim primenjenim brzinama smicanja. Ova koncentracija predstavlja kritičnu agregacionu koncentraciju-  $c_{ac}$  i veoma je bliska vrednostima  $c_{ac}$  određenim primenom konduktometrijske i viskozimetrijske metode. Vrednost prividnog viskoziteta dostiže maksimum pri koncentraciji SDS 0,45%, nakon čega, daljim povećanjem koncentracije do 1,25%, postepeno opada. Pri koncentracijama SDS većim od 1,25%  $\eta_a$  dostiže konstantnu vrednost. Oblast koncentracija SDS od 0,15 do 1,25% predstavlja oblast HPMC–SDS interakcije kada je koncentracija polimera u sistemu 1,00%. U ovoj oblasti  $\eta_a$  veoma zavisi od primenjene brzine smicanja, što ukazuje da je unutrašnja struktura sistema HPMC–SDS osetljiva na dejstvo sile smicanja. Najveće promene uočene su pri najmanjim brzinama smicanja, pošto se najmanje razrušava struktura sistema.

Krive proticanja serije rastvora HPMC1 pokazuju nenjutnovsko pseudoplastično proticanje (**slika P1**, u prilogu). Promene  $\eta_a$  sa brzinom smicanja ispitivanih rastvora HPMC1, sa različitom koncentracijom SDS, prikazane su na **slici 31**, na kojoj tačke predstavljaju vrednosti dobijene na osnovu eksperimentalnih merenja, a linije vrednosti dobijene fitovanjem eksperimentalnih podataka jednačinom Ostwald-Reiner-a (8).



**Slika 31.** Krive proticanja 1,00% rastvora HPMC1 sa različitim koncentracijama SDS: **A:** 0,00 – 0,45%; **B:** 0,45 – 2,00%.

Uočava se da sa povećanjem koncentracije SDS do 0,45% pseudoplastične osobine sistema postaju sve više izražene (**Slika 32. A**). Naime, povećanjem brzine smicanja dolazi do orijentacije i deformacije formiranog HPMC/SDS kompleksa, što dovodi opadanja prividnog viskoziteta [52, 70, 105]. Daljim povećanjem koncentracije SDS sistem polako gubi pseudoplastične osobine, da bi pri koncentracijama 1,25% SDS i većim, pokazivao njutnovsko ponašanje pri kome viskozitet ne zavisi od brzine smicanja i ima niže vrednosti od rastvora HPMC bez prisustva SDS.

Krive zavisnosti prividnog viskoziteta-  $\eta_a$  od brzine smicanja-  $D$  fitovane su jednačinom (8), a parametri  $A$  i  $n$  kao i koeficijenti korelacije  $r$ , dati su u **tabeli 6**.

**Tabela 6.** Parametri fitovanja krivih proticanja rastvora 1,00% HPMC1 pri različitim koncentracijama SDS, jednačinom Ostwald-Reiner-a (8).

SDS (%)	$A$	$n$	$r$
0,00	0,900	0,6715	0,9985
0,06	0,794	0,6856	0,9974
0,15	1,043	0,6709	0,9980
0,20	1,717	0,6342	0,9985
0,25	2,704	0,6032	0,9973
0,35	3,527	0,6000	0,9933
0,45	2,818	0,6540	0,9971
0,65	1,659	0,7230	0,9974
0,75	0,899	0,8004	0,9996
0,85	0,653	0,8390	0,9988
1,00	0,294	0,8987	0,9994
1,25	0,116	0,9651	0,9968
1,50	0,096	0,9030	0,9966
2,00	0,050	0,9920	0,9957

Može se uočiti da reološki parametri  $A$  i  $n$ , pokazuju dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima. Parametar  $A$ , koji je merilo konzistencije sistema, raste sa porastom koncentracije SDS do postizanja maksimalne vrednosti, dok parametar  $n$  istovremeno opada, što ukazuje na izraženo nenjutnovsko pseudoplastično ponašanje. Nakon toga dolazi do opadanja viskoziteta i stepena nenjutnovskog ponašanja sistema do koncentracije 1,25% SDS. Pri ovoj i većim koncentracijama SDS, krive proticanja pokazuju njutnovski tip proticanja, čiji viskozitet ima konstantnu vrednost, približnu konstanti  $A$ , dok konstanta  $n$  ima vrednosti bliske 1. Međutim, čak i nakon postizanja njutnovskog proticanja, viskozitet sistema i dalje opada sa povećanjem koncentracije SDS, iako je interakcija HPMC–SDS praktično završena. Ovo se može objasniti konformacionim promenama kompleksa HPMC/SDS nastalim nakon potpune soljubilizacije micelama SDS, koji postaje sve više zbijen.

Reološka ispitivanja su pokazala da promena tipa proticanja rastvora iz pseudoplastičnog u njutnovsko ukazuje na završetak HPMC–SDS interakcije.

### 4.3. Uticaj HPMC–SDS interakcije na osobine emulzija u/v

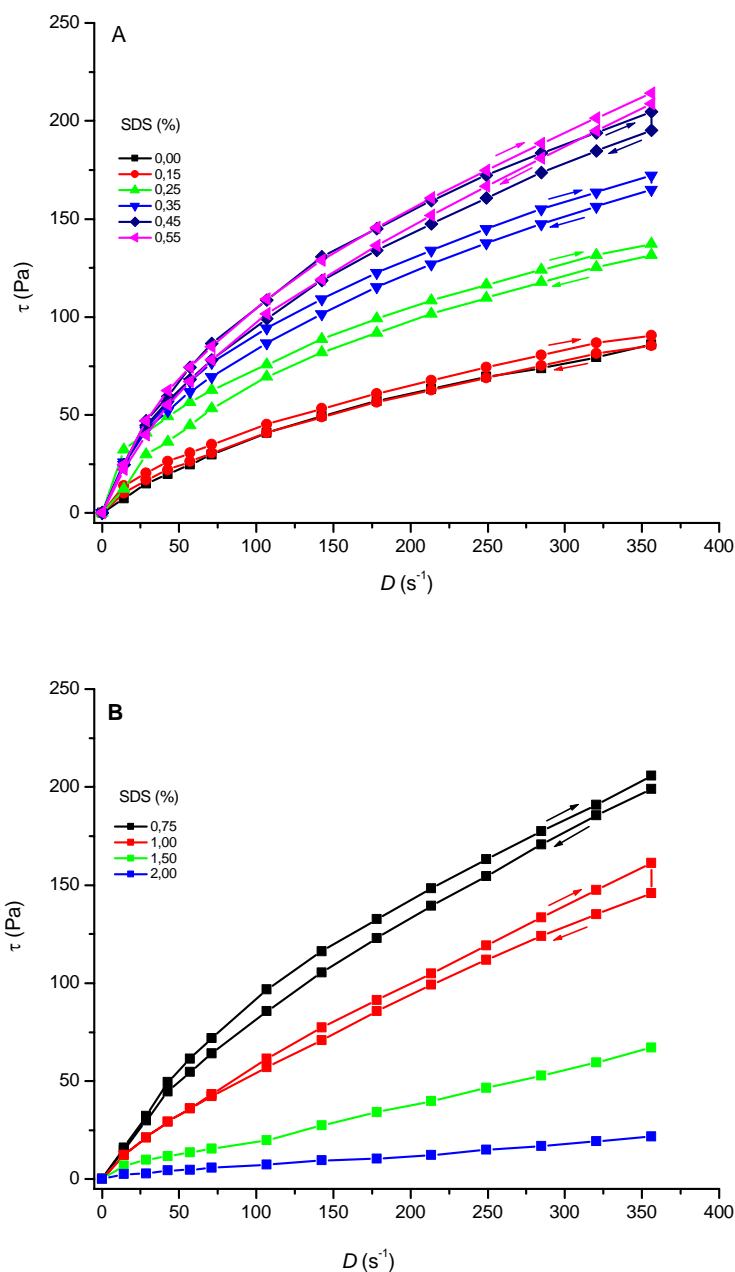
Jedna od primena hidroksipropilmetil celuloze zasnovana je na njenoj osobini da se adsorbuje na granici tečno/tečno, smanji međupovršinski napon i time stabilizuje emulzioni sistem u/v. Obrazovanje stabilnih adsorpcionih slojeva odvija se u dve faze, od kojih prva podrazumeva difuziju molekula HPMC iz rastvora na granicu faza tečno/tečno, a druga njihovu adsorpciju prema *train-loop-tail* modelu. Naime, lipofilni delovi molekula se vezuju za međufaznu površinu u vidu “vagona”, međusobno odvojenih hidrofilnim delovima lanaca u vidu “petlji” i “repora”, koji se nalaze u spoljašnjoj, vodenoj fazi emulzije [59, 64]. Ovakva morfologija adsorpcionog sloja ima dodatni doprinos u stabilizaciji emulzionih sistema sternim efektom, a njegove karakteristike utiču na osobine emulzionog sistema, naročito na sprečavanje koalescencije kapi.

Kada se za stabilizaciju emulzija koristi smeša nejonski polimer–jonska PAM, između kojih dolazi do hidrofobne interakcije, mogu se očekivati promene na granici faza, slične onima koje nastaju u njihovim vodenim rastvorima, koje utiču na stabilnost sistema [54]. Molekuli polimera i PAM mogu da istiskuju jedan drugog iz adsorpcionog sloja ili da pospešuju međusobnu adsorpciju. Takođe, moguće je da se na granici faza adsorbuje kompleks polimer/PAM, nastao u kontinualnoj fazi kao posledica njihove interakcije. Iz ovih razloga, potrebno je ispitati uticaj HPMC–SDS interakcije u kontinualnoj fazi na osobine 20% emulzija suncokretovog ulja, odnosno na strukturu i stabilnost adsorpcionih slojeva. Na osnovu detaljnih ispitivanja uticaja HPMC–SDS interakcije na reološke osobine 1,00% rastvora HPMC1 pri različitim koncentracijama SDS, odabrane su kontinualne faze 20% emulzija. Koncentracija HPMC1 u svim kontinualnim fazama bila je 1,00%. dok su koncentracije SDS odabrane tako da pokrivaju region pre (0,00-0,15%), u toku (0,15-1,00%) i nakon završene interakcije (>1,00%).

#### 4.3.1. Reološke osobine emulzija

Krive proticanja 20% emulzija suncokretovog ulja u 1,00% rastvoru HPMC1, sa različitim sadržajem SDS u kontinualnoj fazi, prikazane su na **slici 32**.

Može se uočiti da emulzije pripremljene pre početka HPMC–SDS interakcije, pri koncentraciji SDS <0,15% i nakon njenog završetka, pri koncentraciji SDS >1,00%, pokazuju pseudoplastično proticanje. Emulzije kod kojih je koncentracija SDS u kontinualnoj fazi u oblasti interakcije (0,15-1,00%), imaju slabo izraženo tiksotropno ponašanje, odnosno povratna kriva proticanja je ispod uzlazne.



**Slika 32.** Krive proticanja 20% emulzija suncokretovog ulja u 1,00% HPMC1 sa različitim koncentracijama SDS: **A:** 0,00 – 0,55%; **B:** 0,75 – 2,00%.

Tiksotropno ponašanje emulzija u oblasti HPMC–SDS interakcije, ukazuje na postojanje unutrašnje strukture, koja se razrušava nakon smicanja pri konstantnoj brzini ( $D=356 s^{-1}$ ) u toku dve minute. Nakon završene interakcije, kada je koncentracija SDS u kontinualnoj fazi veća od 1,00% i molekuli HPMC potpuno soljubilizovani micelama SDS, tiksotropija nestaje. Vrednosti koeficijenta tiksotropije, izračunate prema jednačini (9), date su u **tabeli 7**. Može se uočiti da

najviše izraženo tiksotropno ponašanje, odnosno najveći koeficijent tiksotropije ima emulzija sa 0,45% SDS u kontinualnoj fazi, pri kojoj interakcija HPMC–SDS dostiže svoj maksimum.

Uzlazne krive proticanja pokazuju nenjutnovsko, pseudoplastično proticanje, koje je, sa porastom SDS koncentracije do 0,45%, više izraženo (**slika 32. A**). Dalje povećanje koncentracije SDS, dovodi do manje izražene pseudoplastičnosti (**slika 32. B**). Uzlazne krive proticanja fitovane su jednačinom Ostwald-Reiner-a (7), a parametri  $A$  i  $n$  prikazani u **Tabeli 7.**, u kojoj su dati i izračunati koeficijenti tiksotropije  $K$ .

**Tabela 7.** Parametri fitovanja uzlaznih krivih proticanja 20% emulzija u 1,00% HPMC1, pri različitim koncentracijama SDS, jednačinom Ostwald-Reiner-a [7] i koeficijenti tiksotropije izračunati primenom jednačine [9].

Koncentracija SDS (%)	$A$	$n$	$r$	$K$
0,00	1,021	0,7563	0,9984	-
0,15	2,841	0,5911	0,9988	4,33
0,25	8,203	0,4802	0,9968	6,88
0,35	7,769	0,5298	0,9975	6,40
0,45	7,296	0,5714	0,9965	8,25
0,55	6,900	0,5859	0,9966	6,76
0,75	4,072	0,6689	0,9987	7,19
1,00	1,393	0,8077	0,9992	6,18
1,50	0,343	0,8926	0,9990	-
2,00	0,147	0,8420	0,9967	-

Koeficijent korelacije,  $r$ , ima veće vrednosti od 0,996, što ukazuje na dobro slaganje eksperimentalnih podataka sa stepenim zakonom Ostwald-Reiner-a. U oblasti HPMC–SDS interakcije, pri koncentracijama SDS 0,15-1,00%, uočava se povećanje viskoziteta emulzija, odnosno koeficijenta  $A$ , dok koeficijent  $n$  ima manje vrednosti nego u sistemu bez prisustva SDS, što ukazuje na veći stepen nenjutnovskog ponašanja. Pri koncentracijama od 1,00% SDS i većim, emulzije imaju slabo izraženu pseudoplastičnost, manju nego pre početka interakcije i sve više izraženo njutnovsko ponašanje.

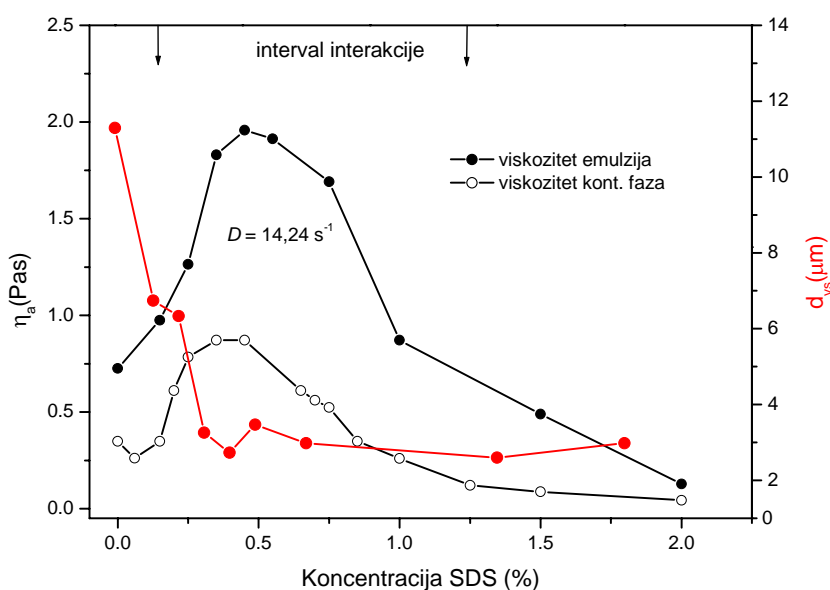
Ovakvo reološko ponašanje emulzija uslovljeno je prisustvom unutrašnje, strukture u kontinualnoj fazi, čije osobine zavise od konformacije formiranog kompleksa HPMC/SDS. S obzirom da je koncentracija HPMC1 u sistemu daleko iznad  $c^*$ , u oblasti interakcije dolazi do povezivanja hidrofobnih aktivnih centara susednih molekula polimera micelama SDS, do formiranja trodimenzionalne umrežene strukture, a samim tim i povećanja viskoziteta. Formirani kompleks HPMC/SDS je osetljiv na dejstvo sile smicanja, odnosno povećanjem brzine smicanja



dolazi do razmotavanja molekula, i postepenog razrušavanja umrežene strukture. Ovo ima za posledicu smanjenje viskoziteta, odnosno sistem pokazuje tiksotropne osobine. Nakon završene interakcije, molekuli HPMC su potpuno soljibilizovani micelama SDS i postaju sve više sklupčani, tako da sistem pokazuje skoro njutnovsko proticanje ( $n \approx 0,9$ ) i veoma male vrednosti viskoziteta, manje nego pre početka HPMC–SDS interakcije.

