

Primjena ciklodekstrina u fizičkoj stabilizaciji emulzija za primjenu na kožu

Buzina, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:141833>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivana Buzina

**Primjena ciklodekstrina u fizičkoj stabilizaciji
emulzija za primjenu na kožu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Oblikovanje lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marija Juga.

Zahvaljujem mentoru, prof. dr. sc. Mariju Jugu na strpljenju, prenesenom znanju, uloženom trudu i savjetima koji su pridonijeli izradi ovog diplomskog rada. Srdačno zahvaljujem na savjetima i uloženom vremenu pri izvođenju praktičnog dijela ovog rada asistentici Sabini Keser. Neizmjerne hvala mojim roditeljima i braći na svemu što su mi omogućili i na stalnoj podršci u svim aspektima života. Hvala mojim prijateljima, onima koje poznajem godinama, ali i kolegama s fakulteta koji su uvijek bili tu za mene i uljepšali period studiranja.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Emulzije	2
1.1.1. Definicija i priprema	2
1.1.2. Fizička stabilnost emulzija	3
1.1.3. Metode fizičke stabilizacije emulzija	4
1.2. Emulgatori	5
1.2.1. Podjela i tipovi emulgatora	5
1.2.2. Stabiliziranje emulzija primjenom čvrstih čestica	6
1.2.3. Stabiliziranje emulzija primjenom CD	7
1.3. Topikalna primjena emulzija stabiliziranih čvrstim česticama	10
1.3.1. Strukturna barijera kože	10
1.3.2. Učinkovitost i prednosti topikalne primjene emulzija stabiliziranih bez primjene tenzida	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. MATERIJALI	18
3.2. METODE	18
3.2.1. Izrada emulzija stabiliziranih primjenom CD	18
3.2.2. Priprava emulzija s CD koje su ugušćene hipromelozom	18
3.2.3. Mikroskopsko određivanje veličine kapljica ulja emulzija	19
3.2.4. Mjerenje pH vrijednosti	19
3.2.5. Određivanje zeta potencijala uzoraka	19
3.2.6. Reološka karakterizacija uzoraka	19
3.2.6.1. Određivanje krivulje viskoznosti	20
3.2.6.2. Test promjene amplitude	20
3.2.7. Određivanje raspodjele vlage na površini kože	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Razvoj i karakterizacija preliminarnih emulzija stabiliziranih primjenom CD	23
4.2. Razvoj CD stabiliziranih emulzija ugušćenih hipromelozom	33
4.2.1. Usporedba veličina kapljica unutarnje faze emulzija ugušćenih hipromelozom ...	33
4.3. Reološka karakterizacija emulzija ugušćenih hipromelozom	39
4.3.1. Određivanje krivulje viskoznosti	39
4.3.2. Test promjene amplitude	41
4.4. Učinak razvijenih emulzija na raspodjelu vlage na površini kože	43
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	46

7. SAŽETAK/SUMMARY	51
8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card	

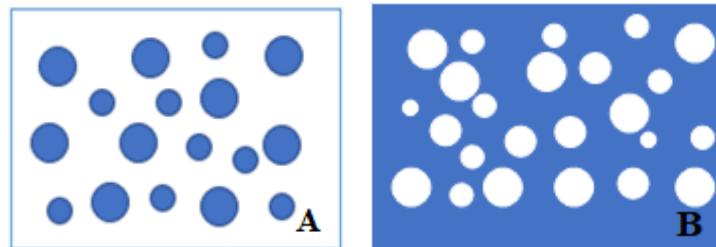
1. UVOD

1.1. Emulzije

1.1.1. Definicija i priprema

Razvojem farmaceutske tehnologije, a temeljem potrebe za unapređenjem učinkovitosti topikalne primjene lijekova, proučavaju se različite tehnologije izrade i fizičke stabilizacije različitih tipova emulzija. Danas emulzije svoju primjenu nalaze u raznim grana industrije, od farmaceutske industrije i kozmetologije do industrije hrane (Yang i sur., 2017).

