

## **RAPORTARE STIINTIFICA**

### **Rezumatul etapei**

Aceasta etapa a proiectului a avut ca obiective principale evaluarea efectelor radiatiei laser asupra emulsiilor cu agenti sclerozanti si validarea noului sistem experimental asistat laser de generare de nanoemulsii.

Astfel au fost aduse imbunatatiri ale dispozitivului de productie de nanoemulsii asistat laser si printr-o serie de teste si experimente repetate s-a validat functionarea dispozitivului de generare de nanoemulsii, obtinandu-se rezultate si parametrii reproductibili.

Principalele imbunatatiri ale dispozitivului experimental au fost determinate de reducerea volumului tampon dintre valvele automate si posibilitatea setarii vitezei de lucru (debit de lucru) in functie de tipul (volumul) seringii utilizate. De asemenea, unele imbunatatiri au fost aduse programului de control si protocolului de realizare a experimentelor. Prin toate acestea a fost crescuta calitatea nanoemulsiilor generate.

Studiile de microscopie optica au aratat ca picaturile emulsiilor au dimensiuni variate, care se micsoareaza pe masura ce numarul de cicluri de mixare si viteza de mixare cresc. Prin expunerea emulsiei la radiatie laser nerezonanta, picaturile se micsoareaza si are loc o uniformizare a dimensiunilor lor.

Analiza prin tehnica DLS (Dynamic Light Scattering) a nanoemulsiilor generate cu dispozitivul asistat laser pe care l-am dezvoltat, pune clar in evidenta ca nanopicaturile obtinute in urma iradierii nerezonante a emulsiei au dimensiuni mai mici (141,8 nm fata de 269,5 nm) si sunt mai stabile in timp, fata de cele produse fara asistenta laser.

Aceleasi concluzii privind micsoarea dimensiunilor picaturilor si a stabilitatii crescute in urma iradierii se obtin si din masuratorile de reflexie cu ajutorul spectroscopiei UV-Vis-NIR si din spectrele FTIR ale emulsiilor inregistrate inainte si dupa iradiere.

Masuratorile de microfluidica pot releva informatii despre stabilitatea in timp a emulsiilor. Aspectul tensiogramelor arata separarea celor doua solutii din emulsie, picaturile de vitamina A uleioasa migrand spre marginea picaturii, la interfata cu aerul, iar picaturile de solutie apoasa de STS 10% ramanand in interiorul picaturii. Migrarea picaturilor de ulei are loc treptat, pana la separarea totala a celor doua faze ale emulsiei.

Pe baza datelor experimentale, putem afirma ca dispozitivul experimental de generare a nanoemulsiilor asistat laser poate fi utilizat cu succes pentru obtinerea unor nanoemulsii de STS, un agent sclerozant, si vitamina A, nanoemulsii ce prezinta caracteristici imbunatatite comparativ cu cele obtinute prin metodele conventionale utilizate in scleroterapie.

Astfel, obiectivele proiectului pentru aceasta etapa au fost indeplinite si au fost obtinute rezultatele estimate.

### **Raport stiintific si tehnic in extenso**

Etapa a doua a proiectului „Dispozitiv de productie de nanoemulsii asistat laser”, denumita „Evaluarea efectelor radiatiei laser asupra emulsiilor cu agenti sclerozanti. Validarea noului sistem experimental asistat laser de generare de nanoemulsii.” are ca activitate principala „Validarea noului sistem experimental dezvoltat.”

Activitatile desfasurate in aceasta etapa includ: \*realizarea de masuratori spectroscopice si microfluidice pentru a caracteriza nanoemulsiile obtinute inainte si dupa iradierea lor; \*validarea dispozitivului de generare de nanoemulsii, obtinand rezultate reproductibile; \*realizarea unor imbunatatiri, pe baza rezultatelor obtinute; \*formularea unor concluzii privind aplicabilitatea acestui sistem in medicina si/sau in alte domenii.

## 1. Realizarea unor imbunatatiri (optimizarea) ale sistemului, pe baza rezultatelor obtinute

Proiectarea si montarea dispozitivului experimental de emulsionare asistat laser, incluzand schema de principiu si programul de control, au fost descrise in raportul stiintific al primei etape.

Prin realizarea unor serii de experimente in care s-au variat parametrii de functionare ai sistemului si caracteristicile solutiilor componente ale emulsiei, s-au impus si realizat imbunatatiri ale dispozitivului de generare de nanoemulsii, atat in schema de functionare a acestuia, implicit in configuratia dispozitivului experimental, cat si in programul de control. De asemenea, a fost optimizat si protocolul de realizare a experimentelor.

Principalele imbunatatiri au fost determinate de reducerea volumului tampon dintre valvele automate si posibilitatea setarii vitezei de lucru (debit de lucru) in functie de tipul (volumul) seringii utilizate.

### Schema de functionare a dispozitivului experimental optimizat; volum tampon de solutie $V_T = 157 \mu\text{l}$ .

In acest caz cele doua valve automate, V1 si V2, au fost conectate direct prin intermediul unui capilar cu lungimea de 50 mm si volum  $157 \mu\text{l}$  (Figura 1). Avantajul acestei variante de montaj o reprezinta faptul ca volumul tampon de solutie dintre seringi s-a redus la 1/3 fata de cel din varianta anterioara, si anume de la  $537 \mu\text{l}$  la  $157 \mu\text{l}$ .

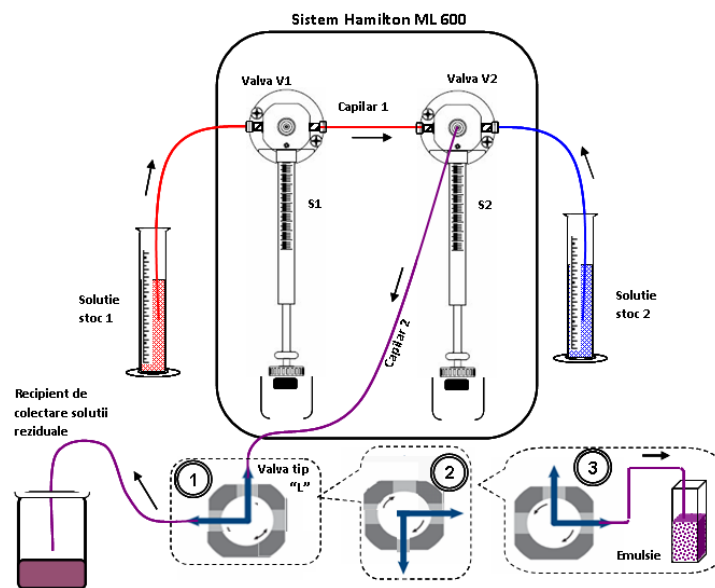


Fig. 1. Schema dispozitivului experimental de emulsionare. Volum tampon de solutie  $V_T = 157 \mu\text{l}$ .

Protocolul de lucru este același ca în etapa anterioară, însă s-au realizat optimizări privind domeniul de viteze de lucru (debite) utilizate:

- **Configuratia 1** – asigură umplerea circuitelor cu soluție (eliminarea aerului) și golirea seringilor (respectiv, pregătirea pentru secvența de încărcare a soluțiilor cu volumele de lucru) la un debit (viteza de pompare) controlabil, specific tipului (volumului) seringii; de exemplu, în cazul seringii de 5 ml, acest debit poate fi variat între 200 și 2500  $\mu\text{l/s}$ ;

- **Configuratia 2** – asigură mutarea (trecerea/translatarea) soluțiilor/emulsiei dintr-o seringă în cealaltă, la o viteză de lucru controlabilă în domeniul specificat anterior;

- **Configuratia 3** – asigura evacuarea emulsiei din seringa catre un recipient de stocare a acesteia; evacuarea se realizeaza in doua etape si la viteza de lucru controlabila.

Ca si in cazul variantei montajului din prima faza a proiectului, configuratiile 1, 2 si 3 asigura: - umplerea circuitelor cu solutie (eliminarea aerului) si golirea seringilor (respectiv, pregatirea pentru secventa de incarcare a solutiilor cu volumele de lucru); - mutarea (trecerea/translatarea) solutiilor/emulsiei dintr-o seringa in alta; - evacuarea emulsiei din seringa, intr-o prima etapa, a unui volum rezidual aflat pe Capilarul 2, iar apoi a volumului de emulsie, catre un recipient de stocare a acesteia.

### **Modificarile programului de control al sistemului Hamilton ML600 realizat pentru implementarea procedurii de emulsionare**

Programul realizat pentru controlul sistemului Hamilton ML600 a fost descris in raportul stiintific al primei etape a proiectului.

In urma experimentelor desfasurate in prima etapa a proiectului, au fost identificate ca fiind utile imbunatatiri de adus programului de control determinate de optimizarea configuratiei dispozitivului si de necesitatea introducerii unor optiuni suplimentare.

In primul rand, a fost introdusa o noua procedura pentru a facilita curatarea seringilor, valvelor si capilarelor. Astfel, bara de meniuri contine acum in meniul “Proceduri” doua butoane “Curatare aparat” si “PED104”, dupa cum se poate observa in Figura 2.

Procedura de curatare a aparatului implica 3 pasi, in primii doi fiind initializate seringile si apoi golite. Pasul al treilea al procedurii permite selectarea vitezei de umplere si a numarului de repetari (numarul de pasi) a umplerii circuitului pentru eliminarea aerului si golire a seringilor.

Spalarea seringilor, valvelor si capilarelor se face repetand procedura “Curatare aparat” cu un numar de 25 de pasi si o viteza de umplere de 2500  $\mu\text{l/s}$  pentru fiecare din umratoarele solutii: solutie de detergent (optima pentru solutii uleioase), apa distilata, alcool etilic si apoi iar apa distilata.

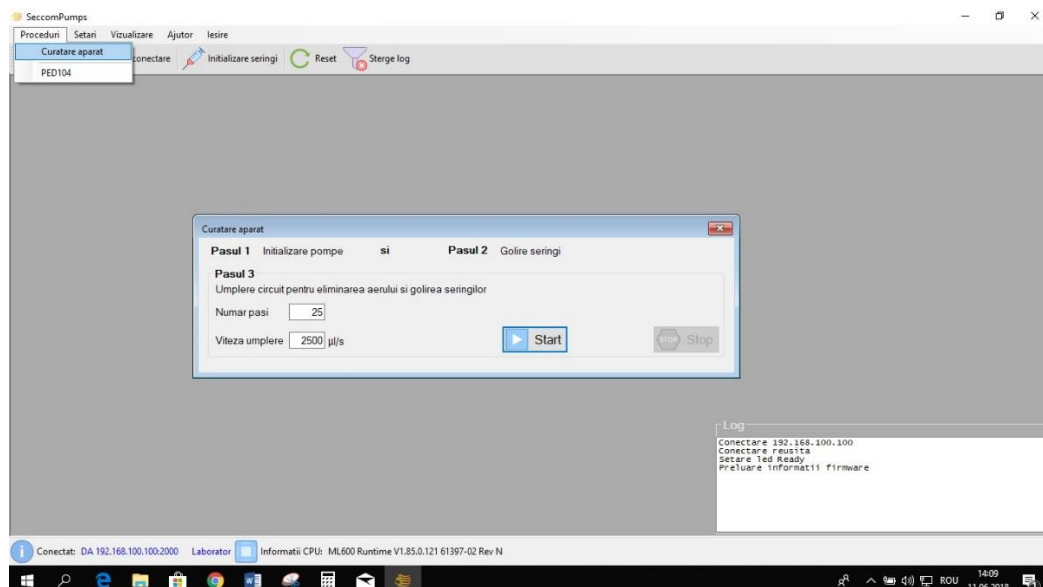


Fig. 2. Fereastra din programul de control al dispozitivului experimental de emulsionare ce prezinta procedura “Curatare aparat”.

