

ЕЛЕКТРООПТИКА НА КОЛОИД / ПОЛИМЕРНИ СИСТЕМИ ЗА КОНТРОЛИРАН ПРЕНОС НА ЛЕКАРСТВА

КАРИНА МИТАРОВА^{1,2}, ВИКТОРИЯ МИЛКОВА²

¹ Катедра „Атомна физика“, Група „Биофизика и Медицинска физика“,
Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

² Институт по физикохимия, БАН, София

*Карина Митарова, Виктория Милкова. ЕЛЕКТРООПТИКА НА КОЛОИД/
ПОЛИМЕРНИ СИСТЕМИ ЗА КОНТРОЛИРАН ПРЕНОС НА ЛЕКАРСТВА*

Представеното изследване има за цел да демонстрира приложението на физични методи (светоразсейване в електрично поле и микроелектрофореза) за изследване на електричните свойства и стабилността на нанокapsули от неразтворимото във вода лекарство индометацин. Чрез последователна електростатична адсорбция на противоположно заредени полизахариди (пектин и хитозан) е формиран стабилен бислоен филм върху наночастиците. Регистрирана е свърхкомпенсация на заряда на повърхността след формирането на всеки адсорбиран слой и рестабилзиране на суспензията. От промяната на ротационния дифузионен коефициент на частиците след всяка адсорбционна стъпка е направена приблизителна оценка за дебелината на филма.

Karina Mitarova, Viktoria Milkova. ELECTRO-OPTICS OF COLLOID / POLYMER SYSTEMS FOR CONTROLLED DRUG RELEASE

The goal of the present study is to demonstrate the application of physical methods (Electric light scattering and Microelectrophoresis) for investigation of the electrical properties and stability of nanocapsules from water insoluble drug Indomethacin. Bilayer film from oppositely charged polysaccharides (pectin and chitosan) is formed through layer-by-layer electrostatic adsorption onto the nanoparticles. The overcompensation of the surface charge and re-stabilization of the suspension is registered after formation of each layer. The estimation of the thickness of the bi-layer film is performed from the change of the rotary diffusion coefficient of the particles before and after each adsorption step.

Keywords: Nanoparticles; Controlled drug release; Electro-optics.

PACS numbers: 87.15.-v; 87.15.Tt

За контакти: Карина Митарова, Катедра „Атомна физика“, Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, бул. „Джеймс Баучър“ 5, София 1164, тел.: +359 2 8161317; E-mail: karina.mitarova@abv.bg; Виктория Милкова, ИФ – БАН, ул. “Акад. Г. Бончев“, бл. 11, София 1113, тел. +359 2 9793922; E-mail: vmilkova@ipc.bas.bg

1. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години е постигнат значителен напредък в получаването и използването на наночастици и композитни материали с наноразмери в медицината. Като наночастици е прието да се означават частици или обекти, които имат размер под 100 nm по поне една от осите им. Големият интерес към тези системи както фундаментален, така и с оглед на големите възможности за тяхното приложение, се дължи на факта, че лекарства под формата на частици с наноразмери се използват все по-активно за лечение на редица заболявания. Наночастиците са обещаващи системи за лекарствено доставяне поради способността им за контролирано освобождаване и биологичната им съвместимост с тъкани и клетки.

За да бъде лекарството ефикасно, то трябва да отговаря на редица условия и някои от тях са: лекарствените частици да имат малък размер, което позволява да достигнат до желано място в организма, както и да се задържат в продължителна циркулация; да е с висока стабилност; да е изградено от биосъвместими и биоразградими компоненти; да има достатъчно високо съдържание на активната съставка в капсулата или композита; да има способността да действа на конкретно място – мишена, в организма (да разпознава или да бъде програмирано).

Лекарствата, които са разтворими във вода, могат лесно да бъдат усвоени от организма. Голяма част от медикаментите, особено тези за борба с рака, са хидрофобни вещества. Те не се разтварят във вода и това затруднява тяхното усвояване. От друга страна, стабилността на тези системи е изключително важна и затова дори и най-малката възможност за агрегация трябва да бъде изключена, тъй като това може да доведе до запушване на кръвоносни съдове (ако приложението е венозно) или до други увреждания. Един от начините за прилагане на неразтворимите във вода лекарства е те да бъдат капсулирани и така да се направят по-хидрофилни, а също така по този начин може да се контролира и тяхната стабилност. Това, което прави наночастиците толкова интересни, е фактът, че те са мост между обемните материали и атомните или молекулните структури. Малките размери на наночастиците, на които съответства голяма повърхност, обуславят различни свойства от тези на обемните структури. Това се отразява на тяхната химична и биологична активност. Намалването на размера и промяната на свойствата влияе също и върху тяхното физично поведение. С нарастване на употребата на наночастиците нараства и необходимостта от по-подробно изследване на тяхната токсичност и на начина, по който те проникват в нашето тяло.