Emulzija je disperzni sustav dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, a sastoje se od disperzne ili unutarnje faze koja je u obliku kapljica raspršena u kontinuiranoj, vanjskoj fazi. Govoreći o tekućinama koje se međusobno ne miješaju, pojednostavljeno se koriste termini uljne i vodene faze. Promjer kapljica disperzne faze emulzije varira ovisno o vrsti farmaceutskog pripravka i tehnologiji pripreme te se raspon kreće od 100 nm do 25 μm . Osim uljne i vodene faze, za pripremu stabilne emulzije potrebni su emulgatori. Izbor faza i emulgatora ograničen je toksičnošću i iritabilnim potencijalom sastavnica emulzija (Aulton i Taylor, 2013), a tip nastale emulzije ovisi o topljivosti emulgatora u pojedinoj fazi emulzije. Faza u kojoj je emulgator više topljiv, smatra se kontinuiranom ili vanjskom fazom (Slika 1). Emulzije se prema tome klasificiraju kao U/V ili V/U emulzije, ovisno o tome što čini kontinuiranu fazu (Lu i Gao, 2010).



Slika 1. V/U tip emulzije (lijevo) i U/V tip emulzije (desno)

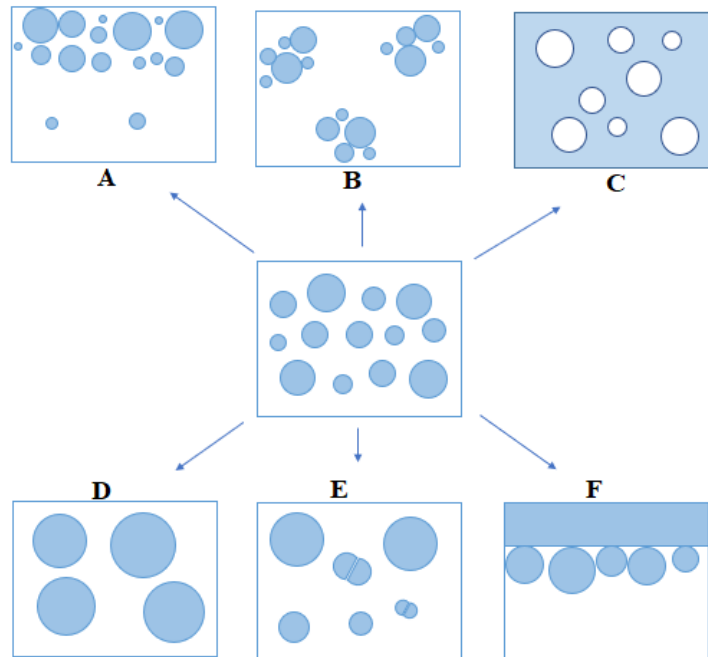
Odabir sastavnica za izradu emulzije utječe na distribuciju veličine dispergiranih kapljica, fizičku stabilnost i reološka svojstva emulzije. Uljna faza emulzije može poslužiti kao nosač liposolubilnog lijeka ili sama po sebi imati povoljan učinak na kožu, djelujući emolijentno. Također, odabir uljne faze ovisi o željenim karakteristikama konačnog pripravka, lipofilnosti, topljivosti lijeka i željenoj konzistenciji pripravka. Prema potrebi, u emulziju je moguće dodati konzervanse, antioksidanse i humektanse s ciljem poboljšanja kemijske i mikrobiološke stabilnosti emulzije te povoljnijeg učinka na kožu (Aulton i Taylor, 2013).

1.1.2. Fizička stabilnost emulzija

Proces emulgiranja rezultat je dva međusobno kompetitivna procesa, jednog u kojem dovođenje energije sustavu rezultira formiranjem kapljica disperzne faze, i drugog koji uključuje koalescenciju nastalih kapljica s ciljem redukcije slobodne energije sustava na minimum. Emulzije su termodinamički nestabilni sustavi, a disperziju sustava se nastoji očuvati primjermom emulgirajućih tvari i povećanjem viskoznosti emulzije (Aulton i Taylor, 2013).