Sa ciljem ispitivanja uticaja HPMC–SDS interakcije na mikrostrukturne karakteristike emulzija, određeni su prividni viskoziteti emulzija sa različitim koncentracijama SDS, pri maloj brzini smicanja. S obzirom da su promene  $\eta_a$  kontinualnih faza, koje su prikazane na **slici 30.**, bile najizraženije pri  $D = 14,28 \text{ s}^{-1}$ , ova brzina je primenjena i kod ispitivanja 20% emulzija suncokretovog ulja u 1,00% HPMC1 [102]. Poređenja radi, prividni viskoziteti kontinualnih faza, na odgovarajućim SDS koncentracijama, prikazani su na istom dijagramu (**slika 33.**). Karakteristične koncentracije SDS,  $c_{ac}$  i  $c_{psp}$ , koje definišu oblast interakcije u kontinualnoj fazi, označene su na dijagramu.

Može se uočiti značajno povećanje viskoziteta emulzija sa porastom koncentracije SDS, od 0,15-0,45%, odnosno u oblasti HPMC–SDS interakcije.



**Slika 33.** Promena prividnog viskoziteta,  $\eta_a$ , 20% emulzija u 1,00% HPMC1 i odgovarajućih kontinualnih faza, pri maloj brzini smicanja ( $14,24 \text{ s}^{-1}$ ), i srednjeg prečnika kapljica emulzija sa koncentracijom SDS.

Nakon dostizanja maksimuma, daljim povećanjem koncentracije SDS prividni viskoziteti emulzija opadaju, i pri koncentraciji većoj od 1,00% imaju manju vrednost nego kod emulzije pripremljene bez SDS, što ukazuje na postepenu soljubilizaciju hidrofobnih supstinenata na molekulu HPMC micelama SDS,

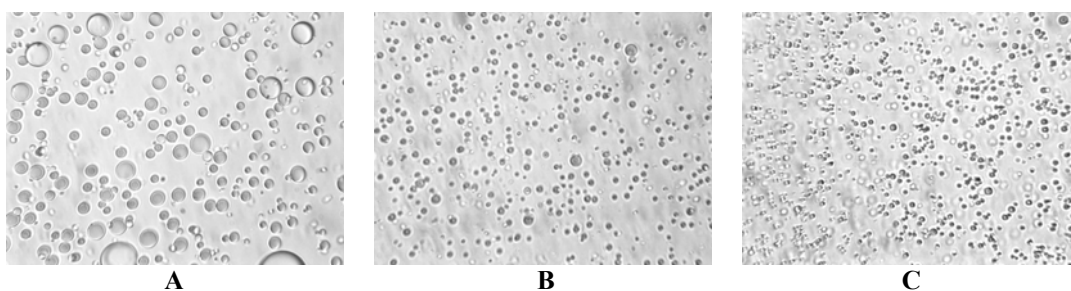
itermolekulska, mrežasta struktura nestaje, čime se interakcija završava, odnosno postignuta je psp.

Promena prividnog viskoziteta kontinualne faze sa koncentracijom SDS ima isti tok, ali su vrednosti  $\eta_a$  značajno niže u celoj oblasti ispitivanja. Ovo ukazuje da, pored kontinualne faze, povećanju viskoziteta emulzija doprinose i dispergovane kapi ulja. Međutim,  $\eta_a$  emulzija u oblasti interakcije ima znatno veće vrednosti, što nije samo posledica uticaja prisustva dispergovanih kapi ulja, već i HPMC–SDS interakcije.

#### 4.3.2. Veličina i raspodela veličina kapi emulzija

Ispitivanje veličine i raspodele veličina kapi emulzija je, svakako, jedna od metoda na osnovu koje se mogu doneti zaključci o stabilnosti emulzija, prisutnoj flokulaciji ili koalescenciji kapi [58, 61-63]. Prethodna ispitivanja su pokazala da je moguće dobiti emulzije u/v zadovoljavajućih osobina upotrebom HPMC kao emulgatora [59, 60]. Iz ovih razloga, sledeća faza ispitivanja u okviru ove disertacije, odnosila se na ispitivanje uticaja HPMC–SDS interakcije u kontinualnoj fazi na disperzione karakteristike emulzija, a samim tim i na njihovu stabilnost.

Posmatranjem 20% emulzija u 1,00% HPMC, pod mikroskopom (**slika 34.**) uočene su razlike u veličini kapi, u zavisnosti od koncentracije SDS u kontinualnoj fazi. Rezultati određivanja veličine i raspodele veličina kapi, obradom mikrofotografija primenom Qwin softvera, prikazani su u **tabeli 8.**



**Slika 34.** Mikrofotografije 20% emulzija u 1,00% HPMC1 sa različitim koncentracijama SDS: **A** – 0,00%; **B** – 0,35%, **C** – 1,50%.

Emulzija koja ne sadrži SDS ima kapi velikog prečnika ( $d_{vs} = 11,291 \mu\text{m}$ ) i izraženu polidisperznost ( $\sigma = 5,896 \mu\text{m}$ ), što je i očekivano s obzirom na činjenicu da HPMC ima manju površinsku aktivnost od niskomolekularnih PAM, koje se uobičajeno koriste za stabilizaciju emulzija [59].

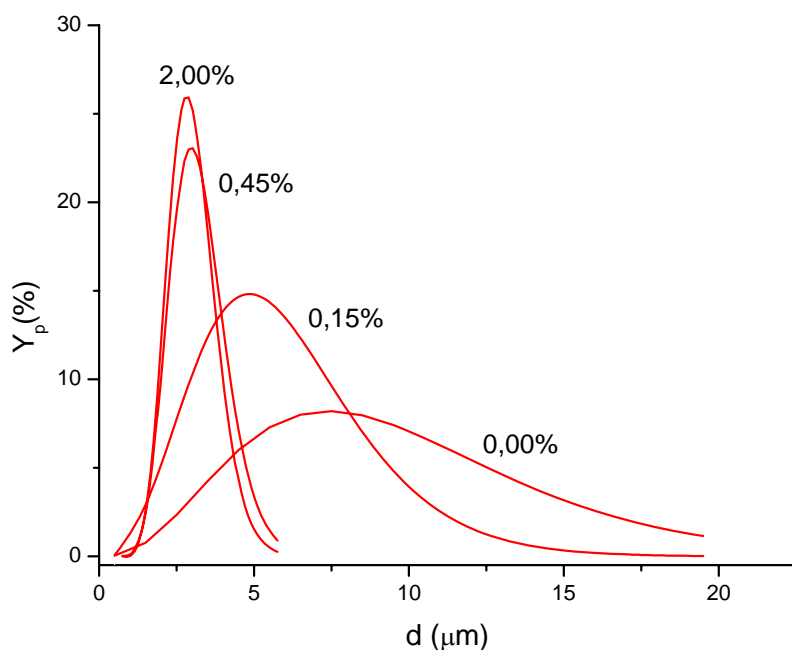
Uvođenje molekula SDS u kontinualnu fazu emulzije, u velikoj meri utiče na proces emulgovanja. Nakon postizanja cac (0,15% SDS), kada započinje intermolekularno povezivanje lanaca HPMC micelama SDS, usled čega raste viskozitet kontinualne faze, dolazi do smanjenja srednjeg prečnika kapi na  $d_{vs} = 6,743 \mu\text{m}$ . Međutim, pored uticaja viskoziteta kontinualne faze, na osnovu ranije sprovedenih ispitivanja može se pretpostaviti da i jače izražena površinska aktivnost kompleksa HPMC/SDS, nastalog kao posledica interakcije, utiče na veličinu kapi emulzija. Tenziometrijskim ispitivanjima polimer–PAM interakcije na granici faza tečno/gas [32, 39, 54] pokazano je da kompleks nejonski polimer/jonska PAM, nastao nakon dostizanja cac, ima jako izražen afinitet prema granici faza. Iz ovih razloga se može pretpostaviti da nastali kompleks HPMC/SDS ima bolja emulgujuća svojstva od samog polimera.

**Tabela 8.** Parametri raspodele veličina kapi 20% emulzija u 1,00% HPMC1 sa različitim koncentracijama SDS:  $d_{vs}$ – srednji prečnik;  $\sigma$ – standardna devijacija;  $\beta_1$  – asimetrija;  $\beta_2$ – spljoštenost;  $S$ – specifična površina;  $X$ – najzastupljeniji prečnik.

SDS (%)	Parametri					
	$d_{vs} (\mu\text{m})$	$\sigma (\mu\text{m})$	$\beta_1$	$\beta_2$	$S (\text{m}^2/\text{cm}^3)$	$X (\mu\text{m})$
0,00	11,291	5,896	0,462	2,446	0,531	7,511
0,15	6,743	2,717	4,113	7,459	0,890	4,815
0,25	6,333	1,130	3,755	6,159	0,947	4,206
0,35	3,255	0,733	0,686	5,412	1,844	3,333
0,45	2,733	0,899	0,027	2,851	2,195	2,977
0,55	3,479	1,008	0,039	2,731	1,725	3,264
0,75	2,983	0,912	0,075	2,843	2,011	2,765
1,00	2,573	0,643	0,044	3,009	2,332	2,451
1,50	2,610	0,704	0,298	3,783	2,299	2,461
2,00	2,986	0,806	0,131	3,267	2,009	2,827

Dalje povećanje koncentracije SDS dovodi do njegovog vezivanja za aktivne centre HPMC, sve dok se lanci polimera potpuno ne povežu,  $d_{vs}$  se smanjuje i dostiže minimalnu vrednost pri koncentraciji SDS od 0,45%. Srednji prečnik kapi od 2,733  $\mu\text{m}$  i uska raspodela veličina ( $\sigma = 0,899 \mu\text{m}$ ), određena u emulziji sa 0,45% SDS, posledica su umrežene strukture HPMC/SDS kompleksa i povećanog viskoziteta kontinualne faze koji doprinosi emulgovanju (**slika 33.**).

Povećanjem koncentracije SDS iznad 0,45% dolazi do razrušavanja mrežaste strukture, međutim, slobodni molekuli SDS doprinose emulgujućim osobinama kontinualne faze. Pri koncentracijama SDS većim od psp ( $\approx 1,00\%$ ), molekuli HPMC su potpuno soljubilizovani micelama SDS i takva struktura kompleksa gubi svoju površinsku aktivnost i desorbuje se sa površine kapi. Može se pretpostaviti da se kod emulzija, koje sadrže više od 1,00% SDS u kontinualnoj fazi, na granici faza adsorbuju samo molekuli SDS, pa se  $d_{vs}$  i polidisperznost emulzija praktično ne menjaju.



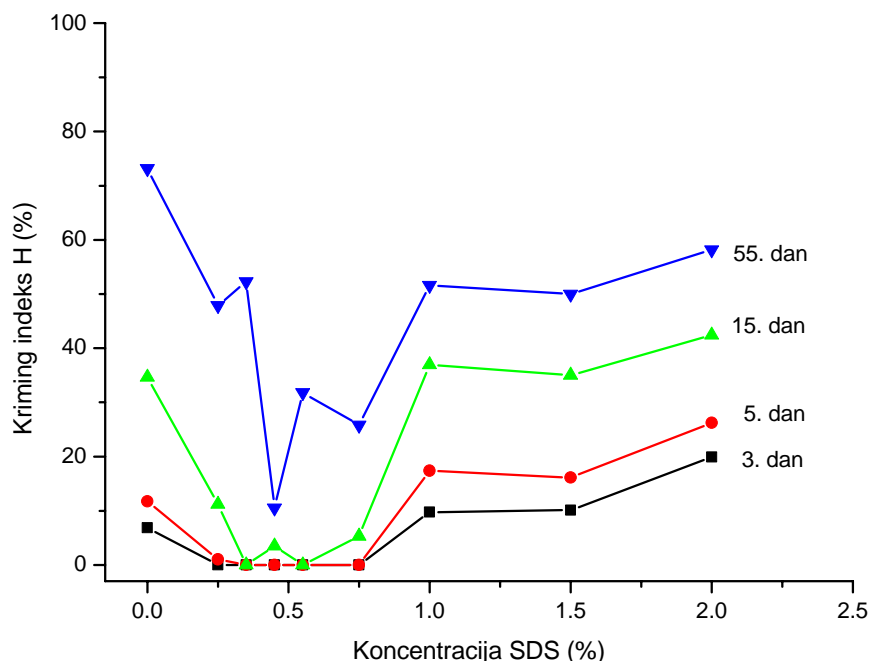
**Slika 35.** Krive raspodele veličina kapi 20% emulzija u 1,00% HPMC1 sa različitim koncentracijama SDS.

Krive raspodele veličina kapi emulzija sa karakterističnim SDS koncentracijama u kontinualnoj fazi, dobijene fitovanjem eksperimentalnih podataka funkcijom krive raspodele (10), kao na **slici P2**. datoj u prilogu, prikazane su na **slici 35**. Vidi se da povećanje koncentracije SDS u kontinualnoj fazi utiče na smanjenje polidisperznosti emulzije. Raspodela veličina kapi postaje sve uža i sve više simetrična, odnosno koeficijent asimetrije,  $\beta_1$ , se smanjuje (**tabela 8.**). Pri SDS koncentraciji 0,45%, pri kojoj se postiže maksimum HPMC–SDS interakcije u kontinualnoj fazi,  $\beta_1$  ima najnižu vrednost (0,027), tako da se vrednost najzastupljenijeg prečnika kapi,  $X$ , praktično poklapa sa srednjem prečnikom,  $d_{vs}$ . Povećanjem koncentracije SDS iznad 0,45%, polidisperznost emulzija, kao i njihov sredni prečnici, se malo menjaju, pa se, sa stanovišta disperzione analize, mogu očekivati sistemi približne stabilnosti.

### 4.3.3. Stabilnost emulzija

Polimer-PAM interakcije u emulzionim sistemima mogu izazvati promene u agregaciji, koalescenciji, veličini kapi i raspodeli veličina kapi, koje utiču na vrednost kringing indeksa H [106, 107], kao merila stabilnosti emulzija. Iz ovih razloga je

stabilnost 20% emulzija suncokretovog ulja u sistemu HPMC-SDS je praćena određivanjem kriming indeksa u toku 60 dana stajanja na sobnoj temperaturi. Iako kriming indeks pruža samo indirektno podatke o stabilnosti emulzionih sistema, može se reći da predstavlja dobar indikator promena nastalih posredstvom HPMC-SDS interakcije [101, 108]. Promene kriming indeksa, H, sa vremenom, u zavisnosti od koncentracije SDS u kontinualnoj fazi, prikazane su na **slici 36**.



**Slika 36.** Promene kriming indeksa, H, 20% emulzija u 1,00% HPMC1 u zavisnosti od koncentracije SDS u kontinualnoj fazi, posmatrane u različitim vremenskim intervalima.

Najlošiju stabilnost sa vremenom imaju emulzije pripremljene bez SDS. Uzimajući u obzir ne tako dobra emulgujuća svojstva HPMC, kao i veliki srednji prečnik kapi u ovoj emulziji, ovakvo ponašanje je očekivano (**tabela 8**). Uvođenjem SDS i porastom njegove koncentracije u kontinualnoj fazi, kapi ulja u emulzijama postaju sve manje, a raspodela veličina sve uža, tako da se može očekivati njihova povećana stabilnost.

Nakon stajanja u toku 2-3 dana, emulzije kod kojih je koncentracija SDS u kontinualnoj fazi 0,15-0,75% (oblast HPMC-SDS interakcije), pokazuju veću stabilnost, što je posledica, kako smanjenja  $d_{vs}$ , tako i povećanja viskoziteta kontinualne faze (**slika 31**). Kod ovih emulzija ne dolazi do izdvajanja kontinualne faze- seruma. U emulzijama, kod kojih je SDS koncentracija veća od 0,75%, dolazi do izdvajanja seruma sa vremenom, odnosno kriming indeks, H, raste, što ukazuje na njihovu smanjenu sedimentacionu stabilnost.