На този етап подобни проучвания се извършват чрез различни моделни изследвания (компютърни симулации, взаимодействие на наночастици с

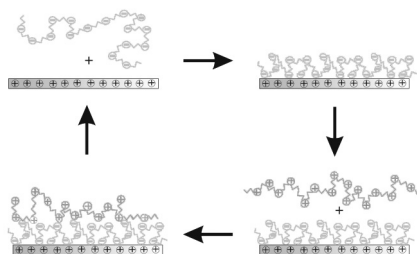
фосфолипидни везикули като модел на биологични мембрани), както и реални експерименти с животни. Установено е, че двата основни фактора, които определят токсичността на наноматериалите, са размерът и формата им.

Целта на настоящото моделно изследване е да се демонстрира приложението на физични методи (светоразсейване в електрично поле и микроелектрофореза) за изучаване на електричните свойства, дебелината и стабилността на нанокapsули от неразтворимо във вода лекарство. В това изследване е използван индометацин, тъй като разтворимостта му нараства с увеличаване на рН на средата и поради това е подходящ за капсулиране и изследване на неговото бавно освобождаване през полимерна обвивка. Полизахаридите, от които тя е формирана, са натурални продукти, които са биосъвместими, биоразградими и нетоксични. Получаването на нано-колоиди от това лекарство, както и включването му в полимерна капсула вече е изследвано от Радева и сътр. [1]. Авторите са показали формиране на стабилен многослоен филм от противоположно заредени полимери върху частиците и как с промяна на рН на средата може да се постигне бавно освобождаване на лекарството. Стабилизирането на суспензията след формирането на полимерен слой е контролирано фино чрез концентрацията на добавения полимер.

2. ФОРМИРАНЕ НА МНОГОСЛОЙНИ ФИЛМИ ОТ ПОЛИЕЛЕКТРОЛИТИ

Методът за получаване на многослойни филми чрез последователна физична адсорбция на два противоположно заредени полиелектролита върху заредена плоска повърхност (Layer-by layer assembly of polyelectrolytes (LbL)) е предложен от Decher през 1991 г. [2]. Той се оказва ефективен за формирането на стабилни тънки полимерни филми с желани свойства и състав.

Главната движеща сила за получаването на многослойният филм е електростатичното привличане между мономерите на два противоположно заредени полиелектролита, както и привличането им към противоположно заредена повърхност. Свръхкомпенсацията на заряда (презаредянето) на повърхността след всяка адсорбционна стъпка осигурява възможността за образуване на следващ слой от противоположно зареден полиелектролит. Крайният резултат от послойната процедура е многослойна полиелектролитна структура, стабилизирана от силни електростатични взаимодействия.



Фиг. 1. Схема на послойната техника за формиране на полиелектролитните многослойни филми върху плоска повърхност [3]

Получаването на филмите е показано схематично на фиг. 1. Първият слой от полимер се формира чрез потапяне на плоска повърхност в разтвор с достатъчно висока концентрация на полиелектролит, така че да се осигури равномерна наситена адсорбция и презареждане на повърхността. Това позволява адсорбирането на втори слой от полиелектролит с противоположен знак на заряда от разтвор също с достатъчно висока концентрация, така че да се постигне свръхкомпенсация на заряда на вече формирания комплекс. Следва отново адсорбция на първия полимер и т.н. Чрез използването на тази процедура могат да се получат практически неограничен брой слоеве. След всяка адсорбционна стъпка излишният полимер, който е останал неадсорбиран в разтвора или по-слабо свързан с повърхността, се отстранява чрез потапяне на повърхността във вода или разтвор на електролит с подходяща концентрация.

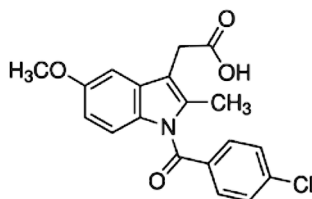
По-късно послойната техника е приложена за формиране на многослойни филми от противоположно заредени полиелектролити и върху сферични колоидни частици. След разтваряне на частиците при подходящи условия могат да се получат тънки полимерни обвивки, подходящи за микрокапсули, в които да се включат ензими, лекарства и др. [4].