Insa, cele mai importante optimizari din punct de vedere al programului de control au fost aduse procedurii “PED104” (Figura 3):

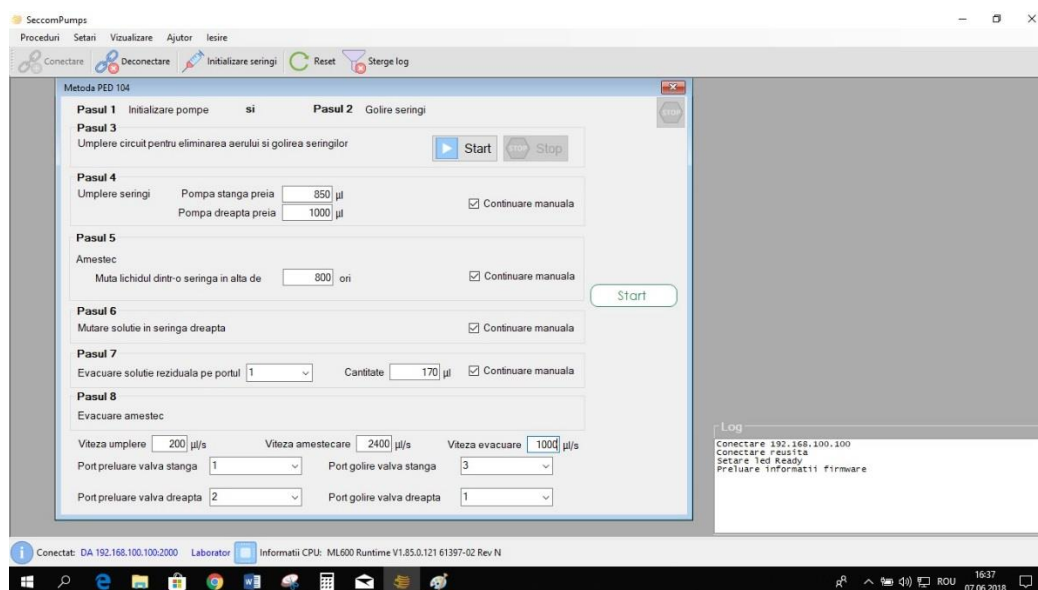


Fig. 3. Fereastra din programul de control al dispozitivului experimental de emulsionare ce prezinta procedura “PED104”.

Metoda “PED104” contine pasii pe care ii urmeaza sistemul pentru obtinerea emulsiei, precum si parametrii de functionare:

Pas	Actiune
1	Comanda: Start/ Initializeaza pompe / stabilirea referintelor pentru seringi
2	Seringile sunt golite complet, iar pistoanele seringilor sunt aliniate pentru pozitie “zero”
3	Umplerea circuitului (capilarelor) cu solutiile de lucru pentru eliminarea aerului / cicluri nelimitate de incarcare si golire a seringilor, alternativ, stanga – dreapta, pana la comanda: Stop.
4	Umplerea seringilor cu volumele de lucru, stanga – dreapta, specificate
5	Amestecarea solutiilor prin translatarea dintr-o seringa in alta un numar de cicluri specificat
6	Emulsia stocata in seringa din stanga la finalul ciclurilor este translata in seringa din dreapta
7	Volumul selectat de solutie reziduala (corespunzator Capilarului 2 din Fig. 1) este golit din seringa din dreapta pe portul specificat al valvei
8	Evacuarea emulsiei din seringa din dreapta pe capilarul destinat probei
Viteza umplere (μl/s)	Permite selectarea vitezei de umplere a seringilor cu solutiile de lucru
Viteza amestecare (μl/s)	Permite selectarea vitezei de amestecarea a solutiilor (viteza cu care solutiilor sunt mutate dintr-o seringa in cealalta)
Viteza evacuare (μl/s)	Permite selectarea vitezei cu care vor fi evacuate din circuit volumul selectat de solutie reziduala si emulsia generata
Porturi preluare – golire valva stanga / dreapta	Permite setarea porturilor de incarcare, respectiv golire, pentru cele doua valve. In variantele A si B ale dispozitivului experimental, acestea sunt fixe.

Imbunatatirile aduse procedurii “PED104” au derivat din unele necesitati intampinate in timpul experimentelor, astfel ca, in noua varianta a programului de control, la Pasul 7, se poate selecta un volum de solutie (170 μl, in cazul configuratiei experimentale actuale) ce poate

fi eliminat pe capilarul de evacuare in recipientul de reziduuri. Volumul de 170  $\mu$ l este ales sa fie mai mare decat volumul capilarului 2 dintre valva dreapta automata (V2) si valva manuala (valva tip "L") ce permite comutarea intre capilarul de evacuare in recipientul de reziduuri si capilarul de evacuare a emulsiei. Astfel, solutia ce nu participa la formarea emulsiei, ramasa pe acest capilar, este evacuata in vasul de reziduuri, nu in recipientul probei impreuna cu emulsia.

Posibilitatea selectarii vitezei de umplere ajuta foarte mult in cazul solutiilor uleioase, cum este si Vitamina A. Din cauza vascozitatii mai mari a solutiei uleioase, Vitamina A curgea mult mai incet prin orificiul mic al seringii si pana sa aiba loc umplerea cu solutie, din cauza formarii unui volum de vid in seringa, acesta favoriza patrunderea de aer in instalatie. Acest lucru conducea la formarea de spuma in componenta finala a emulsiei. In cazul selectarii unei viteze de umplere de 200  $\mu$ l/s, dar si ca urmare a reducerii substantiale a numarului de conexiuni (imbinari) in varianta actuala de montaj, aerul nu mai patrunde in seringa in timpul incarcarii cu solutie uleioasa de Vitamina A si nu se mai formeaza spuma.

Posibilitatea selectarii vitezei de amestecare exista si in prima varianta a programului de control, insa acum s-a marit viteza maxima ce poate fi selectata prin schimbarea seringilor din dispozitivul Hamilton ML600. Pentru seringile cu volum de 5 ml viteza maxima de amestecare este de 2500  $\mu$ l/s. In cadrul experimentelor s-a folosit o viteza de amestecare de 2400  $\mu$ l/s.

O alta viteza ce poate fi selectata in noua varianta a programului de control este viteza de evacuare. In cadrul experimentelor au putut fi selectate de la o curgere lenta de 200  $\mu$ l/s pana la o evacuare rapida cu viteza de 2500  $\mu$ l/s.

## **Protocolul de operare a Sistemului de emulsionare conform montaj – Varianta optimizata**

### **A. Pregatirea secventei de emulsionare**

- Se verifica circuitele (capilarele) de incarcare a solutiilor, respectiv ca acestea sunt perfect uscate inainte sa fie introduse in recipientele cu solutiile stoc 1 si 2. Daca nu sunt, acestea se usuca trecand prin ele un flux de azot.
- Se verifica capilarele de conectare a valvelor, precum si pozitia valvelor manuale.
- Se porneste sistemul Hamilton ML 600, precum si programul de control instalat pe PC;
- In programul de control (bara de optiuni) se actioneaza butonul „Conectare” si se verifica in fereastra de interogare „LOG” mesajul de confirmare „Conectare reusita”, precum si activarea butonului „Deconectare” in bara de optiuni.
- In meniul „Setari” din bara de optiuni, meniul „Valve”, se seteaza tipul seringii (volumul in nl) si se bifeaza butonul „Save”, la fiecare repornire a programului.
- Pentru calibrarea seringilor se actioneaza optiunea „Initializare seringi” din bara de optiuni, la fiecare repornire a secventelor de emulsionare, respectiv a Procedurii de emulsionare, punctul B (urmator).

### **B. Setarea procedurii de emulsionare**

- In meniul „Proceduri” se selecteaza optiunea „PED104”
- In fereastra „Metoda PED104” se actioneaza butonul „Start” – Pasul 3 pentru golirea capilarelor de aer si introducerea solutiilor de lucru in acestea (pe capilarul dintre valvele automate V1 si V2). Dupa un circuit complet se actioneaza optiunea „Stop” – Pasul 3.
- In fereastra „Metoda PED 104” se introduc parametrii:
  - **Valva manuala (tip „L”)** va fi setata in **Configuratia 2** – asigura mutarea (trecerea) solutiilor dintr-o seringă in alta;