Kinetički stabilnu emulziju karakteriziraju ravnomjerno dispergirane kapljice unutarnje faze emulzije unutar kontinuirane faze, koje zadržavaju svoje početne karakteristike. Također, ne smiju mijenjati izgled, miris i konzistenciju, te je nužno odsustvo mikrobiološke kontaminacije. Nestabilnosti emulzija uključuju kemijsku i fizičku nestabilnost. Za sastavnice emulzija, poželjna je kemijska inertnost u uvjetima emulgiranja. Najveća se pažnja pridodaje izboru uljne faze emulzija zbog moguće oksidativne razgradnje i mikrobiološke kontaminacije što dovodi do promjena u mirisu i okusu emulzije. Bitan je odabir prikladnog emulgatora jer pri različitim uvjetima procesa proizvodnje i skladištenja gotovog pripravka, može doći do depolimerizacije emulgatora, interakcija emulgatora i ostalih sastavnica što rezultira gubitkom odgovarajuće konzistencije pripravka (Aulton i Taylor, 2013).

Fizička nestabilnost emulzija očituje se kroz četiri različita procesa: vrhnjenje, flokulacija, koalescencija i Ostwaldovo zrenje (Slika 2). Vrhjenje i flokulacija ne predstavljaju značajniji problem stabilnosti emulzija jer se lako rješavaju blagim mućkanjem ili dodatkom prikladnijeg emulgatora, no nepoželjni su procesi jer posljedično vode koalescenciji zbog približavanja kapljica emulzija. S druge strane, koalescencija i Ostwaldovo zrenje su kritični procesi jer posljedično uzrokuju razdvajanje faza emulzije. Koalescencija je ireverzibilni proces u kojem se dispergirane kapljice međusobno udružuju u veće, a proces se nastavlja do potpunog odvajanja faza. Kapljice ulja se međusobno približavaju i postaju iskrivljene, što rezultira rupturom filma i udruživanjem kapljica emulzije. Ostwaldovo zrenje je ireverzibilan proces koji uključuje rast većih kapljica emulzije na račun manjih. Problem se javlja kod kapljica emulzija veličina manjih od 600 nm, jer su takve kapljice veće topljivosti i lakše difundiraju kroz kontinuiranu fazu te se odlažu na većim kapljica koje tada rastu rezultirajući povećanjem kapljica (Aulton i Taylor, 2013).



Slika 2. Prikaz različitih procesa fizičke nestabilnosti emulzija: A) vrhnjenje B) flokulacija C) inverzija faza D) Ostwaldovo zrenje E) koalescencija F) odvajanje faza

1.1.3. Metode fizičke stabilizacije emulzija

S obzirom da su emulzije termodinamički nestabilni sustavi, velika je mogućnost razdvajanja faza uslijed flokulacije, koalescencije i Ostwaldovog zrenja. Za povećanje stabilnosti emulzije koriste se različiti tipovi emulgatora i tvari za povećanje viskoznosti emulzija. Osim pravih emulgatora koji će biti obrađeni u odjeljku 1.2.1., emulzije možemo stabilizirati dodatkom različitih polimera. Na primjer, koriste se hidrokoloidi, polimeri dugih lanaca djelomično ili potpuno topljivi u vodi. U širokoj su uporabi kao emulgatori, stabilizatori i gelirajuće tvari. Zahvaljujući sposobnosti vezanja vode hidrokoloidi modificiraju reološka svojstva, a povećanjem viskoznosti povećavaju stabilnost emulzija, djelujući nepovoljno na proces koalescencije (Karp i sur., 2019).

Kako bi očuvali fizičku stabilnost U/V emulzija tijekom skladištenja i spriječili vrhnjenje, u emulziju se dodaju maltodekstrini, ksantanska guma i karagenan. Maltodekstrini djelovanje temelje na modifikaciji viskoznosti kontinuirane faze ili geliranju vodene faze koja okružuje kapljice emulzije. S druge strane, odgovarajući tip emulgatora može utjecati na kemijsku i fizičku stabilnost U/V emulzija. Tu se izdvajaju ciklodekstrini (CD) zbog tvorbe inkluzijskog kompleksa s komponentama uljne faze što povećava kemijsku stabilnost, a adsorpcijom nastalog kompleksa na površinu kapljica emulzije dovode do fizičke stabilizacije sustava (Kibici i Kahveci, 2019).