Тъй като електростатичните взаимодействия са основната причина за получаването на многослойните филми в предложената техника, тя се оказва подходяща за формиране на филми с включени различни заредени компоненти – неорганични частици, багрила, ензими, клетки, вируси и много други. Предимство на техниката е, че тя успешно се прилага за получаване на равномерно покрити повърхности с различна форма, размер и свойства. Получаването на хибридни композитни структури с наноразмери е от особен интерес за приложение в медицината и биотехнологиите.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

3.1. ИЗПОЛЗВАНИ МАТЕРИАЛИ

Наночастици. В проведеното изследване е използван индометацин (1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indoleacetic acid), продукт на Sigma-Aldrich. Лекарството принадлежи към групата на нестероидните противовъзпалителни средства и се използва за лечение на остри и хронични болки при възпалителни заболявания на ставите (ревматоиден артрит, тендовагинит, коксартроза, ишиас, плексит, радикулит), както и при травматологични заболявания (контузии, луксации).



Индометацин

Индометацинът е слабо разтворим във вода при рН~4, но разтворимостта му бързо нараства с повишаване на рН на средата. Това негово свойство го прави много подходящ за включаване в капсули, което позволява да се постигне фин контрол при освобождаването му в организма.

Полиелектролити. Отрицателно зареден пектин (Herbstpeinth & Fox KG, Германия) и положително зареден хитозан (Sigma Aldrich) са използвани за формирането на полимерната капсула. Изходните разтвори на полимерите с концентрация 1 g.dm^{-3} са приготвени с тройно дестилирана вода или 0,4% разтвор на оцетна киселина, съответно за пектин и хитозан. След това полимерните разтвори са филтрувани през $0,45 \mu\text{m}$ филтър (Sartorius AG). Концентрацията на използваните полимери е $10^{-2} \text{ g.dm}^{-3}$, а рН~4 е поддържано с оцетна киселина.

3.2. МЕТОДИ

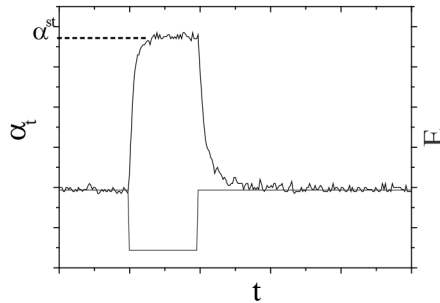
Светоразсейване в електрично поле. При прилагане на електричното поле върху суспензия от колоидни частици те се ориентират в резултат на взаимодействието на техните електрични моменти (индуциран и постоянен) с полето. В резултат на ориентацията на частиците се променя интензите-

тът на разсеяната от суспензията светлина. Електро-оптичният ефект, α , при светоразсейване в електрично поле се дефинира като [5]

$$\alpha = \frac{I_E - I_0}{I_0} = \frac{\Delta I}{I_0}, \quad (1)$$

където I_E и I_0 са интензитетите на разсеяната светлина, съответно в присъствие на поле и без поле.

На фиг. 2 е показан типичен електро-оптичен отговор на системата. При прилагане на електрично поле върху суспензията от колоидни частици електро-оптичният ефект нараства постепенно поради повишаване на степента на ориентация на частиците. При прилагане на полето достатъчно дълго време електро-оптичният ефект достига стационарна стойност α^{st} . След изключване на полето електро-оптичният ефект намалява, тъй като ориентацията на частиците в суспензията намалява.



Фиг. 2. Електро-оптичен импулс

От времето на отпускане на ефекта, което е свързано с брауновата дифузия на частиците и връщането на системата в началното състояние, може да се получи информация за ротационния дифузионен коефициент ($D_r = 1/6\tau$) и съответно за размера на частиците [6]:

$$\alpha_t = \alpha^{st} \exp(-6D_r t). \quad (2)$$

При ниски енергии на ориентация на частиците в суспензията ($U \ll kT$), където има линейна зависимост на ефекта от квадрата на интензитета на приложеното поле, е в сила зависимостта [7]

$$\alpha = \frac{A(Ka, Kb)}{I_0(Ka, Kb)} \left[\frac{\mu_p^2}{kT} + (\gamma_a - \gamma_b) \right] \frac{E^2}{4kT}, \quad (3)$$

