

# Optimiranje procesa pripreme mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu

---

**Grgić, Filip**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:467788>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Filip Grgić

1270/BPI

**OPTIMIRANJE PROCESA  
PRIPREME MIKROEMULZIJA U  
MIKROPROTOČNOM SUSTAVU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc dr.sc. Ane Jurinjak Tušek, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr.sc. Davora Valingera.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se tvrtki Anton Paar Croatia d.o.o. na posudbi instrumenta Litesizer 500. Zahvaljujem se doc.dr.sc. Ani Jurinjak Tušek na ugodnoj suradnji i velikoj pomoći pri izradi diplomskog rada i svim njegovim segmentima, kao i doc.dr.sc. Davoru Valingeru, doc.dr.sc. Maji Benković i doc.dr.sc. Tamari Jurina na pomoći kod izvođenja eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### Optimiranje procesa pripreme mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu

*Filip Grgić, 1270/BPI*

**Sažetak:** U ovom radu proveden je postupak optimiranja pripreme mikroemulzija ulje u vodi i ulje i vodenom ekstraktu mente u mikroprotočnom sustavu uz emulgator polietilen glikol (PEG1500, 6000 i 20000). Ispitan je utjecaj količine emulgatora, količine ulja i ukupnih protoka na stabilnost mikroemulzija koja je izražena zeta potencijalom i Feretovim promjerom te su određeni optimalni procesni uvjeti za 6 sustava pripreme mikroemulzija. Na temelju dobivenih vrijednosti zeta potencijala kao najstabilnije su se pokazale emulzije pripremljene s vodom kao kontinuiranom fazom i emulgatorom PEG1500 te je uočeno da vrijednost zeta potencijala opada porastom molekulske mase upotrijebljenog emulgatora. Nadalje izabrani emulgatori ne osiguravaju zadovoljavajuću stabilnost emulzija ako se kao kontinuirana faza upotrijebi vodeni ekstrakt mente. Umjetne neuronske mreže pokazale su se pouzdanima u predviđanju Feretovog promjera kapljica emulzija ulje u vodi za sve analizirane sustave.

**Ključne riječi:** mikroemulzije, mikroprotočni sustavi, optimiranje, NIR spektroskopija, umjetne neuronske mreže,

**Rad sadrži:** 56 stranica, 18 slika, 8 tablica, 70 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Ana Jurinjak Tušek, doc.dr.sc

**Pomoć pri izradi:** Davor Valinger, doc.dr.sc.

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Davor Valinger
2. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
3. Doc.dr.sc. Maja Benković
4. Doc.dr.sc. Antonija Trontel (zamjena)

**Datum obrane:** 29.09.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of process engineering  
Laboratory for measurement, control and automatization

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### Optimisation of microemulsion production in microfluidic system

*Filip Grgić, 1270/BPI*

**Abstract:** In this work, optimisation of oil in water and oil in peppermint extract microemulsion preparation in microfluidic system using polyethylene glycol as emulsifier (PEG 1500, 6000 and 20000) was performed. The effect of the emulsifier amount, oil amount and total flow rate on the microemulsion stability expressed as zeta potential and Feret diameter was analysed. Optimal process conditions for microemulsion preparations were estimated for all 6 analysed systems. Based on the zeta potential, the most stable emulsions were prepared with water as continuous phase and using PEG 1500 as emulsifier. It was observed that with the increase of emulsifier molecular weight value of zeta potential decreases. Furthermore, the selected emulsifiers did not ensure satisfactorily stability for emulsions when the aqueous extract of mint was used as the continuous phase. Artificial neural networks (ANNs) were shown reliable for prediction of Feret diameter of droplets in oil in water emulsions for all analysed systems.

**Keywords:** microemulsions, microfluidic systems, optimization, NIR spectroscopy, artificial neural networks

**Thesis contains:** 56 pages, 18 figures, 8 tables, 70 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Davor Valinger, Assistant professor*

#### Reviewers:

1. PhD. *Davor Valinger, Assistant professor*
2. PhD. *Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor*
3. PhD. *Maja Benković, Assistant professor*
4. PhD. *Antonija Trontel, Assistant professor (substitute)*

**Thesis defended:** 29.09.2020.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. MIKROEMULZIJE.....	2
2.1.1 Prednosti i primjena mikroemulzija.....	3
2.1.2 Klasični postupci pripreme mikroemulzija.....	5
2.2 MIKROPROTOČNI SUSTAVI.....	7
2.2.1 Osnovne karakteristike, prednosti i nedostaci .....	7
2.2.2 Primjena mikroprotočnih sustava za pripremu mikroemulzija .....	8
2.3 FIZIKALNA SVOJSTVA KOJA UTJEČU NA STRUJANJE U MIKROKANALIMA .....	9
2.3.1 Močivost, kapilarni tlak, viskozne sile u mikrokanalima .....	9
2.3.2 Režimi strujanja dvofaznih sustava u mikrokanalima .....	11
2.3.3 Modeliranje dvofaznih režima strujanja u mikrokanalima .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
3.1 MATERIJALI .....	14
3.1.1. Otapala i reagensi .....	14
3.1.2 Oprema i uređaji .....	14
3.1.3. Programski paketi .....	14
3.2 METODE .....	15
3.2.1. Metoda odzivnih površina za optimiranje procesa pripreme mikroemulzija .....	15
3.2.2. Priprema vodenoga ekstrakta mente .....	16
3.2.3. Priprema otopina polietilen glikola (PEG) .....	17
3.2.4. Određivanje fizikalnih svojstva komponenata za pripremu mikroemulzija.....	17
3.2.4.1. Određivanje gustoće.....	17
3.2.4.2. Određivanje viskoznosti.....	17
3.2.5. Analiza profila strujanja dvofaznog sustava voda-ulje u mikroprotočnom sustavu .....	18
3.2.6. Priprema mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu.....	18
3.2.7. Određivanje Feretovog promjera kapljica u mikroemulzijama ulje u vodi .....	19
3.2.8. Mjerenje zeta potencijala mikroemulzija.....	19
3.2.9. Snimanje NIR spektra mikroemulzija ulje u vodi.....	19
3.2.10. Analiza dinamike destabilizacije mikroemulzija .....	20
3.2.11. Statistička analiza i modeliranje .....	20
3.2.11.1. Analiza osnovnih komponenata (PCA) NIR spektara mikroemulzija .....	20
3.2.11.2. Umjetne neuronske mreže za predikciju Feretovog promjera kapljica u mikroemulzijama ....	20
3.2.11.3. Procjena kinetičkih parametara destabilizacije mikroemulzija .....	21
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
4.1 ODREĐIVANJE FIZIKALNIH SVOJSTVA KOMPONENATA ZA PRIPREMU MIKROEMULZIJA .....	22
4.2 ANALIZA PROFILA STRUJANJA DVOFAZNOG SUSTAVA U MIKROPROTOČNOM SUSTAVU.....	24
4.3 OPTIMIRANJE UVJETA PRIPREME MIKROEMULZIJA U MIKROPROTOČNOM SUSTAVU .....	26
4.4 KINETIKA DESTABILIZACIJE EMULZIJE .....	41
4.5. ANALIZA NIR SPEKTARA MIKROEMULZIJA I PRIMJENA MODELA UMJETNIH NEURONSKIH MREŽA ZA PREVIĐANJE SREDNJEG FERETOVOG PROMJERA KAPLJICA .....	43
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>49</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>50</b>



## 1. UVOD

Zbog svojih svojstava prednosti kao što su spontano formiranje s relativno jednostavnim komponentama, mogućnosti korištenja kao nosača hidrofилnih i lipofilnih tvari te sposobnosti poboljšanja biološke dostupnosti i stabilnosti biološki aktivnih spojeva, mikroemulzije su našle široko područje primjene. Koriste se u kemijskoj, tekstilnoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, kozmetici, biomedicini i biotehnologiji. Konvencionalno se mikroemulzije proizvode tehnologijama koje se temelje na usitnjavanju kapljica pomoću smicanja ili udarnog naprezanja koje se stvara ručnim ili mehaničkim miješanjem. Zbog neujednačenih naprezanja u cijelom sustavu, emulzije proizvedene na opisan način se sastoje od kapljica različitih veličina. Kao alternative klasičnim metodama pripreme mikroemulzija navode se mikroprotočni sustavi. Smanjenjem dimenzija opreme za nekoliko redova veličina (do mikrodimenzija u promjeru od 10 do 1000  $\mu\text{m}$ ) mogu se postići značajne energetske uštede i smanjenje negativnog utjecaja na okoliš. Mikroprotočni sustavi imaju sposobnost brzog miješanja reagensa (visoki omjeri međufazne površine i volumena reaktora), osiguravaju provođenje procesa u homogenim uvjetima, omogućuju kontinuirane promjene u reakcijskim uvjetima, omogućuju dodavanje reagensa u preciznim vremenskim intervalima tijekom provedbe reakcije te su zbog svega navedenog atraktivna tehnologija za razne primjene. U odnosu na klasične procese pripreme mikroemulzija, mikroprotočni sustavi osiguravaju dobivanje jedne po jedne kapi, pa time taj proces rezultira visoko monodisperznom emulzijom. Jedno od najatraktivnijih svojstava mikroprotočnih sustava je što omogućuje pripremu dvostrukih, trostrukih ili čak emulzija višeg reda čemu je moguće precizno upravljati veličinom i brojem proizvedenih kapljica s visokom preciznošću uz minimalan utrošak energije.

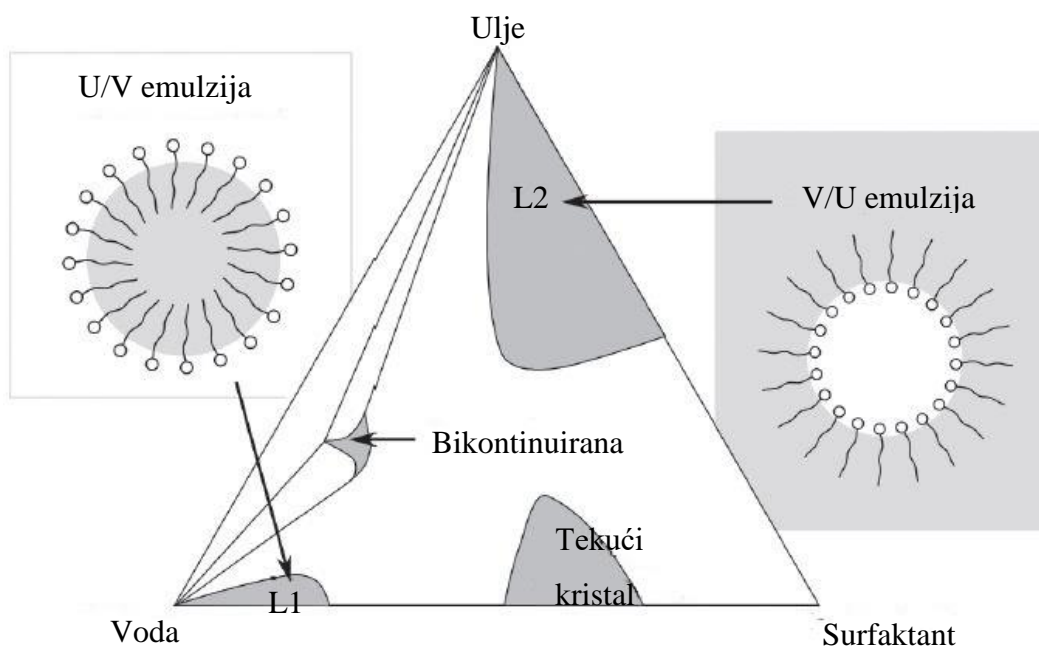
U ovom radu provesti će se optimiranje postupka pripreme mikroemulzija ulje u vodi u mikroprotočnom sustavu uz emulgator polietilen glikol (PEG). Provesti će se analiza profila strujanja dvofaznog sustava u mikrokanalu mikroprotočnog sustava te će se ispitati utjecaj količine emulgatora, količine ulja i ukupnih potoka na stabilnost dobivenih mikroemulzija primjenom metode odzivnih površina. Razviti će se također modeli umjetnih neuronskih mreža za predikciju srednjih vrijednosti Feretovih promjera kapljica u pripremljenim emulzijama na temelju snimljenih blisko infracrvenih (NIR; eng. Near Infrared ) spektara.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MIKROEMULZIJE

Mikroemulzije su disperzije sastavljene od vode, ulja i surfaktanta (tj. površinski aktivna tvar). Mikroemulzije su izotropni i termodinamički stabilni sustavi s dispergiranim domenama promjera od približno 1 do 100 nm, obično između 10 i 50 nm (Sottmann i Stubenrauch, 2009). Na molekularnoj razini, mikroemulzije su fino uravnoteženi sustavi gdje se energija entropije i površine suprotstavljaju jedna drugoj. Entropija sustava povećava se što je veći broj dispergiranih kapljica, dok se površinska energija povećava sa većim brojem čestica. Ravnoteža se može pomaknuti malim promjenama u kemijskom sastavu i promjenama uvjeta te samim time uzrokovati značajne promjene u svojstvima sustava (Karunaratne i sur., 2017).

Kod karakterizacije mikroemulzija, važno je detaljno opisati fazno ponašanje. Ulje, voda i surfaktant pomiješani u različitim molarnim omjerima, formiraju faze (Acharya i Hartley, 2012). Općeniti fazni dijagram dobiven praćenjem faza prikazan je na slici 1.



Slika 1. Primjer faznog dijagrama sustava ulje/voda/surfaktant. (Archarya i Hartley, 2012)

Na pojedinim dijelovima faznog dijagrama, jedna faza je prisutna na kraju gdje su sferične uljne kapljice dispergirane u vodi (u/v emulzije), dok su na drugom kraju sferične kapljice vode dispergirane u ulju (v/u emulzije). Između ta dva ekstrema, ovisno o omjeru komponenti, oblik kapljice može se mijenjati iz sferičnog u valjkasti, do crvolikih i do dvofaznih micela (Najjar, 2012). Za proučavanje svih svojstava mikroemulzija koriste se razne metode: mikroskopija,

reologija, metoda konduktivnosti, nefelometrija, dinamičko raspršenje svjetla, raspršivanje neutrona, raspršivanje x-zraka, elektronska mikrografija, nuklearna magnetna rezonancija, paramagnetna elektron rezonancija (Karunaratne i sur., 2017).

Fazno ponašanje može se analizirati sa nekoliko tehnika. Osim vizualnog promatranja, optička mikroskopija korištenjem polariziranog svjetla je često korištena za detektiranje prisutnosti singularnih faza ili za prisutnost odvojenih faza (Lutz i sur., 2007). Mjerenjem vodljivosti može se identificirati jesu li faze ulje u vodi ili obje faze kontinuirane (Lagues i Sauterey, 1980). Vodljivost emulzije vode u ulju se povećava dodavanjem vode. Nakon što je dostignuta maksimalna količina vode koju emulzija vode u ulju (V/U) može podnijeti, emulzija propada i vodljivost se smanjuje. S druge strane, za emulzije ulje u vodi (U/V), vodljivost je stabilna do trenutka povećanja koncentracije kapljica ulja čime dolazi do naglog porasta u vrijednosti vodljivosti (Lagues i Sauterey, 1980). Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) imaju adekvatnu rezoluciju za prikaz pojedinačnih čestica ili morfologije neke veće regije. Ipak, nativna struktura može biti narušena zbog pripreme uzorka koja zahtjeva dehidraciju (Strey, 1994).

### 2.1.1 Prednosti i primjena mikroemulzija

Mikroemulzije karakteriziraju specifična svojstva koja su korisna kod pakiranja i isporuke lijekova. Točnije, mikroemulzije mogu:

- (i) isporučiti aktivan farmaceutski sastojak u tekućem obliku;
- (ii) poboljšati biološku dostupnost i stabilnost biološki aktivnih spojeva malih veličina kapljica;
- (iii) otopiti i isporučiti hidrofilne i lipofilne lijekove;
- (iv) spontano se formirati s relativno jednostavnim početnim komponentama (Callender i sur., 2017)

Lijekovi isporučeni u tekućem obliku imaju prednost pred lijekovima u krutom obliku jer lijekovi u krutom obliku moraju proći dodatan korak otapanja prije nego se mogu apsorbirati. Mikroemulzije i tekućine iz tog razloga imaju puno bržu apsorpciju u slučaju oralne konzumacije lijeka (McCuiston i sur., 2014). Prisutnost lijeka u tekućem obliku je također prednost uzimajući u obzir i gastrointestinalnu stabilnost (Brandlin, 2013). Tekućinama je potrebno 20-30 min za prolaženje cijelim probavnim sustavom, dok će krutinama trebati i do 3 sata ovisno o sastavu (Brandlin, 2013). Mala veličina kapljica kod mikroemulzija (1-100 nm) povećava omjer aktivne površine i volumena za apsorpciju lijeka čime se stječe bolja biološka

dostupnost (McClements, 2015; Liu i sur., 2016). Nadalje, povećana je stabilnost mikroemulzijskog sustava jer se tako male veličine kapljica opiru gravitacijskom razdvajanju. Lijekovi koji se loše otapaju u vodi mogu se otopiti u mikroemulzijskim sustavima što je prednost tih sustava. Loša topivost u vodi, kao i loša farmaceutska svojstva, razlozi su zbog kojih više od 40 % lijekova ne prođe razvojnu fazu (Dahan i Hoffman, 2011). Mikroemulzijska amfipatska struktura omogućuje ugradnju i predaju hidrofilnih i hidrofobnih aktivnih farmaceutskih sastojaka. Spontano formiranje mikroemulzija predstavlja vrlo ekonomičan proces jer u mnogim slučajevima, energija nije potrebna za njihovo formiranje (Tong i sur., 2015).

Mikroemulzije se zbog svojih prednosti mogu primijeniti u raznim područjima industrija: farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj, naftnoj, metalnoj, tekstilnoj i kemijskoj industriji. Kozmetička industrija koristi potencijal mikroemulzijskih sustava u raznim proizvodima. Proizvodi kožne njege, proizvodi njege kose i parfemi su glavne vrste mikroemulzijskih proizvoda dostupnih na tržištu. Prirodni ili sintetski surfaktanti (ionski ili neionski), kosurfaktanti i ulja su korišteni u kozmetici u obliku mikroemulzija (Paul i Moulik, 2001). Biološko aktivni agensi, uključujući antioksidanse i agense za pobjeljivanje kože, ugrađeni su i preneseni na kožu uz pomoć mikroemulzijskih kozmetičkih proizvoda (Montenegro, 2014). Prehrambena industrija također može profitirati od mikroemulzija. Ono što se ističe je svojstvo mikroemulzija da zaštite, sporije otpuštaju inkapsulirani materijal i da se formiraju primjenom jestivih sastojaka (Karunaratne i sur., 2017). Esencijalno ulje češnjaka inkapsulirano u mikroemulziji pokazalo je antimikrobnu aktivnost i moguću upotrebu u prehrambenoj industriji (El-Sayed i sur., 2017). Uostalom, mikroemulzijski oklopljen stepogenin pokazao je učinkoviti utjecaj pri smanjenju enzimskog posmeđivanja jabučnog soka. Koinkapsulacija vitamina C sa stepogeninom uvelike smanjuje efekt posmeđivanja (Tao i sur., 2017). U naftnoj industriji, mikroemulzije se koriste u mnogim aspektima eksploatacije nafte, pogotovu u poboljšanom uljnom povratu (PUP). Mikroemulzijsko naplavlivanje (eng. *microemulsion flooding*) prikazuje jedinstvena svojstva mikroemulzijskih sustava, kao što je visoka viskoznost i mogućnost induciranja niske međufazne napetosti, što povećava efikasnost ekstrakcije ulja (Mohyaldinn i sur., 2019). Fosilna goriva se u svijetu pokušavaju sve više izbjeći, stoga se koriste nove alternative koje bi imale manji utjecaj na onečišćenje atmosfere. Tako je istraživano mikroemulzijsko gorivo čija goriva vrijednost, kinematička viskoznost i udio vode pokazuje približno jednake rezultate sa biodizelskim standardima a ujedno je i kompatibilna za uporabu u dizelskim motorima. Mikroemulzijsko gorivo sa 5% etanola pokazalo je velik

potencijal kao biogorivo sa manjom emisijom nepogodnih plinova u dizelskim motorima bez modifikacije (Sankumgon i sur., 2018). Za pripremu nanočestica, često se koriste mikroemulzije. Korištenjem mikroemulzija može se dobiti široki raspon monodisperznih nanočestica različitih veličina i oblika (Zielinska-Jurek i sur., 2012).

### 2.1.2 Klasični postupci pripreme mikroemulzija

U pripremi emulzija koriste se metode visoke energije i metode niske energije. Metode visoke energije koriste mehaničku silu za razbijanje ulja u manje kapljice kao npr. visokotlačni homogenizator, mikrofluidizator, ultrazvučna sonda, itd. (Lee i sur., 2011). Niskoenergetske metode ne koriste mehaničku silu i oslanjaju se na spontanu formaciju malih kapljica preko mijenjanja sastava otopine i mijenjanja okolišnih uvjeta poput temperature, pH i ionske jakosti (McClements, 2012). Prilikom pripreme mikroemulzija koriste se metode inverzija faza. One se mogu podijeliti na : temperaturnu inverziju faza (eng. phase inversion temperature, PIT), promjenu kemijskog sastava faznom inverzijom (eng. phase inversion composition, PIC) i točku emulzijske inverzije (eng. emulsion inversion point, EIP). Mikroemulzije se dobiju jednostavnim miješanjem ulja, vode i surfaktanta praćeno sa niskoenergetskom metodom pripreme emulzija.