- **Pasul 4:** Setarea volumelor de lucru pentru seringă (pompa) stanga și seringă dreapta (μl).  
**Obs.** *Volumele de lucru însumate pentru cele 2 seringi NU trebuie să depășească volumul seringii cu volumul cel mai mic!*
  - **Pasul 5:** Se selectează numărul de cicluri de pompare dintr-o seringă în alta.  
**Obs.** *Pentru obținerea unor emulsii cu o distribuție uniformă a dimensiunilor picaturilor se alege un număr de cicluri optim, determinat anterior.*
  - **Pasul 7:** Se setează portul de golire al valvei automate dreapta (portul de evacuare a emulsiei) și se selectează volumul de soluție reziduală ce va fi eliminat.  
**Obs.** *In varianta B a montajului se pot utiliza porturile de evacuare 1 sau 3.*
  - Se alege viteza de umplere a seringilor de la minim 200 μl/s până la maxim 2500 μl/s.  
**Obs.** *Pentru soluții vascoase tip soluții uleioase se va utiliza viteza minimă 200 μl/s!*
  - Se stabilește viteza de amestecare a seringilor de la minim 200 μl/s până la maxim 2500 μl/s.  
**Obs.** *Pentru obținerea unor emulsii cu diametrele picaturilor cât mai mici se alege o viteză aproape de viteză maximă.*
  - Se setează viteza de evacuare a emulsiei de la minim 200 μl/s până la maxim 2500 μl/s.
  - Porturile de încărcare (preluare) valve stanga și dreapta sunt presetate și fixe: stanga Port 1 și dreapta Port 2.
  - Porturile de golire (evacuare) pentru valvele stanga și dreapta sunt presetate și fixe: stanga Port 3 și dreapta Port 1.
  - Pentru o trecere manuală de la Pasul 4 spre 8 se pot bifa casutele „Continuare manuală”.  
**Obs.** *Pentru această variantă a montajului NU este obligatorie bifarea acestor opțiuni decât în cazul etapei de evacuare a emulsiei, unde este necesară acționarea valvei manuale tip “L”.*
  - Se acționează butonul „Start” pentru pornirea procedurii de emulsionare.
  - După „Pasul 4” – umplerea seringilor cu volumele setate, se trece la „Pasul 5” – cicluri de pompare dintr-o seringă în alta, prin acționarea butonului „Ok” din fereastra de avertizare „Selectare pauză”.
  - „Pasul 5” – cicluri de pompare dintr-o seringă în alta, are o durată de aproximativ 26 minute / 800 cicluri complete. La finalul ciclurilor, emulsia va fi stocată în seringă stanga permițând o primă evaluare vizuală a emulsiei obținute; se trece la „Pasul 6” prin selectarea butonului „Ok” din fereastra de avertizare.
  - După finalizarea „Pasului 5” și trecerea la „Pasul 6” – transferarea emulsiei în seringă din partea dreapta, **Valva manuală (tip „L”)** va fi setată în **Configurația 1**, care asigură evacuarea soluției reziduale de pe Capilarul 2;
  - La “Pasul 7” se completează volumul (170 μl) ce va fi evacuat în recipientul de reziduuri. Acesta este ales să fie mai mare decât volumul Capilarului 2 (>157 μl).
  - După evacuarea soluției reziduale, **Valva manuală (tip „L”)** va fi setată în **Configurația 3**, care asigură evacuarea emulsiei din seringă către un recipient de stocare a acesteia;
  - Finalizarea „Pasului 8” prin acționarea butonului „Ok” din fereastra de avertizare conduce la golirea seringii dreapta, respectiv evacuarea emulsiei.
- C. Repetarea procedurii de emulsionare**
- Procedura de emulsionare se poate repeta pentru același raport al volumelor inițiale sau rapoarte diferite (în acest caz ajustând valorile volumelor) astfel: **Valva manuală (tip „L”)** va fi setată din nou în **Configurația 2**; după care se selectează opțiunea „Start”, și urmând apoi procedura de mai sus (Pași 5-8).
  - În caz că se dorește utilizarea altor soluții stoc, instalația trebuie în prealabil curățată și apoi urmata procedura de la punctul B (Pași 4-8).
- D. Curățarea instalației**
- În acest caz se apelează procedura “Curățare aparat”, unde se setează număr de pași corespunzător și o viteză de umplere de 2500 μl/s pentru fiecare din soluțiile: soluție de detergent, apă distilată, alcool etilic și apoi iar apă distilată.

## 2. Validarea dispozitivului de generare de nanoemulsii, obtinand rezultate reproductibile

Dispozitivul de generare de emulsii a fost utilizat la emulsionarea a doua solutii: o solutie de sodiu tetradecil sulfat (STS) in apa ultra pura, cu concentratia procentuala de 10%, cu o solutie uleioasa de vitamina A, asa cum este ea disponibila in farmacii.

Emulsiile obtinute au fost iradiate cu armonica a doua a unui laser pulsant cu Nd:YAG "Surelite II", Excel Technology (Continuum, SUA), cu frecventa 10 Hz, durata pulsului 6ns. Lungimea de unda a fost 532 nm, cu o energie medie a fasciculului laser de 35 mJ (densitate de energie de 70 mJ/cm<sup>2</sup>, talia fasciculului de 8 mm), intr-o cuva cu volumul de 400 µl si drum optic de 1mm. Lungimea de unda pentru iradiere a fost aleasa pe baza spectrelor de absorbtie ale componentelor emulsiilor inregistrate in prima etapa a acestui proiect. Cele doua solutii nu absorb la 532nm, astfel ca efectul radiatiei laser asupra emulsiei este de natura mecanica.

In cadrul experimentelor au fost testate diferite proportii ale componentelor emulsiilor, selectandu-se pentru iradierea laser proportia 1:1 a solutiei apoase de STS cu solutia uleioasa de vitamina A, datorita stabilitatii mai mari.

Un parametru important in generarea emulsiilor este numarul de cicluri de amestecare. Experimentele au fost realizate cu emulsii formate in 100, 300, 500 si 800 de cicluri.

Imaginile emulsiilor generate variind numarul de cicluri de amestecare au obtinute cu ajutorul unui microscop optic Imager Z1m Zeiss cu o camera pentru inregistrarea imaginilor axio Cam MRc 5 (HR); rezolutia camerei poate varia de la 1388x1040 la 4164x3120 pixeli. Microscopul poate lucra in transmisie, reflexie sau fluorescenta.

Pe baza imaginilor obtinute cu ajutorul microscopului, s-a observat ca numarul picaturilor mai mici in raport cu numarul total creste cu numarul de cicluri de amestecare.

Se poate observa in Figura 4b ca distributia dimensiunilor picaturilor este aproape uniforma in cazul unei emulsii formate in 800 de cicluri de amestecare, pe cand in Figura 4a exista o variatie mai mare a dimensiunii picaturilor.

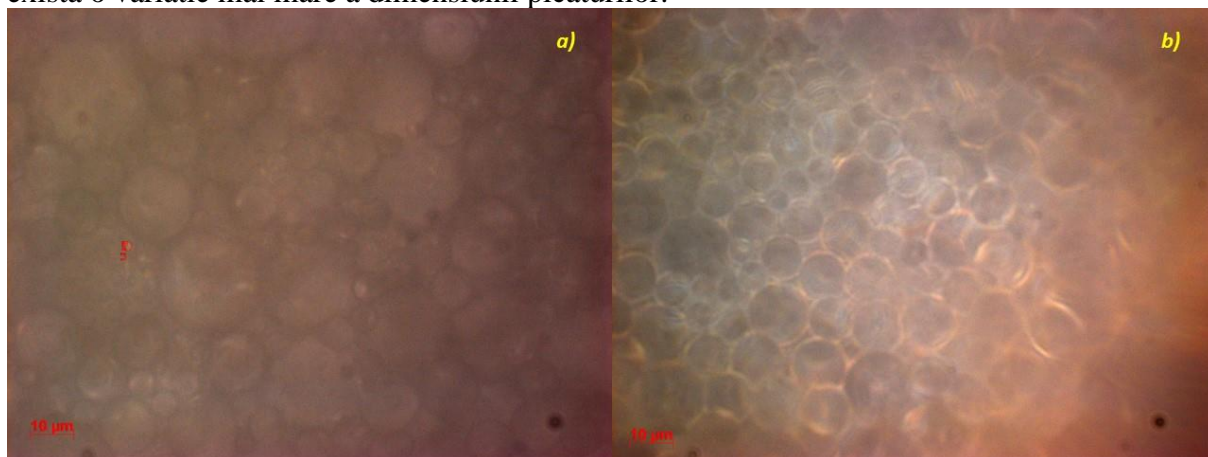


Fig. 4. Imagini inregistrate in transmisie, cu marire 100X, ale emulsiilor de vitamina A si STS in raport 1:1, formate in: a) 500 de cicluri; b) 800 de cicluri.

Emulsiile prezentate in Figura 4 au fost generate prin amestecarea solutiilor de vitamina A cu STS in raport 1:1, cu o viteza de 2400 µl/s si un numar de 500 de cicluri de amestecare (Figura 4 a), respective 800 de cicluri de pompare a seringilor (Figura 4b).

In Figura 5 sunt prezentate imagini ale emulsiei de vitamina A cu STS, in raport 1:1, generata prin 800 cicluri de pompare a seringilor, cu o viteza de 2400 µl/s.

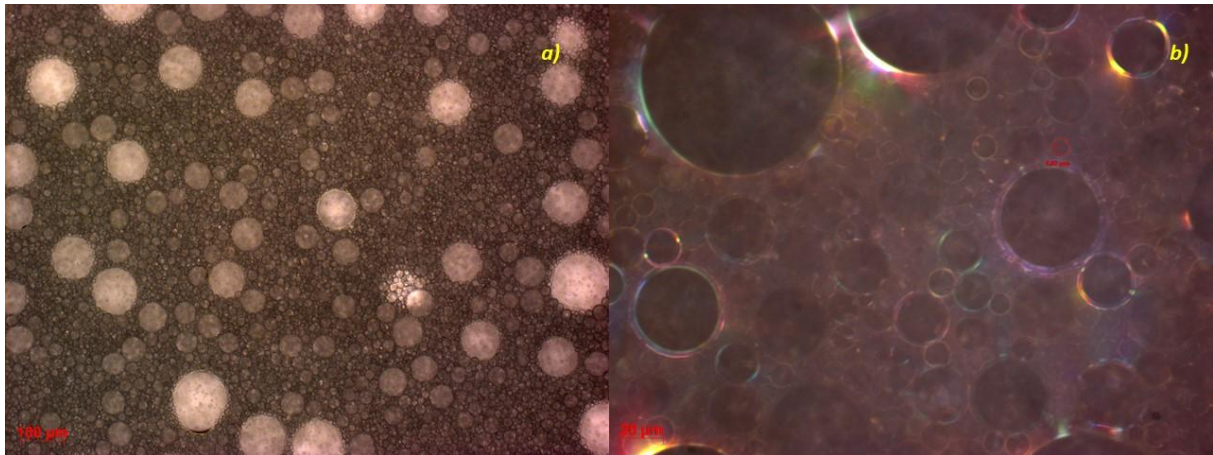


Fig. 5. Imagini ale emulsiei de vitamina A si STS in raport 1:1, 800 de cicluri de amestecare: **a)** imagine inregistrata in transmisie, cu marire 10X; **b)** imagine inregistrata in reflexie, cu marire 50X.

Din imaginile obtinute la diferite mariri, se poate observa ca emulsia prezinta picaturi de diferite dimensiuni, cu diametre de la 2-3  $\mu\text{m}$  pana la aproape 100  $\mu\text{m}$ , insa picaturile mari contin, la randul lor alte picaturi. Aspectul probei impreuna cu imaginile microscopice duc la concluzia ca emulsiile formate sunt emulsii multiple, de tipul apa-in-ulei-in-apa (water-in-oil-in-water sau W/O/W) [1].

Emulsii de STS si vitamina A, in raport 1:1, obtinute in aceleasi conditii experimentale (800 de cicluri de pompare cu viteza de 2400  $\mu\text{l/s}$ ) au fost expuse la radiatie laser cu lungimea de unda 532 nm de la un laser pulsant cu Nd:YAG, cu frecventa 10 Hz, durata pulsului 6ns. Energia medie a fasciculului laser a fost 35 mJ. Iradierea emulsiei a avut loc intr-o cuva cu volumul de 400  $\mu\text{l}$  si drum optic de 1mm, timp de 1 ora.