където $A(Ka, Kb)$ и $I_0(Ka, Kb)$ са оптични функции, зависещи от размерите и формата на частиците; $K = (2\pi/\lambda)\sin\theta/2$, а λ е дължината на вълната на падащата светлина, θ – ъгълът на наблюдение; μ_p – постоянният диполен момент, γ_a и γ_b са електричните поляризуемости по дългата и късата ос на частицата. От наклона на зависимостта може да се получи информация за стойността и посоката на електричната поляризуемост на частиците с и без адсорбиран полиелектролит.

Електричното светоразсейване е чувствителен метод, който дава възможност да се изследват електричните и геометричните свойства на частици. Методът е приложим за частици с размери под и около 1 μm , ако те имат коефициент на пречупване на светлината, различен от този на водата. Важно изискване при електро-оптичните експерименти е да има ниска концентрация на частици в разтвора, за да се предотврати многократно разсейване на светлината.

В електро-оптичните измервания е използвана стъклена клетка, снабдена с два хоризонтално разположени платинови електрода. Всеки от електродите има площ 1 cm^2 , а разстоянието между тях е 0,26 cm . Обемът на клетката е около 10 cm^3 , от които само около 2% се намират между електродите.

Микроелектрофореза. Презареждането на повърхността след формирането на всеки слой от полиелектролит е измерено с апарат за микроелектрофореза Rank Brothers II с плоска кварцова клетка при 25°C.

3.3. ПРОЦЕДУРА ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА НАНОЧАСТИЦИ ОТ ИНДОМЕТАЦИН

Водната суспензия на индометацин съдържа игловидни кристали с размери над един микрон. Ето защо в първия етап от проведеното изследване се прилага подходяща процедура за получаване на стабилна суспензия от частици с по-малки размери [1].

Отделено количество индометацин се стрива механично в хаванче и след това се диспергира в дестилирана вода. Суспензията се обработва с ултразвук (Sonopuls Ultrasonic Homogenizer HD 2200) за 30 минути при непрекъснато охлаждане (ледена баня), за да се избегне загряване и предизвикване на нежелана допълнителна агрегация. Полученият разтвор се центрофугира при 4500 rpm за 30 минути, за да се отделят по-големите частици. Концентрацията на частици в работната суспензия е 0,1 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ и $\text{pH}\sim 4$, което е постигнато чрез добавяне на оцетна киселина.

Според снимките, направени със сканиращ електронен микроскоп, формата на получените частици може да бъде разглеждана като диск (дълга и къса ос, съответно $a = 200 \pm 70 \text{ nm}$, $b = 140 \pm 50 \text{ nm}$, осево съотношение около 1,4) [1]. Получените данни от електро-оптичните измервания показват диаметър на диска около $300 \pm 3 \text{ nm}$.

3.4. ПРОЦЕДУРА ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА СТАБИЛНИ НАНОКАПСУЛИ (ЯДРО-ОБВИВКА) ОТ ПОЛИЗАХАРИДИ И ИНДОМЕТАЦИН

Първият слой е формиран чрез добавянето на суспензия на наночастици от индометацин към разтвор на хитозан с концентрация $2 \cdot 10^{-2} \text{ g.dm}^{-3}$ при разбъркване с електромагнитна бъркалка. Разбъркването продължава 20 минути, тъй като това време е достатъчно за постигане на наситена адсорбция [8]. Излишъкът от полимер, неадсорбиран или по-слабо свързан с повърхността, се отстранява чрез центрофугиране на суспензията при 13 500 оборота в минута в продължение на 15 минути. Супернатантата се отстранява и утаените частици на дъното на епруветките се редиспергират чрез обработка с ултразвук (Ultrasonic disintegrator, type UD-11, automatic-Techran, Poland) за около 20 s в разтвор на оцетна киселина (pH~4), тъй като е важно условията на адсорбция да се поддържат постоянни от началото до края на формирането на филма. Тази процедура се повтаря, като се добавят покритията с хитозан частици към разтвор на пектин с концентрация $10^{-2} \text{ g.dm}^{-3}$.