PIT metoda koristi fizikalno-kemijska svojstva (molekularna geometrija i relativna topljivost) neionskih malih molekula surfaktanta i mijenja ih sa promjenom temperature (McClements i Rao, 2011). Temperatura pri kojoj se sustav promjeni iz V/U emulzije u U/V emulziju (ili obrnuto) shodno zakrivljenosti (molekularna geometrija) i topljivosti surfaktanta naziva se temperaturna inverzija faza. Mogućnost surfaktanta da promjeni svoju strukturu za grupiranje u agregate i razne fazne sisteme (laminarna faza, U/V emulzija i V/U emulzija) na način da se promijeni temperatura sustava, povezana je sa kritičnim parametrom pakiranja (KPP) surfaktanata (Israelachvili i sur., 1976). KPP je obilježje surfaktanata gdje se oni grupiraju u surfaktantski sloj u suglasju sa njihovom molekularnom geometrijom, a definira se izrazom (jednadžba 1)

$$KPP = \frac{\gamma}{\alpha l_c} \quad [1]$$

gdje je  $\gamma$  parcijalni molarni volumen hidrofobnog djela surfaktanta,

$\alpha$  je površina koju zauzima glava surfaktanta i

$l_c$  je duljina hidrofobnog lanca surfaktanta.

Metoda promjene kemijskog sastava faznom inverzijom (PIC) se, kao i PIT metoda, bazira na promjeni optimalne zakrivljenosti strukture surfaktantskih molekula u prostoru, no promjena je

inducirana promjenom pH ili ionske jakosti (Anton i Vandamme, 2009). Mijenjanjem pH ili dodavanjem soli dolazi do promjene električnog naboja glave surfaktanta, čime se promjeni zaobljenost surfaktanta. U PIC metodi se zbog toga mogu koristiti ionski surfaktanti. Dodavanjem soli, KPP ionskog surfaktanta postaje veći od 1 što više odgovara formiranju V/U emulzija zbog iona soli koji mogu zasjeniti utjecaj električnog naboja na polarnoj glavi surfaktanta (McClements i Rao, 2011). Slično tome, povećavanjem pH sustava iznad vrijednosti  $pK_a$  ionskog surfaktanta, karboksilna skupina ionskog surfaktanta biva više ionizirana čime se povećava topljivost surfaktanta u vodi, KPP postane manji od 1 zbog čega se formira U/V emulzija (McClements i Rao, 2011). Pojava implicira da ukoliko je pH niži od  $pK_a$  vrijednosti ionskog surfaktanta dolazi do formiranja emulzije V/U.

Točka emulzijske inverzije (EIP) drukčija je od prethodnih metoda. Rezultati se postižu promjenom volumena svakog sastojka (promjena omjera ulja i vode). Odlučujući korak u EIP metodi je tranzicija između V/U i U/V emulzija preko prijelazne bikontinuirane faze na način da se postepeno dodaje dispergirana faza vode u emulziju U/V koja je prethodno pripremljena. Drugi način je korištenjem dispergirane faze ulja i dodavajući ga u početnu emulziju voda u ulju (Hessien i sur., 2011). U tom procesu, surfaktanti stvaraju jedan sloj na granici ulja i vode koji se kasnije pretvara u biokontinuiranu mikroemulziju u točki inverzije (Fernandez i sur., 2004).

## 2.2 MIKROPROTOČNI SUSTAVI

### 2.2.1 Osnovne karakteristike, prednosti i nedostaci

Mikroprotočno inženjerstvo je područje znanosti koje koristi mikrostrukturne uređaje (dimenzija osnovnih jedinca u rasponu od 10 do 100  $\mu\text{m}$ ) za precizno rukovanje sa malim volumenima tekućine unutar njih. Uočena je povećana produktivnost prilikom minijaturizacije što može poslužiti kod smanjenja veličine analitičkih sustava, a ujedno postoji i opcija „lab on a chip“. „Lab on a chip“ (LOC) je uređaj u kojem je integrirano i automatizirano nekoliko laboratorijskih tehnika u mikro- ili nanodimenzijama (Schönberger i Hoffstetter, 2016). Navedeni LOC uređaji su u početku korišteni u analitičkoj kemiji, no mikroprotočno inženjerstvo se proširila u razna područja, uključujući biologiju i druge grane kemije. Mikroprotočni sustavi se mogu izraditi od silikona, stakla, kvarca i drugih polimernih materijala. Proces silikonske mikroizrade je već ustaljen proces u mikroelektronskoj i mikroelektromehaničkoj (MEMS) industriji. Međutim, silikon nije optički transparentan i provodi struju. Mikroprotočni sustavi izgrađeni od silikona imaju ograničenja kod primjene u optičkoj i elektrokemijskoj detekciji. Drugi alternativni materijali za izradu mikroprotočnih sustava su: staklo, kvarc i polimerni materijali. Ovi materijali su jeftiniji, optički su transparentni i ne provode struju (Sheng i sur., 2012).

Strujanje unutar mikroprotočnih sustava je gotovo uvijek laminarno što znači da se miješanje dominantno odvija molekularnom difuzijom. Miješanje difuzijom može trajati i nekoliko dana u običnoj laboratorijskoj tikvici, dok se u mikrokanalima odvija u sekundama ili minutama (Janasek i sur., 2006). Laminarno, predvidljivo strujanje tekućine s visokim gradijentima brzine i dominirajući međupovršinski efekt omogućava kontroliranu manipulaciju strujanja tekućine i nastanak monodisperznih emulzija. Jedna od prednosti ovih sustava je veliki omjer međufazne površine i volumena što osigurava termalnu homogenost kroz cijeli sustav i brži prijenos topline između uređaja i tekućine unutar kanala. Brzina i jednakost miješanja u mikroprotočnom sustavu rezultira minimalnoj pogrešci. Takve karakteristike smanjuju raznolikost u svojstvima pojedinog proizvoda i povećanu preciznost kod analitičkih metoda (Hess i sur., 2015). Sukladno tomu, mnogi kemijski i biološki sustavi ovisni su o temperaturi i osjetljivi na lokalne promjene temperature. Korištenjem ravnih mikroprotočnih sustava, lokalizirane mrtve zone su rijetkost. Dakle, zašto onda mikroprotočni sustavi ne zasićuju tržište? Što im nedostaje? Za početak, njihova primjena je sužena na tekućine i otopine manje viskoznosti kako ne bi došlo do začepljenja kanala. Zato su mikroprotočni sustavi najviše korišteni u analitici, biomedicini, kemijskoj sintezi i molekularnoj biologiji (Whitesides, 2006). U biomedicini, postoji nekoliko

prepreka kod korištenja mikroprotočnih sustava. Visoki omjer međufazne površine i volumena dovodi do visokih koncentracija proteina koji proizvode imunološke stanice. Nadalje, brže se potroše nutrijenti u sustavu i brže je nakupljanje otpada. Na taj način povećava se stanična osjetljivost pri malim fluktuacijama (Young i Simmons, 2010). Za izgradnju mikroprotočnih sustava, potrebno je detaljno predznanje u izradi, a i oprema za izradu je skupocjena (Wu i sur., 2011). Mikroprotočni sustavi nisu dovoljno izdržljivog materijala za transport (Baker, 2011), stoga se sprječava mogućnost prijenosa znanja u druge laboratorije (Young i Simmons, 2010). Kod kemijske industrije, nailazi se na dva problema. Prvi problem je da se uobičajena aparatura još uvijek nije uspjela prilagoditi za primjenu s mikroprotočnim sustavima. Drugo, materijal koji je često korišten u istraživanju mikroprotočnog inženjerstva, polidimetilsiloksan (PDMS), otapa se ili deformira u dodiru s organskim otapalima (Lee i sur., 2003).

### 2.2.2 Primjena mikroprotočnih sustava za pripremu mikroemulzija

Većina prehrambenih proizvoda (pekarski proizvodi, smrznuti proizvodi, itd.) dispergirani su sustavi koji se sastoje od raznih komponenata (van Dijke, 2009). Stvaranje i dispergiranje kapljica postiže se uglavnom miješanjem ili mehaničkim raspadanjem. Budući da je veličina operativne jedinice koja formira kapljice puno veća od nastalih kapljica, dolazi do turbulentnog raspada čestica što dovodi do smanjenja učinkovitosti procesa i otežana je kontrola nad veličinom, oblikom i raspodjelom veličine kapljica (van Dijke i sur., 2010). Navedena svojstva emulzije nužno je kontrolirati, ukoliko se žele dizajnirati inovativne mikrostrukture koje određuju razne poželjne karakteristike u prehrambenom proizvodu (Maan i sur., 2015). Precizno oblikovanje kapljica emulzije postaje moguće uz mikroprotočne sustave. Palit i suradnici (2020) opisali su primjenu mikroprotočnog sustava za pripremu farmaceutske mikroemulzije (emulzije s lijekom lulikonazolom). Korišten je mikroprotočni sustav s mikrokanalima širine oko 3,5 mm i dubine oko 1,2 mm ukupne duljine kanala od 120 mm te aktivnog volumena od 750  $\mu\text{L}$ . Ispitan je utjecaj koncentracije ulja, koncentracije emulgatora (Tween 20) te ukupnog protoka na pripremu mikroemulzija. Rezultati pokazuju da primjena opisanog mikroprotočnog sustava omogućava pripremu mikroemulzija s prosječnom promjerom kapljica od  $d = 24,9 \pm 3$  nm pri ukupnom protoku od  $q = 20$  mL  $\text{min}^{-1}$ . Također Ontiveros i suradnici (2020) proveli su analizu hidrodinamičkih uvjeta za pripremu mikroemulzija U/V ili V/U u mikroprotočnom sustavu s mikrokanalima širine 105  $\mu\text{m}$  i dubine 100  $\mu\text{m}$  te je potvrđena važnost preciznih hidrodinamičkih uvjeta na dimenzije mikropapljica.



## 2.3 FIZIKALNA SVOJSTVA KOJA UTJEČU NA STRUJANJE U MIKROKANALIMA

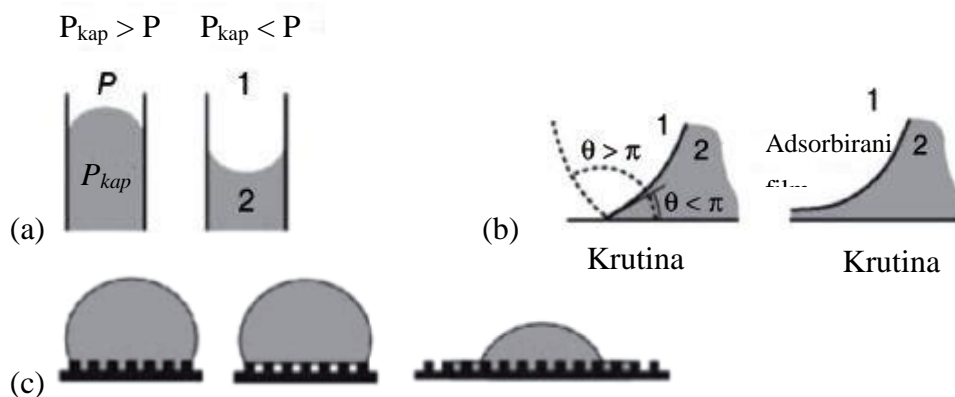
### 2.3.1 Močivost, kapilarni tlak, viskozne sile u mikrokanalima

U uvjetima ustaljenog toka, sa zanemarivom gravitacijskom silom  $g$  i temperaturnom razlikom, obje faze kapljevine će biti u ravnoteži ako je tlak obje faze uniforman. Tlak između obje faze se treba razlikovati samo u kapilarnom tlaku koji je dan Young-Laplace jednadžbom (jednadžba 2):

$$\Delta P_{kap} = \gamma \kappa \quad [2]$$

pri čemu  $\gamma$  predstavlja međufazni otpor te  $\kappa$  koji predstavlja prosječnu lokalnu zakrivljenost na granici dviju faza (Ajaev i Homsy, 2006).

$\gamma_{12}$  će se koristiti kako bi se naglasio međufazni otpor između kapljevine 1 i kapljevine 2 kako bi se pojam odvojio od uobičajene oznake  $\gamma$ . Simbol  $\sigma = \gamma_{1g}$  opisuje površinsku napetost odnosno međufazni otpor tekuće i plinske faze. Ovisno o zakrivljenosti međupovršinskoj sloja (slika 2a), međufazne sile mogu smanjiti ili povećati pritisak  $P_{kap}$  u tekućini u odnosu na tlak okoline. Na primjer, kapilarni tlak graničnog sloja voda-zrak u 100  $\mu\text{m}$  širokom hidrofilnom mikrokanalu je u prosjeku 1,5 kPa i povećava se kod nižih vrijednosti širine mikrokanala, doseže i do 1,5 MPa za 100 nm širok mikrokanal (Günther i Kreutzer, 2009).



Slika 2. (a) Pozitivna i negativna razlika kapilarnog tlaka i tlaka okoline, što rezultira ili sa pozitivnom ili negativnom zaobljenošću između zrak-voda granice (Eijkel i sur., 2005) (b) Lokalna konfiguracija u trofaznoj regiji. Lijevo, dvije faze tekućine (1 i 2) i čvrsta stjenka sijeku se pod kutom  $\theta$ ; nadesno su tekuće faze odvojene sa adsorpcijskim slojem (Ajaev i Homsy, 2006) (c) prikazuje kako se korištenjem kemijski homogenih, mikro- i nanostrukturnih površina može mijenjati svojstvo močivosti (Bartolo i sur., 2006)

Čvrste površine obilježavaju se po svojoj hrapavosti i močivosti, što je određeno kutem kontakta. Kada statični fluid dolazi u kontakt sa čvrstom površinom, dvije lokalne konfiguracije mogu se raspoznati detaljnijim promatranjem trofaznog područja (slika 2b). Granica fluida može dodirivati čvrsti sloj i oblikovati kontaktnu liniju između tri faze, ili adsorbirani sloj odvaja drugi fluid od čvrstog sloja. Prvi slučaj se opisuje sa kontaktnim kutem  $\theta$ , koji je povezan sa međufaznim energijama krutine,  $s$ , i dvije kapljevite faze 1 i 2 preko Young-ove jednadžbe (jednadžba 3):

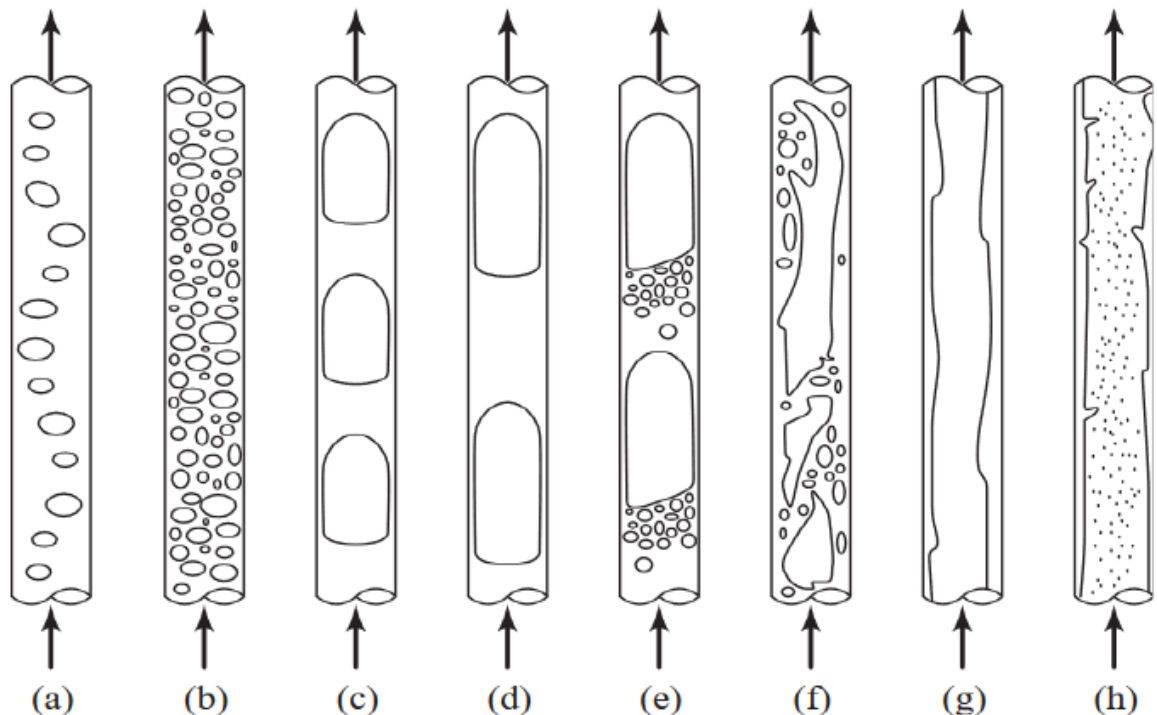
$$\gamma_{12} \cdot \cos \theta = \gamma_{1s} - \gamma_{2s} \quad [3]$$

gdje je  $\gamma_{12}$  površinska napetost dviju kapljevina,  $\gamma_{1s}$  površinska napetost krutine i kapljevine 1,  $\gamma_{2s}$  površinska napetost krutine i kapljevine 2 a  $\cos \theta$  kosinus kontaktnog kuta  $\theta$ .

Močive tekućine imaju mali kontaktni kut koji je približan nuli, a nemočive tekućine imaju veći kontaktni kut koji je bliži  $180^\circ$ . Zbog učinaka interakcije tekućine i čvrste stijene, viskoznost tekućine se mijenja ovisno o udaljenosti čestice od stjenke. Viskoznost tekućine je pozitivno proporcionalna sa međufaznom močivošću, a negativno korelirana sa tlakom (Li i sur., 2019).

### 2.3.2 Režimi strujanja dvofaznih sustava u mikrokanalima

Sustav kapljevina-kapljevina i drugi višefazni sustavi imaju širok raspon primjene u različitim područjima. Poznavanje hidrodinamike u mikrokanalima je od velike važnosti kada se radi o određivanju parametara, o postavljanju reakcije ili o procesu ekstrakcije. Četiri različita režima strujanja identificirana su preko vizualnog proučavanja: segmentirano (Taylor-ovo) strujanje, mjehuričasto strujanje, paralelni tok i anularno strujanje (slika 3) (Ghaini i sur.,2011). Ukoliko postoji veliki raspon omjera brzine u strujanju dvije faze, velika je vjerojatnost da će se razviti segmentirano ili paralelno strujanje od navedenih profila strujanja (Ufer i sur., 2011). Segmentirano strujanje nastaje kada se u mikrokanal propuštaju dvije kapljevine koje su različite topivosti u vodi, pri čemu postoji naizmjenično strujanje segmenata dviju faza, a svaki segment promatra se kao posebno područje unutar mikrokanala.



Slika 3. Prikaz uzoraka strujanja fluida: (a,b) mjehuričasto strujanje, (c,d) segmentirano strujanje, (e) prijelazno segmentirano uzburkano strujanje, (f) uzburkano strujanje, (g) strujanje u filmu, (h) anularno strujanje (Kreutzer i sur., 2005)

Takvim strujanjem pospješuje se učinkovitost procesa jer se postiže veći intenzitet prijenosa tvari unutar segmenata i između segmenata. Konvekcijom unutar segmenata i difuzijom između segmenata odvija se prijenos tvari. Do konvekcije unutar segmenata dolazi kao posljedica segmenta kapljevine pri čemu se obnavlja međufazna površina i kao posljedica trenja između stijenke kanala. Sama konvekcija ovisi o fizikalnim svojstvima kapljevine, geometriji sustava i

srednjoj prividnoj brzini strujanja (Kashid i sur., 2007). Difuzija se pojavljuje zbog postojanja koncentracijskog gradijenta između segmenata (što je on veći, veća je pokretačka sila). Difuzija ovisi o međufaznoj površini preko koje se odvija prijenos tvari (Kashid i Agar, 2007). Paralelni tok se formira kada je odnos sila inercije i međufaznog otpora u obje faze približno jednak, odnosno Weberovi brojevi za obje faze su približno jednakih vrijednosti (Zhao i sur., 2006). Paralelni tok manifestira se na način da tekućine protječu jedna pored druge u mikrokanalu bez miješanja, što je korisno svojstvo za ekstrakciju ili pročišćavanje otapala. Ekstrakcija i pročišćavanje su korisne metode u analitici (Hibara i sur., 2003; Maruyama i sur., 2004). Najvažniji bezdimenzijski brojevi koji se koriste pri analizi režima strujanja prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Bezdimenzijski brojevi često korišteni u analizi mikroprotočnih sustava (Fatoyinbo, 2013)

Bezdimenzijska veličina	Jednadžba	Opis
Reynoldsov broj (Re)	$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot L}{\mu}$	omjer inercijske i viskozne sile
Pecletov broj (Pe)	$Pe = \frac{d_s^2 \cdot u_s}{D \cdot L}$	omjer konvektivnog prijenosa mase i molekulske difuzivnosti
Weissenbergov broj (Wi)	$Wi = \tau_p \cdot \dot{\gamma}$	umnožak brzine smicanja i vremena opuštanja
Deborahov broj (De)	$De = \frac{\tau_p}{\tau_{proticanje}}$	omjer vremena opuštanja i vremena proticanja
Deanov broj (Dn)	$Dn = Re \left( \frac{D_h}{2r} \right)^{1/2}$	pretpostavlja pojavu vrtloga u zakrivljenim kanalima
Raleighov broj (Ra)	$Ra = \frac{u_b D_h}{D}$	Pecletov broj za tok na koji djeluje sila uzgona
Grashofov broj (Gr)	$Gr = \frac{\rho u_b D_h}{\mu}$	Reynoldsov broj u uvjetima kada na tok djeluje sila uzgona
Kapilarni broj (Ca)	$Ca = \frac{\mu \cdot u}{\sigma}$	odnos viskoznih sila i sila površinske napetosti između faza
Weberov broj (We)	$We = \frac{u^2 \rho r}{\gamma}$	odnos sile trenja i površinske napetosti
Stokesov broj (St)	$St = \frac{\mu u}{\rho g D_h^2}$	odnos viskoznih sila i gravitacijskih sila
Poiseuilleov broj (Po)	$Po = \frac{r^2 \Delta P}{\mu L u}$	odnos tlaka i viskoznih sila

### 2.3.3 Modeliranje dvofaznih režima strujanja u mikrokanalima

Mogućnost određivanja međufazne granice olakšava pristup dvofaznom sustavu za izvedbu specifične reakcije (Pohar i sur., 2012). U uvjetima u kojima se u reakcijskom sustavu kapljevina-kapljevina pojavi segmentirano strujanje, predmet istraživanja postaju hidrodinamički uvjeti strujanja, veličina segmenta, međufazna površina i pad tlaka. Prijenos tvari je određen geometrijom segmenta i načinom strujanja. Površinska napetost doprinosi padu tlaka duž mikrokanala. Dobro razvijeno segmentirano strujanje u sustavu kapljevina-kapljevina osigurava uniformnu međufaznu površinu i na taj način omogućava prijenos tvari. Duljina segmenta je određena brzinom strujanja, geometrijom kanala, viskoznošću kapljevina i svojstvima površine mikrokanala. Analitičkim metodama i uporabom računalne dinamike fluida (CFD; eng. computational fluid dynamics) moguće je dobiti detaljan uvid u protok kroz kapilare kako bi se mogla pratiti, nadzirati i optimizirati njihova izvedba (Kashid i sur., 2007). Harries i sur., 2003 objavili su numerički model koji opisuje segmentirani tok u mikroreaktoru temeljen na CFD-u koristeći Navier-Stokes jednadžbe (Harries i sur., 2003). Model uzima u obzir mnogo uvjeta i varijabli (jednadžba očuvanja momenta, mase, energije, koncentracije kemijskih vrsta itd.) i prikazana je jednadžbama 4 i 5:

$$\frac{\partial u}{\partial t} + \nabla \cdot (u \cdot u) = -\frac{1}{\rho} [\nabla p + \mu \cdot \nabla^2 u] + \frac{1}{\rho} \cdot F_{SF} \quad [4]$$

$$\nabla \cdot u = 0 \quad [5]$$

gdje  $u$  predstavlja lokalnu brzinu strujanja ( $\text{m s}^{-1}$ ),

$t$  je vrijeme (s),

$\rho$  je gustoća ( $\text{kg m}^{-3}$ ),

$p$  je tlak (Pa),  $\mu$  je viskoznost (Pas), a

$F_{SF}$  je površinska sila koja djeluje na segment(N).