In urma expunerii la fasciculul laser, la o lungime de unda stabilita anterior in functie de spectrele de absorbtie ale componentelor emulsiei, aspectul probelor analizate la microscop este diferit. Astfel ca, in urma iradierii, picaturile din care este formata emulsia sunt mult mai mici decat in cazul emulsiei neiradiate.

In Figura 6 se poate observa ca emulsia are un aspect dens si nu se poate concluziona care din cele doua solutii (vitamina A uleioasa sau solutia apoasa de STS 10%) este faza dispersata si care este faza continua.

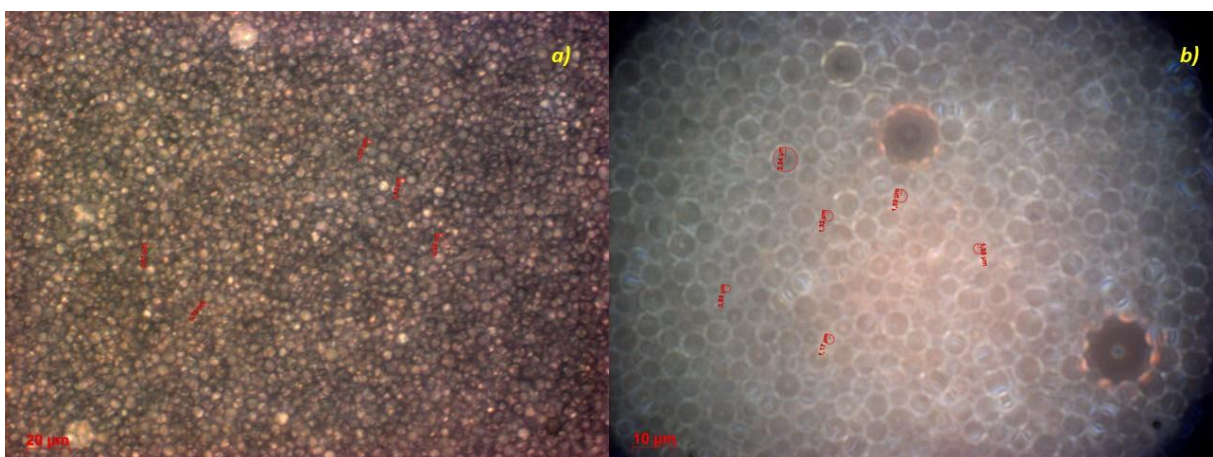


Fig. 6. Imagini ale emulsiei iradiate ( $\lambda=532\text{ nm}$ ,  $E=35\text{ mJ}$ ,  $t=1\text{ h}$ ) de vitamina A si STS in raport 1:1, 800 de cicluri de amestecare: **a)** imagine inregistrata in transmisie, cu marire 50X; **b)** imagine inregistrata in reflexie, cu marire 100X.



Majoritatea picaturilor observate in Figura 6 au diametrul de 1,5-3  $\mu\text{m}$ , insa au putut fi masurate si picaturi cu diametrul de 0,65 – 0,9  $\mu\text{m}$ , fiind aproape de limita de detectie a microscopului.

Pentru o mai buna analiza a dimensiunilor picaturilor din imaginile inregistrate cu ajutorul microscopului a fost utilizat programul ImageJ. ImageJ este un program de analiza si procesare al imaginilor ce permite, printre altele, si numararea particulelor dintr-o imagine si distributia acestora dupa dimensiune [2].

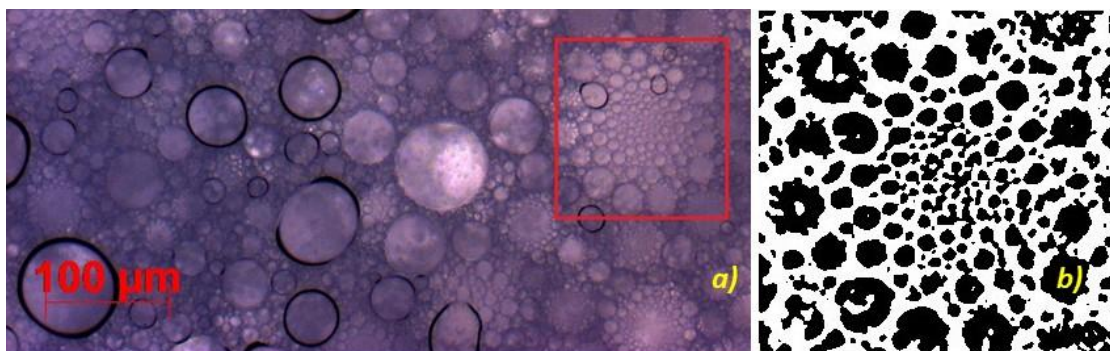


Fig. 7. a) Imagine inregistrata in transmisie, cu marire 10X, a emulsiei iradiate ( $\lambda=532\text{ nm}$ ,  $E=35\text{ mJ}$ ,  $t=1\text{ h}$ ) de vitamina A si STS in raport 1:1, 800 de cicluri de amestecare. b) Zona procesata cu ImageJ pentru numararea picaturilor si analiza distributiei dupa dimensiuni.

Zona delimitata cu rosu din Figura 7a a fost selectata datorita iluminarii uniforme, iar rezultatul obtinut in urma prelucrarii cu ImageJ este prezentat in Figura 7b.

Cu ajutorul functiei de analiza a particulelor din imagine au fost identificate 152 de picaturi de diferite dimensiuni. In Figura 8 este prezentata distributia picaturilor emulsiei in functie de raza lor. Se poate observa ca din totalul de picaturi, 13,5% au raza sub 1  $\mu\text{m}$ .

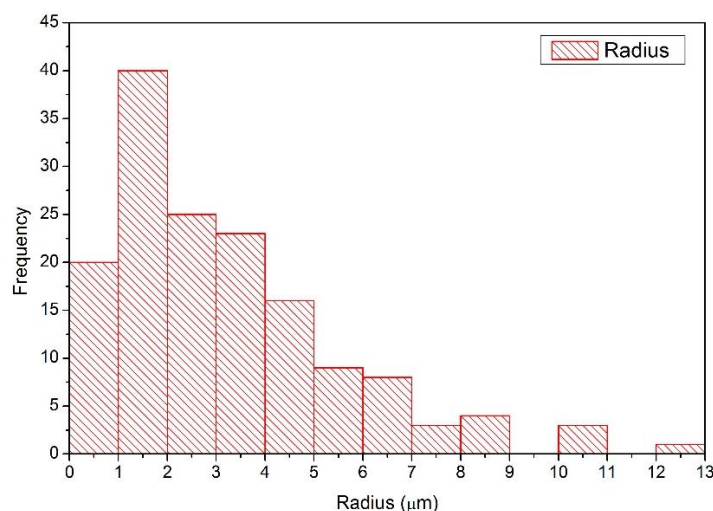


Fig. 8. Distributia picaturilor din imaginea analizata in functie de raza lor.

Pentru a putea determina si picaturi mai mici ale emulsiei, de ordinul a cateva sute de nanometri, a fost utilizata tehnica de difuzie dinamica a luminii (Dynamic Light Scattering - DLS). Emulsiile, inainte si dupa expunerea la radiatie laser, au fost analizate cu ajutorul unui echipament Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). Acesta masoara diametrul hidrodinamic (calculat pe baza ecuatiei Stokes – Einstein), distributia in functie de dimensiune

si potentialul zeta  $\zeta$ . Toate masuratorile de DLS au fost facute la lungimea de unda de 633 nm, la 25°C, la un unghi de detectie de 173°.

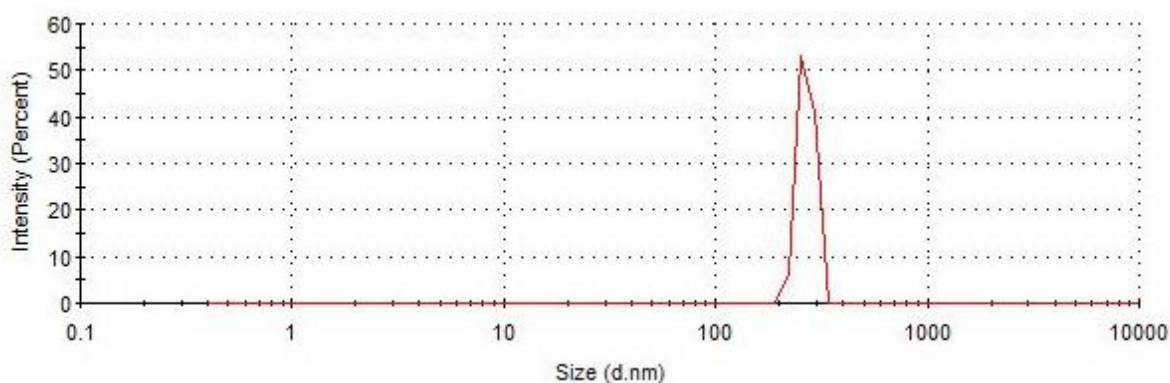


Fig. 9. Distributia particulelor in functie de dimensiune determinata prin DLS pentru emulsia de vitamina A si STS in raport 1:1, 800 de cicluri de amestecare

Analiza prin difuzia dinamica a luminii a evidentiat dimensiunea hidrodinamica a nanoparticulelor de emulsie obtinute ca fiind 269,5 nm. In Figura 9 se poate observa existenta unui singur peak, ceea ce indica o distributie monomodala a nanopicaturilor din emulsia de vitamina A si STS in raport 1:1, 800 de cicluri de amestecare, cu o viteza de 2400  $\mu\text{l/s}$ .