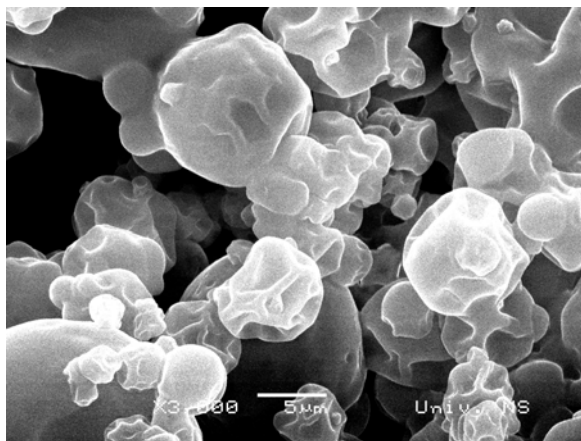
Nakon stajanja u toku 55 dana, kod svih emulzija je došlo do izdvajanja seruma. Sa dijagrama prikazanog na **slici 36.**, može se uočiti da stabilnost emulzija raste sa povećanjem koncentracije SDS u kontinualnoj fazi do 0,45%, pri kojoj kriming indeks ima najmanju vrednost ( $H=10,53\%$ ), odnosno emulzije imaju najveću sedimentacionu stabilnost. Ova promena je u saglasnosti sa smanjenjem  $d_{vs}$  u oblasti SDS koncentracija 0,15-0,45% (**tabela 8.**). Može se pretpostaviti da HPMC/SDS kompleks, koji je adsorbovan na granici tečno/tečno, formira gusto pakovan adsorpcioni sloj, ili više slojeva, koji ima veću kompaktnost nego adsorpcioni sloj kod emulzija stabilizovanih samo HPMC, bez prisustva SDS [64]. Takođe, kompleks adsorbovan na granici faza, verovatno formira umreženu strukturu sa kompleksom prisutnim u kontinualnoj fazi, što dovodi do porasta viskoziteta, a samim tim i do povećane stabilnosti emulzionog sistema.

Nakon postizanja najveće stabilnosti, kod emulzija sa 0,45% SDS, dalje povećanje njegove koncentracije u kontinualnoj fazi, dovodi do promene u strukturi adsorpcionog sloja oko kapi ulja, uslovljene promenama u morfologiji kompleksa HPMC/SDS. Naime, dolazi do razrušavanja umrežene strukture i opadanja viskoziteta kontinualne faze, tako da se stabilnost emulzije smanjuje. Kompleks HPMC/SDS, nakon završene interakcije (koncentracija SDS  $>1,00\%$ ), nema površinsku aktivnost, pa adsorpcioni sloj oko kapi ulja čine samo molekuli SDS [102]. Takođe, nakon završene interakcije, usled smanjenja viskoziteta kontinualne faze, emulzije pokazuju slabu sedimentacionu stabilnost ( $H > 50\%$ ), mada je veličina kapi praktično ista kao u oblasti interakcije (**tabela 8.**). Treba naglasiti da, izdvajanje ulja na površini emulzija, čak i nakon stajanja u toku 60 dana, nije primećeno [109].

#### 4.4. Mikrokapsulacija ulja u sistemu HPMC–SDS

Pokazano je da HPMC–SDS interakcija utiče na osobine formiranog adsorpcionog sloja na granici faza ulje/voda, kao i da se u oblasti najizraženije interakcije dobijaju emulzioni sistemi sa najsitnijom raspodelom veličina kapi i najvećom sedimentacionom stabilnosti. Osobine adsorpcionog sloja formiranog oko kapi ulja, zavise od strukture i konformacije adsorbovanog kompleksa HPMC/SDS [59, 60, 64], nastalog u oblasti interakcije, što se može odraziti na mogućnost dobijanja i osobine mikrokapsula.

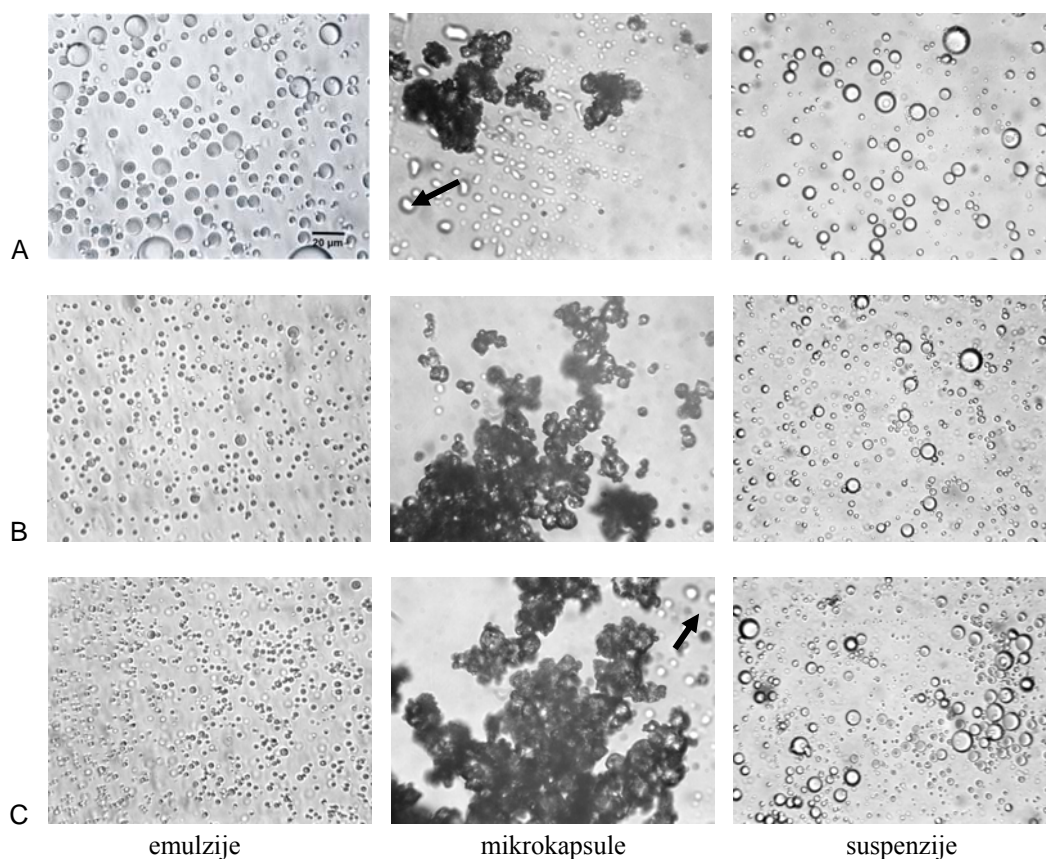
Raspršivanjem u *spray dryer*-u 20% emulzija suncokretovog ulja u 1,00% HPMC sa različitom koncentracijom SDS u kontinualnoj fazi dobijen je beli prašak mikrokapsula, u formi agregata. Postupak sušenja uzoraka emulzija, naročito onih sa koncentracijom SDS u kontinualnoj fazi 0,25-0,75%, odnosno u oblasti maksimuma HPMC–SDS interakcije, bio je otežan zbog njihovog velikog viskoziteta. Podešavanjem uslova sušenja, protoka emulzije, aspiracije, ulazne i izlazne temperature, postignuti su uslovi pri kojima nije dolazilo do pucanja mikrokapsula i izdvajanja ulja u prihvatnoj posudi ispod komore za sušenje. Takođe, dobijeni prašak mikrokapsula, prihvatatan u kolektorskoj posudi nakon prolaska kroz ciklon, bio je potpuno suv.



**Slika 37.** SEM (3 000 x) mikrokapsula dobijenih *spray drying* postupkom iz 20% emulzije u 1,00% HPMC1 i 0,35% SDS.

Posmatranjem morfologije mikrokapsula, primenom SEM (**slika 37.**), uočava se njihov sferan oblik sa izuzetno naboranom površinom. Ovakva građa zida mikrokapsula, formiranog u toku procesa sušenja, ukazuje da je film, formiran adsorpcijom HPMC/SDS kompleksa na kapima ulja, veoma elastičan i podložan skupljanju [110, 111].

Mikrokapsule, formirane u oblasti HPMC–SDS interakcije, bile su stabilne, s obzirom na činjenicu da je adsorpcioni sloj na graničnoj površini u/v veoma kompaktan, i dobro su se redispergovale u vodi. Sposobnost redispergovanja mikrokapsula dobijenih u uslovima interakcije, poboljšavala se sa porastom SDS koncentracije. Naime, povećanjem koncentracije SDS povećava se elektrostatičko odbijanje naelektrisanih, polarnih glava molekula SDS adsorbovanih na aktivnim centrima HPMC, što omogućuje dobru dezagregaciju. Mikrokapsule dobijene sušenjem emulzije stabilizovane samo molekulima HPMC i emulzija dobijenim u uslovima završene interakcije, imaju slabu moć redispergovanja.



**Slika 38.** Mikrofotografije emulzija, mikrokapsula i suspencija mikrokapsula u vodi, dobijenih u prisustvu različitih koncentracija SDS: **A** – 0,00 %; **B** – 0,35%; and **C** – 1,50% SDS.

Na **slici 38.** prikazane su mikrofotografije emulzija, mikrokapsula i njihovih suspencija u vodi, dobijenih pri karakteristicnim SDS koncentracijama. Kapljice ulja, koje su vidljive na fotografijama mikrokapsula bez SDS i pri koncentraciji 1,50% (nakon završene interakcije) označene strelicom, ukazuju na slabu otpornost adsorpcionog sloja na uslove sušenja i lako pucanje omotača pri čemu se ulje oslobađa, što utiče i na njihovu sposobnost redispergovanja.



#### 4.4.1. Veličina i raspodela veličina mikrokapsula

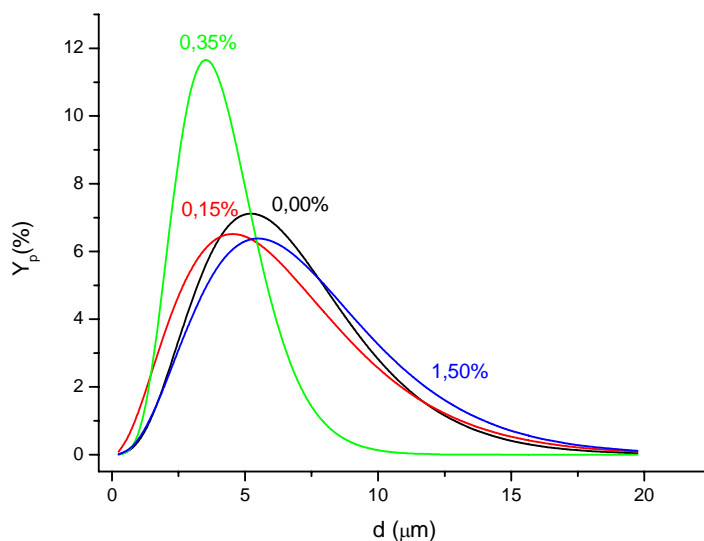
Rezultati određivanja veličine i raspodele veličina mikrokapsula, dobijeni obradom mikrofotografija njihovih suspenzija u vodi, primenom Qwin softvera, prikazani su u **tabeli 9**. Jasno je da ne postoji pravilnost u zavisnosti srednjeg prečnika mikrokapsula i koncentracije SDS, odnosno mora se uzeti u obzir uticaj uslova sušenja i osobina omotača (adsorpcionog sloja) na srednji prečnik.

Uočava se da mikrokapsule u vodenim suspenzijama imaju znatno veće vrednosti srednjih prečnika od srednjih prečnika kapi odgovarajućih emulzija, koji su dati u **tabeli 8**., sa izuzetkom mikrokapsula pripremljenih bez prisustva SDS. Ovo se može objasniti lošim karakteristikama adsorpcionog sloja formiranog samo od molekula HPMC, te zbog napona pare u kapima dolazi do pucanja kapi velikog prečnika u toku procesa sušenja. Pošto se radi o emulzijama sa velikim udelom kapi većeg prečnika, nakon sušenja dolazi do smanjenja  $d_{vs}$  mikrokapsula. Sitnije kapi prisutne u uzorcima emulzija pripremljenih u oblasti i nakon završene HPMC–SDS interakcije, su odnešene aspiracijom, tako da mikrokapsule dobijene iz njih imaju veće vrednosti  $d_{vs}$ . Veće vrednosti standardne devijacije od srednjeg prečnika mikrokapsula, u odnosu na odgovarajuće emulzije, ukazuju na povećanu polidisperznost uzoraka mikrokapsula.

**Tabela 9.** Parametri raspodele veličina mikrokapsula suspendovanih u vodi, dobijenih iz 20% emulzija u 1,00% HPMC sa različitim koncentracijama SDS:  $d_{vs}$  – srednji prečnik;  $\sigma$  – standardna devijacija;  $\beta_1$  asimetrija;  $\beta_2$  – spljoštenost;  $S$  – specifična površina;  $X$  – najzastupljeniji prečnik.

SDS (%)	Parametri					
	$d_{vs}$ ( $\mu\text{m}$ )	$\sigma$ ( $\mu\text{m}$ )	$\beta_1$	$\beta_2$	$S$ ( $\text{m}^2/\text{cm}^3$ )	$X$ ( $\mu\text{m}$ )
0,00	6,503	3,161	0,908	4,678	0,923	5,182
0,15	6,362	3,623	0,391	2,750	0,943	4,520
0,25	6,474	2,806	1,478	3,898	0,927	4,216
0,35	4,988	1,615	2,191	4,818	1,203	3,528
0,45	6,240	2,837	0,296	2,630	0,961	4,904
0,75	5,641	3,033	0,316	2,235	1,064	3,910
1,50	6,798	3,636	0,107	2,466	0,883	5,433

Krive raspodele veličina mikrokapsula, dobijene fitovanjem eksperimentalnih podataka funkcijom krive raspodele (10), prikazane su na **slici 39**.



**Slika 39.** Krive raspodele veličina mikrokapsula dobijenih pri različitim koncentracijama SDS.

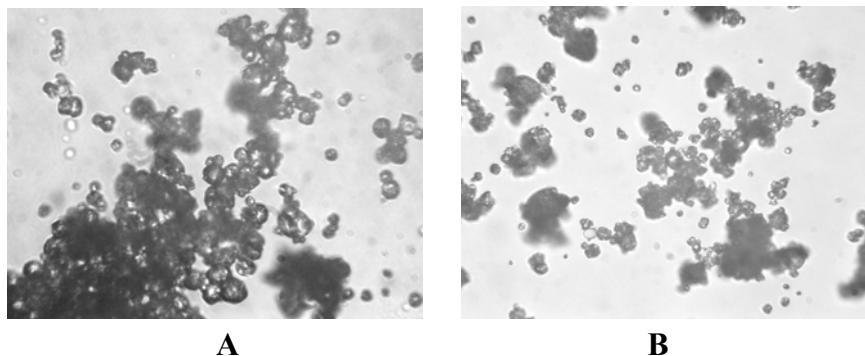
Vidi se da na polidisperznost suspenzija mikrokapsula u najvećoj meri utiču osobine formiranog adsorpcionog sloja. Uzorak mikrokapsula sa 0,35% SDS ima najmanji  $d_{vs}$ , najužu raspodelu veličina, a najzastupljeniji prečnik mikrokapsula,  $X$ , je najpribližniji  $d_{vs}$  (kriva raspodele je najviše simetrična). Time se potvrđuje činjenica da je adsorpcioni sloj, formiran oko kapi ulja u blizini maksimuma HPMC–SDS interakcije (0,35-0,45%SDS), najkompaktniji i najotporniji na uslove sušenja. Kapi formirane u emulzijama na maksimumu interakcije su najujednačenijih veličina, što se vidi iz **tabele 8.**, tako da ne dolazi do njihovog pucanja ni aspiracije u toku sušenja spray drying postupkom.

#### 4.4.2. Ispitivanje efikasnosti mikrokapsulacije

Radi ispitivanja efikasnosti postupka mikrokapsulacije, ekstrahovano je ulje iz uzoraka mikrokapsula primenom cikloheksana kao ekstragenta. Sadržaj ulja u ekstraktu određen je primenom spektrofotometrijske metode, merenjem apsorpcije na 234 nm. Masa ekstrahovanog ulja praćena je sa vremenom trajanja ekstrakcije.