Promjena koncentracije opisuje je jednadžbom 6:

$$\frac{\partial c_{ik}}{\partial t} + u \cdot \nabla c_{ik} = \nabla \cdot (D_{ik} \cdot \nabla c_{ik}) \pm r_{ik} \quad [6]$$

gdje je  $c_{ik}$  – množinska koncentracija tvari ( $\text{mol dm}^{-3}$ )

$D_{ik}$  – koeficijent difuzije ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ )

$i$  – identitet tvari

$k$  – identifikacija faze

$r_{ik}$  – brzina reakcije koja se odvija za tvar  $i$  u fazi  $k$  (Kashid i sur., 2007).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 MATERIJALI

##### 3.1.1. Otapala i reagensi

Polietilenglikol 1500 (Acros Organics, Belgija)

Polietilenglikol 6000 (Acros Organics, Belgija)

Polietilenglikol 20000 (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Suncokretovo ulje (Zvijezda, Hrvatska)

Listovi paprene metvice (*Mentha piperita*) (Suban, Srbija)

##### 3.1.2 Oprema i uređaji

Klipne pumpe (NE – 1000 Syringe Pump, New Era Pump Systems, SAD)

Kapilarni (Ostwaldov) viskozimetar (Jenaer Glaswerk Schott & Gen, Njemačka)

Analizator veličine čestica (Litesizer 500, Anton Paar, Austrija)

Magnetna miješalica (Heidolph Instruments, Njemačka)

Uljno-vodena kupelji s integriranim miješanjem (HBR 4 digital, IKA, Njemačka)

NIR spektrofotometar (NIR128L-1.7, Control Development Inc, SAD)

Analitička vaga (Sartorius TE214S-0CE, Njemačka)

Mikroreaktorski čip (Micronit Microfluidics BV, Nizozemska)

Svjetlosni mikroskop (Motic B1-220A, Njemačka)

Kamera (Motic 3, Njemačka)

Kamera (AM2111, Dino-Lite, SAD)

Staklena menzura (250 mL, 100 mL, 5 mL)

Staklena čaša (800 mL, 250 mL, 100 mL, 50 mL, 25 mL)

Pipetman (1 mL)

##### 3.1.3. Programski paketi

Microsoft Excel (verzija 16.0, Microsoft, SAD)

Statistica (verzija 13.0, StatSoft Inc., SAD)

ImageJ (verzija 1.8.0, NIH, SAD)

## 3.2 METODE

### 3.2.1. Metoda odzivnih površina za optimiranje procesa pripreme mikroemulzija

Metoda odzivnih površina je skup matematičkih i statističkih tehnika koje su korisne za modeliranje i analiziranje problema, gdje je željeni odziv zapravo ishod nekoliko varijabli, a cilj je optimiziranje tog odziva (Montgomery, 2013). Za definiranje optimalnih uvjeta zeta potencijala i srednjeg promjera čestica, korišten je Box-Behnkenov dizajn.

Box-Behnkenov dizajn (slika 4) predlaže kako odabrati točke eksperimenta kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenata matematičkih modela prvog i drugog reda. Ovaj dizajn ima mogućnost ispitivanja više varijabli i to od 3 do 10 (Bezerra i sur., 2008)

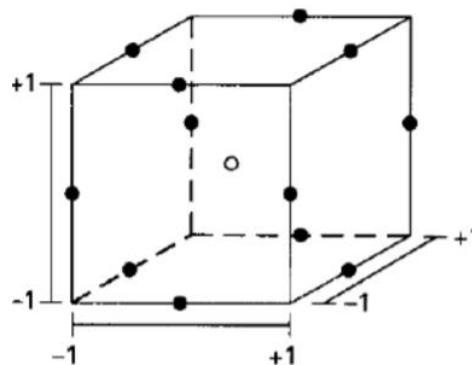
Osnovne karakteristike ovoga dizajna su:

- a) zahtjeva broj eksperimenata definiran prema sljedećem izrazu (jednadžba 7):

$$N = 2^k(k - 1) + c_p \quad [7]$$

gdje je  $k$  broj faktora, a  $c_p$  broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

- b) sve razine faktora moraju se svesti na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom između razina



Slika 4. Box-Behnken plan pokusa (Bezerra i sur., 2008)

U ovome radu je analiziran utjecaj nezavisnih varijabli: (i) udio emulgatora ( $X_1$ ), (ii) udio ulja ( $X_2$ ) i ukupni protok ( $X_3$ ) na stabilnost emulzija određenu zeta potencijalom ( $Y_1$ ) i na srednji Fereteov promjer kapljica ( $Y_2$ ) u mikroemulzijama primjenom Box-Benken dizajna eksperimenta u programskom paketu Statistica. Utjecaj svih triju parametra je analiziran na tri nivoa (-1, 0, 1) kroz 17 nezavisnih eksperimenata prema dizajnu eksperimenata prikazanom u tablici 2.

Tablica 2. Dizajn eksperimenta za pripremu mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu

Eksperiment	Udio emulgatora ( $X_1$ ) / %	Udio ulja ( $X_2$ ) / %	Ukupni protok ( $X_3$ ) / $\mu\text{L min}^{-1}$
1	2 (-1)	30 (0)	200 (-1)
2	6 (1)	30 (0)	200 (-1)
3	2 (-1)	30 (0)	400 (1)
4	6 (1)	30 (0)	400 (1)
5	2 (-1)	25 (-1)	300 (0)
6	6 (1)	25 (-1)	300 (0)
7	2 (-1)	35 (1)	300 (0)
8	6 (1)	35 (1)	300 (0)
9	4 (0)	25 (-1)	200 (-1)
10	4 (0)	25 (-1)	400 (1)
11	4 (0)	35 (0)	200 (-1)
12	4 (0)	35 (0)	400 (1)
13	4 (0)	35 (0)	300 (0)
14	4 (0)	35 (0)	300 (0)
15	4 (0)	35 (0)	300 (0)
16	4 (0)	35 (0)	300 (0)
17	4 (0)	35 (0)	300 (0)

Utjecaj ispitivanih nezavisnih varijabli na zavisne varijable opisan je polinomom drugog stupnja (jednadžba 8):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} \cdot X_i \cdot X_j \quad [8]$$

gdje  $Y$  predstavlja zavisnu varijablu,  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  i  $\beta_{ij}$  su regresijski koeficijenti za slobodan, lineran, kvadratni i interakcijski član.

Procjena optimalnih uvjeta za pripremu mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu je provedena zasebno za zeta potencijal i zasebno za srednji Feretov promjer primjenom funkcije poželjnosti u rasponu od 0 (nepoželjno) do 1 (izrazito poželjno).

### 3.2.2. Priprema vodenoga ekstrakta mente

U staklenu čašu volumena  $V = 200$  mL odvažuje se  $m = 1$  g usitnjenog osušenog lista mente te se prelije s  $V = 50$  mL destilirane vode zagrijane na  $T = 80$  °C. Pripremljena ekstrakcijska smjesa termostatira se na  $T = 80$  °C u uljnoj kupelji (HBR 4 digital, IKA, Njemačka) pri  $250$  rpm<sup>-1</sup> kroz  $t = 30$  min. Nakon isteka vremena ekstrakcije, uzorak se profiltrira kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze.



### 3.2.3. Priprema otopina polietilen glikola (PEG)

Pripremljeno je 9 vodenih otopina tri različita emulgatora (PEG 1500, PEG 6000 i PEG 20000) s tri različite koncentracije emulgatora (2 %, 4 % i 6 %). Pripremljeno je također 9 otopina tri različita emulgatora (PEG 1500, PEG 6000 i PEG 20000) s tri različite koncentracije emulgatora (2 %, 4 % i 6 %) u vodenom ekstraktu mente.

### 3.2.4. Određivanje fizikalnih svojstva komponenata za pripremu mikroemulzija

#### 3.2.4.1. Određivanje gustoće

Gustoća pripremljenih otopina PEG-a i korištenoga ulja određena je pomoću piknometra volumena ( $V = 2$  mL). Masa praznog i čistog piknometra se odredila vaganjem na analitičkoj vagi nakon čega je napunjen odabranom kapljevnom ponovo izvagan. Potom se gustoća može izračunati prema sljedećoj relaciji (jednadžba 9):

$$\rho_x = \frac{m_{pik+x} - m_{pik}}{V_{pik}} \quad [9]$$

gdje  $\rho_x$  predstavlja gustoću pripremljenih otopina PEG-a i korištenog ulja ( $\text{g mL}^{-1}$ ),  $m_{pik+x}$  masu piknometra sa odabranom kapljevnom (g),  $m_{pik}$  masu praznog i čistog piknometra i  $V_{pik}$  volumen piknometra (mL).

#### 3.2.4.2. Određivanje viskoznosti

Viskoznost pripremljenih otopina PEG-a i korištenoga ulja određena je Ostwaldovim (kapilarnim) viskozimetrom. Metoda se temelji na mjerenju vremena potrebnog da određeni volumen ispitivane tekućine protekne kroz kapilaru pod utjecajem gravitacijske sile. Viskozimetar je napunjen tekućinom te je štopericom mjereno vrijeme za koje je razina tekućine stigla od točke A do točke B. Najprije je provedeno mjerenje za destiliranu vodu, a nakon toga i za analizirane uzorke. Za računanje dinamičke viskoznosti analiziranih uzoraka korištena je sljedeća jednadžba 10:

$$\eta_x = \eta_{H_2O} \frac{t_x \cdot \rho_x}{t_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}} \quad [10]$$

gdje su:

$\eta_x, \eta_{H_2O}$  – dinamička viskoznost analizirane kapljevine i vode, Pas

$t_x, t_{H_2O}$  – vrijeme protjecanja analizirane kapljevine i vode, s

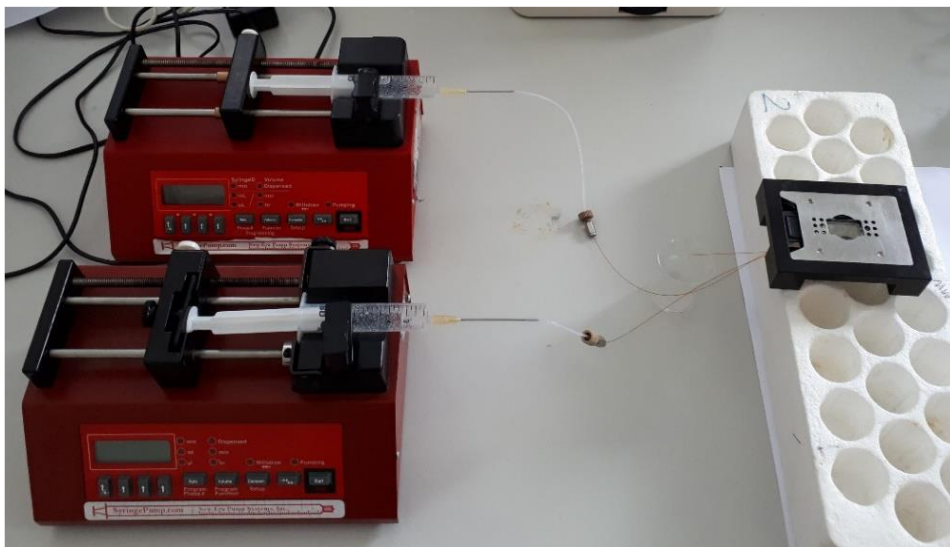
$\rho_x, \rho_{H_2O}$  – gustoća analizirane kapljevine i vode,  $\text{g cm}^{-3}$

### 3.2.5. Analiza profila strujanja dvofaznog sustava voda-ulje u mikroprotočnom sustavu

Provedena je analiza profila strujanja u mikroprotočnom sustavu za pripremu mikroemulzija. Mikroprotočni sustav se sastojao od mikrokanala širine : visine : duljine = 250  $\mu\text{m}$  : 150  $\mu\text{m}$  : 55,3 mm opremljenog sa statičkim mikromješačima u izvedbi viseće kapi. Element s mikrokanalima je postavljen u nosač od nehrđajućeg čelika (Micronit Microfluidics BV, Nizozemska) koji omogućuje stabilnost sustava i jednostavnije spajanje s pumpama. Za dovođenje procesnih struja bile su potrebne dvije pumpe (NE-1000 Syringe Pump, New Era Pump Systems, SAD) s plastičnim klipovima. Jedna klipna pumpa je služila za uljne faze, a druga za uvođenje vodene faze (PEG-ovi otopljeni u vodi te PEG-ovi otopljeni u ekstraktu mente). Spajanje pumpi sa čipom je izvedeno pomoću silikatnih cjevčica (375  $\mu\text{m}$  O.D., 150  $\mu\text{m}$  I.D., Micronit Microfluidics BV, Nizozemska), a protok fluida u mikrokanalima je fotografiran pomoću kamere (AM2111, Dino-Lite, SAD) na ulazu u mikrokanal, u središnjem dijelu te na izlasku iz mikrokanala. Za obje faze određene su Reynolds-ove značajke za sve analizirane protoke.

### 3.2.6. Priprema mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu

Provedena je priprema mikroemulzija ulje u vodi (U/V) u mikroprotočnom sustavu. Analizirana su dva sustava, vode/ ulje i vodeni ekstrakt mente/ulje. Kao emulgatori su se koristili PEG 1500, PEG 6000 i PEG 20000 otopljeni u vodenoj fazi. Priprema mikroemulzija je proveden u mikroprotočnom sustavu prikazanom na slici 5, čiji su elementi detaljno opisani u poglavlju 3.2.5. Analiza profila strujanja dvofaznog sustava ulja-vode u mikroprotočnom sustavu.



Slika 5. Fotografija mikroprotočnog sustava za pripremu mikroemulzija ulje u vodi (vlastita fotografija)

Eksperimenti su provedeni pri različitim udjelima emulgatora (2, 4 i 6 %), pri različitim udjelima uljne faze (25, 30 i 35 %) te pri različitim ukupnim protocima (200, 300 i 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) prema dizajnu eksperimenata prikazanih u tablici 2. Pripremljene mikroemulzije su na izlasku iz mikroprotočnog sastava sakupljene u plastične kivete te je za svaki uzorak provedena analiza promjera kapljica, analiza stabilnosti te snimanje NIR spektara.

### 3.2.7. Određivanje Feretovog promjera kapljica u mikroemulzijama ulje u vodi

Na izlasku iz mikroprotočnog sustava uzorak je uhvaćen na predmetno stakalce te je promatran i fotografiran pod mikroskopom (BTC Type LCD-35, Besser, Njemačka) pod povećanjem od 4 puta. Na sakupljenim slikama je određen prosječan Feretov promjer kapljica primjenom programskog alata ImageJ (v.1.8.0. NIH, Maryland, SAD). Feretov promjer definira se kao okomita udaljenost između dvije tangente na suprotnim stranama čestice.

### 3.2.8. Mjerenje zeta potencijala mikroemulzija

Za određivanje zeta potencijala korišten je analizator veličine čestica i zeta potencijala (Litesizer 500, Anton Paar, Austrija). Navedeni analizator veličine čestica je instrument za određivanje svojstava nano i mikro čestica u disperzijama i otopinama. Određuje veličinu čestica, zeta potencijal i molekularnu masu metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS). Dinamičko raspršenje svjetlosti temelji se na prolasku laserske svjetlosti kroz uzorak i detekciji intenziteta raspršene svjetlosti pod određenim kutovima (15, 90 i 175°). Metoda analize zeta potencijala koristit će se za određivanje stabilnosti emulzija. Visoke vrijednosti zeta potencijala (više od 30 mV a niže od – 30 mV) istodobno znače veću stabilnost emulzije. Približno 300  $\mu\text{L}$  svakog uzorka stavljeno je u kvarcnu kivetu i mjerenje zeta potencijala je provedeno tri puta te su rezultati prikazani kao srednja vrijednost.

### 3.2.9. Snimanje NIR spektra mikroemulzija ulje u vodi

Blisko infracrvena spektroskopija (eng. Near Infrared, NIR) spektroskopija je nedestruktivna metoda koja koristi elektromagnetski spektar u rasponu od 750 do 2500 nm (Matijević i Blažević, 2008). Zračenje u tom rasponu utječe na vibracije istezanja kovalentnih veza C-H i O-H u molekulama ulja, vode i polietilenglikola. NIR spektri odlikuju se velikim omjerom šuma i signala, a položaj i intenzitet vrpce može se vrlo točno odrediti, što je osobito važno za kvantitativnu analizu.

U radu je ispitan potencijal primjene NIR spektroskopije za analizu veličine kapljica emulzije ulje u vodi pripremljenih u mikroprotočnom sustavu. Za svaki pripremljeni uzorak snimani su NIR spektri u području valnih duljina u rasponu od 904 nm do 1699 nm primjenom NIR spektrometra (NIR – 128 – 1.7 – USB/6.25/50  $\mu$ m Control Development Inc., SAD) povezanog s računalom. Za analizu promjene apsorbancije u ovisnosti o valnoj duljini korišten je programski paket Control Development Spec 32 (Control Development Inc., SAD). Snimanja NIR spektara provedena su u tri paralele te su za daljnju analizu korištene srednje vrijednosti spektara.

### 3.2.10. Analiza dinamike destabilizacije mikroemulzija

Nakon određivanja optimalnih procesnih uvjeta za pripremu mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu za svaki odabrani emulgator provedena je analiza dinamike destabilizacije mjerenjem zeta potencijala tijekom vremena. Za sustav ulje/voda uz PEG 1500, analiza je provedena kroz vrijeme od 51 min, za sustav ulje/voda uz PEG 6000 analiza je provedena kroz vrijeme od 46 min, a za sustav ulje/voda uz PEG 20000 analiza je provedena kroz vrijeme od 45 min.

### 3.2.11. Statistička analiza i modeliranje

#### 3.2.11.1. Analiza osnovnih komponenata (PCA) NIR spektara mikroemulzija

NIR spektri pripremljenih mikroemulzija analizirani su metodom glavnih komponenata (eng. *Principle Component Analysis*, PCA) u programskom paketu Statistica 13.0. Metoda glavnih komponenata ima za cilj redukciju sustava podataka i njihovu interpretaciju na temelju analize strukture matrice kovarijanci i kovarijanci skupa izvornih varijabli pomoću maloga broja njihovih. Zbog navedenoga, metodu glavnih komponenata možemo definirati kao alat za pronalaženje sličnosti i različitosti između podataka.

#### 3.2.11.2. Umjetne neuronske mreže za predikciju Feretovog promjera kapljica u mikroemulzijama

Umjetne neuronske mreže su multivarijantni nelinearni modeli, gdje su analizirani podaci mapirani do izlaznih varijabli preko nekoliko slojeva obrade podataka. Članovi mreže postupno se prilagođavaju, često u fazi učenja, gdje umjetne neuronske mreže proučavaju podatke i

pokušavaju odrediti uzorke po kojima se ulazni podaci ponašaju, te nakon nekoliko slojeva mreža predvidjeti specifične izlazne varijable.

U ovom radu razvijeni su modeli višeslojnih perceptronskih neuronskih mreža (eng. Multiple Layer Perceptrone, MLP) za predikciju Feretovog promjera kapljica u mikroemulzijama na temelju NIR spektra primjenom programskog paketa Statistica. Kao ulazne varijable izabrano je prvih 5 faktora iz PCA analize koji maksimalno doprinose varijabilnosti, a podaci za učenje, testiranje i validaciju su podijeljeni u omjeru 70:15:15. Odabir optimalne arhitekture neuronske mreže temeljen je na koeficijentu determinacije i srednjem kvadratnome odstupanju između eksperimentalnih rezultata i modelom previđenih rezultata.