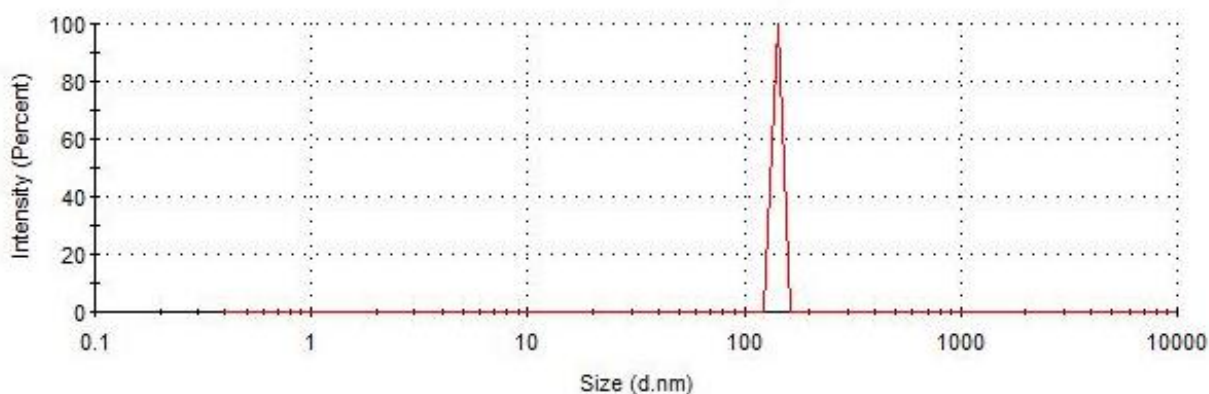


Fig. 10. Distributia particulelor in functie de dimensiune determinata prin difuzia dinamica a luminii pentru emulsia iradiata ( $\lambda=532$  nm,  $E=35$  mJ,  $t=1$  h) de vitamina A si STS in raport 1:1, 800 de cicluri de amestecare

In Figura 10 este prezentata distributia nanopicaturilor din emulsia de vitamina A si STS in raport 1:1, expusa la radiatie laser ( $\lambda=532$  nm,  $E=35$  mJ). Emulsia a fost formata in 800 de cicluri de amestecare, cu o viteza de 2400  $\mu\text{l/s}$  si apoi iradiata 1 ora. Din grafic se poate observa distributia monomodala a particulelor din emulsia iradiata. Analiza DLS a evidentiat ca dimensiunea hidrodinamica a nanopicaturilor din emulsia iradiata este 141.8 nm, mai mica decat in cazul emulsiei neiradiate.

In Tabelul 1 sunt date dimensiunile hidrodinamice si valorile potentialului zeta pentru particulele prezente in cele doua probe: emulsia de vitamina A si STS in raport 1:1 si acelasi tip de emulsie insa expus la radiatie laser ( $\lambda=532$  nm,  $E=35$  mJ,  $t=1$  h).

Tabel 1. Datele obtinute prin analiza de difuzie dinamica a luminii

Tipul probei	Dimensiunea (nm)	Potentialul zeta $\zeta$ (mV)
Emulsie neiradiata	269,5	- 42,2
Emulsie iradiata	141,8	- 54,6

Analiza potentialului zeta, care este potentialul electrostatic in planul de forfecare, poate da informatii despre stabilitatea solutiilor coloidale in vederea depozitarii. Valori ale potentialului zeta mai mari ca -30 mV (valoarea absoluta) arata o stabilitate fizica buna; valorile optime ale potentialului zeta fiind aproape de -60 mV. Astfel, particulele incarcate, cu valori ale potentialului zeta mari, nu vor agrega datorita respingerii electrostatice dintre particule [3].

Analiza DLS a emulsiei de vitamina A si STS in raport 1:1, 800 de cicluri de amestecare, cu o viteza de 2400  $\mu\text{l/s}$ , a relevat ca valoarea potentialului zeta a acestei probe este de - 42,2 mV.

In urma expunerii timp de 1 ora la radiatie laser cu  $\lambda=532$  nm si  $E=35$  mJ, valoarea potentialului zeta a emulsiei iradiate este de - 54,6 mV.

Astfel, analizele DLS permit concluzionarea ca nanopicaturile obtinute in urma iradierii emulsiei au dimensiuni mai mici (141,8 nm fata de 269,5 nm) si sunt mai stabile in timp.

### **3. Realizarea de masuratori spectroscopice si microfluidice pentru a caracteriza nanoemulsiile obtinute inainte si dupa iradierea lor**

#### **Masuratori de microfluidica**

Tensiogramele nanoemulsiilor au fost inregistrate cu ajutorul tensiometrului de analiza a profilului picaturii PAT-1 (Sinterface, Berlin-Germania).

Tensiometrul PAT-1 permite determinarea tensiunii superficiale a unui lichid pe baza formei unei picaturi suspendate sau a unei bule de gaz generate intr-un lichid. Aceasta forma este data de ecuatia Gauss-Laplace, care reprezinta o relatie intre curbura meniscului unui lichid si tensiunea superficiala:

$$\gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta P_0 + \Delta \rho g z,$$

unde  $R_1$  si  $R_2$  sunt razele principale ale curburii,  $\Delta P_0$  este diferenta de presiune in planul de referinta,  $\Delta \rho$  este diferenta de densitate,  $g$  reprezinta acceleratia gravitacionala si  $z$  este inaltimea picaturii fata de planul de referinta.

Tensiunea superficiala  $\gamma$  poate fi determinata prin fitarea coordonatelor unei picaturi in ecuatia Gauss-Laplace si folosind  $\gamma$  ca parametru de fitare. Modificand  $\gamma$ , rezulta o familie de curbe teoretice. Curba care se potriveste cel mai bine pe punctele experimentale inregistrate pe conturul picaturii, corespunde valorii optime a tensiunii superficiale [4].

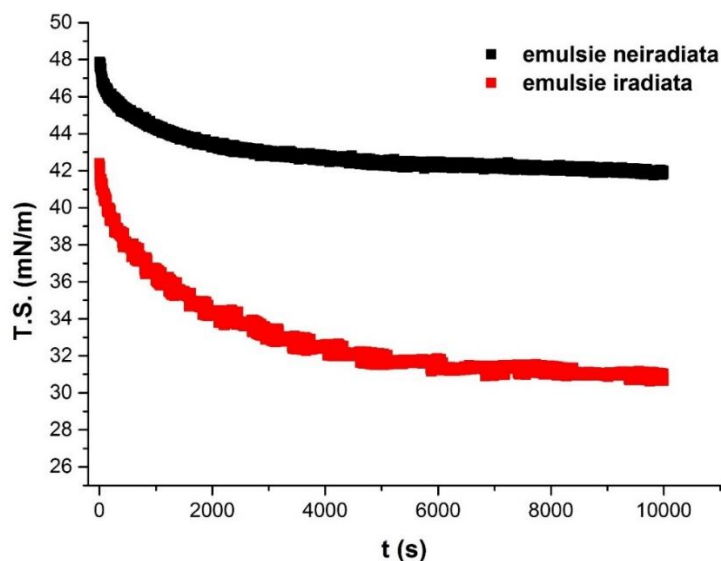


Fig. 11. Tensiunea superficiala a emulsiei de vitamina A si STS in raport 1:1, inainte si dupa expunere la radiatie laser ( $\lambda=532$  nm,  $E=35$  mJ,  $t=1$  h)

In Figura 11 sunt prezentate tensiogramele emulsiei de vitamina A si STS in raport 1:1, formata in 800 de cicluri de amestecare, cu o viteza de  $2400 \mu\text{l/s}$ , inainte si dupa expunerea timp de 1 ora la radiatie laser cu lungimea de unda de 532 nm si energia medie de 35 mJ.

Pentru masurarea tensiunii superficiale a fost generata o picatura de emulsie cu volumul de  $15 \mu\text{l}$ , picatura a carui contur a fost comparat cu rezultatele (curbele) teoretice date de ecuatia Gauss-Laplace. In cazul emulsiei neiradiate, tensiunea superficiala porneste de la valoarea  $47,8 \text{ mN/m}$  si are o scadere rapida in primele 1500 s, apoi tinde sa se stabilizeze pana la finalul celor 10000 s in jurul valorii  $41,8 \text{ mN/m}$  (curba neagra din Figura 11).

Tensiunea superficiala a emulsiei iradiate porneste de la valoarea  $42,4 \text{ mN/m}$ , scade rapid pana la aproximativ 2000 s, continua cu o scadere lenta pana la 6000 s si se stabilizeaza pana la finalul masurarii in jurul valorii de  $31 \text{ mN/m}$  (curba rosie din Figura 11).

Aspectul tensiogramelor arata separarea celor doua solutii din emulsie, picaturile de vitamina A uleioasa migrand spre marginea picaturii, la interfata cu aerul, iar picaturile de solutie apoasa de STS 10% ramanand in interiorul picaturii. Migrarea picaturilor de ulei are loc treptat, pana la separarea totala a celor doua faze ale emulsiei. Astfel, analiza tensiunii superficiale a unei picaturi de emulsie poate fi o metoda prin care se poate urmari stabilitatea in timp a emulsiei.

### **Spectroscopia UV-Vis-NIR – masuratori de reflexie**

Deoarece probele de emulsii sunt puternic imprastietoare iar spectrele de transmisie in domeniile UV-Vis-NIR nu furnizeaza date concludente, investigatiile proprietatilor optice ale acestora s-au indreptat catre analiza spectrelor de reflexie.

Folosind tehnica reflexiei speculare a fost inregistrata reflectanta unor esantioane de emulsii STS: vitamina A (1:1) imediat dupa preparare, cat si dupa expunerea la fascicul laser Nd:YAG ( $\lambda = 532$  nm;  $E = 35$  mJ) timp de 1 ora.

S-a utilizat un accesoriu de reflectanta speculara B0086703 ce reflecta radiatia incidenta la un unghi de  $6^\circ$ , care a fost montat in compartimentul probelor unui spectrofotometru UV-Vis-NIR Lambda 950 (Perkin-Elmer, SUA).

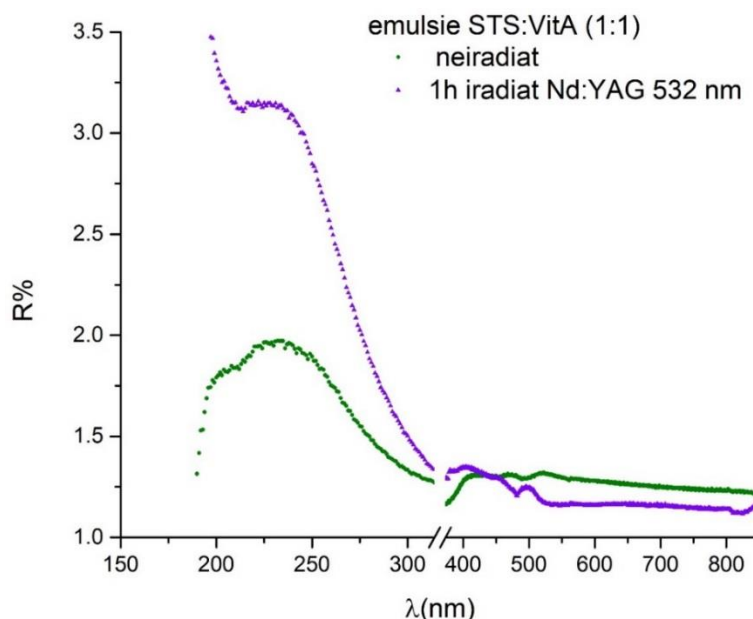


Fig. 12. Spectrele de reflexie in UV-Vis-NIR al emulsiei de vitamina A si STS in raport 1:1, inainte si dupa expunere la radiatie laser ( $\lambda=532$  nm,  $E=35$  mJ,  $t=1$  h)

Analiza spectrelor de reflexie permite identificarea unui maxim situat la 232 nm in cazul emulsiei proaspete, neiradiate, in timp ce dupa iradiere se constata o deplasare a maximului spre lungimi de unda mai mici ( $\Delta\lambda = 10$  nm, efect hipsocrom) insotit de o crestere a intensitatii acestuia (efect hipercrom).