Концентрациите на полизахаридите, които са използвани в проведеното кратко изследване, са определени предварително [9]. Те са достатъчно високи, така че да се постигне свръхкомпенсиране на заряда на повърхността и стабилизиране на суспензиите, но и същевременно достатъчно ниски, така че излишното количество от полимер, който остава неадсорбиран в разтвора, да бъде малко.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. ДЕБЕЛИНА НА АДСОРБИРАНИТЕ СЛОЕВЕ

С помощта на електро-оптичния метод беше определена хидродинамичната дебелина на всеки от адсорбираните слоеве. За целта от релаксационното време на дезориентация на частиците след изключване на приложено поле τ беше изчислен техният ротационен дифузионен коефициент D_r ($D_r = 1/6\tau$).

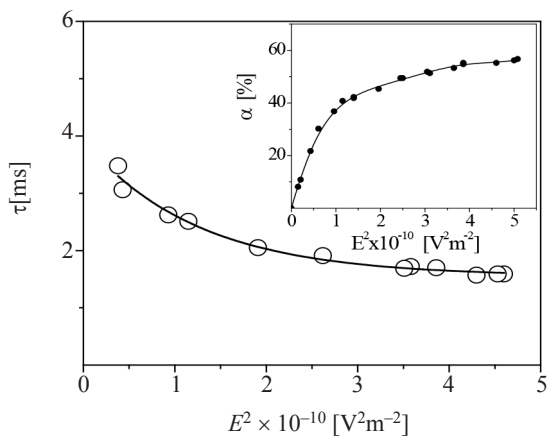
Според електронномикроскопските снимки частиците от индометацин могат да се разглеждат като диск. От уравнението на Perrin [10] за ротационния дифузионен коефициент на диск с безкрайна малка дебелина беше направена приблизителна оценка за размерите на наночастиците преди и след адсорбирането на всеки слой от полизахарид:

$$B^3 = \frac{9kT}{2\eta} \tau, \quad (4)$$

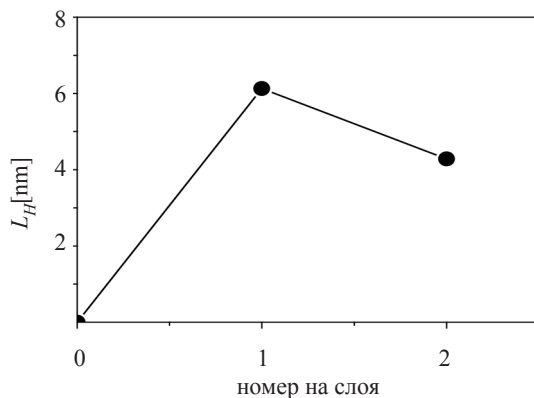
където B е диаметърът на диска, η – вискозитетът на дисперсната среда (за водата 10^{-2} Р). От промяната на ротационния дифузионен коефициент преди и след адсорбцията на всеки слой е определен диаметърът на диска, а от там и дебелината на адсорбирания слой L_H .

Един от основните проблеми при формирането на филмите е възможността да се получат агрегати от частици, което да внесе неточност при определянето на дебелините. Ето защо ние изследвахме зависимостта на електро-оптичния ефект α и релаксационното време на дезориентация на частиците след изключване на електричното поле като функция от квадрата на силата на приложеното поле (фиг. 3). От фигурата се вижда, че τ не се променя при полетата, при които се постига пълна ориентация и насищане на електро-оптичния ефект. В съответствие с електро-оптичната теория на полидисперсните системи, при тези полета приносът към ефекта на големите частици е малък в сравнение с този на единичните частици.

Ето защо ние приемаме, че измервайки τ при високи полета, получаваме информация за дебелината на филмите, адсорбирани предимно върху единични частици. Този начин за определяне на релаксационното време на дезориентация на частиците с формирани върху тях полизахаридни слоеве беше прилаган за определяне на дебелината им.



Фиг. 3. Зависимост на релаксационното време на дезориентация τ от силата на приложеното електрично поле за суспензии от наночастици на индометацин без добавен полизахарид. Малка фигура: зависимост на електро-оптичния ефект от квадрата на интензитета на приложеното електрично поле при честота 1 kHz