### *3.2.11.3. Procjena kinetičkih parametra destabilizacije mikroemulzija*

U svrhu analize dinamike procesa destabilizacije mikroemulzija provedena je procjena vrijednosti parametra kinetičkih modela. Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka procijeni su parametri modela kinetike prvog reda u programskom paketu Excel. Model kinetike prvog reda dan je izrazom (jednadžba 11):

$$c_t = c_0 \cdot (1 - e^{(-k \cdot t)}) \quad [11]$$

gdje  $c_0$  predstavlja početnu vrijednost zeta potencijala (mV),  $c_t$  predstavlja vrijednost zeta potencijala u vremenu  $t$  (mV), a  $k$  predstavlja brzinu destabilizacije ( $\text{min}^{-1}$ ).

Koeficijenti modela kinetike prvog reda za opis procesa destabilizacije mikroemulzija određeni su linearizacijom jednadžbe 11.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu proveden je postupak optimiranja procesa pripreme mikroemulzija ulje u vodi u mikroprotočnom sustavu uz emulgator polietilen glikol. Analiziran je utjecaj destilirane vode i vodenog ekstrakta mente kao kontinuirane faze. U poglavlju 4.1. biti će prikazani rezultati analize fizikalnih svojstava komponenata mikroemulzija (tablica 3) dok će u poglavlju 4.2. biti prikazani rezultati analize profila strujanja dvofaznog sustava u mikrokanalu (slika 6-7). Rezultati optimiranja procesa pripreme mikroemulzija ulje u vodi i ulje u vodenom ekstraktu mente biti će prikazani u poglavlju 4.3 (slike 8-14, tablice 4-6). Analiza kinetike destabilizacije emulzija ulje u vodi pripremljenih pri optimalnim uvjetima biti će prikazan u poglavlju 4.4. (slike 15-16, tablica 7) dok će u poglavlju 4.5. biti prikazani rezultati analize NIR spektara emulzija, razvijeni modeli umjetnih neuronskih mreža za predviđanje Feretovog promjera kapljica i PCA analiza (slika 17-18, tablica 8).

### **4.1 ODREĐIVANJE FIZIKALNIH SVOJSTVA KOMPONENATA ZA PRIPREMU MIKROEMULZIJA**

Kako bi se moglo precizno kontrolirati proces pripreme mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu prethodno su određene gustoće i viskoznosti komponenata (ulje, vodene otopine polietilen glikola u koncentracijama 2, 4 i 6 % te otopine polietilen glikola u vodenom ekstraktu mente u koncentracijama 2, 4 i 6 %). Gustoća je određena gravimetrijski piknometrom, a viskoznost je određena uz pomoć kapilarnog (Ostwaldovog) viskozimetra u odnosu na destiliranu vodu. Rezultati su prikazani u tablici 3.

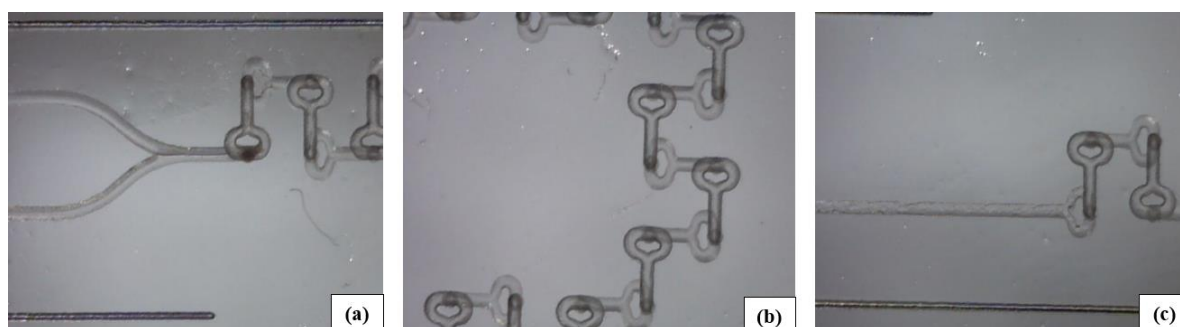
Tablica 3. Gustoća i viskoznost ulja, vodenih otopine polietilen glikola te otopina polietilen glikola u vodenom ekstraktu mente

komponenta		$\rho / \text{g mL}^{-1}$	$\eta / \text{mPa s}$
ulje		0,679	63
	udio emulgatora /%		
PEG 1500 u vodi	2	0,9963	1,0793
	4	1,0210	1,2263
	6	1,0230	1,3751
PEG 6000 u vodi	2	1,3245	1,7847
	4	1,3207	2,0899
	6	1,3264	2,6789
PEG 20000 u vodi	2	1,3324	2,1856
	4	1,2939	3,2875
	6	1,3128	4,8419
PEG 1500 u vodenom ekstraktu mente	2	1,3163	1,4324
	4	1,3099	1,4911
	6	1,3206	1,6291
PEG 6000 u vodenom ekstraktu mente	2	1,3378	1,5612
	4	1,2749	1,9201
	6	1,3259	2,4664
PEG 20000 u vodenom ekstraktu mente	2	1,3256	2,2234
	4	1,3366	3,8296
	6	1,3028	5,3381

Za emulgator PEG otopljen u vodi, očekivano najmanja gustoća i najmanja viskoznost izmjerene su za 2 %-tnu otopinu emulgatora PEG 1500, dok su najveće vrijednosti gustoće i viskoznosti uočene za 6 % otopinu PEG 20000. Trend porasta gustoće i viskoznosti otopina porastom molekulske mase emulgatora i porastom udjela korištenog emulgatora uočeno je i za fazu PEG otopljen u vodenom ekstraktu mente. Važno je napomenuti da su gustoće i viskoznosti otopina PEG-a u vodenom ekstraktu mente više u odnosu na iste za otopine PEG-a u vodi zbog prisutnosti ekstrahiranih tvari u ekstraktu.

## 4.2 ANALIZA PROFILA STRUJANJA DVOFAZNOG SUSTAVA U MIKROPROTOČNOM SUSTAVU

Nakon određenih fizikalnih svojstava komponenata za pripremu mikroemulzija, provedena je analiza profila strujanja dvofaznog sustava vodena faza – uljna faza u mikroprotočnom sustavu s mikrokanalima opremljenim mikromješačima. Analizirani su različiti udjeli uljne faze od 25, 30 i 35 %, pri ukupnim protocima  $q = 200, 300$  i  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ . Profili strujanja promatrani su pod mikroskopom i fotografirani pod povećanjem od 20 puta. Budući da su za sve kombinacije analiziranih protoka dobiveni isti profili strujanja, na slici 6 je prikazan reprezentativni primjer uočenog profila strujanja.



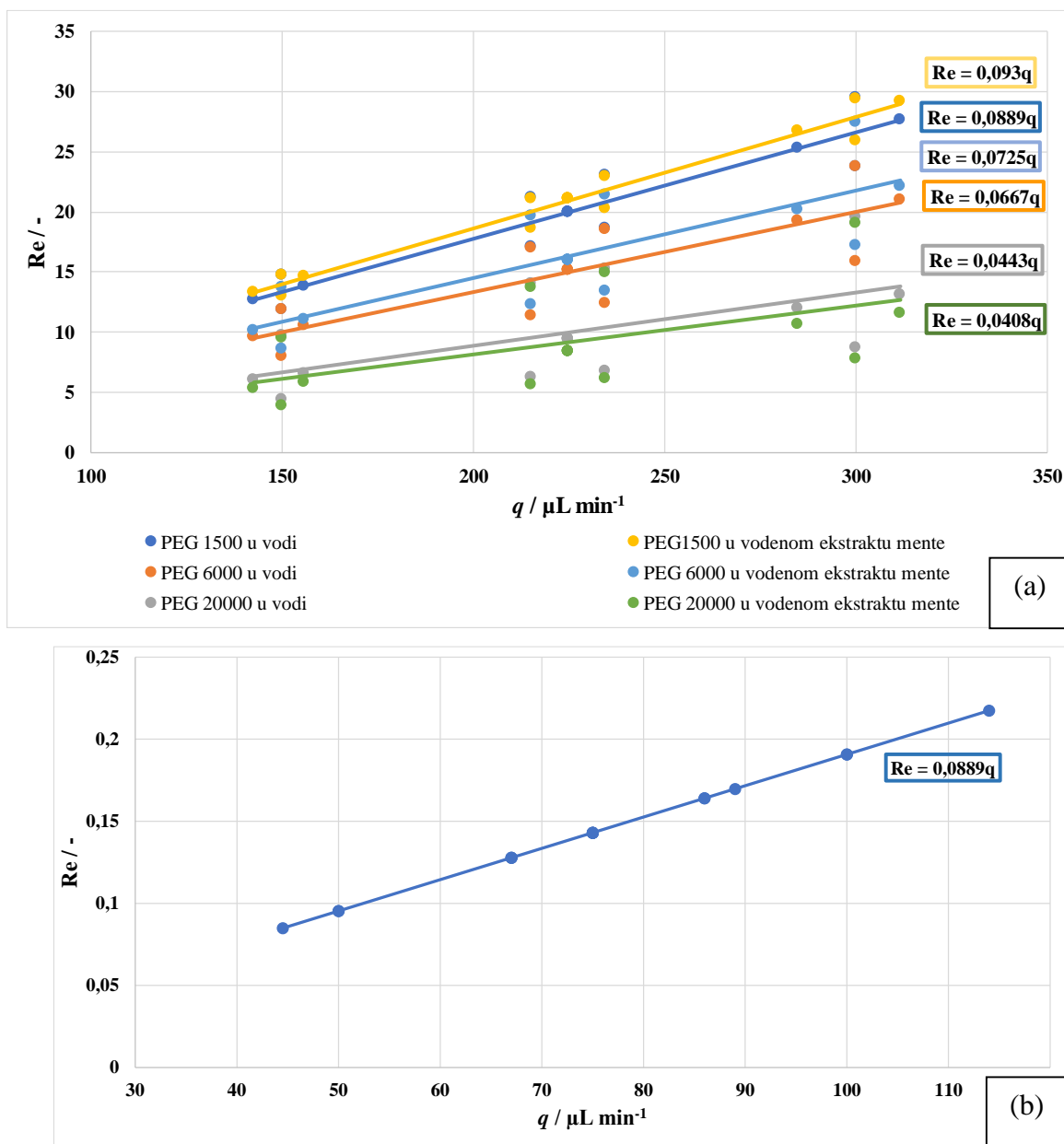
Slika 6. Profili strujanja u mikrokanalu s mikromiješalima u izvedbi viseće kapi (pri protoku uljne faze od  $q = 50 \mu\text{L min}^{-1}$  i protoku vodene faze od  $q = 150 \mu\text{L min}^{-1}$ ). (a) ulazni dio mikrokanala, (b) središnji dio mikrokanala i (c) izlazni dio mikrokanala.

Uvođenjem dviju nemiješljivih faza u mikrokanale, najčešće se formiraju paralelno ili segmentirano strujanje (Doku i sur., 2005). Razvoj oblika strujanja ovisi o linearnoj brzini strujanja faza, omjeru faza, svojstvima fluida, geometriji mikrokanala i materiju od kojeg mikrokanal izrađen (Kashid i sur., 2007). U ulaznoj sekciji (slika 6a), prije prvog mikromješača, jasno se vidi paralelno strujanje i odvojenost faza. Naime, u radovima Marques i sur., 2012, Novak i sur., 2012, Gojun i sur., 2019 u kojima je ispitivano protjecanje dvofaznih sustava kapljevina-kapljevina u mikroreaktorima bez hrapavosti površine stjenke mikrokanala, opisano je formiranje paralelnog toka dviju faza koje je bilo stabilno čitavom dužinom mikrokanala. Time je potvrđeno da hrapavost površine ima značajan utjecaj površinske hrapavosti na režim strujanja. Na slici 6.b, vidi se da su obje faze vrlo dobro promiješane već nakon prolaska kroz prvi mikromješač i ne uočava se nikakvo razdvajanje faza. Miješanje se provodi po principu Coanda efekta; do promjene smjera toka dolazi u posebno konstruiranoj strukturi mikromiješala pri čemu nastaje nova međufazna površina unutar toka (Hessel i sur., 2005). U izlaznoj sekciji,



na slici 6.c, prilikom izlaza dvofaznog sustava sa zadnjeg mješača, jasno se vidi potpuna izmiješanost sustava.

U svrhu dobivanja detaljnog uvida u hidrodinamičke uvjete pri strujanju dvofaznog sustava vodena (vodena otopina PEG i otopina PEG u vodenom ekstraktu menta) – uljna faza u mikrokanalu dimenzija poprečnog presjeka  $250 \cdot 150 \mu\text{m}$  i hrapavosti površine od  $1 \mu\text{m}$  izračunate su vrijednosti Reynoldsovog broj (Re) za svaku pojedinu fazu. Re je bezdimenzijska veličina koja predstavlja omjer inercijske i viskozne sile te definira režim strujanja u protočnim sustavima. Ovisnost Re o protoku vodene faze za sustav PEG otopljen u vodenoj prikazan je na slici 7a, dok je ovisnost Re o protoku uljne faze prikazana na slici 7b.



Slika 7. Grafički prikaz ovisnosti Re broja o (a) protoku vodene otopine PEG-a, (b) protoku uljne faze.

Uočeno je da za analizirane vrijednosti protoka vodene faze  $Re$  ne prelazi 100. Najviše vrijednosti  $Re$  broja dobivene su za otopinu PEG-a 1500 u vodenom ekstraktu mente. Pri protoku od  $q = 300 \mu\text{L min}^{-1}$  određena je vrijednost  $Re$  od 29,539 za 2 % otopinu PEG 1500 u vodenom ekstraktu mente. Plazl i Lakner, 2010 su u svojem radu naveli da se prijelazno područje između laminarnog i turbulentnog strujanja u mikrokanalima postiže za približne vrijednosti Reynolds-ove značajke  $Re = 100$  na temelju čega se može zaključiti da su svi pokusi provedeni u laminarnom režimu strujanja. Uočeno je također da su najviše vrijednosti  $Re$  broja dobivene za sustave u kojima je kao emulgator korišten PEG 1500. Povećanjem molekularne mase PEG-a vrijednost  $Re$  broja opada jer raste viskoznost navedenih otopina. Najmanje vrijednosti  $Re$  broja dobivene su za uljnu fazu što bi značilo da je puno veća gravitacijska sila koja djeluje na ulje nego na ostale sustave.

#### 4.3 OPTIMIRANJE UVJETA PRIPREME MIKROEMULZIJA U MIKROPROTOČNOM SUSTAVU

U ovom radu proveden je postupak optimiranja uvjeta pripreme mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu. Ispitan je utjecaj udjela emulgatora ( $X_1 = 2, 4$  i  $6 \%$ ), udjela uljne faze ( $X_2 = 25, 30$  i  $35 \%$ ) te utjecaj različitih ukupnih protoka ( $X_3 = 200, 300$  i  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ ) prema dizajnu eksperimenata prikazanih u tablici 2. Za sva tri odabrana emulgatora (PEG 1500, PEG 6000 i PEG 20000) otopljenih u vodi i vodenom ekstraktu mente provedeno je 17 nezavisnih eksperimenata te je analiziranim emulzijama određen zeta potencijal ( $\zeta$ ), vodljivost ( $C$ ), Feretov promjer kapljica ( $d$ ) te su snimani NIR spektri. Eksperimentalni rezultati za sustave u kojima su PEG-ovi otopljeni u vodi prikazani su u tablici 4, dok su za sustave u kojima su PEG-ovi otopljeni u vodenom ekstraktu mente rezultati prikazani u tablici 5.

Tablica 4. Zeta potencijal, vodljivost i Feretov promjer mikroemulzija pripremljenih u mikroprotočnom sustavu uz PEG-ove otopljene u vodi

X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	PEG 1500			PEG 6000			PEG 20000		
			ζ/mV	C /mS cm <sup>-1</sup>	d /μm	ζ/mV	C /mS cm <sup>-1</sup>	d /μm	ζ/mV	C /mS cm <sup>-1</sup>	d /μm
2 (-1)	30 (0)	200 (-1)	-55,6025 ±2,4750	0,0221±0,0001	123,9333±8,6381	-32,3215 ±2,1174	0,0136±0,0003	113,8333 ±5,0520	-23,2620 ±3,5130	0,0138±0,0002	118,7333±3,5905
6 (+1)	30 (0)	200 (-1)	-36,5454 ±2,6860	0,0466±0,0008	89,5333±28,2425	-17,1002 ±0,2620	0,0241±0,0003	139,5333 ±12,1421	0,5005 ± 0,1646	0,0006±0,0000	127,2333±21,5562
2 (-1)	30 (0)	400 (+1)	-53,7521 ±3,1537	0,0238±0,0003	90,2333±20,1266	-34,1289 ±1,4656	0,0139±0,0003	127,2667 ±25,2135	-27,7386 ±1,9007	0,0132±0,0001	114,1333±23,1110
6 (+1)	30 (0)	400 (+1)	-37,2885 ±2,4066	0,0488±0,0007	108,0000±22,0329	-15,8367 ±1,4230	0,0245±0,0003	140,6±14, 1436	-8,3256 ±0,7711	0,0236±0,0003	129,3667±31,4725
2 (-1)	25 (-1)	300 (0)	-46,3805 ±7,5189	0,0237±0,0005	96,3333±30,0498	-33,9928 ±2,0210	0,0145±0,0006	117,0333 ±32,5221	-19,9362 ±2,694	0,0149±0,0002	141,9000±3,7078
6 (+1)	25 (-1)	300 (0)	-40,1549 ±2,6070	0,0466±0,0007	85,7667±25,0292	-16,3530 ±0,4140	0,0234±0,0001	158,1333 ±4,5768	-9,0475 ±0,4657	0,0238±0,0003	124,3333±11,9289
2 (-1)	35 (+1)	300 (0)	-55,7952 ±3,0398	0,0225±0,0003	89,7333±27,7811	-35,7271 ±1,8484	0,0134±0,0002	129,3667 ±6,0429	-22,1113 ±6,2153	0,0132±0,0002	125,9667±13,2209
6 (+1)	35 (+1)	300 (0)	-38,7544 ±0,6376	0,0463±0,0007	85,4000±20,5554	-15,8488 ±0,5982	0,0289±0,0004	131,0667 ±2,7409	-2,4240 ±0,5421	0,0006±0,0000	144,4000±5,5822
4 (0)	25 (-1)	200 (-1)	-20,8167 ±0,5633	0,0230±0,0003	144,8077±46,8461	-22,9696 ±1,3137	0,0216±0,0004	100,3667 ±13,5277	-14,1481 ±0,8558	0,0188±0,0003	127,8667±3,7299
4 (0)	25 (-1)	400 (+1)	-21,2519 ±1,1822	0,0234±0,0006	126,8846±8,6085	-20,7211 ±0,3974	0,0237±0,0005	87,7667± 19,4292	-13,5820 ±1,4167	0,0201±0,0004	130,8667±29,7249
4 (0)	35 (+1)	200 (+1)	-20,1103 ±0,5500	0,0230±0,0003	152,0769±12,4577	-21,6619 ±1,4566	0,0215±0,0003	116,0333 ±9,1557	-15,1446 ±1,4524	0,0191±0,0003	127,0000±9,1123
4 (0)	35 (+1)	400 (+1)	-20,1447 ±1,5777	0,0231±0,0003	128,7308±10,4214	-18,5556 ±2,1981	0,0210±0,0003	114,7333 ±11,5488	-12,6908 ±0,9956	0,0191±0,0002	111,5667±20,4091
4 (0)	30 (0)	300 (0)	-17,9392 ±1,3881	0,0239±0,0002	127,7667±15,8912	-23,1222 ±0,4709	0,0207±0,0002	104,0000 ±3,9392	-15,2397 ±0,4377	0,0211±0,0002	137,3333±21,6768
4 (0)	30 (0)	300 (0)	-20,4198 ±1,1706	0,0222±0,0002	112,3000±25,1096	-20,7787 ±1,4929	0,0217±0,0003	95,5333± 29,4287	-14,6866 ±0,6697	0,0211±0,0005	131,5333±6,2903
4 (0)	30 (0)	300 (0)	-18,6112 ±0,4823	0,0222±0,0001	130,0667±29,4289	-21,9282 ±1,9739	0,0216±0,0005	82,5667± 16,4876	-14,9632 ±0,1214	0,0211±0,0004	133,5333±18,1026
4 (0)	30 (0)	300 (0)	-18,7189 ±0,6655	0,0229±0,0010	135,7000±39,7042	-23,3199 ±1,0356	0,0220±0,0003	100,3000 ±9,0788	-14,3200 ±0,2268	0,0203±0,0004	121,9000±9,1212
4 (0)	30 (0)	300 (0)	-23,3093 ±0,3898	0,0218±0,0001	138,2667±19,2317	-21,8329 ±1,6979	0,0213±0,0004	97,0667± 19,066	-14,3433 ±2,1252	0,0229±0,0007	108,5333±8,5328

Tablica 5. Zeta potencijal, vodljivost i Feretov promjer mikroemulzija pripremljenih u mikroprotočnom sustavu uz PEG-ove otopljene u vodenom ekstrakt mente