Aceste aspecte, asociate cu rezultatele celorlalte masuratori (microscopie optica, DLS, TS etc.) duc la concluzia modificarii caracteristicilor fizice ale emulsiei, atat in ceea ce priveste microrarea dimensiunii micropicaturilor cat si modificari ale proprietatilor la interfata, care conduc la cresterea reflectantei prin favorizarea imprastierii radiatiei incidente in cazul probei iradiate cu fascicul laser. Efectul radiatiei laser exercitat asupra probei iradiate influenteaza stabilitatea emulsiei prin microrarea si uniformizarea dimensiunii picaturilor componente.

### Spectroscopia FTIR

FTIR-ATR este o metoda spectroscopica ce poate fi utilizata in determinarea rapida a stabilitatii emulsiilor prin masurarea interactiilor apa-emulsificator [5,6]. S-a utilizat aceasta metode pentru a obtine o analiza rapida a stabilitatii emulsiilor de vitamina A si STS in raport 1:1.

Spectrele IR au fost inregistrate cu un spectrometru FT-IR Nicolet™ iS™50 echipat cu un modul ATR (reflexie total atenuata) in domeniul  $4000-650$   $\text{cm}^{-1}$ , la o rezolutie de  $4$   $\text{cm}^{-1}$  si o mediere pe 16 spectre. Cristalul ZnSe utilizat are urmatoarele caracteristici: o singura reflexie interna la un unghi de incidenta de  $42^\circ$ , diametru 1.5 mm, indice de refractie 2.4 si adancime de penetrare la  $1000$   $\text{cm}^{-1}$  de  $2.03$   $\mu\text{m}$ . Un volum de  $50$   $\mu\text{L}$  de emulsie de solutie apoasa STS 10% si vitamina A (raport 1:1, 800 de cicluri de amestecare cu viteza  $2400$   $\mu\text{l/s}$ ) a fost investigat. In cazul emulsiilor neiradiate si iradiate, au fost inregistrate la diferite intervale de timp pana la 300 min un numar de 90-100 de spectre.

Spectrele FTIR-ATR ale componentelor din emulsii sunt prezentate in Figura 13, unde spectrul IR al apei prezinta doua benzi cu maxime la  $3347$   $\text{cm}^{-1}$  si  $1638$   $\text{cm}^{-1}$ , cel al STS cinci benzi cu maxime la  $2916$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $2849$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1468$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1215$   $\text{cm}^{-1}$  si  $1080$   $\text{cm}^{-1}$ , iar cel al vitaminei A cinci benzi cu maxime la  $2900$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $2853$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1743$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1464$   $\text{cm}^{-1}$  si  $1235$   $\text{cm}^{-1}$ .

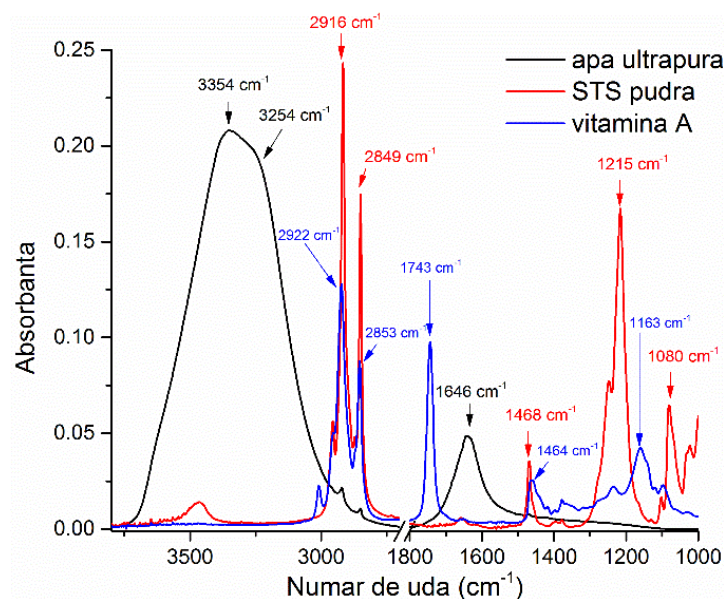


Fig. 13. Spectrele IR pentru componentele emulsiei: apa ultrapura, STS si vitamina A

In cazul emulsiei de vitamina A si STS in raport 1:1 se poate observa ca spectrul IR este influentat doar de contributia apei si a vitaminei A (Figura 14), deoarece concentratia de STS este prea mica pentru a putea fi observata prin FTIR-ATR.

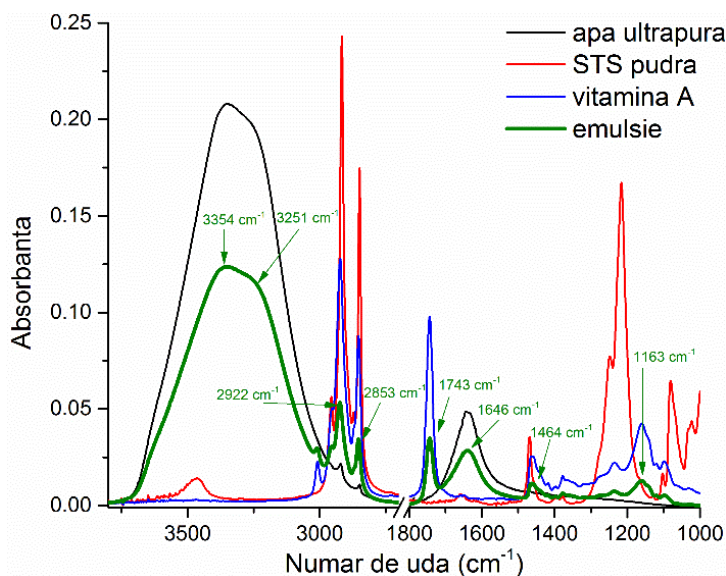


Fig. 14. Comparatie intre spectrele IR ale emulsiei, apei ultrapure, STS si vitamina A

Domeniile IR de interes in cazul emulsiilor sunt  $3600-3200\text{ cm}^{-1}$  (vibratii  $-\text{OH}$ ),  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  (vibratii  $-\text{CH}_2$ ) si  $1800-1600\text{ cm}^{-1}$  (vibratii  $-\text{C}=\text{O}$ ). In domeniul  $3600-3200\text{ cm}^{-1}$  banda de interes este cea de la  $3254\text{ cm}^{-1}$  responsabila de vibratia de intindere a hidrogenului legat ( $\text{O}-\text{H}$ ) in cazul moleculelor de apa. Vibratiile simetrice si asimetrice ale metilenului ( $-\text{CH}_2$ ) se regasesc la  $2922\text{ cm}^{-1}$  si  $2853\text{ cm}^{-1}$  si se datoreaza lantului alifatic hidrocarbon. Banda cu maxim la  $1741\text{ cm}^{-1}$  este responsabila de vibratiile gruparilor carbonil prezente in vitamina A si cea de la  $1634\text{ cm}^{-1}$  este responsabila de vibratiile de deformare  $\text{H}-\text{O}-\text{H}$  din cadrul moleculei de apa.

Spectrele IR pentru emulsiile neiradiate si iradiate sunt prezentate in Figura 15. Se poate observa ca, pe parcursul celor 300 min, intensitatea absorbantei benzii cu maxim la  $3354\text{ cm}^{-1}$  scade sugerand faptul ca apa incepe sa-si schimbe faza in timp, astfel micșorandu-se considerabil vibratiile din regiunea  $-\text{OH}$  (hidrogenul legat). Aceasta modificare in timp este insotita de cresterea benzii cu maxime la  $2922\text{ cm}^{-1}$  si  $2853\text{ cm}^{-1}$ . Acest lucru se datoreaza cresterii numarului de vibratii  $-\text{CH}_2$  datorită interacțiunii reduse a fazei surfactant-vitamina A. Separarea emulsiei a condus la o adsorbție sporită a picăturilor de vitamina A pe suprafața cristalului ZnSe, de unde și la creșterea vibrațiilor.

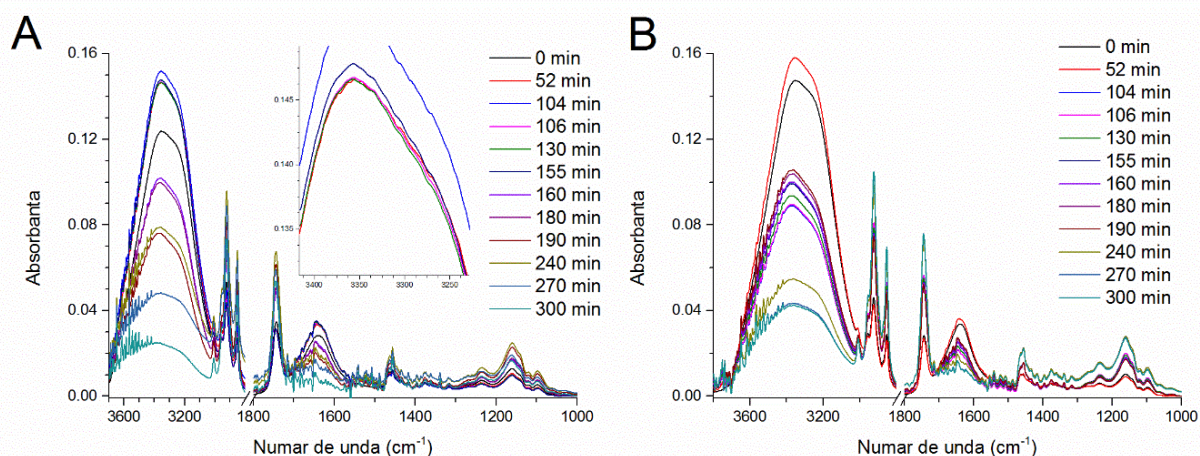


Fig. 15. Spectrele IR pentru emulsia neiradiata (A) si iradiata 1 ora (B), pentru un interval de timp de 0-300 min.

Prin urmare, se pot obtine informații semnificative din vibrațiile din regiunile  $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$  si  $1800\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ , ce pot fi utilizate pentru a determina starea unei emulsii. In Figura 16 este prezentat studiul stabilitatii in timp a emulsiei neiradiate si iradiate 1 h, unde au fost investigate benzile apei si vitaminei A, respectiv maximele de la  $3354\text{ cm}^{-1}$  si  $2922\text{ cm}^{-1}$ .