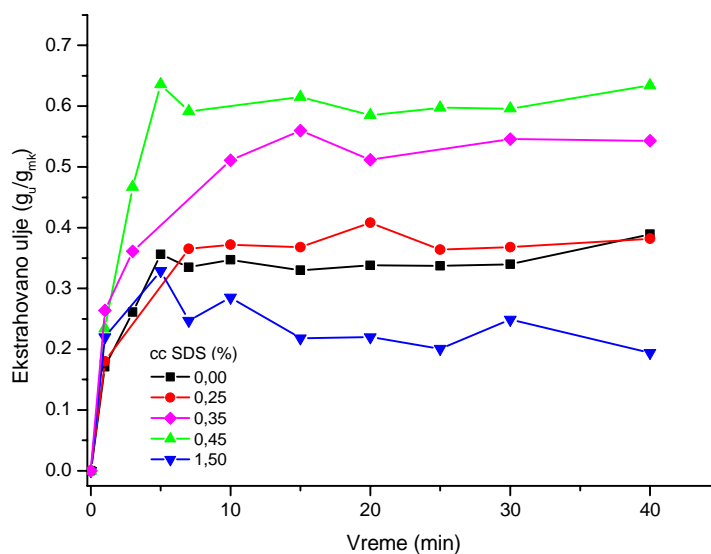
Nakon ekstrakcije mikrokapsule su sušene na sobnoj temperaturi. Posmatranjem pod mikroskopom, jasno se vidi da je njihov prečnik manji, odnosno da se radi o praznim mikrokapsulama (**slika 40.**). Takođe, vidi se da prilikom određivanja sadržaja inkapsuliranog ulja, nije došlo do pucanja zida mikrokapsula. Naime, dispegovanjem u cikloheksanu, zbog smanjene rastvorljivosti kompleksa

HPMC/SDS koji se skuplja, omotač mikrokapsula postaje porozan, čime je omogućeno oslobađanje inkapsuliranog sadržaja. Vreme trjanja ekstrakcije od 10 min. bilo je dovoljno za potpuno oslobađanje inkapsuliranog ulja.



**Slika 40.** Mikrokapsule dobijene sušenjem 20% emulzije u HPMC1 sa 0,35% SDS pre (A) i posle (B) ekstrakcije cikloheksanom.

Zavisnost mase ekstrahovanog ulja iz mikrokapsula, sa vremenom, za različite SDS koncentracije, prikazana je na **slici 41**.



**Slika 41.** Masa ulja izdvojena ekstrakcijom uzoraka mikrokapsula dobijenih iz 20% emulzija u 1,00% HPMC1 sa različitom koncentracijom SDS.

Mikrokapsule, čiji omotač čine samo adsorbovani molekuli HPMC, dobijene iz emulzija kod kojih u kontinualnoj fazi nije prisutan SDS, imaju relativno mali sadržaj inkapsuliranog ulja ( $\approx 0,35 \text{ g}_u/\text{g}_{mk}$ ). Mala efikasnost mikrokapsulacije je posledica osobina adsorpcionog sloja, odnosno loša sposobnost formiranja kompaktnih filmova, otpornih na uslove sušenja.

Kao što je već pokazano, dodatak SDS dovodi do formiranja HPMC/SDS kompleksa, koji ima bolja emulgujuća svojstva od čistog polimera, dok je adsorpcioni sloj oko kapi ulja umrežen i kompaktniji. Očekivano, količina inkapsuliranog ulja raste, do postizanja maksimuma ( $\approx 0,6 \text{ g}_u/\text{g}_{mk}$ ) pri koncentraciji 0,45% SDS. Zid mikrokapsula, dobijenih pri ovoj koncentraciji SDS, je čvrst i kompaktan, tako da ne dolazi do njihovog pucanja u toku procesa sušenja.

Kako, sa porastom koncentracije SDS, HPMC/SDS kompleks postaje sve više soljubilizovan micelama SDS, i interakcija poprima intramolekulski karakter, sposobnost obrazovanja kompaktnih filmova se smanjuje. Mikrokapsule, dobijene pri koncentraciji SDS iznad psp ( $>1,00\%$ ), odnosno nakon završene interakcije, su veoma nežne i osetljive na pucanje. Efikasnost mikrokapsulacije je mala ( $\approx 0,25 \text{ g}_u/\text{g}_{mk}$ ), niža nego kada u sistemu i nije prisutan SDS, pre početka interakcije.

Sprovedena ispitivanja ukazuju na dominantan uticaj HPMC–SDS interakcije na osobine mikrokapsula uljnog sadržaja: veličinu i raspodelu veličina čestica, stabilnost, sposobnost redispergovanja, kompaktnost obrazovanih omotača, kao i na količinu inkapsuliranog ulja. U uslovima najizraženije interakcije (0,35–0,45% SDS) postignuta je najveća efikasnost mikrokapsulacije, a dobijene mikrokapsule pokazale su najbolju stabilnost, sposobnost redispergovanja i najmanji srednji prečnik. Ovo ukazuje na činjenicu da HPMC/SDS kompleks obrazuje kompaktan, umrežen adsorpcioni sloj koji je otporan na uslove sušenja u struji toplog vazduha- *spray drying* postupkom.

#### **4.5. Dobijanje mikrokapsula sa CO<sub>2</sub> ekstraktom nevena**

Na osnovu ispitivanja uticaja HPMC–SDS interakcije na formiranje mikrokapsula sa uljnim sadržajem, rađenim sa uzorkom HPMC1, može se zaključiti da se u oblasti interakcije dobijaju mikrokapsule uljnog sadržaja zadovoljavajućih osobina. Međutim, sam proces emulgovanja suncokretovog ulja kao i proces sušenja dobijenih emulzija bili su praćeni određenim problemima, koji su u najvećoj meri izazvani velikim viskozitetom kontinualnih faza emulzija pripremanih u oblasti najizraženije interakcije. Tako je homogenizovanje ulja bilo moguće izvoditi samo pri relativno malom broju obrtaja rotor/stator homogenizera (4700 o/min) u toku 3 min, dok je za sušenje emulzija velikog viskoziteta bilo potrebno podesiti uslove za svaki pojedinačni uzorak (protok emulzije, aspiracija, ulazna i izlazna temperatura). Iz ovih razloga, u nastavku ispitivanja pokušali smo da dobijemo mikrokapsule sličnih karakteristika sa uzorkom HPMC, čiji je viskozitet pri istim koncentracijama u kontinualnoj fazi manji.

Na osnovu ranije izloženog može se zaključiti da na HPMC–SDS interakciju, pored temperature i  $c^*$  u najvećoj meri utiče stepen supstitucije makromolekula. Iz ovih razloga, za dobijanje mikrokapsula sa ekstraktom nevena, uzorak HPMC1 zamenjen je uzorkom HPMC4, koji ima približnu vrednost stepena supstitucije i sadržaj metoksi i hidroksipropil supstituenata kao uzorak HPMC1 (**tabela 1**), ali oko tri puta manju molekulsku masu.

#### 4.5.1. Uticaj uslova homogenizovanja na veličinu i raspodelu veličina kapi emulzija

Sledeća faza obuhvatila je ispitivanje uticaja uslova homogenizovanja (broja obrtaja homogenizera i vremena homogenizovanja) na veličinu i raspodelu veličina kapi 20% emulzija u 1,00% HPMC4, bez prisustva SDS. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su u **tabeli 10**.

**Tabela 10.** Parametri raspodele veličina kapi 20% emulzija suncokretovog ulja u rastvoru 1,00% HPMC4 dobijenih pri različitim uslovima:  $d_{vs}$ –srednji prečnik;  $\sigma$ –standardna devijacija;  $\beta_1$ –asimetrija;  $\beta_2$ –spljoštenost;  $S$ –specifična površina;  $X$ –najzastupljeniji prečnik.

Parametri	Intenzitet homogenizovanja (o/min)			
	4700		6000	
	Vreme homogenizovanja (min.)			
	3	15	3	15
$d_{vs}$ ( $\mu\text{m}$ )	9,724	9,919	8,667	8,187
$\sigma$ ( $\mu\text{m}$ )	4,737	4,276	3,836	4,834
$\beta_1$	0,235	0,192	0,166	0,214
$\beta_2$	2,253	2,497	2,479	2,078
$S$ ( $\text{m}^2/\text{cm}^3$ )	0,617	0,543	0,692	0,653
$X$ ( $\mu\text{m}$ )	7,182	8,092	6,726	5,971

Može se uočiti da se homogenizovanjem pod istim uslovima (4700 o/min u toku 3 minute), kod emulzija sa 1,00% HPMC4 dobijaju kapi nešto manjeg srednjeg prečnika ( $d_{vs} = 9,724 \mu\text{m}$ ) nego u kada je u kontinualnoj fazi prisutan HPMC1 ( $d_{vs} = 11,291 \mu\text{m}$ ). Analizom rezultata dolazi se do zaključka da produžetak vremena homogenizovanja sa 3 na 15 min. ne utiče značajnije na srednji prečnik kapi ispitivanih emulzija, kako pri manjem (4700 o/min) tako i pri većem (6000 o/min) primenjenom broju obrtaja homogenizera. S druge strane, povećanjem broja obrtaja homogenizera srednji prečnik kapi se neznatno smanjuje, sa 9,724 na 8,667  $\mu\text{m}$  kod homogenizovanja u toku 3 min, ali se dobijaju emulzije manje polidisperznosti,

odnosno standardna devijacija se smanjuje a raspodela postaje sve manje asimetrična (koeficijent asimetrije  $\beta_1$  ima nižu vrednost). Međutim, priprema emulzija u uslovima primenjenog većeg broja obrtaja homogenizera, bila je znatno otežana, prvenstveno zbog izražene viskoelastičnosti kontinualne faze, pa je proces emulgovanja morao biti više puta prekidan. Iz ovih razloga u daljem radu 20% emulzije u 1,00% HPMC4 pripremane su homogenizovanjem u toku 3 minuta na 4700 o/min.

#### 4.5.2. Osobine emulzija sa ekstraktom nevena

Za dobijanje mikrokapsula koje sadrže ekstrakt nevena kao aktivnu komponentu korišćen je totalni CO<sub>2</sub> ekstrakt nevena dobijen u superkritičnoj oblasti ekstrakcije na 200 bar i 40°C. Uzimajući u obzir da se, zbog malih prinosa ekstrakcije, raspolagalo ograničenom količinom CO<sub>2</sub> ekstrakta nevena, u suncokretovo ulje je dodavano 1% ekstrakta, a tako obogaćeno ulje korišćeno je za pripremu 20% emulzija. Zbog najvećeg sadržaja farmakološki aktivnih supstanci- FAS, odabran je totalni ekstrakt nevena, dobijen primenom CO<sub>2</sub> ekstrakcije biljnog materijala u toku 10 sati na 200 bar i 40°C.

S obzirom na kompleksan hemijski sastav CO<sub>2</sub> ekstrakta nevena, njegov dodatak u uljnu fazu može uticati na osobine formiranih emulzija i iz njih dobijenih mikrokapsula. Takođe, dodatak ekstrakta nevena može imati različit uticaj na osobine mikrokapsula, u zavisnosti od toga da li su na granici faza adsorbovani molekuli HPMC, kompleks HPMC/SDS nastao u uslovima interakcije, ili molekuli SDS prisutni u višku nakon završetka interakcije. Iz ovih razloga, pripremane su dve serije 20% emulzija suncokretovog ulja u 1,00% HPMC4, prva sa ekstraktom nevena u uljnoj fazi i druga bez njega. Svaka serija obuhvatila je pripremu emulzija bez SDS, u oblasti najizraženije HPMC–SDS interakcije (0,35% SDS) i nakon završene interakcije (1,00% SDS).

Rezultati određivanja veličine i raspodele veličina kapi ispitivanih emulzija, dobijeni obradom mikrofotografija uz pomoć Qwin softvera, prikazani su u **tabeli 11**.

Analizom rezultata uočava se da emulzija suncokretovog ulja koja ne sadrži SDS ima kapi velikog prečnika ( $d_{vs}= 8,395 \mu\text{m}$ ) i izraženu polidisperznost ( $\sigma= 3,424 \mu\text{m}$ ) usled male površinske aktivnosti molekula HPMC. Takođe, u uslovima izražene HPMC–SDS interakcije, pri koncentraciji 0,35% SDS, u emulziji su prisutne kapi najmanjeg prečnika ( $d_{vs}=3,997 \mu\text{m}$ ) sa najužom raspodelom veličina ( $\sigma= 1,555 \mu\text{m}$ ), što je posledica, kako boljih emulgujućih svojstava nastalog HPMC/SDS kompleksa, tako i prisustva umrežene strukture koja povećava viskozitet kontinualne faze. S obzirom na činjenicu da je kompleks HPMC/SDS nakon završene interakcije potpuno

soljubilizovan molekulima SDS i da nema površinsku aktivnost, može se pretpostaviti da su na granici faza adsorbovani samo molekuli SDS. Iz ovih razloga u emulziji sa 1,00% SDS dolazi do malog porasta  $d_{vs}$  i  $\sigma$ .

**Tabela 11.** Parametri raspodele veličina kapi 20% emulzija u 1,00% HPMC4, bez aktivne komponente i sa dodatim ekstraktom nevena (1%), sa različitim koncentracijama SDS:  $d_{vs}$ –srednji prečnik;  $\sigma$ –standardna devijacija;  $S$ –specifična površina;  $X$ –najzastupljeniji prečnik.

Parametri	Bez aktivne komponente			Sa ekstraktom nevena		
	Koncentracija SDS (%)					
	0,00	0,35	1,00	0,00	0,35	1,00
$d_{vs}$ ( $\mu\text{m}$ )	8,395	3,997	4,481	6,751	3,582	4,690
$\sigma$ ( $\mu\text{m}$ )	3,424	1,555	2,995	2,677	1,341	2,966
$S$ ( $\text{m}^2/\text{cm}^3$ )	0,715	1,501	1,339	0,889	1,675	1,279
$X$ ( $\mu\text{m}$ )	6,545	2,829	2,704	5,902	3,023	2,708

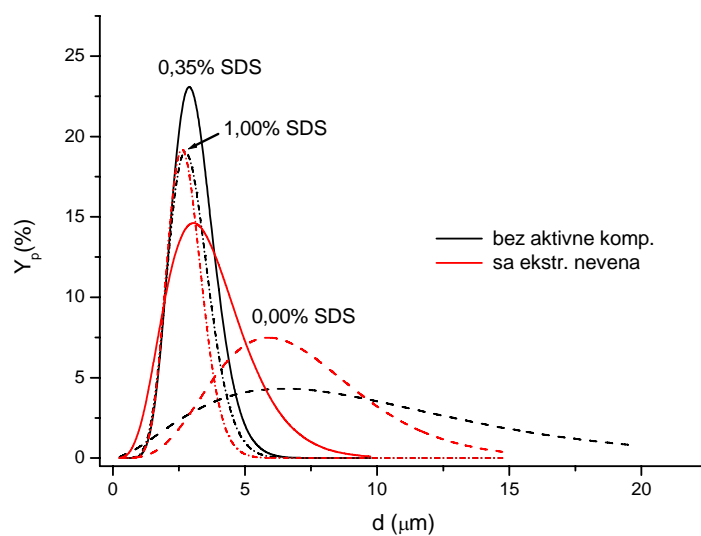
Na osnovu izloženog jasno je da prisustvo SDS u kontinualnoj fazi emulzija sa HPMC4, bez i sa ekstraktom nevena, ima isti uticaj na veličinu i raspodelu veličina kapi kao kod emulzija kod kojih se u kontinualnoj fazi nalazi HPMC1 (**tabela 8.**).

Prisustvo ekstrakta nevena u uljnoj fazi emulzije koja ne sadrži SDS, utiče na smanjenje srednjeg prečnika kapi ( $d_{vs}= 6,751 \mu\text{m}$ ) i suženje raspodele ( $\sigma= 2,667 \mu\text{m}$ ). Kako sastav totalnog ekstrakta čine, u najvećoj meri, biljni voskovi, smole i masna ulja ( $\approx 96\%$ , **tabela 3**), može se pretpostaviti da je ovo smanjenje posledica površinske aktivnosti nekih od komponenata sadržanih u ekstraktu, kao što su saponini, steroli [112].