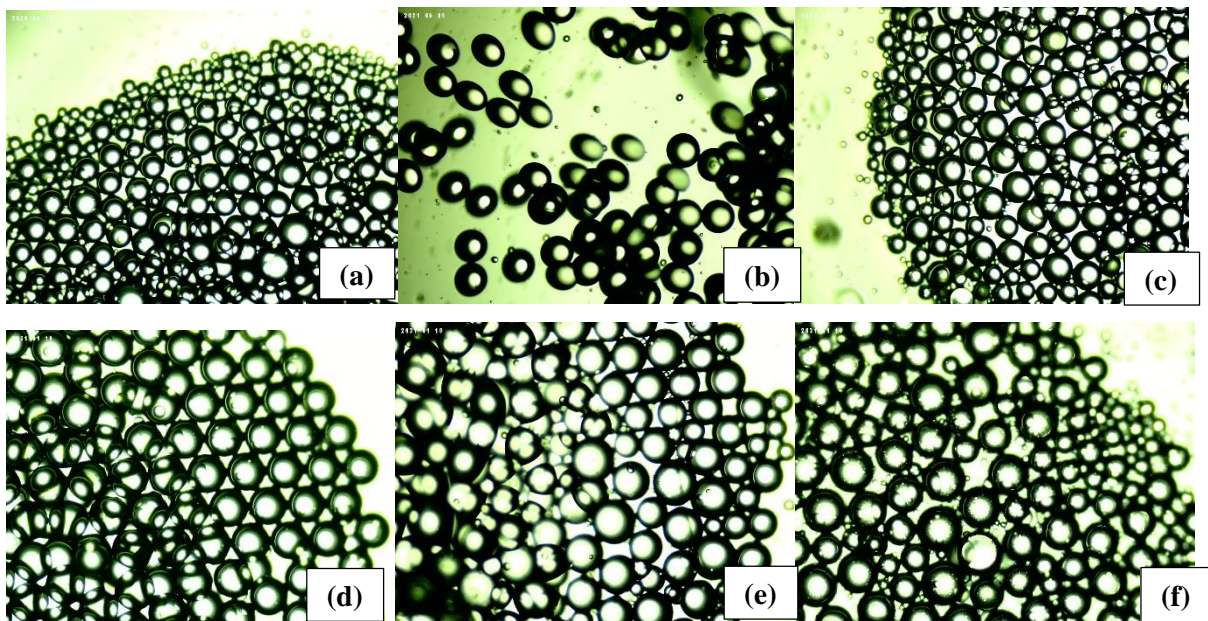
X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	PEG 1500			PEG 6000			PEG 20000		
			ζ/mV	C /mS cm <sup>-1</sup>	d /μm	ζ/mV	C /mS cm <sup>-1</sup>	d /μm	ζ/mV	C /mS cm <sup>-1</sup>	d /μm
2 (-1)	30 (0)	200 (-1)	-4,7921 ±0,6581	1,3529±0,0091	140,9667±9,9913	-6,1186±0,5086	1,2521±0,0032	75,0000±39,1513	-2,7836±0,2925	1,1726±0,0076	116,3667±19,8346
6 (+1)	30 (0)	200 (-1)	-4,1012 ±0,6558	1,2635±0,0149	146,7667±29,9778	-5,3849±0,5988	1,2104±0,0079	95,2667±22,9977	-0,2077±0,0648	0,0006±1·10 <sup>-5</sup>	114,9000±29,6419
2 (-1)	30 (0)	400 (+1)	-4,4654 ±0,4985	1,4891±0,0074	137,7333±5,6929	-6,5743±1,3918	1,4470±0,0052	143,0000±21,2927	-3,7625±0,5253	1,1419±0,0077	139,7000±3,9579
6 (+1)	30 (0)	400 (+1)	-5,0479 ±1,1086	1,3034±0,0108	130,6333±22,5854	-5,7972±0,2859	1,2446±0,0013	85,7333±25,1217	0,0081±0,4645	0,0006±8·10 <sup>-6</sup>	163,3333±8,3515
2 (-1)	25 (-1)	300 (0)	-4,7394 ±0,4446	1,46±0,0175	153,7±13,0758	-4,255±1,5223	1,3441±0,0089	72,6667±10,6652	-3,0464±0,2994	1,3706±0,0157	149,6667±17,1672
6 (+1)	25 (-1)	300 (0)	-2,6028 ±0,4832	1,3499±0,0223	159,8333±28,4618	-4,4874±0,4702	1,2622±0,0119	82,7667±10,023	0,4923±1,4529	0,0006±3·10 <sup>-6</sup>	148,3333±4,1467
2 (-1)	35 (+1)	300 (0)	-4,9996 ±0,2740	1,4113±0,0071	141,7667±3,0249	-6,3043±0,3297	1,3982±0,0048	115,1000±5,73766	-3,5441±0,5429	1,4383±0,0137	104,5333±36,8199
6 (+1)	35 (+1)	300 (0)	-3,9304 ±0,3000	1,338±0,0141	122,1667±34,5214	-5,4641±0,3977	1,1659±0,0027	107,3667±4,02135	0,3121±0,3652	0,0006±2·10 <sup>-5</sup>	154,4667±14,6422
4 (0)	25 (-1)	200 (-1)	-3,5047 ±0,1804	1,4241±0,0096	121,4±3,6065	-2,6290±0,2324	1,3632±0,0142	102,2333±14,3351	-2,7186±0,6055	1,1760±0,0051	148,0333±16,2151
4 (0)	25 (-1)	400 (+1)	-3,707 ±0,1528	1,4896±0,0221	143,2333±5,8409	-2,8241±0,9365	1,3893±0,0117	52,3667±16,5018	-0,8484±0,1783	0,0006±9·10 <sup>-6</sup>	132,1667±35,1225
4 (0)	35 (+1)	200 (+1)	-4,1414 ±0,4757	1,48±0,0292	160,8333±41,2704	-4,5443±0,3955	1,3471±0,0034	75,5333±19,9045	-2,4712±0,3655	1,1895±0,0131	135,6000±19,308
4 (0)	35 (+1)	400 (+1)	-3,3072 ±0,2729	1,4731±0,0177	136,9667±30,1725	-3,8279±0,3775	1,3287±0,0067	34,3000±5,54698	-1,9592±0,0940	1,3969±0,0252	139,1000±36,1809
4 (0)	30 (0)	300 (0)	-2,7411 ±0,3975	1,4731±0,0177	118,3±33,5221	-2,8153±0,3226	1,3230±0,0035	164,9333±33,7342	-2,2365±0,0320	1,4383±0,0327	131,4667±15,0051
4 (0)	30 (0)	300 (0)	-2,0881 ±0,2152	1,3642±0,0052	140,4667±17,6903	-2,9944±0,4298	1,4365±0,0138	154,5333±4,54657	-2,4305±0,0750	1,4156±0,0195	64,0667±21,5390
4 (0)	30 (0)	300 (0)	-3,3897 ±0,7559	1,3642±0,0052	160,7667±20,8437	-3,8461±0,7724	1,3468±0,0025	40,4333±6,96634	-2,3056±0,3628	1,4181±0,0151	246,9333±144,2000
4 (0)	30 (0)	300 (0)	-2,5972 ±0,5449	1,3545±0,0093	121,4333±29,2347	-2,0889±0,2868	1,3134±0,0112	82,0000±36,5381	-2,2714±0,3632	1,2936±0,0033	140,1000±5,7377
4 (0)	30 (0)	300 (0)	-2,8682 ±0,2979	1,4282±0,0110	161,9±11,8507	-3,122±0,2125	1,3604±0,0131	90,8333±54,3628	-0,4829±0,1437	0,0006±1·10 <sup>-5</sup>	147,3667±24,5209

Zeta potencijal se definira kao razlika potencijala između nabijene površine kapljica disperzne faze i pozitivno nabijenih iona u vodenoj otopini emulgatora koja čini kontinuiranu fazu. Visoke pozitivne ili negativne vrijednosti zeta potencijala upućuju na stabilnu emulziju, dok vrijednosti zeta potencijala oko nule upućuju na flokulaciju (Pinto i Buss, 2020). Na temelju rezultata prikazanih u tablici 4 može se zaključiti da su korištenjem PEG 1500 kao emulgatora, najstabilnije mikroemulzije dobivene u eksperimentima 1 i 7. Eksperiment 1 proveden je pri udjelu emulgatora od 2 %, udjelu ulja od 30 % te ukupnom protoku od  $200 \mu\text{L min}^{-1}$  te je za pripremljenu emulziju izmjeren zeta potencijal od  $\zeta = -55,6025 \pm 2,4750 \text{ mV}$ . Nadalje, eksperiment 7 proveden je pri udjelu emulgatora od 2 %, udjelu ulja od 35 % te ukupnom protoku od  $300 \mu\text{L min}^{-1}$  te je za pripremljenu emulziju izmjeren zeta potencijal od  $\zeta = -55,7952 \pm 3,0398 \text{ mV}$ . Eksperimentalni uvjeti eksperimenta 7 osigurali su također najstabilniju emulziju primjenom PEG 6000 ( $\zeta = -35,7271 \pm 1,8484 \text{ mV}$ ). Primjenom PEG 200000 kao emulgatora najstabilnije emulzija dobivena je u eksperimentu 3 (udio emulgatora od 2 %, udio ulja od 30 % te ukupni protoku od  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ ) gdje je izmjerena vrijednost zeta potencijala od  $\zeta = -27,7386 \pm 1,9007 \text{ mV}$ ). Prema rezultatima prikazanim u tablici 4., može se zaključiti da uporaba emulgatora veće molekulske mase za posljedicu ima nižu stabilnost emulzija. Primjenom vodenog ekstrakta mente kao kontinuirane faze za pripremu mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu, dobivaju se emulzije jako niske stabilnosti (tablica 5). Primjenom PEG 1500 kao emulgatora, najstabilnija emulzija je dobivena u eksperimentu 4 (udio emulgatora od 6 %, udio ulja od 30 % te ukupni protok od  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ ) gdje je izmjerena vrijednost zeta potencijala od  $\zeta = -5,0479 \pm 1,1086 \text{ mV}$ . Nadalje primjenom PEG 6000 i PEG 20000 kao emulgatora, najstabilnija emulzija je dobivena u eksperimentu 3 (udio emulgatora od 2 %, udio ulja od 30 % te ukupni protok od  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ ) gdje su izmjerene vrijednosti zeta potencijala od  $\zeta = -6,5743 \pm 1,3918 \text{ mV}$  za PEG 6000 te  $\zeta = -3,7625 \pm 0,5253 \text{ mV}$  za PEG 20000.

Mjerenjem vodljivosti može se identificirati jesu li faze ulje u vodi ili obje faze kontinuirane te vrijedi da je za emulzije ulje u vodi (U/V), vodljivost stabilna do trenutka povećanja koncentracije kapljica ulja čime dolazi do porasta vodljivosti (Lagues i Sauterey, 1980). Analizom rezultata prikazanih u tablici 4 može se uočiti da nema značajnih razlika u vodljivosti između emulzija pripremljenih s istim emulgatorom. Uočeno je također da najviše vodljivosti pokazuju mikroemulzije pripremljene s PEG 1500 emulgatorom dok su najniže vodljivosti izmjerene za mikroemulzije s PEG 20000 kao emulgatorom. Usporedbom vodljivosti emulzija u kojim je emulgator otopljen u vodi i emulzija u kojima je emulgator otopljen u vodenom

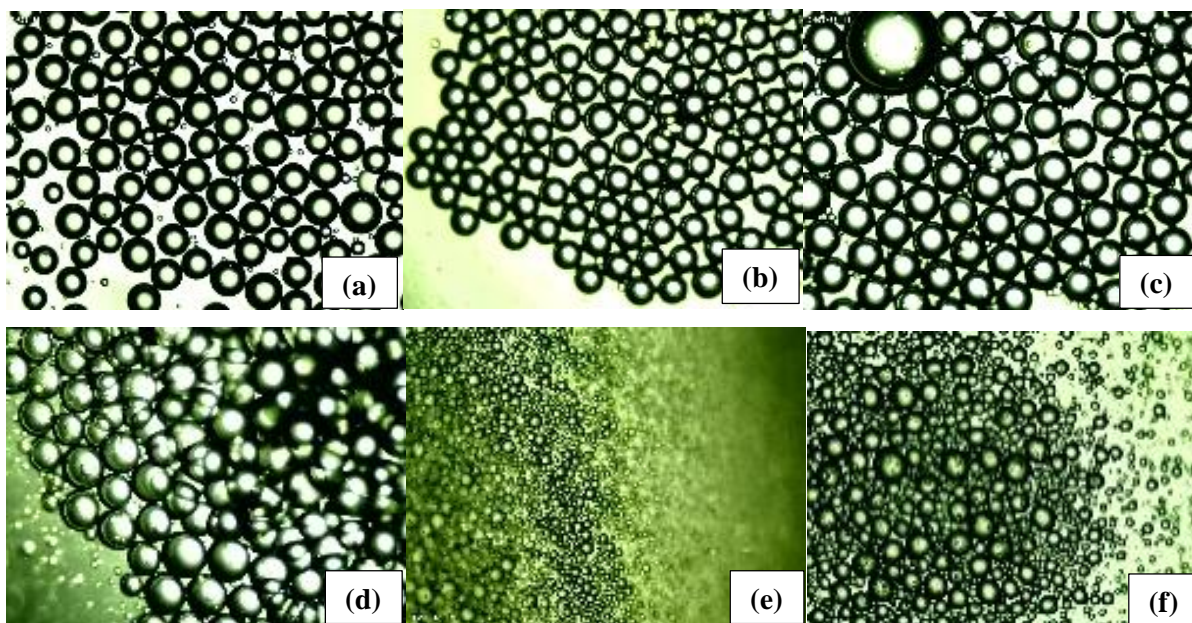
ekstraktu mente vidljivo je da emulzije s vodenim ekstraktom (tablica 5) imaju više vodljivosti. To se može objasniti prisustvom ekstrahiranih tvari iz mente.

Na temelju fotografija emulzija fotografiranih pod mikroskopom nakon izlaska emulzije iz mikrokanala određene su vrijednosti Feretovog promjera disperzne faze za sve pripravljene emulzije u programu ImageJ (verzija 1.8.0, NIH, SAD). Na slici 8, 9 i 10 prikazane su izabrane fotografije mikroemulzija pripremljenih uz emulgatore PEG 1500, PEG 6000 i PEG 20 000 na izlasku iz mikroprotočnog sustava.

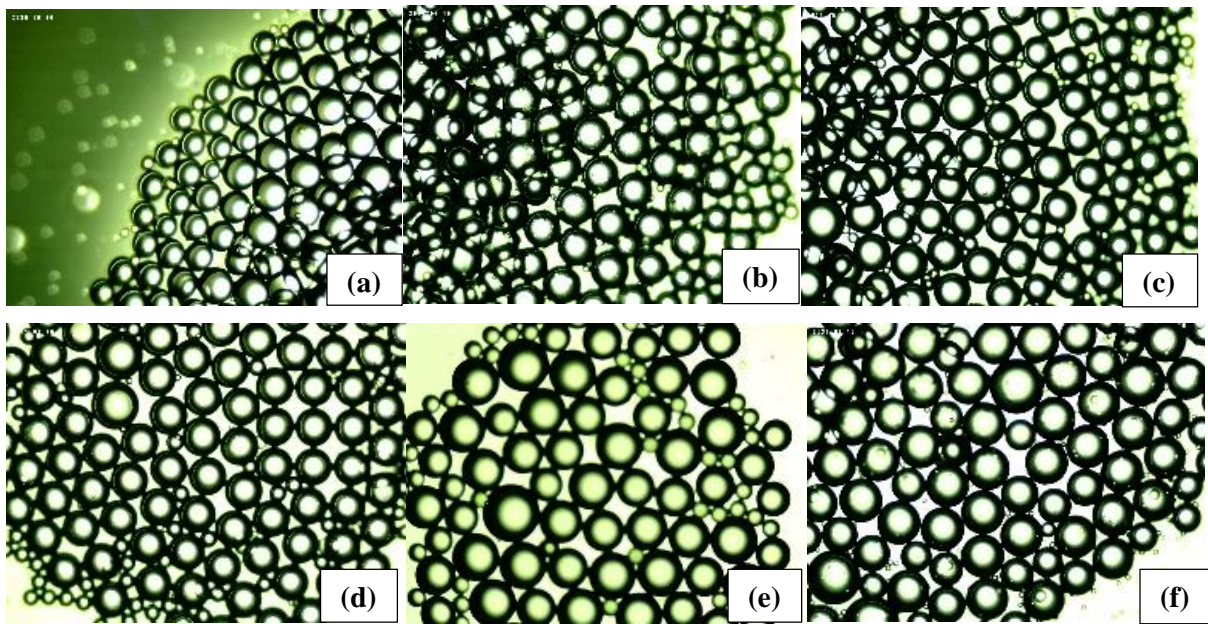


Slika 8. Fotografije mikroemulzija pripremljenih uz PEG 1500 kao emulgatorom pri ukupnom protoku od  $q = 400 \mu\text{L min}^{-1}$  : (a) ulje/voda, udio emulgatora 2%, udio ulja 30%; (b) ulje/voda, udio emulgatora 4 %, udio ulja 30 %; (c) ulje/voda, udio emulgatora 6 %, udio ulja 35 %; (d) ulje/vodeni ekstrakt mente, udio emulgatora 2 %, udio ulja 30 %; (e) ulje/vodeni ekstrakt mente, udio emulgatora 4 %, udio ulja 30 %; (f) ulje/vodeni ekstrakt mente, udio emulgatora 6 %, udio ulja 35 %





Slika 9. Fotografije mikroemulzija pripremljenih uz PEG 6000 kao emulgatorom pri ukupnom protoku od  $q = 400 \mu\text{L min}^{-1}$  : (a) voda/ulje, udio emulgatora 2%, udio ulja 30%; (b) ulje/voda, udio emulgatora 4 %, udio ulja 30 %; (c) ulje/voda e, udio emulgatora 6 %, udio ulja 35 %; (d) ulje/vodeni ekstrakt mente udio emulgatora 2 %, udio ulja 30 %; (e) ulje/vodeni ekstrakt mente, udio emulgatora 4 %, udio ulja 30 %; (f) ulje/vodeni ekstrakt mente, udio emulgatora 6 %, udio ulja 35 %



Slika 10. Fotografije mikroemulzija pripremljenih uz PEG 20 000 kao emulgatorom pri ukupnom protoku od  $q = 400 \mu\text{L min}^{-1}$  : (a) ulje/voda, udio emulgatora 2%, udio ulja 30%; (b) ulje/voda, udio emulgatora 4 %, udio ulja 30 %; (c) ulje/voda, udio emulgatora 6 %, udio ulja 35 %; (d) ulje/vodeni ekstrakt mente, udio emulgatora 2 %, udio ulja 30 %; (e) ulje/vodeni ekstrakt mente, udio emulgatora 4 %, udio ulja 30 %; (f) ulje/vodeni ekstrakt mente, udio emulgatora 6 %, udio ulja 35 %

Feretov promjer kapljica također se smatra kao indikator stabilnosti emulzije i obrnuto je proporcionalan na stabilnost emulzije. Za mikroemulzije s vodom kao kontinuiranom fazom (tablica 4) približno slične vrijednosti Feretovog promjera izmjerene su za emulzije s PEG 1500 ( $d_{\text{srednje}} = 115,6196 \mu\text{m}$ ) i PEG 6000 ( $d_{\text{srednje}} = 115,01176 \mu\text{m}$ ) kao emulgatorom, dok su veće kapljice izmjerene za PEG 20000 ( $d_{\text{srednje}} = 126,8353 \mu\text{m}$ ). S druge strane za mikroemulzije s vodenim ekstraktom mente kao kontinuiranom fazom (tablica 5) najmanje vrijednosti Feretovog promjera izmjerene su za emulzije s PEG6000 ( $d_{\text{srednje}} = 97,6511 \mu\text{m}$ ), dok su za PEG 1500 ( $d_{\text{srednje}} = 141,1098 \mu\text{m}$ ) i PEG 20000 ( $d_{\text{srednje}} = 139,7725 \mu\text{m}$ ) dobivene kapljice većih promjera u usporedbi s vodom kao vodenom fazom.

Polinom drugog reda s interakcijskim članovima upotrijebljen je za opis eksperimentalnih podataka. Razvijeni su kvadratni modeli za opis zeta potencijala i Feretovog promjera.



Procjena optimalnih uvjeta za pripremu mikroemulzija u mikroprotočnom sustavu je provedena zasebno za zeta potencijal i zasebno za Feretov promjer primjenom funkcije poželjnosti u rasponu od 0 (nepoželjno) do 1 (izrazito poželjno).