Ostwaldovo zrenje se može izbjeći uvođenjem druge uljne komponente koja je netopljiva u kontinuiranoj fazi, kao što je skavalan. Drugi način uključuje modifikaciju filma na granici faza, tj. smanjenje površinske napetosti koja će rezultirati smanjenjem Ostwaldovog zrenja. To se postiže adsorpcijom kopolimernih surfaktanata na granicu faza koji se prilikom sazrijevanja neće desorbirati (Tadros, 2008). U tu se svrhu često primjenjuje Poloksamer F68®, surfaktant koji sprječava stvaranje micela u kontinuiranoj fazi (Aulton i Taylor, 2013).

1.2. Emulgatori

1.2.1. Podjela i tipovi emulgatora

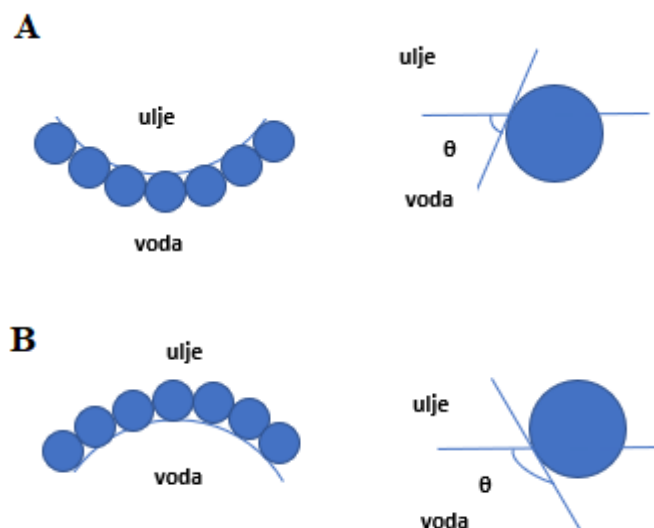
Emulgatori se primjenjuju s ciljem olakšanja izrade emulzije i očuvanja jednolike disperzije kapljica emulzije tijekom određenog vremenskog perioda. S obzirom na podrijetlo, razlikujemo sintetske ili polusintetske površinski aktivne tvari i polimere te prirodne emulgirajuće materijale i njihove derivate. Površinski aktivne tvari ili tenzidi nakupljanjem na graničnoj međupovršini ulje/voda snižavaju napetost površine i stvaraju homogeni film oko kapljica dispergirane faze. Tvorbom elektrostatičke barijere na površini kapljica emulzije, stabiliziraju emulziju te inhibiraju procese koalescencije i Ostwaldovog zrenja (Aulton i Taylor, 2013). Površinski aktivne tvari su amfipatske molekule i tvore micelle u polarnom otapalu ukoliko su prisutni u koncentracijama većim od kritične micelarne koncentracije, CMC. Iznad te koncentracije, daljnjim dodavanjem emulgatora više se ne mijenja napetost površine, već dolazi do samoorganizacije površinski aktivnih tvari u vodenoj fazi pripravka te nastaju micelle (Ng i Roberts, 2018).

Za razliku od tenzida, polimeri stvaraju multimolekularni film na granici faza te ne utječu na smanjenje površinske napetosti, već stabiliziraju emulziju stvaranjem mehaničke barijere i povećanjem viskoznosti kontinuirane faze (Senjković, 1994).

U klasifikaciji neionogenih emulgatora koristi se HLB vrijednost (eng. *Hydrophilic-lipophilic balance*) koja predstavlja omjer lipofilnih i hidrofilnih skupina u molekuli emulgatora. Poznavanje HLB vrijednosti je od praktične važnosti jer omogućuje odabir emulgatora za određenu lipofilnu fazu pripravka te dobivanje optimalne disperznosti i stabilnosti. Emulgatori s HLB vrijednosti 3 – 6 primarno formiraju V/U emulzije, a s HLB vrijednošću 8 – 16 formiraju U/V emulzije (Ng i Roberts, 2018).