Kod emulzija, kod kojih su u kontinualnoj fazi prisutni HPMC i SDS, uticaj dodatka ekstrakta nevena na srednji prečnik kapi i polidisperznost je manje izražen. U oblasti maksimuma interakcije (0,35% SDS) dolazi do neznatnog smanjenja srednjeg prečnika kapi ( $d_{vs}= 3,582 \mu\text{m}$ ) i standardne devijacije ( $\sigma= 1,341 \mu\text{m}$ ) u odnosu na emulziju bez ekstrakta nevena. Prisustvo ekstrakta u uljnoj fazi emulzije, kod koje je HPMC–SDS interakcija u kontinualnoj fazi završena (1,00% SDS), praktično ne utiče na veličinu i raspodelu veličina kapi.

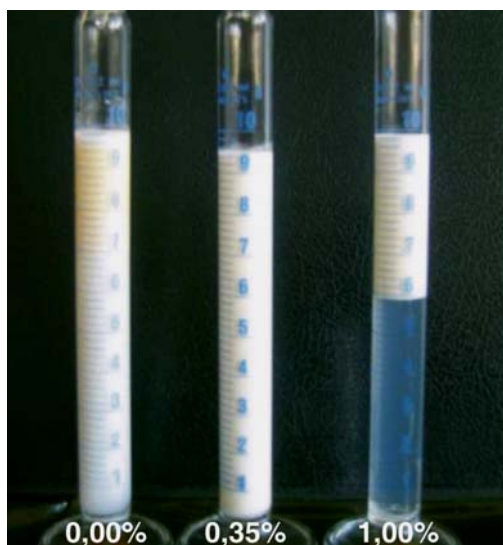
Krive raspodele veličina kapi ispitivanih emulzija, dobijene fitovanjem eksperimentalnih podataka funkcijom krive raspodele, prikazane su na **slici 42**.

Može se zapaziti da je uticaj dodatka ekstrakta nevena na disperzione karakteristike emulzija je najizraženiji kada u kontinualnoj fazi nije prisutan SDS. Tada do izražaja dolaze emulgujuća svojstva sterola i saponina prisutnih u ekstraktu, pa emulzije imaju užu raspodelu veličina kapi.



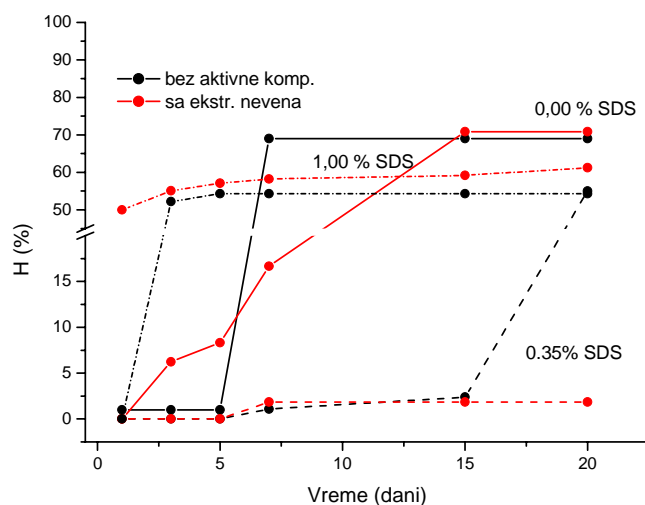
**Slika 42.** Krive raspodele veličina kapi 20% emulzija u 1,00% HPMC4, sa različitim koncentracijama SDS, bez aktivne komponente i sa dodatim ekstraktom nevena (1%) u ulje.

Stabilnost emulzija ispitivana je vizuelno (**slika 43**), praćenjem promene kringing indeksa emulzija H na sobnoj temperaturi, u toku 20 dana, a rezultati su grafički prikazani na **slici 44**.



**Slika 43.** Raslojavanje 20% emulzija u 1,00% HPMC4, sa ekstraktom nevena (1%) i različitim koncentracijama SDS, nakon stajanja u toku 12 dana.





**Slika 44.** Promene kringing indeksa, H, 20% emulzija u 1,00% HPMC4 i sa različitim koncentracijom SDS, bez aktivne komponente i sa dodatim ekstraktom nevena (1%).

Može se uočiti da se stabilnost emulzija menja sa vremenom, kako u zavisnosti od HPMC–SDS interakcije, tako i u zavisnosti od prisustva ekstrakta nevena.

Nakon stajanja u toku 5 dana najveće raslojavanje- izdvajanje bistrog seruma je uočeno kod emulzija sa 1,00% SDS ( $H > 50\%$ ), dok je kod ostalih emulzija ono izostalo ili je prisutno u jako maloj meri. S obzirom da ove emulzije imaju mali srednji prečnik kapi kao i najmanje izraženu polidisperznost, sedimentaciona nestabilnost je posledica malog viskoziteta kontinualne faze i deplecione flokulacije [65]. Naime, pri koncentraciji SDS 1,00% viskozitet kontinualne faze emulzija je znatno smanjen (**slika 30**), kompleks HPMC/SDS potpuno soljubilizovan micelama SDS, tako da gubi adsorbujuća svojstva, odnosno ponaša se kao neadsorbujući polimer. Oko dispergovanih kapi ulja javlja deplecioni omotač, sastavljen od čiste kontinualne faze. Preklapanje deplecionih omotača kapi dovodi do njihovog međusobnog privlačenja (efekat praznine) i formiranja flokula, čime se kringing dodatno pospešuje. Dodatak ekstrakta nevena u emulziju sa 1,00% SDS neznatno smanjuje njenu stabilnost. Daljim stajanjem u toku 15 dana promene kringing indeksa kod ovih emulzija nisu uočene, odnosno H ima konstantnu vrednost, bez obzira na prisustvo ekstrakta nevena.

Intenzivna obojenost ekstrakta nevena, inkorporiranog u emulzije omogućila je detaljnije praćenje raslojavanja (**slika 43.**). Naime, kod emulzije bez SDS, iako je granica između izdvojenog seruma i emulzije teško uočljiva, jasno se vidi razlika u boji stuba emulzije. Gornji slojevi su intenzivnije narandžaste boje, što je posledica raslojavanja kapi po veličini. Sedimentaciona stabilnost ovih emulzija sa vremenom u velikoj meri zavisi od prisustva ekstrakta nevena, odnosno emulgujućih svojstava

saponina i sterola prisutnih u njemu. Dodatak ekstrakta nevena povećava stabilnost emulzije (separacija faza je sporija), mada nakon stajanje u toku 20 dana kriming indeks dostiže istu vrednost kao kod emulzija bez ekstrakta ( $H \approx 70\%$ ). Nakon 20 dana stajanja na sobnoj temperaturi ove emulzije pokazuju veću nestabilnost od emulzija sa 1,00% SDS.

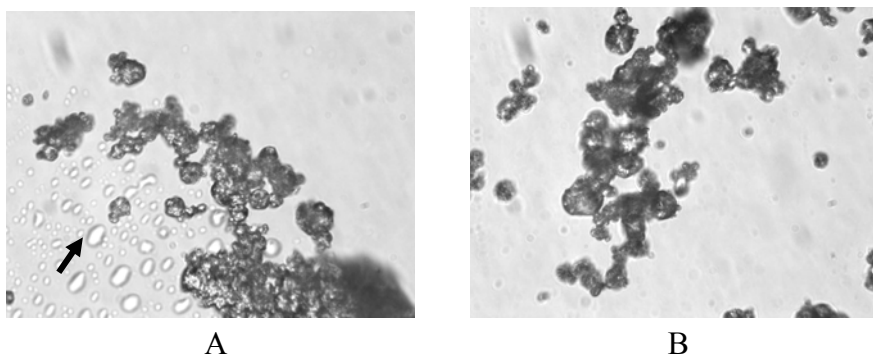
Ova promena nije uočena kod emulzije sa 0,35% SDS kod koje  $d_{vs}$  ima znatno manje vrednosti.

Najveću sedimentacionu stabilnost sa vremenom pokazale su emulzije pripremljene u oblasti interakcije, odnosno pri koncentraciji SDS 0,35%. Nakon stajanja u toku 15 dana emulzije se ponašaju jednako, bez obzira na prisustvo ekstrakta nevena, i pokazuju veliku stabilnost ( $H \approx 2\%$ ). Promena boje slojeva emulzije sa ekstraktom nevena nije uočena, pošto se radi o emulzijama ujednačene raspodele veličina kapi kod kojih je adsorpcioni sloj kompaktan. Međutim, nakon 20 dana stajanja na sobnoj temperaturi, kod emulzije bez ekstrakta nevena uočena je separacija faza ( $H = 55\%$ ), što pokazuje da ekstrakt nevena dodatno stabilizuje adsorpcioni sloj emulzija pripremanih u oblasti najizraženije HPMC–SDS interakcije.

#### 4.5.3. Osobine mikrokapsula sa ekstraktom nevena

Sušenje emulzija raspršivanjem, primenom *spray drying* postupka, nakon podešavanja uslova (protok emulzije, aspiracija, ulazna i izlazna temperatura) izvođen je bez većih poteškoća, s obzirom na relativno manji viskozitet emulzija pripremanih sa uzorkom HPMC4 u odnosu na emulzije sa HPMC1.

Dobijen je suv prašak mikrokapsula, u formi agregata čije su mikrofotografije prikazane na **slici 45**.



**Slika 45.** Mikrofotografije mikrokapsula sa ekstraktom nevena koje su dobijene *spray drying* postupkom iz 20% emulzija u 1,00% HPMC4 sa 0,00% (A) i 0,35% (B) SDS.

Uočava se da su mikrokapsule sfernog oblika i naborane površine, što ukazuje na elastičnost adsorbovanog filma, dok prisustvo ekstrakta nevena nije uticalo na morfološke osobine mikrokapsula.

Na **slici 45. A** strelicom su označene kapljice ulja nastale kao posledica pucanja mikrokapsula bez SDS, usled slabe mehaničke otpornosti omotača. Ove mikrokapsule imale su i slabu sposobnost redispersovanja. Istovremeno, mikrokapsule dobijene u oblasti izražene interakcije (0,35% SDS) imale su dobru mehaničku otpornost i sposobnost redispersovanja u vodi, što nije bio slučaj sa mikrokapsulama dobijenim u uslovima završene HPMC–SDS interakcije.

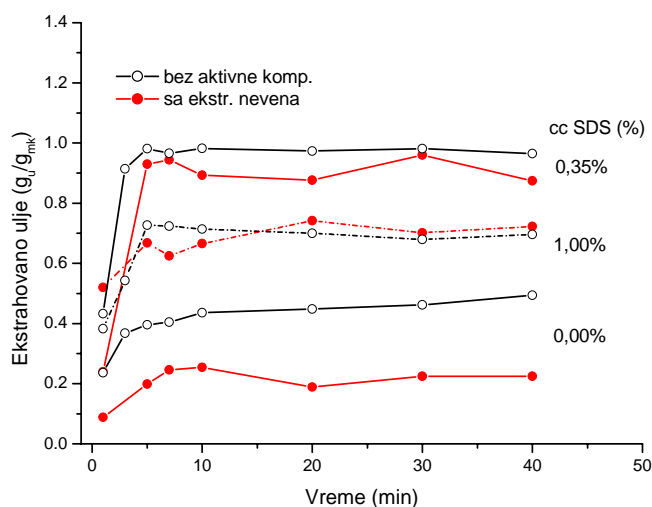
Rezultati određivanja veličine i raspodele veličina čestica mikrokapsula, dobijeni obradom mikrofotografija njihovih suspenzija u vodi, primenom Qwin softvera, prikazani su u **tabeli 12.**

**Tabela 12.** Parametri raspodele veličina čestica mikrokapsula suspendovanih u vodi, bez aktivne materije i sa dodatim ekstraktom nevena (1%):  $d_{vs}$ –srednji prečnik;  $\sigma$ –standardna devijacija;  $S$ –specifična površina;  $X$ –najzastupljeniji prečnik.

Parametri	Bez aktivne komponente			Sa ekstraktom nevena		
	Konzentracija SDS (%)					
	0,00	0,35	1,00	0,00	0,35	1,00
$d_{vs}$ ( $\mu\text{m}$ )	7,160	5,999	8,063	6,190	5,882	7,101
$\sigma$ ( $\mu\text{m}$ )	3,318	2,840	3,394	3,164	2,112	3,158
$S$ ( $\text{m}^2/\text{cm}^3$ )	0,838	1,000	0,744	0,969	1,020	0,845
$X$ ( $\mu\text{m}$ )	5,411	4,441	6,639	4,195	5,670	5,557

Može se uočiti da mikrokapsule imaju različite vrednosti  $d_{vs}$  od odgovarajućih emulzija (**tabela 11.**), što je posledica uticaja uslova sušenja i osobina njihovog omotača. U toku procesa sušenja dolazi do pucanja mikrokapsula većih prečnika, prisutnih u većem udelu u emulzijama bez SDS, dok su one malih prečnika odnešene aspiracijom kod emulzija sa 0,35, a naročito kod emulzija sa 1,00% SDS, što svakako utiče na promenu  $d_{vs}$ . Mikrokapsule sa ekstraktom nevena dobijene u uslovima maksimuma interakcije imaju najmanji srednji prečnik i najužu raspodelu veličina, odnosno najmanju standardnu devijaciju. Međutim, na osnovu izloženih rezultata ne može se sa sigurnošću definisati uticaj dodatka ekstrakta nevena na stabilnost omotača mikrokapsula i njihov srednji prečnik.

Sa ciljem ispitivanja efikasnosti postupka mikrokapsulacije suncokretovog ulja bez i sa ekstraktom nevena, uzorci mikrokapsula, dobijeni u uslovima pre, u toku i nakon završene HPMC–SDS interakcije, ekstrahovani su cikloheksanom, a sadržaj ulja u ekstraktu određen spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 234 nm. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na **slici 46.**



**Slika 46.** Masa ekstrahovanog ulja iz uzoraka mikrokapsula bez i sa 1% ekstrakta nevena dobijenih iz 20% emulzija u 1,00% HPMC4 sa različitim koncentracijom SDS.

Uočava se da je nakon 10 min ekstrakcije u cikloheksanu došlo je do potpunog oslobađanja inkapsuliranog ulja. Ekstrakcijom uzoraka mikrokapsula, dobijenih bez SDS, izdvojeno najmanje ulja, što je i očekivano uzimajući u obzir osobine omotača koji čine molekuli HPMC. Mikrokapsule sa ekstraktom nevena, dobijene bez SDS, imaju manji sadržaj inkapsuliranog ulja ( $\approx 0,25$  g<sub>u</sub>/g<sub>mk</sub>) u odnosu na mikrokapsule bez ekstrakta nevena ( $\approx 0,46$  g<sub>u</sub>/g<sub>mk</sub>), što se može pripisati uticaju voskova i smola prisutnih u ekstraktu. Naime, ove materije se verovatno nalaze na granici faza zajedno sa molekulima HPMC, tako da omotač mikrokapsula postaje manje propustljiv u uslovima ekstrakcije sa cikloheksanom.

Najviše ulja ( $\approx 0,9$  g<sub>u</sub>/g<sub>mk</sub>) je izdvojeno iz mikrokapsula dobijenih u uslovima najizraženije HPMC–SDS interakcije (0,35% SDS), što je posledica dobrih filmogenih osobina kompleksa HPMC/SDS. Ekstrakt nevena nema značajniji uticaj na efikasnost mikrokapsulacije.

Mikrokapsule dobijene pri koncentraciji SDS od 1,00%, odnosno nakon završene interakcije, bez i sa ekstraktom nevena, su osetljive na pucanje, pa je i efikasnost mikrokapsulacije smanjena. Može se uočiti da ekstrakt nevena praktično ne utiče na efikasnost mikrokapsulacije u uslovima završene HPMC–SDS interakcije.