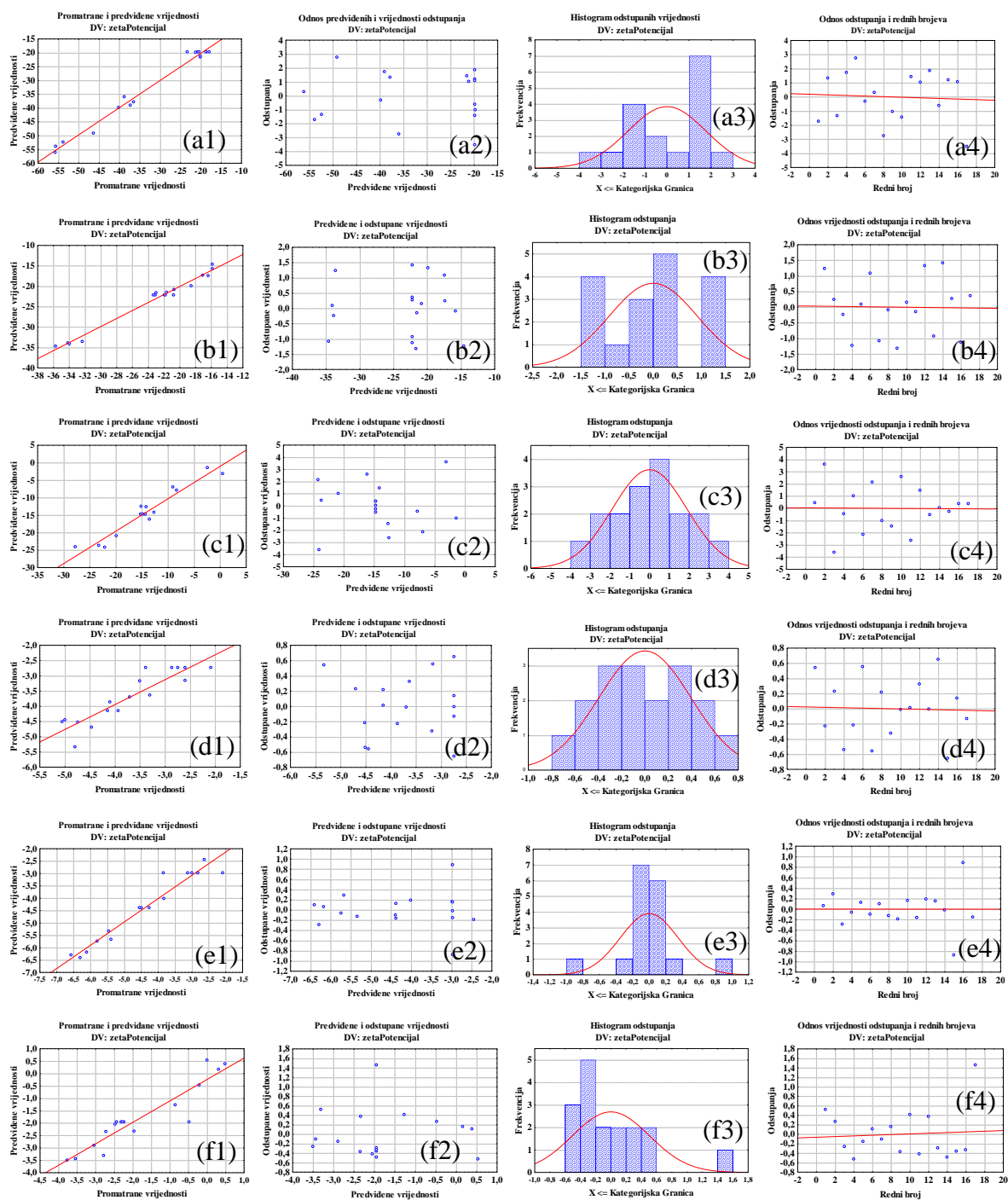
Tablica 6. Modeli odzivnih površina za opis zeta potencijala ( $Y_1$ ) i Feretovog promjera kapljica ( $Y_2$ ). Član  $X_1$  vezan je uz udio emulgatora,  $X_2$  uz udio uljne faze, a  $X_3$  uz ukupni protok obje faze.

Kontinuirana faza	Modeli odzivnih površina za opis zeta potencijal ( $Y_1$ ) i srednjeg Feretovog promjera čestica ( $Y_2$ )	$R^2$
otopina PEG 1500 u vodi	$Y_1 = 14,6968 \cdot X_1 - 1,5502 \cdot X_2 + 0,1594 \cdot X_3 + 25,3439 \cdot X_1^2 + 0,1276 \cdot X_2^2 + 0,6535 \cdot X_3^2 + 5,4076 \cdot X_1 \cdot X_2 - 1,2968 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,2004 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,9846
	$Y_2 = -7,8833 \cdot X_1 + 0,5372 \cdot X_2 - 14,1256 \cdot X_3 + 37,3558 \cdot X_1^2 + 2,1558 \cdot X_2^2 - 11,4608 \cdot X_3^2 + 3,1167 \cdot X_1 \cdot X_2 + 26,0833 \cdot X_1 \cdot X_3 - 2,7115 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,9343
otopina PEG 6000 u vodi	$Y_1 = 17,7579 \cdot X_1 + 0,5608 \cdot X_2 + 1,2027 \cdot X_3 + 3,5769 \cdot X_1^2 - 0,2929 \cdot X_2^2 - 0,9265 \cdot X_3^2 + 1,1193 \cdot X_1 \cdot X_2 + 1,5355 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,4289 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,9809
	$Y_2 = 20,4583 \cdot X_1 + 6,9750 \cdot X_2 + 0,1500 \cdot X_3 - 31,7950 \cdot X_1^2 - 6,2117 \cdot X_2^2 - 2,6200 \cdot X_3^2 - 19,7000 \cdot X_1 \cdot X_2 - 6,1833 \cdot X_1 \cdot X_3 + 5,6500 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,8853
otopina PEG 20000 u vodi	$Y_1 = 18,4379 \cdot X_1 + 1,0857 \cdot X_2 - 2,5707 \cdot X_3 - 0,2579 \cdot X_1^2 - 1,0729 \cdot X_2^2 + 0,2537 \cdot X_3^2 + 4,3992 \cdot X_1 \cdot X_2 - 2,1748 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,9438 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,9279
	$Y_2 = 6,1500 \cdot X_1 - 4,0083 \cdot X_2 - 3,7250 \cdot X_3 - 2,8125 \cdot X_1^2 - 4,7708 \cdot X_2^2 + 7,0125 \cdot X_3^2 + 18,0000 \cdot X_1 \cdot X_2 + 3,3667 \cdot X_1 \cdot X_3 - 9,2167 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,5600
otopina PEG 1500 u vodenom ekstraktu mente	$Y_1 = 0,8285 \cdot X_1 - 0,4562 \cdot X_2 + 0,0029 \cdot X_3 + 1,1339 \cdot X_1^2 + 0,1973 \cdot X_2^2 + 0,7309 \cdot X_3^2 - 0,5337 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,6368 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,5182 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,8169
	$Y_2 = -3,6917 \cdot X_1 - 4,1083 \cdot X_2 - 5,3500 \cdot X_3 - 1,1050 \cdot X_1^2 - 2,6883 \cdot X_2^2 - 2,6533 \cdot X_3^2 - 12,8667 \cdot X_1 \cdot X_2 - 6,4500 \cdot X_1 \cdot X_3 - 22,8500 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,2565
otopina PEG 6000 u vodenom ekstraktu mente	$Y_1 = 0,5297 \cdot X_1 - 1,4863 \cdot X_2 - 0,0867 \cdot X_3 + 2,3333 \cdot X_1^2 - 0,1790 \cdot X_2^2 + 0,6620 \cdot X_3^2 + 0,5303 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,0217 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,4558 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,9412
	$Y_2 = -8,6533 \cdot X_1 + 5,5667 \cdot X_2 - 8,1583 \cdot X_3 - 10,7850 \cdot X_1^2 + 22,8567 \cdot X_2^2 + 17,5817 \cdot X_3^2 - 8,9167 \cdot X_1 \cdot X_2 - 38,7667 \cdot X_1 \cdot X_3 + 4,3167 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,2774
otopina PEG 20000 u vodenom ekstraktu mente	$Y_1 = 3,4353 \cdot X_1 - 0,3853 \cdot X_2 + 0,4048 \cdot X_3 - 0,4059 \cdot X_1^2 - 0,0930 \cdot X_2^2 + 0,1469 \cdot X_3^2 + 0,1587 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,5974 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,6791 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,8640
	$Y_2 = 17,6917 \cdot X_1 - 11,125 \cdot X_2 + 14,85 \cdot X_3 + 5,9433 \cdot X_1^2 + 0,7933 \cdot X_2^2 + 6,4683 \cdot X_3^2 + 25,6333 \cdot X_1 \cdot X_2 + 12,55 \cdot X_1 \cdot X_3 + 9,6833 \cdot X_2 \cdot X_3$	0,1236

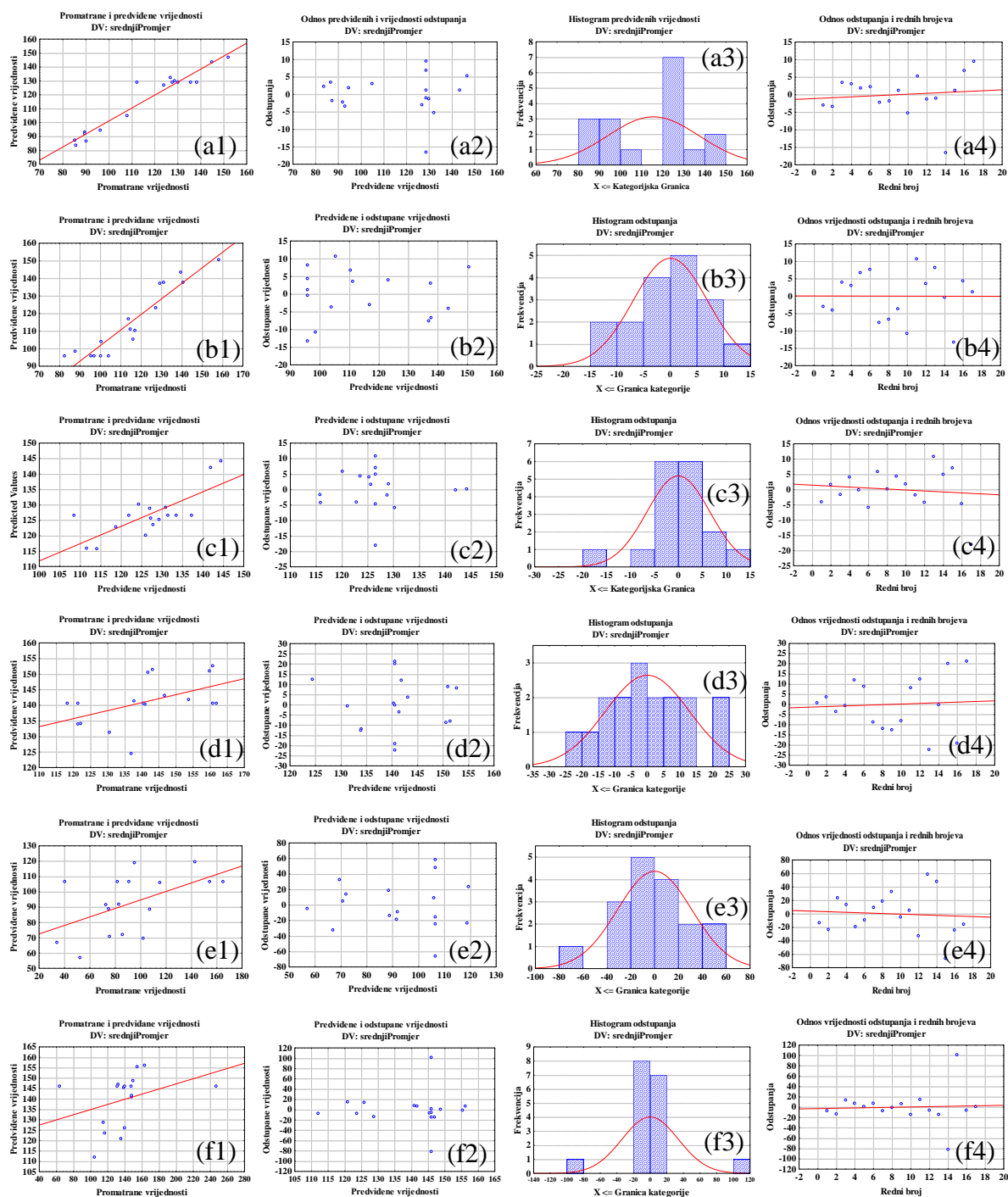
Signifikantni koeficijenti modela odzivnih površina označeni su podebljano u tablici 6. Uočeno je da udio emulgatora ( $X_1$ ) ima pozitivan signifikantan utjecaj na zeta potencijal za emulzije s

PEG 1500 otopljenim u vodi, na emulzije s PEG 20000 otopljenim u vodi te za emulzije s PEG 20000 otopljenim u vodenom ekstraktu mente. Uočen je također signifikantan pozitivan utjecaj udjela emulgatora u kvadratnom članu na zeta potencijal za emulzije s PEG 1500 otopljenim u vodi, na emulzije s PEG 6000 otopljenim u vodi te za emulzije s PEG 6000 otopljenim u vodenom ekstraktu mente. Iz rezultata je također vidljiv signifikantan pozitivan utjecaj udjela emulgatora u kvadratnom članu na vrijednost Feretovog promjera za emulzije s PEG 1500 otopljenim u vodi. Što se tiče koeficijenta determinacije, vidljivo je da je puno bolje slaganje između modela i eksperimenta za emulzije kod kojih je voda bila kontinuirana faza. Najbolje slaganje dobiveno je za opis zeta potencijala ( $Y_1$ ) kod emulzije s PEG 1500 otopljenim u vodi ( $R^2 = 0,9846$ ). Prema Le Man i sur. (2010) model se može smatrati prihvatljivim ako koeficijent determinacije koji opisuje razliku između modela i eksperimenta ima vrijednost iznad 0,75. Na temelju te pretpostavke može se zaključiti da su razvijeni modeli odzivnih površina prihvatljivi za opis zeta potencijala i Feretovog promjera emulzija kod kojih je kontinuirana faza bila voda. S druge pak strane vidljivo je također, da razvijeni modeli odzivnih površina za opis zeta potencijala i Feretovog promjera emulzija kod kojih je kontinuirana faza bio vodeni ekstrakt mente pokazuju veliko raspršenje eksperimenta od modela i zahtijevaju daljnje poboljšanje.

Provjera pouzdanosti modela odzivnih površina napravljena je analizom odstupanja modela i rezultati su prezentirani na slikama 11 i 12. Može se uočiti da je svih 12 razvijenih modela normalno distribuirano (slika 11a1-e1, slika 12a1-e1). Područje odstupanja je djelomično grupirano uzduž ravnog pravca i time je zadovoljena pretpostavka normalnosti. Odnos vrijednosti odstupanja i predviđenih vrijednosti prikazano je na slikama 11a2-e2 i 12a2-e2. Vidi se da dijagrami ne pokazuju ponavljajući uzorak odnosno odstupane vrijednosti ponašaju se nasumično što upućuje da model dobro odgovara eksperimentalnim podacima. Histogrami koji predstavljaju distribuciju mjerenja također su potvrdili normalnu distribuciju točaka odstupanja (slika 11a3-e3, slika 12a3-e3). Prema nabrojenim slikama, dobiveni su karakteristični zvonoliki histogrami sa manjim odmakom simetrije. Nadalje, odnos vrijednosti odstupanja i rednih brojeva prikazan je na slikama 11a4-e4 i 12a4-e4 kako bi se provjerilo može li poredak serije eksperimenata utjecati na podatke. Zapaženo je da vrijednosti odstupanja variraju oko centralne vrijednosti bez vidljivih ekstrema.



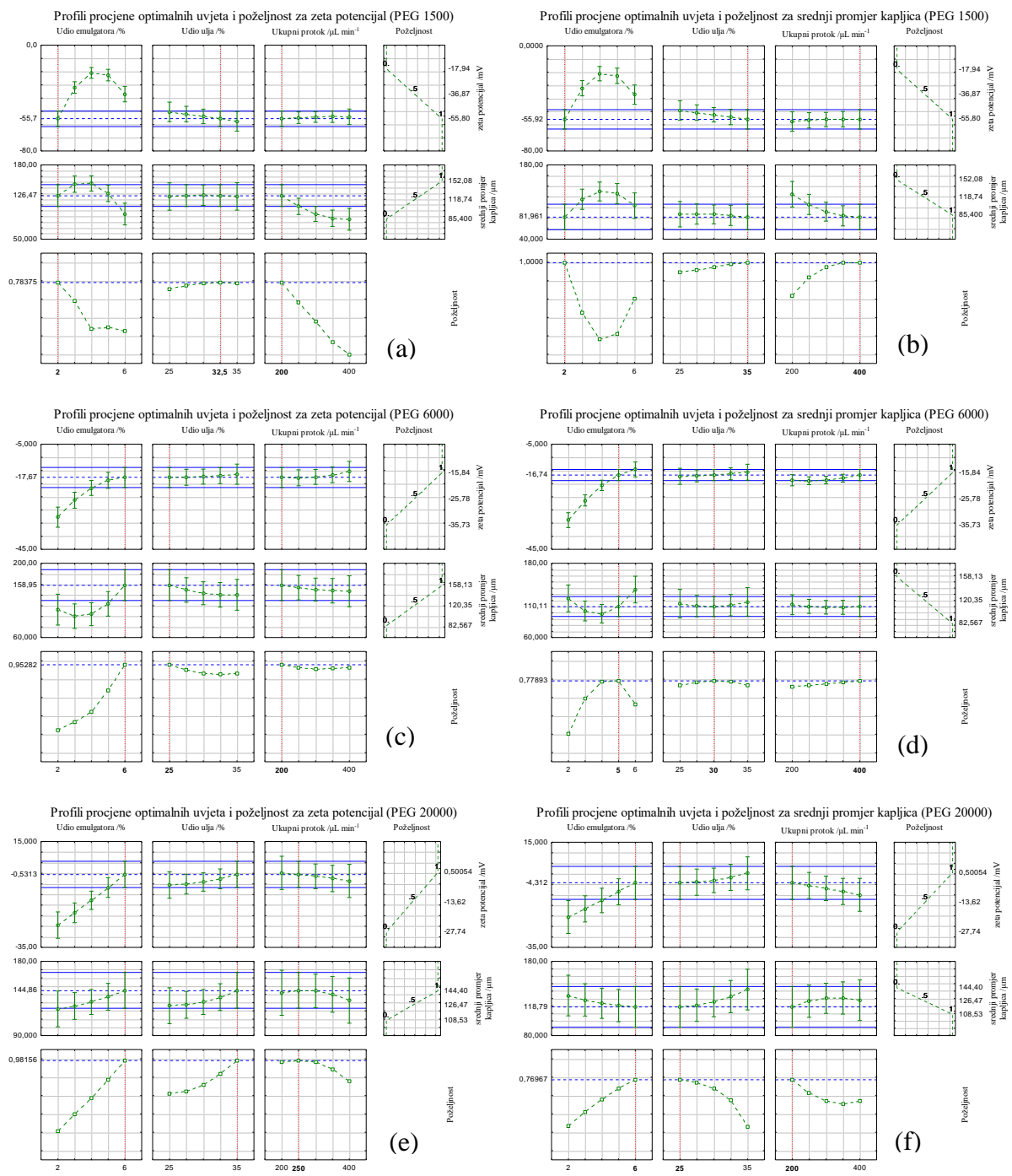
Slika 11. Analiza odstupanja modela odzivnih površina za opis: (a) zeta potencijal mikroemulzije ulje/voda uz PEG 1500, (b) zeta potencijal mikroemulzije ulje/voda uz PEG 6000, (c) zeta potencijal mikroemulzije ulje/voda uz PEG 20000, (d) zeta potencijal mikroemulzije ulje/vodeni ekstrakt mente uz PEG 1500, (e) zeta potencijal mikroemulzije ulje/vodeni ekstrakt mente uz PEG 6000, f) zeta potencijal mikroemulzije ulje/vodeni ekstrakt mente uz PEG 20000. (1) normalna raspodjela odstupanja, (2) usporedaba odstupanja i predviđene vrijednosti (3) histogram odstupanja, (4) odstupanje po redoslijedu podataka



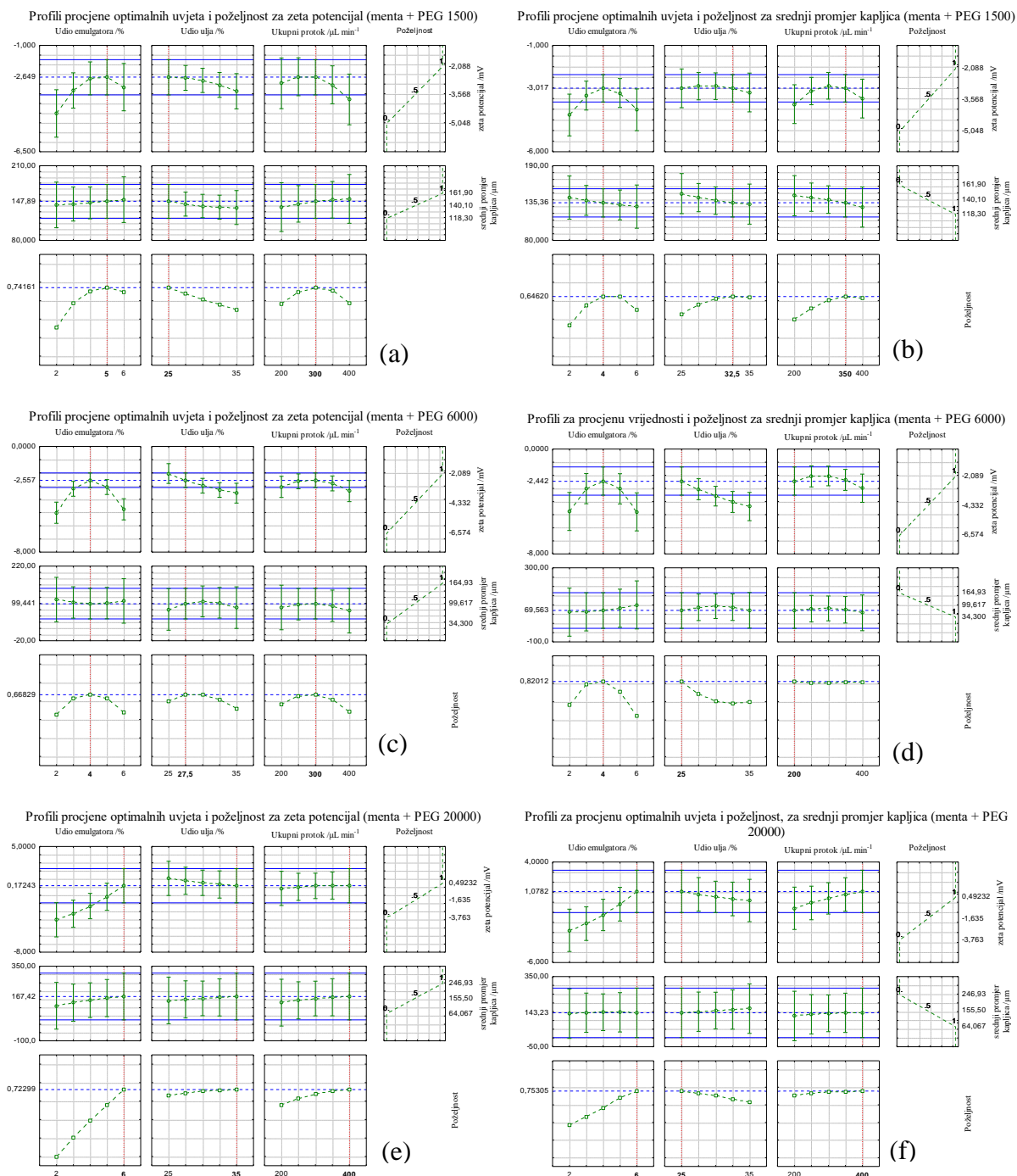
Slika 12. Analiza odstupanja modela odzivnih površina za opis: (a) Feretov promjer mikroemulzije ulje/voda uz PEG 1500, (b) Feretov promjer mikroemulzije ulje/voda uz PEG 6000, (c) Feretov promjer mikroemulzije ulje/voda uz PEG 20000, (d) Feretov promjer mikroemulzije ulje/vodeni ekstrakt mente uz PEG 1500, (e) Feretov promjer mikroemulzije ulje/vodeni ekstrakt mente uz PEG 6000, f) Feretov promjer mikroemulzije ulje/vodeni ekstrakt mente uz PEG 20000. (1) normalna raspodjela odstupanja, (2) usporedba odstupanja i predviđene vrijednosti (3) histogram odstupanja, (4) odstupanje po redoslijedu podataka