1.2.2. Stabiliziranje emulzija primjenom čvrstih čestica

Činjenica da čvrste čestice mogu stabilizirati emulzije poznata je još od početka prošlog stoljeća zahvaljujući Pickeringu (1907), koji je primijetio stabilizaciju U/V tipa emulzije česticama bolje kvašenim vodenom fazom emulzije (Aveyard i sur., 2003). Slično tenzidima, čvrste čestice se adsorbiraju na granici faza ulje/voda, ali uglavnom nisu amfipatske molekule. Nastali tip emulzije ovisi o sposobnosti tekućina da održe kontakt s površinom čvrste čestice i opisuje se kutom močenja (θ). To je kut na granici faza između čvrste čestice, disperzne i kontinuirane faze. U/V tip emulzije nastat će ako je čvrsta čestica bolje kvašena vodom s pripadajućim $\theta < 90^\circ$ (npr. silicijev dioksid, glina), dok će V/U tip emulzije nastati ako je $\theta > 90^\circ$ i kvašenje bolje uljnom fazom emulzije (Slika 3). Najčešće korištene čestice u stabilizaciji emulzija su hidroksiapatit, koloidni silicijev dioksid, glina, kitozan, ciklodekstrini i škrob (Yang i sur., 2017).



Slika 3. Prikaz nastalog tipa emulzije ovisno o kutu močenja (θ): A) U/V tip emulzije B) V/U tip emulzije

Emulzije stabilizirane čvrstim česticama (eng. Pickering emulsion) ekološki su prihvatljivije, biokompatibilne i veće stabilnosti prema koalescenciji za razliku od emulzija stabiliziranih tenzidima. Stabilnost emulzija ovisi o koncentraciji, veličini i obliku čestica, udjelu vodene i uljne faze te ionskoj jakosti medija i zeta potencijalu (Tang i sur., 2015). Pri tome veličina čvrstih čestica trebala biti manja od ciljnih veličina kapljica emulzije (Martó i sur., 2016).

Različiti tipovi anorganskih čestica se koriste i prepoznati su kao uspješni stabilizatori emulzija za topikalnu primjenu. Visokodisperzni silicijev dioksid se koristi kao pomoćna tvar

u farmaceutskim oblicima lijekova. Titanov dioksid (TiO_2) se koristi u preparatima za zaštitu od sunca više od 25 godina. Dobro se podnosi i kod ljudi s povećanim rizikom kožnih iritacija, a osigurava postizanje visokog faktora zaštite od sunca (SPF). U takvim proizvodima, TiO_2 ima dvostruku ulogu jer stabilizira emulziju te osigurava zaštitu od sunca.

Zbog povećane potražnje za prirodnim proizvodima, za stabilizaciju emulzija sve se češće koriste čvrste čestice biljnog podrijetla i njihovi derivati (Zhu, 2019). Organske čestice kao što su škrob, zein i CD odgovaraju zahtjevima tržišta i koriste se u razvoju emulzija stabiliziranih čvrstim česticama. Škrob je biokompatibilan, biorazgradiv i jeftin, ne izaziva iritacije i toksičnost, a osigurava dobru stabilnost i konzistenciju emulzija (Marto i sur., 2016). Ubraja se u GRAS skupinu tvari (eng. *generally recognized as safe*) te je kao ekscipijens u dugogodišnjoj uporabi u farmaceutskoj tehnologiji. Kombinacija škroba s nanokristalima celuloze dodatno poboljšava stabilnost emulzija (Zhu, 2019).