Navedenim ispitivanjima potvrđen je dominantan uticaj HPMC–SDS interakcije na proces mikrokapsulacije i osobine dobijenih mikrokapsula, njihovu morfologiju, redispergujuća svojstva, veličinu i raspodelu veličina čestica kao i količinu inkapsuliranog ulja. Pokazano je da se mikrokapsule sa CO<sub>2</sub> ekstraktom nevena dobrih karakteristika mogu dobiti u uslovima najizraženije HPMC–SDS interakcije, pri koncentraciji SDS od 0,35%, primeno *spray drying* postupka mikrokapsulacije.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Na osnovu kvalitativne i kvantitativne GC/MS i GC/FID analize etarskog ulja nevena, dobijenog postupkom destilacije pomoću vodene pare, utvrđeno je da su njegove najzastupljenije komponente:  $\alpha$ -kadinol, T-kadinol i T-muurolol,  $\gamma$ -kadinen, heksadekanska kiselina, ledan, leden i  $\alpha$ -muurolen.
2. Izoternskim povećanjem pritiska ekstrakcije ugljendioksidom u superkritičnoj oblasti (40°C), dolazi do povećanja prinosa, što je slabije izraženo u tečnoj oblasti ekstrakcije (15°C). Sadržaj etarskog ulja u ekstraktima, izražen u odnosu na drogu, je 1,52–2,70 puta veći od njegovog sadržaja određenog destilacijom sa vodenom parom biljnog materijala (0,050% m/m). Ekstrakcijom ugljendioksidom pod pritiskom se, pored “slobodnog” etarskog ulja, ekstrahuju i masna ulja, voskovi i smole, kao i u njima rastvoreno etarsko ulje. Dobijena etarska ulja su kompleksnijeg sastava od etarskog ulja izolovanog iz biljnog materijala oficinalnim postupkom destilacije sa vodenom parom.
3. Etarska ulja izolovana iz CO<sub>2</sub> ekstrakata, kao najzastupljenija, sadrže jedinjenja iz grupe kadinola, i to  $\alpha$ -kadinola, T-kadinola i T-muurolola,  $\gamma$ -kadinena i  $\delta$ -kadinen, koji nije nađen u etarskom ulju izolovanom iz droge. Ova grupa jedinjenja, koja je nosilac farmakološkog delovanja, zastupljena je u znatno većem procentu u etarskim uljima dobijenim iz CO<sub>2</sub> ekstrakata (39,33-60,12%) u odnosu na etarsko ulje izolovano iz droge (28,82%), što ukazuje na njihov bolji farmakološki učinak.
4. Ispitivanje kinetike ekstrakcije rađeno je u superkritinoj oblasti pri pritisku 200 bar. Nađeno je da totalni ekstrakt (6,54%), dobijen nakon 10 sati ekstrakcije, sadrži 4,16 puta više etarskog ulja nego što je nađeno u biljnom materijalu primenom oficinalnog postupka. Produžavanje vremena trajanja ekstrakcije ne utiče značajno na prinos i promenu sastava ekstrakta. Totalni ekstrakt nevena odabran je za dobijanje mikrokapsula sa farmakološkim delovanjem.

5. Interakcija nejonskih derivata celuloze, HPMC, i jonske PAM, SDS, ispitana je primenom metode konduktometrijske titracije. Određivanjem karakterističnih koncentracija SDS, pri kojima interakcija započinje- cac i završava se- psp, definisana je oblast HPMC–SDS interakcije. Za sve ispitivane uzorke HPMC utvrđeno je da cac ima konstantnu vrednost, nižu od cmc SDS-a (0,252% na 30°C), koja ne zavisi od koncentracije polimera, već od osobina molekula polimera, stepena supstitucije i hidrofobnosti prisutnih supstituenata.
6. Utvrđeno je da psp vrednost HPMC linearno zavisi od njegove koncentracije. Na osnovu parametara linearne zavisnosti, karakterističnih za svaki uzorak HPMC, moguće je izračunati vrednost psp za bilo koju koncentraciju HPMC, kao i koncentraciju SDS potrebnu za postizanje željenih uslova interakcije, obuhvaćenu intervalom između cac i psp. Ispitivanjem zavisnosti psp od stepena supstitucije HPMC utvrđeno je da psp raste porastom DS polimera, dok njegova molekulska masa ne utiče na širinu intervala interakcije. Povećanjem temperature sistema HPMC–SDS dolazi do suženja oblasti interakcije, što je posledica smanjene rastvorljivosti polimera, čiji molekuli postaju sklopčani, a aktivni centri manje dostupni molekulima SDS.
7. Primenom viskozimetrijske metode ispitivanja interakcije HPMC–SDS na 30°C, utvrđeno je da se hidrofobno vezivanje molekula SDS za aktivne centre molekula HPMC odvija različitim mehanizmima, u zavisnosti od njegove koncentracije. Pri koncentracijama HPMC nižim od kritične *overlap* koncentracije,  $c^*$ , nakon postizanja cac, dolazi do intramolekulskog povezivanja aktivnih centara molekula micelama SDS, i pojave minimuma redukovano viskoziteta. Pri koncentracijama HPMC iznad  $c^*$ , nakon dostizanja cac dolazi do intramolekulskog povezivanja dva ili više lanaca polimera micelama SDS i obrazovanja trodimenzionalne umrežene strukture, a time i porasta  $\eta_{red}$ . Nakon postizanja psp, viskozitet ne zavisi od daljeg povećanja koncentracije SDS, i ima konstantnu vrednost nižu od rastvora bez prisutva SDS.
8. Ispitivanjem promene unutrašnjeg viskoziteta  $[\eta]$  HPMC na karakterističnim koncentracijama SDS, potvrđeno je da pri koncentracijama ispod cac nema interakcije jer  $[\eta]$  ima istu vrednost kao kada u rastvoru nije prisutan SDS. Na maksimumu interakcije, pri SDS koncentraciji od 0,25%, uočena je nelinearna zavisnost  $\eta_{red}$  od koncentracije HPMC i kompleks HPMC/SDS se ponaša kao polielektrolit. Pri koncentracijama SDS nakon završene interakcije zavisnost  $\eta_{red}$  od koncentracije HPMC ponovo poprima linearan karakter. Promene u konformaciji lanaca polimera, nakon završene interakcije, izražene preko molekularnog ekspanzionog faktora  $\alpha$ , ukazuju da su molekuli HPMC, sklopčani.

9. Viskozimetrijskim ispitivanjima HPMC–SDS interakcije na 20°C, utvrđeno je da se u ovim uslovima mogu primeniti prethodno definisani mehanizmi interakcije. Primena viskozimetrijske metode je pogodna je za rasvetljavanje mehanizama HPMC–SDS interakcije i definisanje promena u konformaciji molekula polimera izazvanih interakcijom.
10. Reološka ispitivanja 1,00% rastvora HPMC1 sa različitom koncentracijom SDS pokazala su da HPMC–SDS interakcija utiče na reološke osobine sistema. Prividni viskozitet rastvora, određen na konstantnoj brzini smicanja, raste sa porastom SDS koncentracije od 0,15 do 0,45%, a zatim postepeno opada do koncentracije 1,25% SDS, nakon koje ima konstantnu vrednost. Koncentracije 0,15% i 1,25% SDS predstavljaju karakteristične koncentracije koje određuju interval interakcije pri koncentraciji HPMC1 1,00%. Promene prividnog viskoziteta pri konstantnoj brzini smicanja, u oblasti HPMC–SDS interakcije, su izrazitije na nižim brzinama smicanja, što ukazuje na strukturaciju sistema, koja se razrušava pri većim brzinama smicanja.
11. Krive proticanja 1,00% rastvora HPMC1 sa različitom koncentracijom SDS pokazuju nenjutnovsko pseudoplastično ponašanje, pri čemu porast SDS koncentracije do 0,45% dovodi do povećanja viskoziteta i stepena nenjutnovskog ponašanja sistema. Dalje povećanje koncentracije SDS izaziva smanjenje stepena nenjutnovskog ponašanja, tako da sistem, nakon završene interakcije, pri koncentraciji SDS 1,25%, pokazuje njutnovski tip proticanja.
12. Ispitivanjem reoloških osobina 20% emulzija u 1,00% HPMC1 sa različitom koncentracijom SDS, pokazala su da HPMC–SDS interakcija utiče na tip proticanja emulzija. Emulzije dobijene u uslovima pre i nakon završene interakcije u kontinualnoj fazi, pokazuju nenjutnovsko pseudoplastično proticanje, dok je kod emulzija dobijenih u uslovima interakcije (0,15-1,00%SDS) prisutna slabo izražena tiksotropija.
13. Analiza veličine i raspodele veličina kapi 20% emulzija u 1,00% HPMC1, pokazala je da se srednji prečnik i stepen polidisperznosti smanjuju sa povećanjem koncentracije SDS u kontinualnoj fazi do 0,45%, što odgovara maksimumu interakcije. Daljim povećanjem koncentracije SDS dolazi do razrušavanja umrežene strukture, međutim, slobodni molekuli SDS doprinose emulgujućim osobinama kontinualne faze, tako da se  $d_{vs}$  i polidisperznost emulzija praktično ne menjaju.
14. Stabilnost emulzija raste sa povećanjem koncentracije SDS u kontinualnoj fazi do 0,45%, pri kojoj kringing indeks ima najmanju vrednost ( $H=10,53\%$ ), što je u saglasnosti sa smanjenjem  $d_{vs}$  i porastom viskoziteta u oblasti SDS koncentracija

0,15-0,45%. Dalje povećanje koncentracije SDS, dovodi do reorganizacije adsorpcionog sloja oko kapi ulja, i smanjene stabilnosti emulzija. Nakon završene interakcije, usled smanjenja viskoziteta kontinualne faze, emulzije pokazuju slabu sedimentacionu stabilnost ( $H > 50\%$ ). Izdvajanje ulja na površini nije primećeno.

15. Sušenjem emulzija primenom *spray drying* postupka dobijen je beli prašak mikrokapsula, u formi agregata. Mikrokapsule formirane u oblasti interakcije su veoma stabilne, sa dobrom sposobnošću redispergovanja. Utvrđeno je da mikrokapsule imaju veće vrednosti  $d_{vs}$  i izraženiju polidisperznost u odnosu na odgovarajuće emulzije, što se može objasniti značajnim uticajem uslova sušenja i osobina omotača (adsorpcionog sloja) na njihov srednji prečnik.
16. U oblasti HPMC–SDS interakcije postignuta je najveća efikasnost mikrokapsulacije. Količina inkapsuliranog ulja kod mikrokapsula sa 0,45% SDS iznosila je  $\approx 0,6 \text{ g}_u/\text{g}_{mk}$ . Mikrokapsule dobijene u uslovima bez SDS i nakon završene interakcije, imaju malu količinu inkapsuliranog ulja, što je posledica lošijih filmogenih osobina omotača.
17. Dodatak odabranog  $\text{CO}_2$  ekstrakta nevena u uljnu fazu (1%) 20% emulzija sa 1,00% HPMC4 dovodi do smanjenja polidisperznosti i srednjeg prečnika kapi emulzija pripremanih bez SDS. Kod emulzija, kod kojih su u kontinualnoj fazi prisutni HPMC i SDS, ekstrakt nevena praktično ne utiče na veličinu i raspodelu veličina kapi.
18. Sedimentaciona stabilnost emulzija u najvećoj meri zavisi od HPMC–SDS interakcije. Dodatak ekstrakta nevena značajno povećava stabilnost jedino emulzije bez SDS. Najveću sedimentacionu stabilnost sa vremenom pokazala je emulzija sa ekstraktom nevena, pripremljena u oblasti najizraženije interakcije (0,35% SDS).
19. Potvrđen je dominantan uticaj HPMC–SDS interakcije na efikasnost postupka mikrokapsulacije. Mikrokapsule sa ekstraktom nevena pri 0,35% SDS imale su najveći sadržaj inkapsuliranog ulja ( $\approx 0,9 \text{ g}_u/\text{g}_{mk}$ ). Takođe, može se zaključiti da komponente koje ulaze u sastav ekstrakta nevena utiču na proces emulgovanja i efikasnost mikrokapsulacije, odnosno na stabilnost adsorpcionih slojeva oko kapi ulja.



## 6. PRILOG

**Tabela P1.** Vrednosti  $c^*$  uzoraka HPMC, na različitim temperaturama, određene kao  $1/[\eta]$ .

Temperatura (°C)	$c^*$ (%)			
	HPMC1	HPMC3	HPMC4	HPMC5
20	0,127	0,080	0,342	1,667
30	0,152	0,109	0,372	2,024

### Konduktometrijska određivanja

**Tabela P2.** Vrednosti  $cac$  i  $psp$  HPMC1 određene konduktometrijskom titracijom na 30°C.

Koncentracija HPMC1 (%)	$cac$ (%)	$psp$ (%)
0,05	0,141	0,295
0,10		0,330
0,20		0,420
0,35		0,530
0,50		0,650

**Tabela P3.** Vrednosti  $cac$  i  $psp$  HPMC3 određene konduktometrijskom titracijom na 30°C.

Koncentracija HPMC3 (%)	$cac$ (%)	$psp$ (%)
0,050	0,114	0,332
0,075		0,356
0,100		0,377
0,150		0,413
0,200		0,457
0,225		0,500

**Tabela P4.** Vrednosti cac i psp HPMC4 određene konduktometrijskom titracijom na 30°C.

Koncentracija HPMC4 (%)	cac (%)	psp (%)
0,05	0,145	0,322
0,10		0,366
0,15		0,400
0,20		0,435
0,35		0,527
0,50		0,583

**Tabela P5.** Vrednosti cac i psp HPMC5 određene konduktometrijskom titracijom na 30°C.

Koncentracija HPMC5 (%)	cac (%)	psp (%)
0,05	0,114	0,345
0,10		0,391
0,15		0,435
0,20		0,479
0,35		0,581

**Tabela P6.** Vrednosti cmc SDS-a, psp i cac 0, 35% rastvora HPMC1 na različitim temperaturama.

Temperatura (°C)	cmc SDS (%)	cac (%)	psp (%)
20	0,273	0,114	0,567
30	0,245	0,141	0,530
40	0,264	0,156	0,450

## Viskozimetrijska odredivanja

Tabela P7. Vrednosti  $\eta_{red}$  rastvora smeša HPMC1–SDS različitih koncentracija određenih na 30°C.

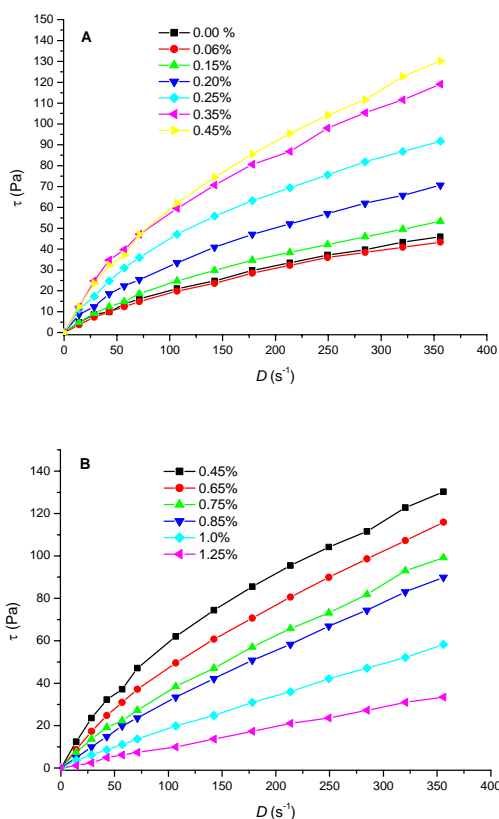
SDS (%)	$\eta_{red}$ rastvora HPMC1 različitih koncentracija (%), na 30°C					
	0,100	0,125	0,150	0,200	0,275	0,350
0,00000	10,2070	11,4161	13,0648	14,9258	19,7967	26,4768
0,02381	9,9553	11,4143	13,0140	14,8999	19,6079	26,5577
0,05882	9,9080	11,5120	12,9627	14,8016	19,5663	26,1045
0,10425	9,8614	11,4326	12,8617	14,9311	19,6856	25,7070
0,14286	9,7444	11,3418	12,8232	14,9134	19,8194	26,1323
0,19626	6,7926	8,4531	9,0259	11,2409	20,1779	31,8958
0,24771	6,5535	7,6648	9,9477	13,1304	22,6511	37,8967
0,29730	6,1447	7,7126	8,4842	10,5971	19,1604	34,6700
0,34513	6,6634	7,1932	8,1691	9,5744	17,0524	28,4971
0,39130	7,6950	7,5129	8,4798	9,0206	12,1414	21,4720
0,45763	8,4284	8,5495	9,2664	9,1241	10,6001	16,5971
0,50000	8,5192	8,9713	9,5852	9,4496	10,3853	14,2706
0,61905	8,3537	9,0528	9,5094	9,7336	10,3267	11,2293
0,692310	8,3360	9,0553	9,2980	9,3937	10,5266	10,9870
0,727280	-	-	-	-	-	11,0848
0,761200	-	-	-	-	-	11,0830

Tabela P8. Vrednosti  $\eta_{red}$  rastvora smeša HPMC1–SDS različitih koncentracija određenih na 20°C.