Optimalni uvjeti procesa pripreme mikroemulzija u mikoprotlačnom sustavu procijenjeni su nezavisno za zeta potencijal i za Feretov promjer kapljica za svaki analizirani sustav na temelju modela odzivnih površina korištenjem profila poželjnosti. Skala poželjnosti bila je u rasponu od 1 (vrlo poželjno) do 0 (nepoželjno). Grafički prikaz procjene optimalnih procesnih uvjeta za pripremu mikroemulzija s vodom kao kontinuiranom fazom dan je na slici 13, dok je na slici 14 dan grafički prikaz optimalnih procesnih uvjeta za pripremu mikroemulzija s vodenim ekstraktom mente kao kontinuiranom fazom. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da se za istu kontinuiranu fazu razlikuju optimalni uvjeti za postizanje čim više vrijednosti zeta potencijala i čim manjeg Feretovog promjera. Tako je za vodu kao kontinuiranu fazu uz PEG 1500 kao emulgator dobiveno da su optimalni uvjeti za zeta potencijal slijedeći: udio emulgatora od 2 %, udio ulja od 32,5 % te ukupni protok od 200  $\mu\text{L min}^{-1}$ , dok su kao optimalni uvjeti za Feretov promjer dobivene slijedeće vrijednosti: udio emulgatora od 2 %, udio ulja od 35 % te ukupni protok od 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Zanimljivo je također da u slučaju zeta potencijala, porastom molekulske mase emulgatora raste i udio emulgatora koja predstavlja optimalnu vrijednost pa tako za PEG 15000 i PEG 20000, optimalni udio emulgatora iznosi 6 %. Za postizanje minimalne srednje vrijednosti Feretovog promjera uporabom PEG 1500 i PEG 6000 kao optimalni pokazao se maksimalni analizirani protok dok je u slučaju uporabe PEG 20000 optimalne vrijednosti protoka 200  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Ta pojava se vjerojatno može objasniti na temelju različitih fizikalnih svojstava kontinuirane faze za pripremu mikroemulzija.

Rezultati procjene optimalnih procesnih uvjeta za sustave u kojima je kontinuirana faza bio vodeni ekstrakt mente ne pokazuju neki specifičan trend bilo prema udjelu emulgatora, bilo prema ukupnom protoku (slika 14). Tako je za pripremu mikroemulzija uz PEG 1500 kao emulgator dobiveno da su optimalni uvjeti za zeta potencijal slijedeći: udio emulgatora od 5 %, udio ulja od 25 % te ukupni protok od 300  $\mu\text{L min}^{-1}$ , dok su kao optimalni uvjeti za Feretov promjer dobivene slijedeće vrijednosti: udio emulgatora od 4 %, udio ulja od 32,5 % te ukupni protok od 350  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Nadalje, za pripremu mikroemulzija uz PEG 20000 kao emulgator dobiveno da su optimalni uvjeti za zeta potencijal slijedeći: udio emulgatora od 6 %, udio ulja od 35 % te ukupni protok od 300  $\mu\text{L min}^{-1}$ , dok su kao optimalni uvjeti za Feretov promjer dobivene slijedeće vrijednosti: udio emulgatora od 6 %, udio ulja od 25 % te ukupni protok od 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Na temelju izloženih rezultata može se zaključiti da svaki sustav za pripremu mikroemulzija zahtijeva nezavisan postupak optimiranja optimalnih procesnih uvjeta.



Slika 13. Procjena optimalnih uvjeta pripreme mikroemulzija u protočnom mikroreaktoru s vodom kao kontinuiranom fazom za (a) zeta potencijal emulzija uz emulgator PEG 1500, (b) Feretov promjer kapljica uz PEG 1500, (c) zeta potencijal emulzija uz emulgator PEG 6000, (d) Feretov promjer kapljica uz PEG 6000, (e) zeta potencijal emulzija uz emulgator PEG 20000, (f) Feretov promjer kapljica uz PEG 20000

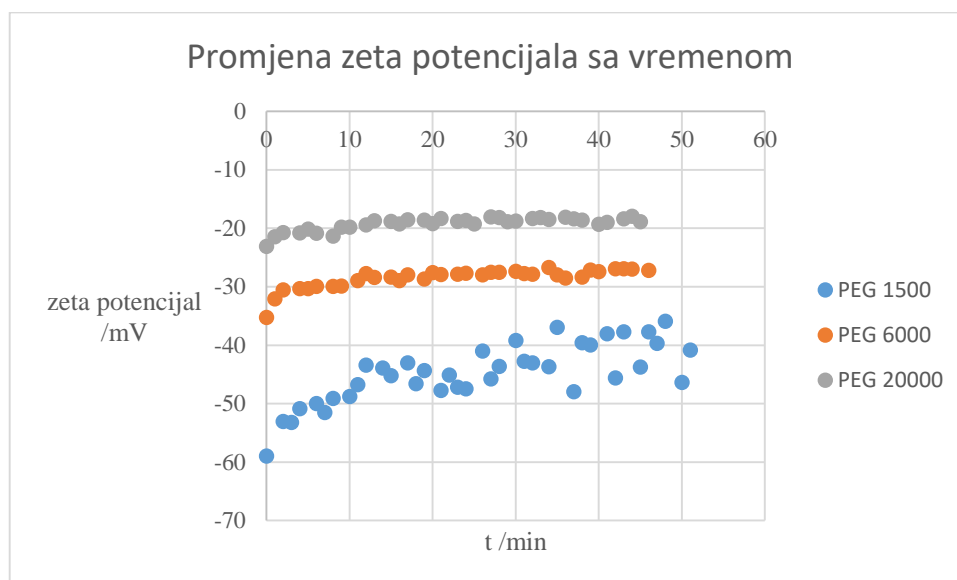


Slika 14. Procjena optimalnih uvjeta pripreme mikroemulzija u protočnom mikroreaktoru s vodenim ekstraktom mente kao kontinuiranom fazom za (a) zeta potencijal emulzija uz emulgator PEG 1500, (b) Feretov promjer kapljica uz PEG 1500, (c) zeta potencijal emulzija uz emulgator PEG 6000, (d) Feretov promjer kapljica uz PEG 6000, (e) zeta potencijal emulzija uz emulgator PEG 20000, (f) Feretov promjer kapljica uz PEG 20000



#### 4.4 KINETIKA DESTABILIZACIJE EMULZIJE

S obzirom da je pri pripremi mikroemulzija, posebno onih s biološki aktivnim tvarima motivacija da iste ostaju stabilne kroz duži vremenski period, nakon određivanja optimalnih procesnih uvjeta ispitana je dinamička stabilnost mikroemulzija s vodom kao kontinuiranom fazom mjerenjem zeta potencijala u definiranim vremenskim intervalima. Dinamička promjena zeta potencijala za sve tri pripremljene emulzije prikazana je na slici 15.

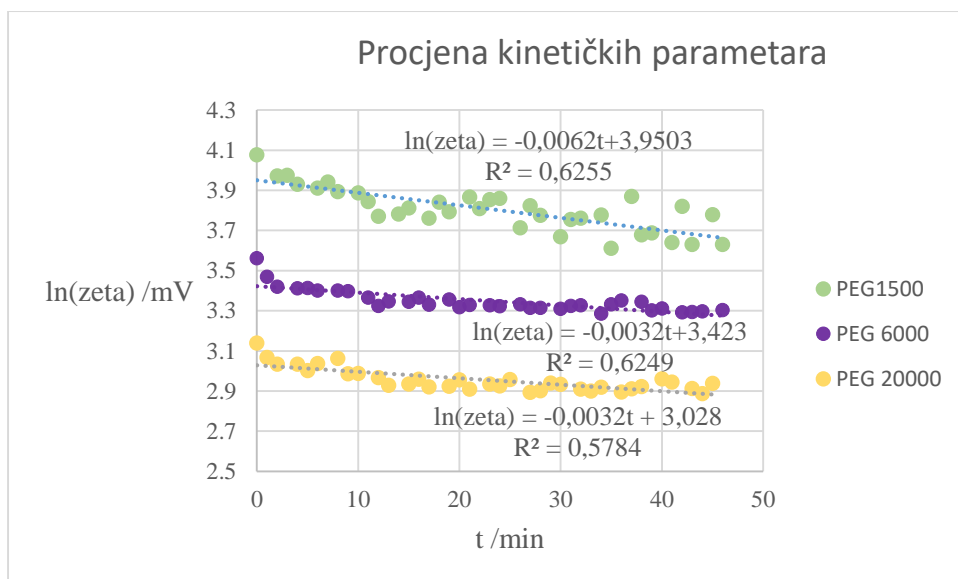


Slika 15. Dinamička promjena zeta potencijala mikroemulzija pripremljenih u mikroprotočnom sustavu pri optimalnim procesnim uvjetima

Na slici 15 je vidljivo da povećanjem molekulske mase odabranog emulgatora, opada početna vrijednost zeta potencijala. Isto tako je vidljivo da tijekom vremena dolazi do smanjenja vrijednosti zeta potencijala. Kako bi se moglo egzaktno govoriti kojom brzinom, tj. koji od sustava osigurava najdužu stabilnost emulzije, provedeno je određivanje brzine destabilizacije primjenom modela kinetike prvog reda. U tu svrhu, podaci prikazani na slici 15 su linearizirani i u linearnom obliku prikazani na slici 16, dok su procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara modela kinetike prvog reda prikazane u tablici 7.

Vrijednosti zeta potencijala raspršenije su u vodenoj otopini PEG-a 1500 nego u vodenim otopinama PEG- 6000 i 20000. Zeta potencijal za vodenu otopinu PEG-a 20000 viši je od -30 mV za sve zadane parametre, što ukazuje da je ovakav sustav relativno nestabilan.

Linearizacijom grafičkog prikaza sa slike 15, dobiva se grafički prikaz na slici 16. U tablici 7. izdvojeni su kinetički parametri iz slike 16.



Slika 16. Linearni prikaz dinamičke promjene zeta potencijala mikroemulzija pripremljenih u mikroprotočnom sustavu pri optimalnim procesnim uvjetima

Tablica 7. Kinetički parametri

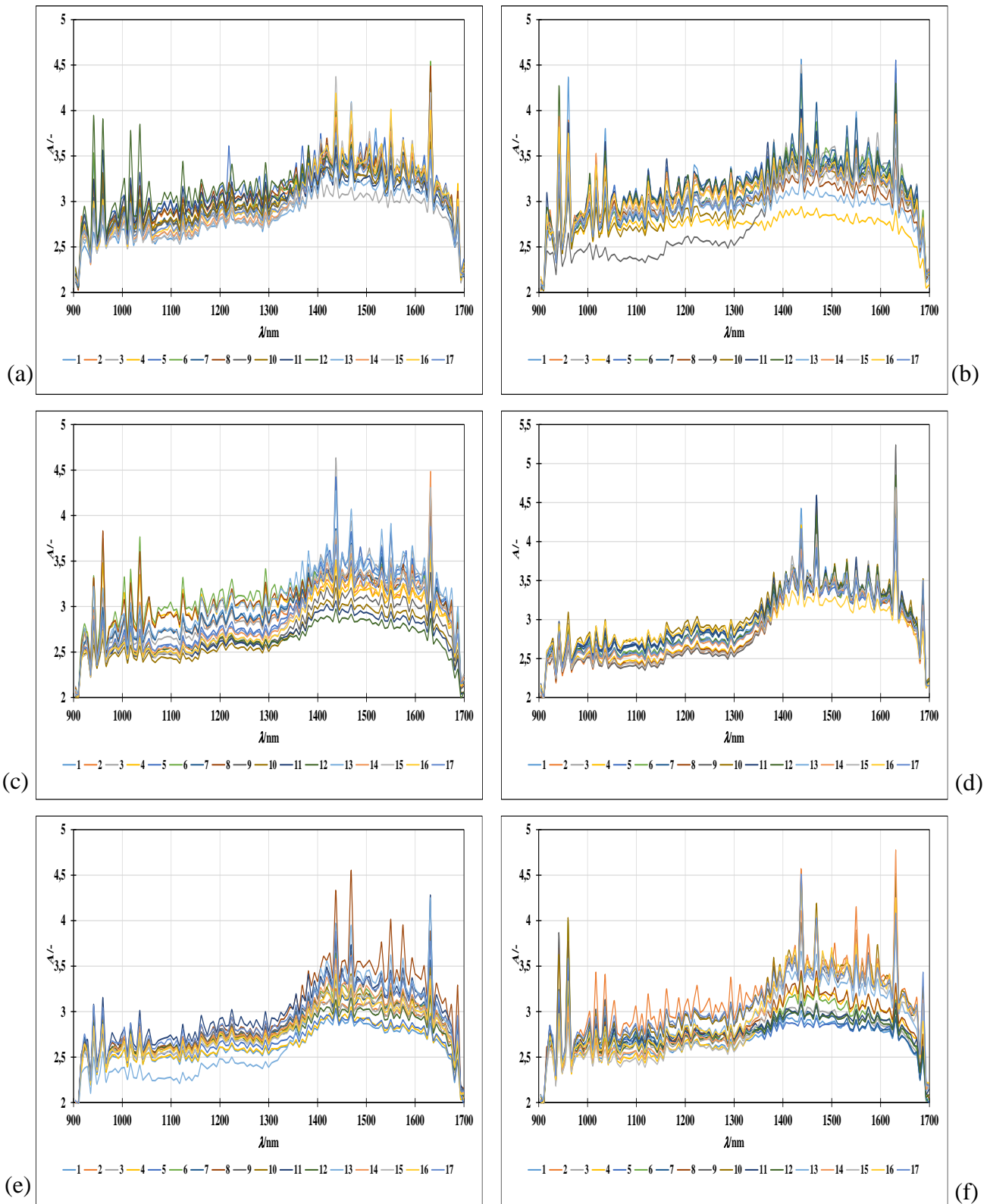
Kinetički parametri	PEG 1500	PEG 6000	PEG 20000
$k / \text{min}^{-1}$	0,0062	0,0032	0,0032
$\text{zeta}_0 / \text{mV}$	51,9509	30,6613	20,6559
$R^2$	0,6255	0,6249	0,5784

Vrijednost  $k$  je najveća kod sustava gdje je PEG1500 upotrijebljen kao emulgator što govori da će se ovaj sustav najbrže destabilizirati. Za sustav sa PEG-om 6000 i 20000, dobivene su jednake konstante destabilizacije, približno dva puta manje nego za sustav gdje je PEG 1500 korišten kao emulgator.

#### 4.5. ANALIZA NIR SPEKTARA MIKROEMULZIJA I PRIMJENA MODELA UMJETNIH NEURONSKIH MREŽA ZA PREVIĐANJE SREDNJEG FERETOVOG PROMJERA KAPLJICA

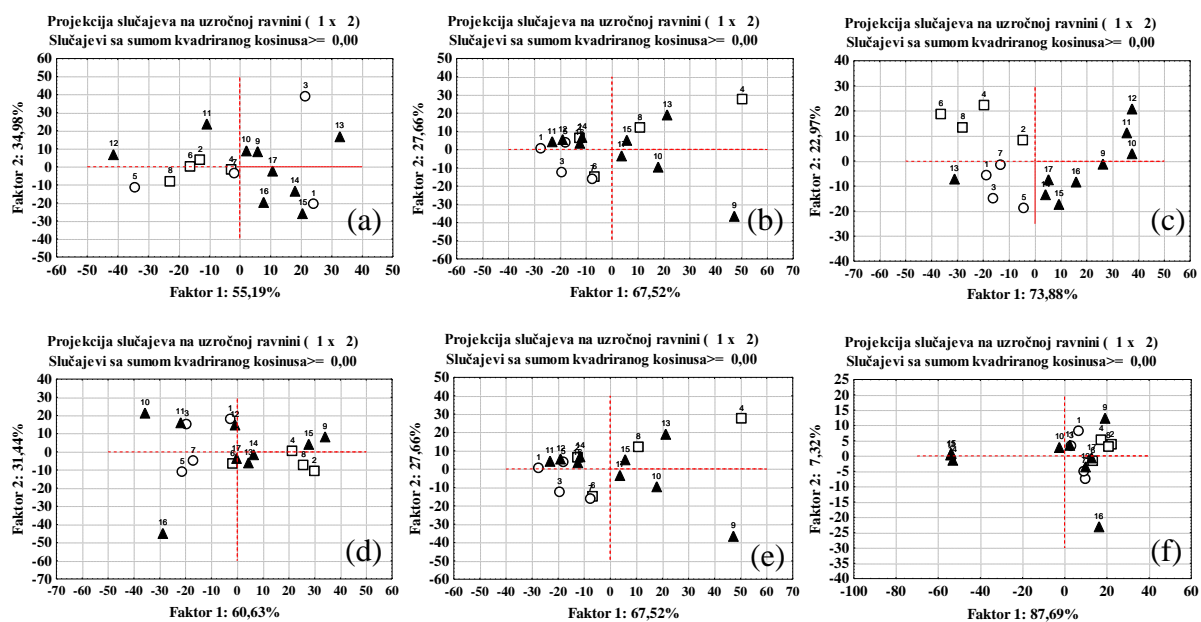
NIR spektri osim o molekularnoj adsorpciji ovise i o mnogim fizikalnim svojstvima uzorka pri čemu se kao posebno važan parametar ističe raspodjela veličina čestica. Primjena NIR spektroskopije za razlikovanje veličina čestica u meljavama saharoze opisana je u radu Valinger i sur. (2011). Na temelju prikazanih rezultata grupiranja spektara prema različitim veličinama čestica može se zaključiti da se NIR spektroskopija može učinkovito koristiti za on-line analizu procesa mljevenja saharoze. Nadalje, primjenjivost NIR spektroskopije za analizu veličine čestica usitnjenih suhih biljka (meta, majčina dušica, lavanda, matičnjak i menta) je prethodno opisana u radu Režan i sur. (2019). Autori navode da se NIR spektroskopija pokazala kao učinkovita metoda za kvalitativno i kvantitativno razlikovanje različitih veličina čestica biljnih mješavina te također da je metoda jako specifična za razlikovanje veličina čestica iste biljne vrste. Također prema Borges i sur. (2015) NIR spektroskopija je metoda koja omogućava učinkovito određivanje srednjeg promjera i udjela vode u emulzijama voda u ulju (uljna faza u istraživanju je bio biodizel) s značajnim potencijalom za kvalitativnu on-line analizu biodizela tijekom skladištenja.

Na temelju pozitivnih rezultata na navedenim sustavima, u ovom radu je ispitana primjenjivost NIR spektroskopije za analizu Feretovog promjera kapljica u mikroemulzijama pripremljenih u kontinuiranom mikroprotočnom sustavu. NIR spektri uzoraka pripremljenih mikroemulzija snimani su kontinuirano u rasponu valnih duljina od 904 do 1699 nm. Prikazi srednjih vrijednosti ne procesiranih spektara za svih 6 analiziranih sustava ulje/voda prikazani su na slici 17.



Slika 17. NIR spektri emulzija u sustavu : (a) ulje/voda uz PEG 1500, (b) ulje/voda uz PEG 6000, (c) ulje/voda uz PEG 2000, (d) ulje/vodeni ekstrakt mente uz PEG 1500, (e) ulje/vodeni ekstrakt mente uz PEG 6000, (f) ulje/vodeni ekstrakt mente uz PEG 20000

Može su uočiti da spektre karakteriziraju šumovi kao posljedica heterogenosti uzoraka (kapljice ulja dispergirane u vodenoj fazi). Može se također uočiti da su kod svih analiziranih emulzija absorbancija izmjerena u rasponu od 2 do 5,5. Najviše vrijednosti absorbancija izmjerene su za područje valnih duljina od 1300 do 1700 nm koja odgovaraju prvom preklapanju O-H veza. S obzirom na veliki broj podataka i nemogućnost postavljanja zaključka o utjecaju procesnih uvjeta pripreme mikroemulzija na profil NIR spektra provedena je analiza glavnih komponenta (PCA analiza). PCA analiza jedna je od najčešće korištenih kemometrijskih metoda koja za cilj ima redukciju i interpretaciju podataka te se često služi kao međukorak za provođenje drugih metoda kao npr. regresijske, klaster ili faktorske analize. PCA analiza je tehnika za smanjenje dimenzionalnosti odabranih skupova podataka, povećava samu razumljivost podataka ali pri tomu gubitak informacija svodi na minimum. To funkcionira na način da se kreiraju nove varijable koje međusobno nisu povezane i te varijable onda maksimiziraju varijancu. U ovom radu PCA analiza je upotrijebljena ne samo za dobivanje uvida u razlike između uzoraka već i za redukciju broja varijabli (slika 18). Budući da je analiza modela odzivnih površina pokazala da je udio emulgatora najvažniji parametar koji utječe na promjer kapljica u emulziji isti utjecaj je ispitan i PCA analizom. No na slici 18 se može uočiti da nema specifičnog grupiranja uzoraka prema udjelu emulgatora mi za jednu skupinu pripremljenih emulzija.