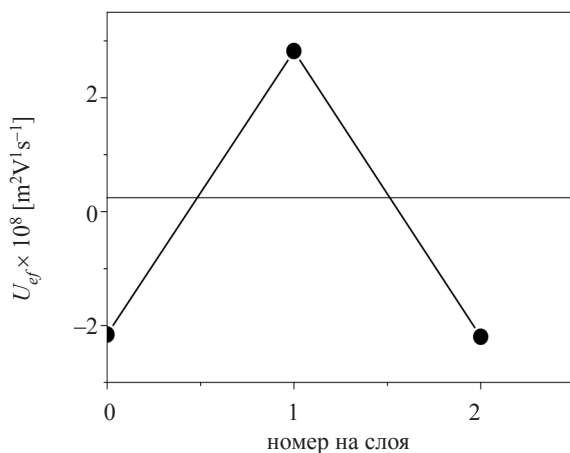
Фиг. 4. Хидродинамична дебелина L_H на бислоинния филм след адсорбцията на всеки слой

Дебелината на бислоинния филм, формиран чрез последователна адсорбция на хитозан и пектин върху наночастиците от индометацин, е показана на фиг. 4. Резултатите показват, че дебелината на филма нараства след формирането на слой от хитозан ($\sim 6 \pm 2$ nm) и намалява след адсорбцията на пектин ($\sim 4 \pm 1$ nm).

Намалението на дебелината на филма, както и осцилацията с номера на слоя не винаги могат да се интерпретират като десорбция [9, 11]. Това може да бъде резултат от свиване на слоя или на други процеси, които стават в хода на формирането на филма (in-out дифузия и др.). Въпреки намалението на дебелината, електрокинетичните измервания показаха свръхкомпенсация на повърхностния заряд на частиците след адсорбцията на слоя от пектин и стабилизиране на суспензията, което е доказателство за осъществената адсорбция.

4.2. ЕЛЕКТРОКИНЕТИЧНИ СВОЙСТВА НА ФОРМИРАНИЯ БИСЛОЕН ФИЛМ

Презареждането на повърхността на частиците след формирането на всеки следващ слой от полиелектролит е главното условие за получаване на стабилни многослойни филми. На фиг. 5 е показано как електрофоретичната подвижност на частиците U_{ef} променя знака си при преминаване от филм с най-външен слой от положително зареден полизахарид към отрицателно зареден.



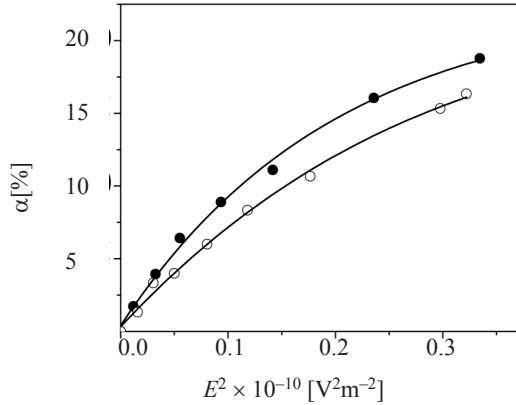
Фиг. 5. Электрофоретична подвижност U_{ef} на бислойния филм след адсорбцията на всеки слой

Осцилацията в знака на електрофоретичната подвижност на частиците след формирането на всеки слой е доказателство за осъществената адсорбция и осигурява възможността за адсорбцията на следващ слой от противоположно зареден полиелектролит. От друга страна, почти еднаквата по абсолютна стойност U_{ef} е показател за достигането на еднаква свръхкомпенсация на повърхностния им заряд след всяка адсорбционна стъпка.

От фигурата се вижда, че в началния момент наночастиците от индометацин (ИМС) са отрицателно заредени. Добавяйки хитозан (СНІ), който е положително зареден, с достатъчно висока концентрация, така че да се презареди повърхността, електрофоретичната подвижност променя знака си. Суспензията е стабилизирана и може да се добави противоположно зареденият пектин. Това води до нова свръхкомпенсация на заряда и измерената електрофоретична подвижност на частиците отново променя знака си.

4.3. ЕЛЕКТРИЧНИ СВОЙСТВА НА ФОРМИРАНИЯ БИСЛОЕН ФИЛМ

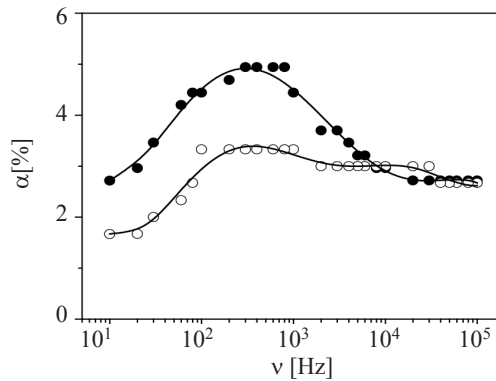
На фиг. 6 е показана зависимостта на регистрирания електро-оптичен ефект като функция от квадрата на интензитета на приложеното електрично поле за суспензия на наночастици с адсорбиран слой от хитозан и пектин.