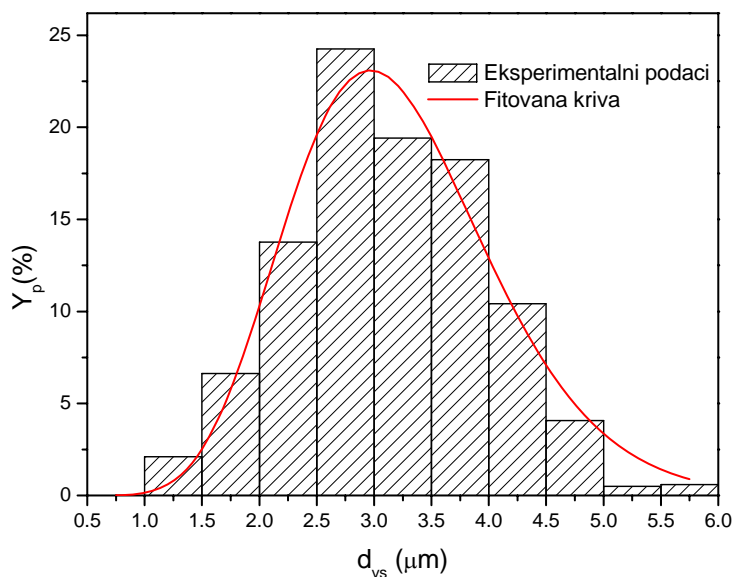
SDS (%)	$\eta_{red}$ rastvora HPMC1 različitih koncentracija (%), na 20°C				
	0,100	0,150	0,200	0,225	0,250
0,0000	11,7130	14,1293	17,4535	19,1071	21,3148
0,0238	11,6720	14,1243	17,4068	19,1223	21,2560
0,0588	11,5850	14,0727	17,2917	19,0136	21,0456
0,1042	11,6190	14,0580	17,1902	18,7714	21,0646
0,1429	11,2900	14,0270	17,1387	18,6999	21,1751
0,1963	8,2370	11,7860	17,3542	20,7001	25,2641
0,2477	7,2840	10,8605	15,9297	18,8348	25,4721
0,2973	7,9700	9,2228	12,1792	14,6473	18,3339
0,3451	8,6020	8,9382	10,5817	12,1436	14,3070
0,3913	8,8430	8,9701	10,0207	10,5041	12,3201
0,4576	8,8820	9,1966	9,7689	10,0608	10,9432
0,5000	8,7840	9,0768	9,9082	10,0571	10,5295
0,6190	8,7100	9,0090	9,7996	9,7973	10,3962
0,6923	8,6930	8,9029	9,6697	9,6522	10,1830
0,7612	8,6270	8,8097	9,0965	9,4794	9,6952
0,8261	8,5990	8,7277	8,9027	9,2669	9,4347

**Tabela P9.** Parametri raspodele veličina kapi, dobijeni računskim putem, za uzorke 20% emulzija u 1,00% HPMC1 sa različitim koncentracijama SDS:  $d_{vs}$ –srednji prečnik ( $\mu\text{m}$ );  $\sigma$ –standardna devijacija ( $\mu\text{m}$ );  $\beta_1$ –asimetrija;  $\beta_2$ –spljoštenost;  $S$ –specifična površina ( $\text{m}^2/\text{cm}^3$ ).

Parametri	Koncentracija SDS (%)									
	0,00	0,15	0,25	0,35	0,45	0,55	0,75	1,00	1,50	2,00
$d_{vs}$	10,799	6,011	4,341	3,308	3,218	3,550	3,084	2,622	2,632	3,022
$\sigma$	5,896	2,717	1,130	0,733	0,899	1,008	0,994	0,643	0,647	0,774
$\beta_1$	1,192	0,817	0,271	0,196	0,312	0,321	0,416	0,240	0,262	0,262
$\beta_2$	4,788	4,226	3,407	3,294	3,468	3,482	3,624	3,360	3,394	3,394
$S$	0,556	0,998	1,382	1,814	1,864	1,690	1,946	2,288	2,280	1,985
Parametri $\Gamma$ raspodele										
$G$	0,691	1,686	0,117	2,991	8,225	2,452	18,481	144,521	125,057	15,136
$m$	2,355	3,894	13,749	19,384	11,798	11,456	8,611	15,642	14,232	14,241
$a$	0,311	0,814	3,398	6,162	3,977	3,500	3,116	6,346	5,788	5,042



**Slika P1.** Krive proticanja 1,00% HPMC1 rastvora pri različitim koncentracijama SDS: A: 0,00–0,45%; B: 0,45–2,00%..



**Slika P2.** Kriva raspodele dobijene fitovanjem eksperimentalnih podataka funkcijom gama  $\Gamma$ -raspodele (10), za 20% emulziju u 1,00% HPMC1 i 0,45% SDS.

**Tabela P10.** Parametri raspodele veličina kapi, dobijeni računskim putem, za uzorke mikrokapsula HPMC1 sa različitim koncentracijama SDS:  $d_{vs}$ –srednji prečnik ( $\mu\text{m}$ );  $\sigma$ –standardna devijacija ( $\mu\text{m}$ );  $\beta_1$ –asimetrija;  $\beta_2$ –spljoštenost;  $S$ –specifična površina ( $\text{m}^2/\text{cm}^3$ ).

Parametri	Koncentracija SDS (%)						
	0,00	0,15	0,25	0,35	0,45	0,75	1,50
$d_{vs}$	6,709	6,565	5,671	4,143	6,247	5,525	7,293
$\sigma$	3,161	3,262	2,806	1,615	2,837	3,033	3,636
$\beta_1$	0,888	1,230	0,979	0,608	0,825	1,206	0,995
$\beta_2$	4,332	4,844	4,469	3,911	4,237	4,808	4,492
$S$	0,894	0,918	1,058	1,448	0,961	1,086	0,823
<b>Parametri <math>\Gamma</math> raspodele</b>							
$G$	0,728	2,070	1,819	2,763	0,765	3,464	0,772
$m$	3,498	2,254	3,107	5,637	3,857	2,314	3,017
$a$	0,670	0,498	0,726	1,604	0,778	0,602	0,551

**Tabela P11.** Parametri raspodele veličina kapi, dobijeni računskim putem, za uzorke 20% emulzija u 1,00% HPMC4, bez aktivne komponente i sa dodatim ekstraktom nevena (1%), pri različitim koncentracijama SDS:  $d_{vs}$ –srednji prečnik ( $\mu\text{m}$ );  $\sigma$ –standardna devijacija ( $\mu\text{m}$ );  $\beta_1$ –asimetrija;  $\beta_2$ –spljoštenost; S–specifična površina ( $\text{m}^2/\text{cm}^3$ ).

Parametri	Bez aktivne komponente			Sa ekstraktom nevena		
	Koncentracija SDS (%)					
	0,00	0,35	1,00	0,00	0,35	1,00
$d_{vs}$	11,619	4,154	2,940	7,081	3,679	2,765
$\sigma$	6,737	1,760	0,777	2,941	1,530	0,660
$\beta_1$	1,345	0,718	0,279	0,690	0,692	0,228
$\beta_2$	5,017	4,077	3,419	4,035	4,037	3,342
S	0,516	1,444	2,041	0,847	1,631	2,170
Parametri $\Gamma$ raspodele						
<b>G</b>	0,917	10,708	17,929	0,152	8,543	39,664
<b>m</b>	1,793	13,255	13,526	5,040	4,782	16,870
<b>a</b>	0,278	4,599	4,947	0,855	1,572	6,450

**Tabela P12.** Parametri raspodele veličina kapi, dobijeni računskim putem, za uzorke mikrokapsula HPMC4, bez aktivne komponente i sa dodatim ekstraktom nevena (1%), pri različitim koncentracijama SDS:  $d_{vs}$ –srednji prečnik ( $\mu\text{m}$ );  $\sigma$ –standardna devijacija ( $\mu\text{m}$ );  $\beta_1$ –asimetrija;  $\beta_2$ –spljoštenost; S–specifična površina ( $\text{m}^2/\text{cm}^3$ ).

Parametri	Bez aktivne komponente			Sa ekstraktom nevena		
	Koncentracija SDS (%)					
	0,00	0,35	1,00	0,00	0,35	1,00
$d_{vs}$	8,129	5,876	9,314	6,202	7,192	6,796
$\sigma$	4,703	2,905	5,004	3,461	3,316	2,902
$\beta_1$	1,339	0,978	1,154	1,245	0,851	0,729
$\beta_2$	5,008	4,467	4,732	4,868	4,276	4,094
S	0,738	1,021	0,644	0,967	0,834	0,883
Parametri $\Gamma$ raspodele						
<b>G</b>	1,408	1,701	0,588	2,505	0,536	0,295
<b>m</b>	1,987	3,092	2,463	2,213	3,688	4,492
<b>a</b>	0,367	0,696	0,372	0,518	0,651	0,808

## 7. LITERATURA

1. Q. Lang, C. M. Wai. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies- a practical review. *Talanta*, 53, 771-782 (2001).
2. P. Chatzopoulou, A. De Han S. Katsiotis, Investigation of the Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Volatile Constituents from *Juniperus communis*. *Planta Med.*, 68, 827-831 (2002).
3. H. Ebrahimzadeh, Y. Yamini, F. Sefidkon, M. Chaloosi, S. Pourmortazavi, Chemical composition of essential oil and supercritical CO<sub>2</sub> extracts from Marigold (*Calendula officinalis*). *Food Chem.*, 83, 357-361 (2003).
4. M. Khajeh, Y. Yamini, F. Sefidkon, N. Bahramifar, Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chem.*, 86, 587-591 (2004).
5. B. Pekić, Ekstrakcija lekovitog bilja gasovima pod pritiskom. Kongres farmaceuta Jugoslavije, X Zbornik radova I (plenarni referati), Novi Sad, 151-166 (1988).
6. Z. Zeković, Ekstrakcija timijana (*Thymus vulgaris* L.) superkričnim ugljendioksidom, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki Fakultet (1998).
7. M. R. A. Rodrigues, E. B. Caramao, J. G. Dos Santos, C. Dariva, J. V. Oliveira. The effects of temperature and pressure on the characteristics of the extracts from high-pressure CO<sub>2</sub> extraction of the *Majoran hortensis* Moench. *J. Agric. Food. Chem.*, 51, 453-456 (2003).
8. N. Aghel, Y. Yamini, A. Hadjiakhoondi, S. Pourmortazavi, Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Talanta*, 64, 407-411 (2004).
9. A. Careda, B. Maringou, S. Proceda, C. Soro. Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Characterization of *Laurus nobilis* Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1492-1496 (2002).
10. B. Maringou, A. Piras, S. Proceda, A. Scorciapino. Chemical Composition of the Essential Oil and Supercritical CO<sub>2</sub> Extract of *Commiphora myrrha* (Nees) Eng. and of *Acorus calamus* L. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7939-7943 (2005).
11. D. Baumann, S. Adler, S. Grüner, F. Otto, B. Weinreich M. Hamburger, Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Marigold at High Pressures: Comparison of Analytical and Pilot-scale Extraction. *Phytochem. Analysis*, 15, 226-230 (2004).
12. L. Campos, E. Michielin, L. Danielski S. Ferreira, Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. *J. Supercrit. Fluid.*, 34, 163-170 (2005).

13. N. Crabas, B. Marongiu, A. Piras, T. Pivetta S. Porcedda, Extraction, Separation and Isolation of Volatiles and Dyes from *Calendula officinalis* L. and *Aloysia tryphilla* (LHer). *J. Essent. Oil Res.*, 15, 350-355 (2003).
14. J. Tucakov: *Lečenje biljem*, Rad, Beograd (1986).
15. P. Lukić: *Farmakognozija*, Farmaceutski fakultet, Beograd (1989).
16. M. Yoshikawa, T. Murakami, A. Kishi, T. Kaguera, H. Matsuda, Medicinal Flowers. III. Marigold. (1): Hypoglycemic, Gastric Emptying Inhibitory, and Gastroprotective Principles and New Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, Calendasaponins A, B, C and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 49, 863-870 (2001).
17. K. Soliman, R. Badeaa, Effect of oil extracted from some medicinal plant on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1669-1675 (2002).
18. S. Lavagna, D. Secci, P. Chimenti, L. Bonsignore, A. Ottaviani, B. Bizzarri, Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. *Il Farmaco*, 56, 451-453 (2001).
19. T. Akihisa, K. Yasukawa, H. Oinuma, Y. Kasahara, S. Yamanouchi, M. Takido, K. Kumaki, T. Tamura, Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, 43, 1255-1260 (1996).
20. K. Zitterl-Eglseer, S. Sosa, J. Jurenitsch, m. Schubert-Zsilavec, R. Della Loggia, A. Tubaro, M. Bertoldi, C Franz, Anti-oedematous activities of the main triterpenol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Ethnopharmacol.*, 57, 139-144 (1997).
21. G. Miliauskas, P. R. Venskutonis, T. A. van Beek, Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant. *Food Chem.*, 85, 231-237 (2004).
22. C. Cordova, I. Siquera, C. Netto, R. Yunes, A. Volpato, V. Filho, R. Curi-Pedrosa, T. Creczynski-Pasa, Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action of free radical scavenger. *Redox Report*, 7, 95-102 (2002).
23. E. Bakó, J. Deli, G. Tóth, HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 53, 241-250 (2002).
24. A. Bilia, M. Bergonzi, S. Gallori, G. Mazzi, F. Vincieri, Stability of the constituents of *Calendula*, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 613-624 (2002).
25. M. Hamburger, S. Adler, D. Baumann, A. Förg, B. Weinreich, Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia*, 74, 328-338 (2003).
26. DAB 8, *Deutsches Arzneibuch* 8. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag and Govi-Verlag, Frankfurt, Germany (1978).
27. J. Chalchat, R. Garry, A. Michet, Chemical composition of essential oil of *Calendula officinalis* L. *Flavour Frag. J.*, 6, 189-192 (1991).
28. M. Takei, A. Umeyama, S. Arihara, T-cadinol and calamenene induce dendritic cells from human monocytes and drive Th1 polarization, *Eur J Pharmacol.*, 537, 190-199 (2006).
29. B. Lindman: *Surfactant-Polymer Systems*. In *Handbook of applied surface and colloid chemistry*, Vol. 1-2, Ed. by Krister Holmberg, John Wiley & Sons Ltd., 445-463 (2002).