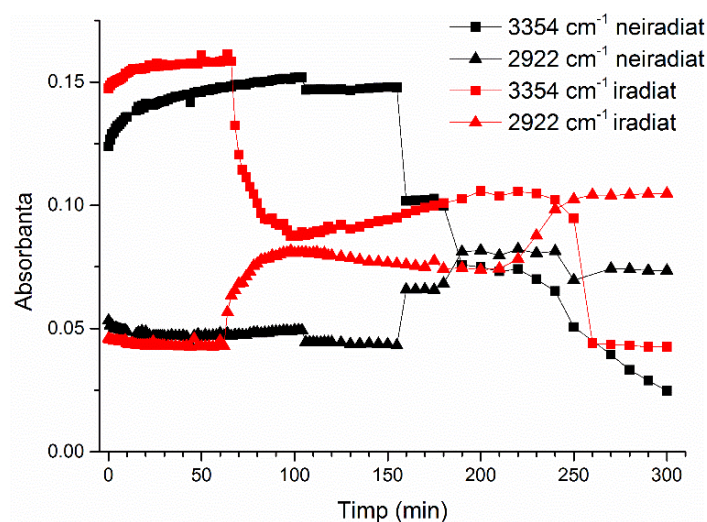


Fig. 16. Stabilitatea in timp a emulsiilor neiradiate si iradiate 1h stabilita prin extragerea absorbantei benzilor IR cu maxime la  $3354\text{ cm}^{-1}$  si  $2916\text{ cm}^{-1}$

In Figura 16 se poate observa pentru emulsia neiradiata o crestere usoara a intensitatii absorbantei benzii de apa ( $3354\text{ cm}^{-1}$ ) pana la 155 min si in acelasi timp o scadere usoara a intensitatii absorbantei benzii de vitamina A ( $2922\text{ cm}^{-1}$ ). Pentru emulsia iradiata 1 h se observa

acelasi fenomen ca in cazul celei neiradiate, insa pana la 126 min. Acest fenomen se datoreaza efectului de „creaming” (Figura 17), unde are loc separarea emulsiei in doua emulsii dintre care una mai bogata in faza de dispersie decat cealalta.

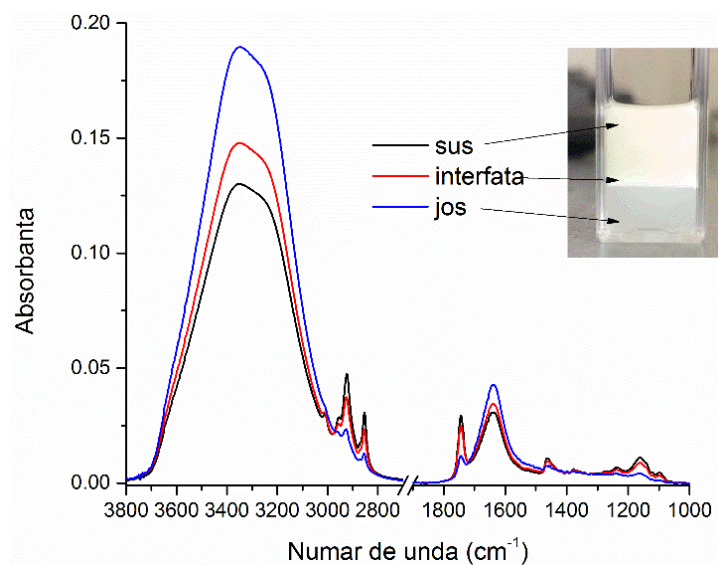


Fig. 17. Observarea fenomenului de creaming pentru emulsia neiradiata.

In Figura 17 se poate observa efectul de creaming confirmat prin spectrele FTIR-ATR, unde faza apoasa este mai abundenta in partea inferioara a emulsiei si faza vitaminei A este dominanta in partea superioara a emulsiei.

De asemenea, in cazul emulsiei neiradiate (Figura 16), mai saraca in faza de dispersie, intre 155 min si 160 min are loc o scadere brusca a intensitatii absorbantei benzii apei ( $3354\text{ cm}^{-1}$ ) si o crestere a celei de la vitamina A ( $2922\text{ cm}^{-1}$ ). Acest aspect sugereaza disproportionarea picaturilor din emulsie, unde are loc difuzia moleculelor din faza de dispersie de la picaturi mici la picaturi mari. Astfel, conform rezultatelor prezentate in Figura 16, intre 155 min si 160 min se unesc picaturi de vitamina A formand o picatura mai mare. Acelasi fenomen se petrece si in intervalul 180-190 min.

Pentru emulsia iradiata 1 ora nu se observa aceeasi scadere brusca a intensitatii absorbantei apei, respectiv cresterea brusca a intensitatii absorbantei vitaminei A. Mai degraba este un proces lent ce se desfasoara intre 122 min si 158 min. Acest aspect sugereaza ca in urma iradierii se formeaza picaturi mai mici, comparativ cu cele din emulsia neiradiata, care la un moment dat incep sa se disproportioneze si sa formeze picaturi mai mari. Cu cat picaturile sunt mai mici cu atat scaderea intensitatii absorbantei apei, respectiv cresterea absorbantei vitaminei A, este mai mica. Astfel prin iradiere se obtine o mai buna stabilitate a emulsiei.

### Spectroscopia Raman

Probele de emulsie realizate din STS (solutie apoasa 10%) si vitamina A in proportie 1:1 care s-au dovedit a fi cele mai stabile au fost caracterizate si prin spectroscopie Raman. Laserul de excitare a imprastierii Raman a fost acelasi cu cel utilizat pentru iradierea emulsiei in celelalte experimente realizate in scopul imbunatatirii proprietatilor emulsiei ( dimensiuni, stabilitate) si anume un laser cu Nd:YAG dublat in frecventa cu emisie la 532 nm, frecventa 10 Hz, energie de 35 mJ.



Astfel au fost inregistrate secvente de 10 spectre Raman mediate pentru 3000 de pulsuri laser, acestea corespunzand unui timp total de iradiere de 50 min. In Fig. 18 este prezentata o astfel de suita de spectre Raman inregistrate in domeniul 2000-5000  $\text{cm}^{-1}$ .

Spectrele Raman prezinta benzi vibrationale caracteristice unor grupari functionale din structura vitaminei A sau a STS si bineinteles a apei. Aceste benzi au o evolutie cu timpul de iradiere care poate da indicatii despre modificarile structurale sau morfologice ale emulsiei.

Astfel la 3400  $\text{cm}^{-1}$  se observa vibratia de intindere OH (prezenta in apa) care are o intensitate constanta. In schimb banda larga de la 2887  $\text{cm}^{-1}$  corespunzatoare vibratiei de intindere C-H alifatic din structura STS sau a vitaminei prezinta o scadere in intensitate cu iradierea. Aceasta poate indica o micorare a particulelor emulsiei care contin STS si respectiv vitamina A cu iradierea.

In acest sens, este de asemenea observata o banda la 3930  $\text{cm}^{-1}$  care poate fi atribuita unor benzi de combinatie ale vibratiilor C-H din lantul alifatic ale STS care dispare pe parcursul iradierii.

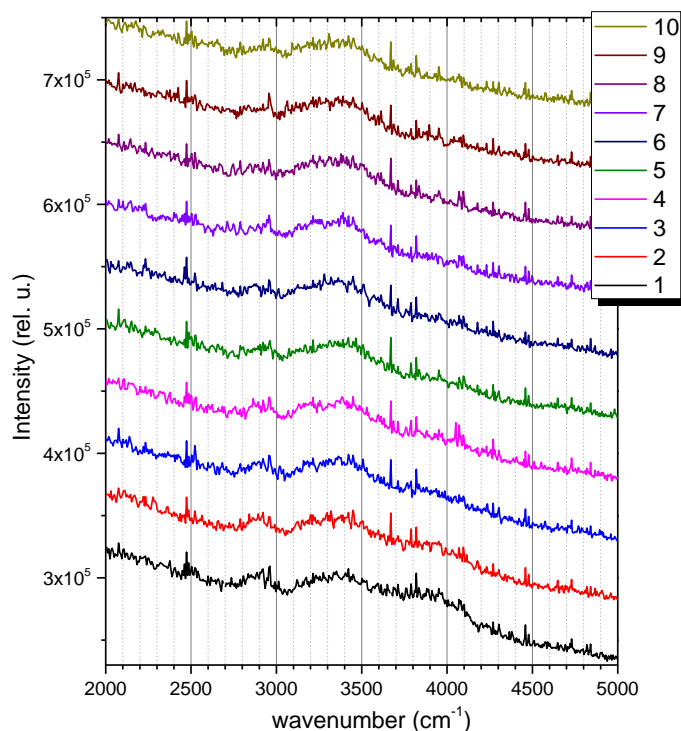


Fig. 18. Secventa de 10 spectre Raman pentru a emulsie de STS (solutie apoasa 10%) si vitamina A in proportie 1:1 (mediate pe 3000 de pulsuri laser, timp total de iradiere de 50 min).

#### 4. Concluzii privind aplicabilitatea acestui sistem in medicina si/sau in alte domenii

Datele obtinute au aratat ca emulsiile de vitamina A si STS generate cu dispozitivul dezvoltat in cadrul proiectului au picaturi cu dimensiuni variate, care se micsoreaza pe masura ce numarul de cicluri de amestecare si viteza de amestecare cresc. Experimentele au aratat ca, dupa alegerea unui numar optim de cicluri de amestecare si a unei viteze de amestecare optime, apropiata de limita maxima a dispozitivului, prin expunerea emulsiei la radiatie laser dimensiunile picaturilor din componenta emulsiei scad si in plus are loc o uniformizare a dimensiunilor picaturilor. Pentru obtinerea rezultatelor dorite, este importanta alegerea

parametrilor optimi ai fasciculului laser. In primul rand, lungimea de unda a fost aleasa pe baza spectrelor de absorbtie ale solutiilor componente, astfel ca la  $\lambda = 532 \text{ nm}$ , STS si vitamina A nu absorb, astfel ca interactia fasciculului laser cu emulsia este nerezonanta, iar efectul radiatiei laser este unul mecanic. Apoi, este important ca energia fasciculului sa fie suficient de mare ca sa se obtina micșorarea picaturilor. Astfel a fost determinata o energie medie optima a fasciculului laser de 35 mJ (densitate de energie de  $70 \text{ mJ/cm}^2$ , talia fasciculului de 8 mm). Si nu in ultimul rand, timpul de expunere la radiatie laser trebuie sa fie suficient de mare pentru obtinerea micșorarii picaturilor, dar nu prea mare pentru a avea loc separarea completa a celor doua faze.