Фиг. 6. Зависимост на електро-оптичния ефект от интензитета на приложеното електрично поле за суспензия на наночастици от индометацин с адсорбиран слой от хитозан (●) и пектин (○) при ниски енергии на ориентация. Честота на полето – 1 kHz

Резултатите показват, че ефектът от суспензията на частици с най-външен слой от хитозан е по-висок от този с пектин. Това може да се обясни с по-високия заряд на този полизахарид в условията на проведения експеримент.

От линейната част на зависимостта на електро-оптичния ефект от интензитета на приложеното поле (фиг. 6) може да бъде определена електричната поляризуемост на частиците с адсорбиран полизахарид, като се използва уравнение (3). Получените стойности за слой от хитозан и пектин са съответно $2 \cdot 10^{-30}$ и $1 \cdot 10^{-30} \text{ Fm}^2$.



Фиг. 7. Зависимост на електро-оптичния ефект от честотата на приложеното електрично поле за суспензия на наночастици с адсорбиран слой от хитозан (●) и пектин (○) при ниски енергии на ориентация. Интензитет на полето е $1,96 \cdot 10^4 \text{ V.m}^{-1}$

На фиг. 7 е показана зависимостта на електро-оптичния ефект от честотата на приложеното електрично поле при интензитет на полето от линейната част на зависимостта, показана на фиг. 6. Резултатите показват, че дисперсионните зависимости на частици, покрити с най-външен слой от хитозан или пектин, се различават по вида си. Освен това критичната честота на релаксация на ефекта (дефинира се като честотата, при която ефектът при 1 kHz намалява наполовина) на двете криви също се различават. За частици с последен слой от хитозан тя е около 3 kHz, а за външен слой от пектин – ~5 kHz. Различното електро-оптично поведение на частиците след адсорбцията на двата слоя потвърждава предположението, че електричните свойства на последния адсорбиран слой от полимер дефинира свойствата на целия филм [2].

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Чрез последователна електростатична адсорбция на противоположно заредени полизахариди (пектин и хитозан) е формиран стабилен бислоен филм върху наночастици от неразтворимото във вода лекарство индометацин. Регистрираната с микроелектрофореза осцилация в знака на електрофоретичната подвижност е доказателство за свърхокомпенсацията на заряда на повърхността след формирането на всеки адсорбиран слой и рестабилизиране на супензията. От промяната на ротационния дифузионен коефициент на частиците след всяка адсорбционна стъпка е направена приблизителна оценка за дебелината на филма. Различното електро-оптично поведение на частиците след адсорбцията на двата полизахарида потвърждава предположението, че електричните свойства на последния адсорбиран слой от полимер определя свойствата на целия филм.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Milkova, V., Kamburova, K., Radeva, Ts. *Colloids and Surfaces. B*, 2013, **108**, 279.
- [2] Decher, G., Hong, J.D., *Macromol. Chem., Macromol. Symp.*, 1991, **46**, 321.
- [3] Милкова, В. Дисертация за образователна и научна степен доктор, София, 2005.
- [4] Sukhorukov, G. Donath, E., Lichtenfeld, H., Knippel, E., Knippel, M., Budde, A., Möhwald, H. *Colloids Surf. A.*, 1998, **137**, 253.
- [5] Stoylov, S. P. *Colloid Electro-Optics*. London, 1991.
- [6] Benoit, H. *Ann. Phys.* 1951, **6**, 561.
- [7] O'Konski, C. T., Yoshioka, K., Orttung, W. H. *J. Phys. Chem.*, 1959, **63**, 1558.
- [8] Radeva, Ts., Milkova, V., Petkanchin, I. *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **244**, 24.
- [9] Kamburova, K., Milkova, V., Petkanchin, I., Radeva, Ts. *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 1242.

- [10] Perrin, F. *J. Phys. Radium*, 1934, **5**, 497.
[11] Milkova, V., Radeva, Ts. *J. Colloid Interface Sci.*, 2007, **308**, 300.

Дата на постъпване: 14.01.2014 г.

Рецензент: гл. ас. д-р Елица Павлова