30. K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg, B. Lindman: Surfactant and Polymers in Aqueous Solution. John Wiley & Sons Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex. (2002).
31. B Lindman, A. Carlsson, S. Gerdes, G. Karlström, L. Picullel, T. Thalberg, K. Zhang, Polysaccharide-Surfactant Systems: Interactions, Phase Diagrams, and Novel Gels. In Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties. P.Walstra and E. Dickinson. Eds. The Royal Society of Chemistry, 113-125 (1993).
32. B Lindman, T. Thalberg, Polymer-surfactant interaction- recent developments. u D. E. Goddard (Ed.) Interaction of surfactants with polymers and proteins, Boca Ration, FL: CRC Press, 203-275 (1993).
33. J. C. Brackman, N. M. van Os, J. B. F. N. Engberts, Polymer-nonionic micelle complexation. Formation of poly (propylene oxide)-complexed n-octyl thioglucoside micelles. Langmuir, 4, 1266-1272 (1988).
34. F, M, Winik, Application of fluorescence spectroscopy to the study of polymer–surfactant interactions, u D. E. Goddard (Ed.) Interaction of surfactants with polymers and proteins, Boca Ration, FL: CRC Press, 367-414 (1993).
35. K. Hayakawa, J. C: T: Kwak, Study of surfactant-polyelectrolyte interactions. Binding of dodecyl and tetradecyltrimethylammonium bromide by some carboxylic polyelectrolytes. Macromolecules, 16, 1642-1649 (1983).
36. K. Hayakawa, J. C: T: Kwak, Study of surfactant-polyelectrolyte interactions. II Effect of multivalent counterion the binding of dodecyltrimethylammonium ions by sodium dextran sulfate and sodium poly (styrenesulfonate). J. Phys.Chem., 87, 506-512 (1983).
37. K. P. Ananthapadmanabhan, Protein-surfactant interactions. u D. E. Goddard (Ed.) Interaction of surfactants with polymers and proteins, Boca Ration, FL: CRC Press, 319-365 (1993).
38. C. Holmberg, L. O. Sundelöf, Temperature Dependence of Hydrodynamic properties and Surfactant-Polymer Interaction in Solution The EHEC/SDS/Water System. Langmuir, 12(4), 883-889 (1995).
39. I. Nahrngbauer, Polymer-Surfactant Interaction As Revealed by the Time Dependence of Surface Tension. The EHEC/SDS Water System. Langmuir, 13, 2242-2249 (1997).
40. D. Myers, Surfactants in Solution: Monolayer and Micelles, u D Myers Surfactant Science and Tecnology, 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, 107-150 (2006).
41. A. D. Bó, B. Schweitzer, A. C. Felipe, D. Zanette, B. Lindman, Ethyl(hydroxyethyl)cellulose–sodium dodecanoate interaction investigated by surface tension and electrical conductivity techniques, Colloids Surf A, 256, 171-180 (2005).
42. I. Garsia-Mateos, S. Perez, M. Velasquez, Interaction between Cetyl Pyridinium Chloride and Water-Soluble polymers in Aqueous Solutions. J. Colloid Interf. Sci., 194, 356-363 (1997).
43. E. Minatti, D. Zanette, Salt effects on the interaction of poly(ethylene oxide) and sodium dodecyl sulfate measured by conductivity. Colloid Surf. A, 113, 237-246 (1996).
44. D. Zanette, V. Frescura, Ideal Mixing of Polymer-Surfactant complexes of Polyethylen oxide and Sodium Dodecyl Sulfate plus Sodium Dodecanoate. J. Colloid Interf. Sci., 213, 379-385 (1999).
45. D, Zanette, V. Soldi, A. Romani M. Gehlen, The Role of the Carboxylate Head Group in the Interaction of Sodium Dodecanoate with Poly(ethylene oxide) Investigated by

- Electrical Conductivity, Viscosity, and Aggregation Number Measurements. *J. Colloid Interf. Sci.*, 246, 387-392 (2002).
46. C. Holmberg, S. Nilsson, S. Sigh, L. O. Sundelof, Hydrodynamic and thermodynamic aspects of SDS-EHEC-water system. *J. Phys. Chem.* 96, 871-880 (1992).
  47. L. M. Zhang, Cellulosic associative thickeners. *Carbohydrate Polym.*, 45, 1-10 (2001).
  48. D. E. Goddard, Polymer-surfactant interaction. Part I. Uncharged water soluble polymers and charged surfactants. u D. E. Goddard (Ed.) *Interaction of surfactants with polymers and proteins*, Boca Ration, FL: CRC Press, 123-169 (1993).
  49. S. K. Singh, S Nilsson, Thermodynamics of Interaction between Some Cellulose Ethers and SDS by Titration Microcalorimetry, I EHEC and HPMC. *J. Colloid Interf. Sci.*, 213, 133-151 (1999).
  50. Y. Touhami, D. Rana, G. H. Neale, V. Hornof, Study of polymer-surfactant interaction via surface tension measurements. *Colloid Polym. Sci.* 279, 297-300 (2001).
  51. L. P. Hormnirun, A. Sirivat, A. M. Jamieson, Complex formation between hydroxypropylcellulose and hexadecyltrimethylammonium bromide as studied by light scattering and viscometry, *Polymer*, 41, 2127-2132 (2000).
  52. A. El Ghzaoui, J. L. Trompette, G. Cassanas, L. Bardet, E. Fabregue, Comparative Rheological Behavior of Some Cellulosic Ether Derivatives. *Langmuir*, 17, 1453-1456 (2001).
  53. S. Nilsson, Interaction between Water-Soluble Cellulose Derivatives and Surfactants. 1. The HPMC/SDS/Water System. *Macromolecules*, 28, 7837-7844 (1995).
  54. A. Avranas, P. Iliou, Interaction between hydroxypropylmethylcellulose and the anionic surfactants hexane-, octane-, and decanesulfonic acid sodium salts, studied by dynamic surface tension measurements. *J. Colloid Interf. Sci.*, 258, 102-109 (2002).
  55. R. de Martins, C. M. Becker, D. Samios, C. I. Bica, Interaction of (Hydroxypropylmethyl)cellulose with Anionic Surfactants. *Macromol. Symp.*, 287-296 (2006).
  56. B. Wittgren, M. Stefansson, B. Porsch, Interaction between sodium dodecyl sulfate and non-ionic cellulose derivatives studied by size exclusion chromatography with online multi-angle light scattering and refractometric detection. *J. Chromatograph.* 1082, 166-175 (2005).
  57. D. Myers, *Emulsions*, u D. Myers *Surfactant Science and Tecnology*, 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, 280-321 (2006).
  58. I. Capek, Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv. Colloid Interfac.*, 107, 125-155 (2004).
  59. W. M. Kulicke, O. Arendt, M. Berger, Characterization of hydroxypropylmethylcellulose-stabilized emulsions, Part I: Particle size determination *Colloid Polym. Sci.*, 276, 1019-1023 (1998).
  60. W. M. Kulicke, O. Arendt, M. Berger, Characterization of hydroxypropylmethylcellulose-stabilized emulsions, Part II: The flow behavior. *Colloid Polym. Sci.*, 276, 1024-1031 (1998).
  61. D. Myers, *Colloids and Colloidal Stability*, u D, Myers *Surfaces, Interfaces and Colloids: Principles and Applications*, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd., New York, 214-252 (1999).

62. J. van Duijneveldt, Effect of Polymers on Colloid Stability. In Colloid Science, Principles, Methods and Applications, Ed. T. Cosgrove, Blackwell Publ. Ltd., Bristol, 143-179 (2005).
63. M. Malmsten, Surfactant and Polymers in Drug Delivery. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, (2002).
64. C. Wollenweber, A. V. Makievski, R. Miller, R. Daniels, Adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect on emulsion stability. Colloid Surf. A, 172, 91-101 (2000).
65. E. Dickinson, Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed system. Food Hydrocolloid. 17, 25-39 (2003).
66. The Merck index, tenth edition. Ed. Martha Windholz, Merck & Co. Inc., Rahway, N. Y. U.S.A., 1983.
67. United States Pharmacopoeia, nineteenth revision. Mack Printing Company, Easton Pa (1975).
68. G. K. Greminger, A. B. Savage, Methylcellulose and its derivatives. In Industrial Gums, Academic Press, New Yourk., 619-644 (1973).
69. O. E. Perez, C. C. Sanchez, J. M. Rodriguez Patino, A. M. Pilosof, Thermodynamic and Dynamic Characteristic of Hydroxypropylmethyl cellulose Adsorbed Films at the Air-Water Interface. Biomacromolecules, 7, 338-393 (2006).
70. V. Michailova, St. Titeva, R. Kotsilkova, E. Krusteva, E. Minkov, Influence of aqueous medium on viscoelastic properties of carboxymethylcellulose sodium, hydroxypropylmethyl cellulose and thermally pre-gelatinized starch gels. Colloid Surf. A, 149, 515-520 (1999).
71. C. Alvarez-Lorenzo, R. Duro, J. L. Gomez-Amoza, R. Martinez-Pacheco, C. Suto, A. Concheiro, Influence of polymer structure on the rheological behavior of hydroxypropylmethylcellulose-sodium carboxymethyl-cellulose dispersions. Colloid Polym. Sci., 279, 1045-1057 (2001).
72. A. S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications. Adv. Drug Deliver. Rev. 43, 3-12 (2003).
73. V. Sovilj, Makromolekuli u procesima mikrokapsulacije, monografija, Tehnoloski fakultet, Novi Sad (2000).
74. M. I. Re, Microencapsulation by spray drying. Dry. Technol., 16, 1195-1236 (1998).
75. P. M. M. Schrooyen, R. van der Meer, C. G. de Kruif, Microencapsulation: its application in nutrition. Proceedings of the Nutrition Society, 60, 475-479 (2001).
76. Liposome Dermatics, Griesbach Conference, Eds. O. Braun-Falko, H. C. Korting, H. I. Maibach, Springer-Verlag (1992).
77. J. Loksuan, Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. Food Hydrocolloid., 21, 928-935 (2007).
78. I. Pedroza-Islas, E. J. Vernon-Carter, C. Duran-Dominguez, S. Trejo-Martinez, Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation – I. Microcapsule particle size, morpholpgy and microstructure. Food Res. Int., 32, 367-374 (1999).
79. Q. Zhao, B. Li, pH-controlled drug loading and release from biodegradable microcapsules. Nanomedicine: NBM, article in press, 4, 302-310 (2008).

80. A. Lamprecht, U. F. Schäffer, C. M. Lehr, Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: Structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 49, 1-9 (2000).
81. A. Gharsallaoui, G. Roudant, O. Chambin, A. Voilley, R. Saurel, Application of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.*, 40, 1107-1121, (2007).
82. M. Song, N. Li, S. Sun, L. R. Tiedt, W. Liebenberg, M. M. de Villiers, Effect of Viscosity and Concentration of Wall Former, Emulsifier and Pore-Inducer on the Properties of Amoxicillin Microcapsules Prepared by Emulsion Solvent evaporation. *Il Farmaco*, 60, 261-267 (2005).
83. Y. D. Kim, C. V. Morr, T. W. Schenz, Microencapsulation properties of gum Arabic and several food proteins: Liquid orange oil emulsion particles. *J. Agr. Food Chem.*, 44, 1308-1313 (1996).
84. S. Gouin, Micro-encapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Tech.*, 15, 330-347 (2004).
85. D. Ermis, A. Yuksel, Preparation of spray-dried microspheres of indomethacin and examination of the effect of coating on dissolution rates. *J. Microencapsul.*, 16, 315-324 (1999).
86. W. Kolanowski, G. Laufenberg, B. Kunz, Fish oil stabilization by microencapsulation with modified cellulose. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 4, 333-343 (2004).
87. C. Wischke, S. P. Schwendeman, Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.*, 364, 298-327 (2008).
88. V. Sovilj, Lj. Đaković, P. Dokić, Influence of Surfactant-Protein Interaction on the Wall Structure of Microcapsules. *J. Colloid Interf. Sci.*, 158, 483-487 (1993).
89. V. Sovilj, P. Dokić, M. Sovilj, A. Erdeljan, Influence of surfactant-gelatin interaction on microcapsule characteristics. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 100, 235-240 (1996).
90. J. Siepmann, N. A. Peppas, Modeling of drug release from delivery system based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliver. Rev.* 48, 139-157 (2001).
91. M. A. Solinis, Y. de la Cruz, R. M. Hernandez, A. R. Gascon, B. Calvo, J. L. Pedraz, Release of ketoprofen enantiomers from HPMC K100M matrices-diffusion studies. *Int. J. Pharm.*, 239, 61-68 (2002).
92. C. Washington, Drug release from microdisperse systems: critical review. *Int. J. Pharm.*, 50, 1-12 (1990).
93. X. Y. Shi, T. W. Tan, Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application on control release of Vitamine D2. *Biomaterials*, 23, 4469-4473 (2002).
94. A. Martinac, J. Filipović-Grčić, M. Barbarić, B. Zorc, D. Voinovich, I. Jalšenjak, Gemfibrozil encapsulation and release from microspheres and macromolecular conjugates. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 17, 207-216 (2002).
95. Lj. Đaković, S. Milošević, V. Sovilj, Influence of Surfactants on the Rheological Behavior of Starch/Gelatin Gels and Gel-Emulsions. *Starch/Stärke*, 46, 266-272 (1994).
96. M. L. Zhang, Synergistic blends from aqueous solutions of two cellulose derivatives. *Colloid Polym. Sci.*, 277, 886-890 (1999).
97. L. Petrović, Ž. Lepojević, V. Sovilj, D. Adamović, V. Tešević, An investigation of CO<sub>2</sub> extraction of Marigold (*Calendula officinalis* L.), *Journal of Serbian Chemical Society*, 72(4), 407-413 (2007).

98. L. Petrović, Ž. Lepojević, V. Sovilj, D. Adamović, V. Tešević, Composition of essential oil obtained from tubular, head and ligulate flowers of *Calendula officinalis* L. by steam distillation of plant material and CO<sub>2</sub> extracts, *J Essent Oil Res.*, 22, 143-146 (2010).
99. V. Sovilj, Conductometric and potentiometric investigation of ionic surfactant-gelatin interaction, *Colloid Polym. Sci.*, 276, 328-334 (1998).
100. Lj. Đaković, *Koloidna hemija*, Tehnološki fakultet, Zavod za izdavanje udžbenika, Novi Sad, (1990).
101. V. Sovilj, L. Petrović, Influence of molecular characteristic of nonionic cellulose ethers on their interaction with ionic surfactant investigated by conductometry, *Colloid Polym. Sci.*, 284, 334-339 (2005).
102. V. Sovilj, L. Petrović, Influence of hydroxypropylmethyl cellulose-sodium dodecylsulfate interaction on the solution conductivity and viscosity and emulsion stability, *Carbohydr. Polym.*, 64, 41-49 (2006).
103. H. W. Jiang, J. S. Han, Viscosity of nonionic polymer/anionic surfactant complexes in water, *J. Colloid Interf. Sci.*, 229, 1-5 (2000).
104. D. E. Goddard, Polymer/Surfactant interaction: Interfacial Aspects, *J. Colloid Interf. Sci.*, 256, 228-235 (2002).
105. C. Clasen, W. M. Kulicke, Determination of viscoelastic and rheo-optical material functions of water-soluble cellulose derivatives, *Prog. Polym. Sci.* 26, 1839-1919 (2001).
106. P. Becher, *Encyclopedia of emulsion technology*, Marcel Dekker, New York, (1996).
107. E. S. Friberg, A few common sense observation on emulsion stability, *Proceedings of the second world congress on emulsion*, Bordeaux, France, Vol, 4, 43-46 (1997).
108. D. Kelley, J. D. Mc Clements, Influence of the sodium dodecyl sulfate on the thermal stability of bovine serum albumin stabilized oil-in-water emulsions, *Food Hydrocolloid.*, 17, 87-93 (2003).
109. V. Sovilj, L. Petrović, Microencapsulation of sunflower oil in the system hydroxypropylmethyl cellulose-sodium dodecylsulfate, XVII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, 23-25. Sept., 2004., *Proceedings*, BFT-3, 1-4 (2004).
110. M. Rosenberg, I. J. Kopelman, Y. Talmon, Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials, *J. Agr. Food Chem.* 50, 139-144 (1985).
111. J. Loksuan, Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin, *Food Hydrocolloids* 21, 928-935, (2007).
112. G. Pratap, V. S. Bhaskar Rao, Evaluation of Surface Active Properties of Saponins Isolated from *Acacia concinna* D. C. Pods, *Lipid-Fatt*, 89, 205-208 (2006).

## 8. SIMBOLI

**PAM** – površinski aktivna materija  
**CO<sub>2</sub>** – ugljendioksid  
**PVP** – polivinil pirolidon  
**PVA** – polivinil alkohol  
**PEO** – polietilen oksid  
**PPO** – polipropilen oksid  
**OTG** – oktitioglukozid  
**HEC** – hidroksietil celuloza  
**HMC** – hidroksimetil celuloza  
**MC** – metil celuloza  
**HPMC** – hidroksipropilmetil celuloza  
**SDS** – natrijum dodecilsulfat (sodium dodecylsulfate)  
**GC/MS** – gasni hromatograf u kombinaciji sa masenim detektorom  
**GC/FID** – gasni hromatograf u kombinaciji sa plameno-jonizujućim detektorom  
**d<sub>vs</sub>** – srednji zapreminsko-površinski prečnik  
**DS** – stepen supstitucije  
**cmc** – kritična micelarna koncentracija  
**cac** – kritična agregaciona koncentracija  
**psp** – kritična koncentracija zasićenja  
**σ** – standardna devijacija  
**β<sub>1</sub>** – asimetrija  
**β<sub>2</sub>** – spljoštenost  
**γ<sub>1</sub>** – koeficijent asimetrije  
**γ<sub>2</sub>** – koeficijent spoljoštenosti  
**S** – specifična površina  
**X** – najverovatniji prečnik  
**SEM** – skening elektronska mikroskopija  
**c\*** – kritična *overlap* koncentracija  
**UV** – ultra ljubičasti  
**FAS** – farmakološki aktivne supstance  
**RT** – retenciono vreme  
**η<sub>red</sub>** – redukovani viskozitet  
**[η]** – unutrašnji viskozitet  
**η<sub>a</sub>** – prividni viskozitet