Dispozitivul experimental de generare a nanoemulsiilor asistat laser dezvoltat in cadrul proiectului a fost testat si validat prin obtinerea unor nanoemulsii de STS, un agent sclerozant, si vitamina A. Solutii de STS sunt folosite ca atare in tratarea malformatiilor venoase [7], dar si sub forma de spuma in scleroterapie [8]. In plus iradierea cu radiatie laser IR potenteaza efectul unor medicamente sclerozante [9].

In general, tipul de emulsii obtinute si evolutia caracteristicilor lor prin expunere la fascicul laser, deschid noi perspective in diferite clase de studii/ aplicatii:

\*in tratarea venelor varicoase unde se folosesc in prezent spume de aetoxisclerol se pot folosi probe de medicament sub forma de spume sau de emulsii care sunt expuse unui fascicul laser in interiorul venelor tratate. Este de asteptat ca expunerea la fascicul laser a spumelor si emulsiilor care conduce la diminuarea picaturilor din structura acestora sa conduca la un efect sporit al medicamentului asupra tesutului tinta (vene). Aceasta ar fi o explicatie a efectelor pozitive ale tratamentelor venelor varicoase cu spume de polidocanol expuse la fascicul laser in interiorul venelor tratate.

\*nanoemulsiile generate cu dispozitivul asistat laser pot fi utilizate ca forma de livrare si a altor medicamente a caror formula de administrare poate fi astfel imbunatatita.

\*nanoemulsiile generate cu dispozitivul asistat laser dezvoltat in cadrul proiectului prezinta potential pentru extinderea ariei de aplicatii farmaceutice, cosmetice, tratamente in dermatologie si oftalmologie, industria alimentara (procesarea alimentelor), tratarea suprafetelor, sinteza materialelor, etc.

## 5. Concluzii generale

In cadrul acestei etape a fost optimizat dispozitivul de producere de nanoemulsii asistat laser. De asemenea, prin experimente repetate a avut loc validarea dispozitivului de generare de nanoemulsii, obtinandu-se rezultate reproductibile.

Principalele imbunatatiri ale dispozitivului experimental au fost determinate de reducerea volumului tampon dintre valvele automate si posibilitatea setarii vitezei de lucru (debit de lucru) in functie de tipul (volumul) seringii utilizate. De asemenea, unele imbunatatiri au fost aduse programului de control si protocolului de realizare a experimentelor.

Studiile de microscopie optica au aratat ca picaturile emulsiilor au dimensiuni variate, care se micșoreaza pe masura ce numarul de cicluri de amestecare si viteza de amestecare cresc. Prin expunerea emulsiei la radiatie laser nerezonanta, dimensiunile picaturilor scad si are loc o uniformizare a dimensiunilor picaturilor.

Analizele DLS permit concluzionarea ca nanopicaturile obtinute in urma iradierii emulsiei au dimensiuni mai mici (141,8 nm fata de 269,5 nm) si sunt mai stabile in timp.

Aceleasi concluzii privind micșorarea dimensiunilor picaturilor și a stabilității crescute în urma iradierii se obțin și din măsurătorile de reflexie cu ajutorul spectroscopiei UV-Vis-NIR și din spectrele FTIR ale emulsiilor înregistrate înainte și după iradiere.

Măsurătorile de microfluidică pot releva informații despre stabilitatea în timp a emulsiilor. Aspectul tensiogramelor arată separarea celor două soluții din emulsie, picaturile de vitamina A uleioasă migrând spre marginea picaturii, la interfața cu aerul, iar picaturile de soluție apoasă de STS 10% rămânând în interiorul picaturii. Migrarea picaturilor de ulei are loc treptat, până la separarea totală a celor două faze ale emulsiei.

Pe baza datelor experimentale, putem afirma că dispozitivul experimental de generare a nanoemulsiilor asistat laser poate fi utilizat cu succes pentru obținerea unor nanoemulsii ce ar putea fi utilizate pe viitor ca formulă de livrare a unor agenți sclerozanti sau a altor medicamente. Astfel, obiectivele proiectului pentru această etapă au fost îndeplinite și au fost obținute rezultatele estimate.

## 6. Diseminarea rezultatelor

Diseminarea rezultatelor s-a făcut în principal utilizând două instrumente: publicarea de articole și prezentarea realizărilor la conferințe naționale și internaționale.

### Articole:

1. Tozar, T; Smarandache, A; Staicu, A; Pascu, ML; Pirvulescu, RA; Laser modified phenothiazines and hydantoin: photo-products characterisation and application on animal eyes pseudo-tumours, *Letters in Drug Design & Discovery* 15: 687-697, 2018;
2. Tozar, T; Andrei, IR; Costin, R; Pirvulescu, RA; Pascu, ML; Case series about ex vivo identification of squamous cell carcinomas by laser induced autofluorescence and Fourier transformed infrared spectroscopy, *Lasers in Medical Science* 33 (4): 861-869, 2018;
3. Smarandache, A.L; Moeller, R; Pascu, ML; Uv-Vis and FTIR Spectroscopic Investigations of Gamma-Ray Irradiated Antibiotics, *Romanian Reports in Physics* 70 (3): 2018 (In Press);
4. Tozar, T; Pascu, ML; Time-Stability of Laser Exposed Phenothiazines Aqueous Solutions in View of Antimicrobial Research, *Proceedings of the Romanian Academy, Series A*, accepted for publication;
5. Smarandache, A; Staicu, A; Dinache, A; Andrei, I.R; Pirvulescu, RA; Pascu, ML; Optical Irradiation of Cytostatics: Photoproducts Characterization and Tests on Rabbit Eye Pseudotumors, *Proceedings of the Romanian Academy, Series A*, accepted for publication.
6. M. Boni, Angela Staicu, I.R. Andrei, Adriana Smarandache, V. Nastasa, Z. Saponjic, M.L. Pascu, TiO<sub>2</sub> nanoparticles influence on Rhodamine 6G droplet emission, *Romanian Reports in Physics*, in press, 2018.
7. Andrei I. R., Boni M., Staicu A., Pascu M.L., Lasing of optically pumped large droplets: instant and gradual blue shift, *Journal of the Optical Society of America B*, 2018 (Under Review)

### Conferințe:

1. Simon, A.; Stoicu, A.; Tozar, T; Andrei, IR; Simion, S; van Loon, JJWA; Dowson, A; Pascu, ML; Impact dynamics of laser modified medicine droplets on target surfaces under hypergravity conditions", *Hypergravity Workshop*, 25-26 January 2018, ESA-ESTEC, Noordwijk, The Netherlands;
2. Simon, A; van Loon, J.J.W.A; Pascu, ML; Wetting of Laser Modified Medicine Droplets under Hypergravity Conditions, *Surface Wettability Effects on Phase Change Phenomena (SWEP) Workshop*, 17-18 May 2018, Brighton, UK;
3. Dinache, A; Pascu, ML; Spectral studies of quinazoline derivatives designed as EPI's, *Annual Scientific Conference University of Bucharest, Faculty of Physics 2018 Meeting*, 21-22 June 2018, Măgurele, Romania;
4. Boni, M; Andrei, IR; Staicu, A; Pascu, ML; Lasing of optically pumped large droplets, *Annual Scientific Conference University of Bucharest, Faculty of Physics 2018 Meeting*, 21-22 June 2018, Măgurele, Romania;
5. Andrei, IR; Onea, C; Sterian, PE; Pascu, ML; Experimental control of low-frequency fluctuations by current modulation in a laser diode chaotic coupled system; *Annual Scientific Conference University of Bucharest, Faculty of Physics 2018 Meeting*, 21-22 June 2018, Măgurele, Romania;

6. Smarandache, A; Boni, M; Handzlik, J; Kiec-Kononowicz, K; Staicu, A; Pascu, ML; Laser Induced Colloidal Structures in Drugs Solutions, European Colloid and Interface Society (ECIS) Conference, 2- 7 September 2018, Ljubljana, Slovenia;

7. Dinache, A; Andrei, IR; Tozar, T; Smarandache, A; Iordache, I; Boni, M; Staicu, A; Pascu, ML; Laser assisted device for micro/nano-emulsion production, European Colloid and Interface Society (ECIS) Conference, 2- 7 September 2018, Ljubljana, Slovenia;

8. Dinache, A; Andrei, IR; Boni, M; Tozar, T; Pascu, ML; Laser foaming of medicine solutions, European Colloid and Interface Society (ECIS) Conference, 2- 7 September 2018, Ljubljana, Slovenia;

9. Boni, M; Andrei, IR; Staicu, A; Pascu, ML; Resonant and unresonant interaction of laser beams with pendant droplets having different contents, International Conference "Advanced Topics in Optoelectronics, Microelectronics and Nanotechnologies" ATOM-N 2018, 23 - 26 August 2018, Constanta, Romania;

10. Boni, M; Andrei, IR; Staicu, A; Pascu, ML; Time delayed lasing during laser pulse excitation of a mm-sized RH6G dye droplet, The 5th International Conference on the Physics of Optical Materials and Devices ICOM2018, 27th to 31st August 2018, Igalo, Montenegro.

### Referinte

[1] J. Sjöblo, "Emulsions and emulsion stability", 2<sup>nd</sup> Edition, Taylor & Francis Group, LLC, 2006

[2] <https://imagej.nih.gov/ij/docs/intro.html>

[3] I. Lacatusu, N. Badea, A. Murariu, C. Nichita, D. Bojin, A. Meghea, "Antioxidant Capacity of Lipid Nanoparticles Loaded with Rosemary Extract", *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, Vol. 523: pp. 260[832]–272[844], 2010

[4] Profile Analysis Tensiometer PAT1 Operation Manual, Version 6, Sinterface Technologies, 2006

[5] D. A. Schmidt and K. Miki, "Structural Correlations in Liquid Water: A New Interpretation of IR Spectroscopy," *J. Phys. Chem. A*, vol. 111, no. 40, pp. 10119–10122, 2007.

[6] J. M. Whittinghill, J. Norton, and A. Proctor, "A fourier transform infrared spectroscopy study of the effect of temperature on soy lecithin-stabilized emulsions," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 76, no. 12, pp. 1393–1398, 1999.

[7] X. Alakailly, R. Kummoona, F. A. Queresby, D. A. Baur, A. E. Gonzales, "The Use of Sodium Tetradecyl Sulphate for the Treatment of Venous Malformations of the Head and Neck", *J. Maxillofac. Oral Surg.*, 14(2):332–338, 2015.

[8] C.M Hamel-Desnos, P.R. Desnos, B. Ferre, A. Le Querrec, "In Vivo Biological Effects of Foam Sclerotherapy", *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 42, 238-245, 2011.

[9] A. Smarandache, A. Staicu, V. Nastasa, J. Moreno-Moraga, J.R. De La Torre, M. Trelles, R. Pirvulescu, M. Pascu, Physical Properties of Laser Irradiated Sclerosing Foams, *Romanian Rep. Phys.* 67, 1480–1490, 2015.