Slika 18. PCA analiza NIR spektra mikroemulzija u sustavu : (a) ulje/voda uz emulgator PEG 1500, (b) ulje/voda uz emulgator PEG 6000, (c) ulje/voda uz emulgator PEG 2000, (d) ulje/vodeni ekstrakt mente uz emulgator PEG 1500, (e) ulje/vodeni ekstrakt mente uz emulgator PEG 6000, (f) ulje/vodeni ekstrakt mente uz emulgator PEG 20000

○ - udio emulgatora 2%, ▲ - udio emulgatora 4%, □ - udio emulgatora 6%

U svrhu ispitivanja primjenjivosti NIR spektroskopije za predikciju Feretovog promjera kapljica mikroemulzija razvijeni su modeli umjetnih neuronskih mreža. Kao ulazne varijable modela uzete su koordinate prvih 5 faktora iz analize glavnih komponenta koje maksimalno doprinose varijabilnosti. Za svaki analizirani sustav razvijen je nezavisni model umjetne neuronske mreže. Primjenjivosti modela procijenjena je na temelju koeficijenta determinacije za učenje, treniranje i validaciju te na temelju srednje kvadratne pogreške također za treniranje, testiranje i validaciju. Kod izbora optimalne arhitekture umjetne neuronske mreže, kao kriterij je u obzir uziman i broj neurona u skrivenom sloju; manji broj neurona podrazumijeva jednostavniju mrežu. Na temelju rezultata prikazanih u tablici 8 može su uočiti da su za sve razvijene modele dobivene visoke vrijednosti koeficijenta determinacije ( $R^2 > 0,7$ ).

Tablica 8. Arhitektura neuronskih mreža odabranih za opis promjera kapljica u emulzijama na temelju NIR spektara

sustav	Struktura neuronske mreže	Preciznost učenja/pogreška učenja	Preciznost testiranja/pogreška testiranja	Preciznost validacije/pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
PEG1500	MLP 5-8-1	0,9919 0,0008	0,9960 0,0373	0,9661 0,0451	Tanh	Funkcija identiteta
PEG6000	MLP 5-9-1	0,9992 0,0001	0,9881 0,0018	0,8029 0,0911	Tanh	Funkcija identiteta
PEG20000	MLP 5-7-1	0,9574 0,0026	0,9416 0,0267	0,9466 0,0325	Eksponecijalna funkcija	Funkcija identiteta
Menta-PEG1500	MLP 5-11-1	0,9920 0,0022	0,9214 0,0333	0,7555 0,8759	Eksponecijalna funkcija	Eksponecijalna funkcija
Menta-PEG6000	MLP 5-7-1	0,9997 0,0014	0,9995 0,0034	0,9101 0,0019	Eksponecijalna funkcija	Funkcija identiteta
Menta-PEG20000	MLP 5-5-1	0,9996 0,0023	0,9083 0,0047	0,8911 0,0479	Eksponecijalna funkcija	Eksponecijalna funkcija

Najviše vrijednosti koeficijenta determinacije dobivene su za sustav voda/ulje uz PEG 1500 kao emulgator (MLP 5-8-1;  $R^2_{\text{učenje}} = 0,9919$ ,  $R^2_{\text{testiranje}} = 0,9960$  i  $R^2_{\text{validacija}} = 0,9661$ ). Odabrana neuronska mreža ima 5 neurona u ulaznom sloju, 8 neurona u skrivenom sloju te jedan neuron u izlaznom sloju. Kao skrivena aktivacijska funkcija koristi se Tanh, dok je izlazna aktivacijska funkcija Funkcija identiteta. Na temelju koeficijenta determinacije za validaciju u slučaju sustava voda/ulje u PEG, najlošije slaganje između eksperimenta i modelom predviđenih podataka dobiveno je za sustav voda/ulje uz PEG 6000 gdje je kao optimalna mreža izabrana MLP 5-9-1 ( $R^2_{\text{učenje}} = 0,9992$ ,  $R^2_{\text{testiranje}} = 0,9881$  i  $R^2_{\text{validacija}} = 0,8029$ ). Usporedbom svih analiziranih sustava može se uočiti da su najniže vrijednosti koeficijenata determinacije dobivene za sustav ulje/vodeni ekstrakt mente uz PEG 1500 (MLP 5-11-1;  $R^2_{\text{učenje}} = 0,9920$ ,  $R^2_{\text{testiranje}} = 0,9214$  i  $R^2_{\text{validacija}} = 0,7555$ ). Odabrana neuronska mreža ima 5 neurona u ulaznom sloju, 11 neurona u skrivenom sloju te jedan neuron u izlaznom sloju. Kao skrivena aktivacijska funkcija i kao izlazna aktivacijska funkcija koristi se Eksponecijalna funkcija. Dobiveni rezultati upućuju da se NIR spektroskopija s visokom preciznošću može koristiti za analizu promjera kapljica u mikro emulzija što je u skladu s literaturom. Naime Borges i sur. (2015) te Araujo i sur. (2008) su prikazali učinkovitu primjenu NIR spektroskopije i metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (eng. *partial least square*, PLS) za predikciju raspodjele veličine kapljica u emulzijama voda u ulju. Nadalje Charin i sur. (2013) pokazali su primjenjivost NIR spektroskopije za detekciju točke inverzije emulzija na temelju razlike absorbiranog svjetla u emulzijama U/V i V/U.



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti slijedeće:

1. Maksimalne vrijednosti Re broja za analizirane protoke korištene za pripremu mikroemulzija ne prelaze 30, što potvrđuje da su eksperimenti provedeni u laminarnom režimu strujanja.
2. Mjerenjem zeta potencijala pripremljenih mikroemulzija kao najstabilnije su se pokazale emulzije pripremljene s vodom kao kontinuiranom fazom i emulgatorom PEG 1500 te je uočeno da vrijednost zeta potencijala opada porastom molekulske mase upotrijebljenog emulgatora.
3. Mjerenjem Feretovog promjera mikroemulzija s vodom kao kontinuiranom fazom dobiveno je da su najmanje vrijednosti postignute s emulgatorom PEG 1500 te je uočeno da vrijednost Feretovog promjera raste porastom molekulske mase upotrijebljenog emulgatora.
4. Mjerenjem zeta potencijala mikroemulzija s vodenim ekstraktom mente kao kontinuiranom fazom uočeno je da izabrani emulgatori ne osiguravaju zadovoljavajuću stabilnost emulzija.
5. Za pripremu mikroemulzija s vodom kao kontinuiranom fazom, uz PEG 1500 kao emulgator, dobiveno je da su optimalni uvjeti u smislu najviše vrijednosti zeta potencijala slijedeći: udio emulgatora od 2 %, udio ulja od 32,5 % te ukupni protok od  $200 \mu\text{L min}^{-1}$ , dok su kao optimalni uvjeti za Feretov promjer dobivene slijedeće vrijednosti: udio emulgatora od 2 %, udio ulja od 35 % te ukupni protok od  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ .
6. Na temelju koeficijenta destabilizacije mikroemulzija, može se zaključiti da se proces destabilizacije najbrže odvija u sustavu s vodom kao kontinuiranom fazu uz emulgator PEG 1500.
7. Umjetne neuronske mreže (ANNs) pokazale su se pouzdanima u predviđanju Feretovog promjera kapljica emulzija ulje u vodi za svaki analizirani sustav. Razvijeni ANN modeli imaju visoke vrijednosti koeficijenata determinacije za testiranje, učenje i validaciju uz pripadajuće male pogreške te se mogu pouzdano koristiti za predviđanje veličine promjera kapljica disperzne faze u procesu pripreme emulzija ulje u vodi.

## 6. LITERATURA

Acharya, D.P., Hartley, P.G. (2012) Progress in microemulsion characterization. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **17**, 274-280.

Ajaev, V.S., Homsy, G.M. (2006) Modelling shapes and dynamics of confined bubbles. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **38**, 227-307.

Anton, N., Vandamme, T.F. (2009) The universality of low-energy nanoemulsification. *Int. J. Pharmaceut.* **377**, 142-147

Araujo, A.M., Santos, L.M., Fortuny, M., Melo, R.L.F.V., Coutinho, R.C., Santos, A.F. (2008) Evaluation of water content and average droplet size in water-in-crude oil emulsions by means of Near-Infrared Spectroscopy. *Energ. Fuels* **22**, 3450-3458.a

Baker, M. (2011) Tissue models: A living system on a chip. *Nature* **471**, 661-665.

Bartolo, D., Bouamrène, F., Verneuil, E., Buguin, A., Silberzan, P., Moulinet, S. (2006) Bouncing or sticky droplets: impalement transitions on superhydrophobic micropatterned surfaces. *EPL* **74**, 299-305.

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P, Villar, L.S., Escaliera, L.A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965-977.

Borges, G.R., Farias, G.B., Braz, T.M., Santos, L.M., Amaral, M.J., Fortuny, M., Franceschi, E., Dariva, C., Santos, A.F. (2015) Use of near infrared for evaluation of droplet size distribution and water content in water-in-crude oil emulsions in pressurized pipeline. *Fuels* **147**, 43-52.

Brandlin, C. (2013) *Your Body, Your Genes, Your Digestion, and Your Metabolism*, 3. izd., Xlibris LLC, SAD.

Callender, S.P., Mathews, J.A., Kobrnyk, K., Wettig, S.D. (2017) Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *Int. J. Pharmaceut.* **526**, 425-442.

Charin, R.M., Nele, M., Tavares, F.W. (2013) Transitional Phase Inversion of Emulsions Monitored by in Situ Near-Infrared Spectroscopy. *Langmuir*, **29**, 5995-6003.

Dahan, A., Hoffman, A. (2011) Enhancement in Drug Delivery, 1. izd., CRC Press, SAD, str. 111.

Doku, G.N., Verboom, W., Reinhoudt, D.N., van den Berg, A. (2005) On-microchip multiphase chemistry-a review of microreactor design principle and reagent contacting modes. *Tetrahedron* **61**, 2733-2742.

Eijkel, J.C.T., van den Berg, A. (2005) Water in micro- and nanofluidics systems described using the water potential. *Lab Chip* **5**, 1202-1209.

El-Sayed, H. S., Chizzola, R., Ramadan, A. A., Edris, A. E. (2017) Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delicery systems. *Food Chem.* **221**, 196-204.

Fatoyinbo, H.O. (2013) Microfluidic Devices for Biomedical Applications, 1.izd. Woodhead Publishing, UK, str. 285-350.

Fernandez, P., André, V., Rieger, J., Kühnke, A. (2004) Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **251** (1-3), 53-58.

Ghaini, A., Mescher, A., Agar, D.W. (2011) Hydrodynamic studies of liquid-liquid slug flows in circular microchannels. *Chem. Eng. Sci.* **66**, 1168-1178.

Gojun, M., Pustahija, L., Jurinjak Tušek, A., Šalić, A., Valinger, D., Zelić, B. (2019) Kinetic parameter estimation and mathematical modelling of lipase catalysed biodiesel synthesis in a microreactor. *Micromachines* **10**, 759.

Günther, A., Kreutzer, M.T. (2009) Multiphase flow. U: Micro Process Engineering: A Comprehensive Handbook. (Hessel, V., Renken, A., Schouten, J.C., Yoshida, J., ured.), Wiley, str. 1-40.

Harries, N., Burns, J.R., Barrow, D.A., Ramshaw, C. (2003) Industrial microreactor process development up to production. *Int. J. Heat. Mass. Trans.* **46**, 3313-3322.

- Hess, D., Rane, A., deMello, A.J., Stavrakis, S. (2015) High-throughput, quantitative enzyme kinetic analysis in microdroplets using stroboscopic epifluorescence imaging. *Anal. Chem.* **87**, 4965-4972.
- Hessien, M., Singh, N., Kim, C. Prouzet, E. (2011) Stability and tunability of O/W nanoemulsions prepared by phase inversion composition. *Langmuir* **27**(6), 2299-2307.
- Hibara, A., Nonaka, M., Tokeshi, M., Kitamori T. (2003) Spectroscopic analysis of liquid/liquid interfaces in multiphase microflows. *J. Am. Chem. Soc.* **49**, 14957-14955.
- Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., Ninham, B.W. (1976) Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **72**, 1525-1568.
- Janasek, D., Franzke, J., Manz, A. (2006) Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature* **442** (27), 374-380.
- Karunaratne, D.N., Pamunuwa, G., Ranatunga, U. (2017) Introductory Chapter: Microemulsions. U: Properties and Uses of Microemulsions, (Karunaratne, D.N., Pamunuwa, G., Ranatunga, U., ured.), IntechOpen, Peradeniya/Gonawila, str. 3-9.
- Kashid, M.N., Agar, D.W. (2007) Hydrodynamics of liquid-liquid slug flow capillary microreactor: Flow regimes, slug size and pressure drop. *Chem, Eng. J.* **131**, 1-13.
- Kashid, M.N., Platte, F., Agar, D.W., Turek, S. (2007) Computational modelling of slug flow in a capillary microreactor. *J. Comput. Appl. Math.* **203**, 487-497.
- Kreutzer, M.T, Kapteijn, F., Moulijn, J.A., Heiszwolf, J.J. (2005) Multiphase monolith reactors: Chemical reaction engineering of segmented flow in microchannels. *Chem. Eng. Sci.* **60**, 5895-5916.
- Lagues, M., Sauterey, C. (1980) Percolation transition in water in oil microemulsions. Electrical conductivity measurements. *J. Phys Chem A.* **84**, 3503-3508.
- Le Man, H., Behera, S. K., Park, H.S. (2010) Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **7**, 157-164.

- Lee, J.N., Park, C., Whitesides, G.M. (2003) Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane) – based microfluidic devices. *Anal. Chem.* **75**, 6544-6554.
- Lee, S. J., Choi, S. J., Li, Y., Decker, E. A., McClements, D. J. (2011) Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility. *J. Agr. Food. Chem.* **59**, 415-427
- Li, X., Chen, X., Huang, Y., Zhang, X. (2019) Effect of interface wettability on the flow characteristics of liquid in smooth microchannels. *Acta Mech.* **230**, 2111-2123.
- Liu, W., Zhai, Y., Heng, X., Che, F., Chen, W., Sun, D., Zhai, G. (2016) Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J. Drug Target* **8**, 694-702.
- Maan, A.A., Nazir, A., Khan, M.K.I, Boom, R.M., Schroën C.G.P.H. (2015) Microfluidic emulsification in food processing. *J. Food Eng.* **147**, 1-7.
- Marques, M.P.C., Fernandes, P., Cabral, J.M.S., Žnidaršič-Plazl, P., Plazl, I. (2012) Continuous steroid biotransformation in microchannel reactor. *New Biotechnol.* **29**, 227-234
- Maruyama, T., Matsushita, H., Uchida, J.I., Kubota, F., Kamiya, N., Goto, M. (2004) Liquid membrane operations in a microfluidic device for selective separation of metal ions. *Anal. Chem.* **76**, 4495-4500.
- Matijević, B., Blažić, M. (2008) Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka. *Mljekarstvo* **58** (2), 151-169.
- McClements, D. J. (2012) Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. *Soft Matter* **8**, 1719-1729
- McClements, D. J. (2015) Nanoscale nutrient delivery systems for food applications: improving bioactive dispersibility, stability, and bioavailability. *J. Food Sci.* **80**, 1602-1611.
- McCustion, L. E., Kee, J., Hayes, E. R. (2014) *Pharmacology: A Patient-Centered Nursing Process Approach*, Elsevier Saunders, SAD.
- Mohyaldinn, M. E., Hassan, A. M., Ayoub, M. A. (2019) Application of emulsions and microemulsions in enhanced oil recovery and well stimulation. U: *Microemulsion - a Chemical Nanoreactor*, (Mejuto, J., ured.), IntechOpen, Permak, str. 1-20.

Montenegro, L. (2014) Nanocarriers for skin delivery of cosmetic antioxidants. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* **4**, 73-92.

Najjar, R. (2012) Microemulsion- A brief introduction. U: An introduction to properties and applications (Najjar, R., ured.), IntechOpen, Tabriz, str. 3-30.

Novak, U., Pohar, A., Plazl, I., Žnidaršič-Plazl, P. (2012) Ionic liquid-based aqueous two- phase extraction within microchannel system. *Step. Purif. Technol.* **97**, 172-178.

Ontiveros, J.F., Company, R., Ortega Vaz, M., Nardello-Rataj, V. (2020) Microfluidic emulsification: Process and formulation variables effects in flow behaviour pattern on a flow-focusing device. *Colloids and Surfaces A: Phytochemical and Engineering Aspects*, **601**, 125038.

Patil, S., Pandit, A., Gaikwad, G., Dandekar, P., Jain, R. (2020) Exploring microfluidic platform technique for continuous production of pharmaceutical microemulsions. *J. Pharm. Innov.* (u objavi) <https://doi.org/10.1007/s12247-020-09457-x>

Paul, B. K., Moulik, S. P. (2001) Uses and applications of microemulsions. *Curr. Sci. India* **8**, 990-1001.

Pinto, I., Buss, A. (2020) Zeta potential as a measure of asphalt emulsion stability. *Energ. Fuel* **34**, 2143-2151.

Plazl, I., Lakner, M. (2010) Modelling and finite differences numerical analysis of reaction-diffusion dynamics in a microreactor. *Acta Chim. Slov.* **57**, 100-109.

Pohar, A., Lakner, M., Plazl, I. (2012) Parallel flow of immiscible liquids in a microreactor: modeling and experimental study. *Microfluid Nanofluid* **12**, 307-316.

Režan, A., Benković, M., Jurina, T., Jurinjak Tušek, A., Gajdoš Kljusurić, J., Valinger, D. (2019) Application of near infrared spectroscopy for detection of ground medicinal herbs. *J. Hyg. Eng. Des.* **27**, 152-156.

Sankumgon, A., Assawadithalerd, M., Phasukarratchai, N., Chollacoop, N., Tongcumpou, C. (2018) Properties and performance of microemulsion fuel: blending of jatropha oil, diesel, and ethanol-surfactant. *Renew. Energy Focus* **24**, 28-32.

Schönberger, M., Hoffstetter, M. (2016) Emerging Trends in Medical Plastic Engineering and Manufacturing, 1. izd., Elsevier, Njemačka.

Sheng, J., Zhang, L., Lei, J., Ju, H. (2012) Fabrication of Tunable Microreactor with Enzyme Modified Magnetic Nanoparticles for Microfluidic Electrochemical Detection of Glucose. *Anal. Chim. Acta* **709**, 41-46.

Sottmann, T., Stubenrauch, C. (2009) Phase Behaviour, Interfacial Tension and Microstructure. U: Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives (Stubenrauch, C., ured.), John Wiley and Sons, Chichester, str. 1-47.

Strey, R. (1994) Microemulsion microstructure and interfacial curvature. *Colloid. Polym. Sci.* **272**, 1005-1019.

Tao, J., Zhu, Q., Qin, F., Wang, M., Chen, J., Zheng, Z.-P. (2017) Preparation of steppogenin and ascorbic acid, vitamin E, butylated hydroxytoluene oil-in-water microemulsions: Characterization, stability, and antibrowning effects for fresh apple juice. *Food Chem.* **224**, 11-18.

Tong, K., Zhao, C., Sun, Z., Sun, D. (2015) Formation of concentrated nanoemulsion by W/O microemulsion dilution method: biodiesel, tween 80, and water system. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **3**, 3299-3306.

Ufer, A., Mendorf, M., Ghaini, A., Agar, D.W. (2011) Liquid/liquid slug flow capillary microreactor. *Chem. Eng. Technol.* **34**, 353-360.

Valinger, D., Benković, M., Gajdoš Kljusurić, J., Bauman, I., Kurtanjek, Ž. (2011) Application of NIR spectroscopy for monitoring different particle sizes of sucrose. *J. Hyg. Eng. Des.* **15**, 188-190.

van Dijke, K. C., Schroën, K., van der Padt, A., Boom, R. M. (2010) EDGE emulsification for food-grade dispersions. *J. Food Eng.* **97** (3), 348-354.

van Dijke, K.C., Veldhuis, G., Schroen, K., Boom, R.M. (2009) Parallelized edge-based droplet generation (EDGE) devices. *Lab Chip* **9**(19), 2824-2830.

Whitesides, G.M. (2006) The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368-373.

Wu, H. W., Lin, C.C., Hwang, S.M., Chang, Y.L., Lee, G. (2011) A microfluidic device for chemical and mechanical stimulation of mesenchymal stem cells. *Microfluid. Nanofluidics* **11**, 545-556.

Young, E.W.K., Simmons, C.A. (2010) Macro- and microscale fluid flow systems for endothelial cell biology. *Lab Chip* **10**, 143-160.

Zhao, Y., Chen, G., Yuan, Q. (2006) Liquid-liquid two-phase flow patterns in a rectangular microchannel. *Aiche J.* **52**, 4052 – 4060.

Zielinska-Jurek, A., Nadolna, J., Grabowska, E., Zaleska-Medynska, A. (2012) Nanoparticles preparation using microemulsion systems. U: An introduction to properties and applications, (Najjar, R., ured.), IntechOpen, Tabriz, 229-250.



---

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Filip Ergić  
Ime i prezime studenta

---