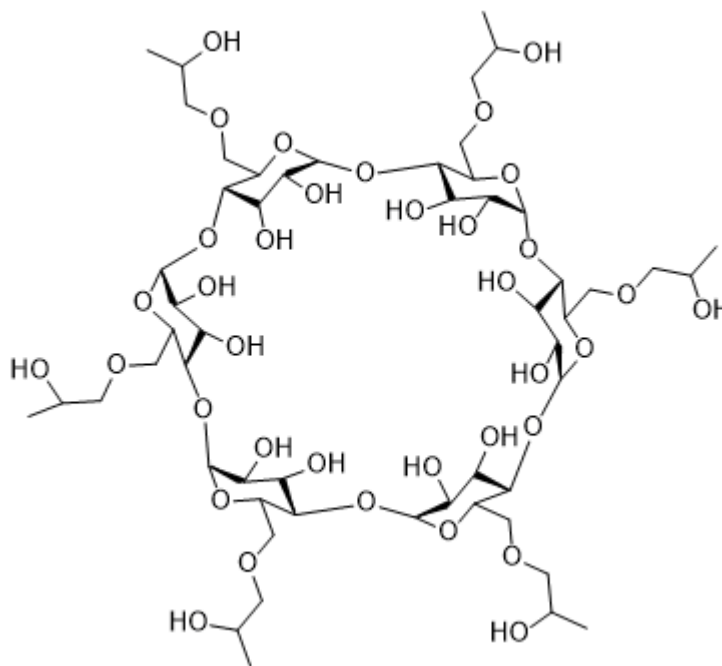
Emulzije stabilizirane čvrstim česticama često se primjenjuju u kozmetici i proizvodima za osobnu njegu, uključujući proizvode za hidrataciju kože, losione za sunčanje, anti-age proizvode, dezodoranse i proizvode za njegu kose. Ovakvim tehnološkim oblicima povećana je stabilnost i produljen rok trajanja, a omogućeno je brzo i kontrolirano oslobađanje djelatnih tvari (Tang i sur., 2015).

1.2.3. Fizička stabilizacija emulzija primjenom CD

Iako se površinski aktivne tvari i polimeri rutinski primjenjuju za fizičku stabilizaciju emulzija, unazad nekoliko godina provode se istraživanja o mogućnostima zamjene ovih emulgatora CD. Predstavljaju dobru alternativu s potencijalom primjene u industriji hrane, farmaceutskoj industriji te u njezini kože (Mathapa i Paunov, 2013).

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi dobiveni enzimskom razgradnjom škroba, a sastoje se od 6, 7 ili 8 glukopiranoznih jedinica po molekuli (α -, β - i γ -CD) povezanih α -1,4 vezama. Strukture su šupljeg krnjeg stošca i amfipatskog karaktera, - OH skupine šećernih jedinica osiguravaju hidrofилnost vanjske površine i dobru topljivost u vodi, a lipofilna unutrašnjost potencijal ciklodekstrina kao nosača lijekova (Marto i sur., 2016). Prirodni ciklodekstrini su ograničene topljivosti, zbog čega su razvijeni derivati poput metil-, hidroksipropil- ili sulfobutil- β -ciklodekstrina, koji su dobro topljivi u vodi te se koriste za otapanje slabo topljivih sastavnica, na primjer lipida (Szente i Fenyvesi, 2017). Među najčešće korištenim derivatima je 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin dobiven reakcijom s propilen oksidom, a povećanje topljivosti je posljedica nastanka velikog broja izomera i

slabljenja intramolekularnih vodikovih veza (Slika 4). Hidrofilni derivati ciklodekstrina slabo prolaze kroz lipofilne biološke membrane poput gastrointestinalnog trakta i kože, stoga imaju nisku oralnu i dermalnu bioraspoloživost te ne uzrokuju lokalne reakcije preosjetljivosti ili iritacije (Loftsson i Duchêne, 2007).



Slika 4. Struktura 2-hidroksipropil- β -CD, HP- β -CD
(preuzeto s <https://www.medkoo.com/products/10978>)

Jedinstvena molekularna struktura ciklodekstrina omogućuje stvaranje inkluzijskih kompleksa s hidrofobnim molekulama (Davarpanah i Vahabzadeh, 2012). Stvaranje inkluzijskog kompleksa moguće je s cijelom molekulom ili dijelom molekule, ovisno o veličini centralne šupljine korištenog ciklodekstrina i steričkoj kompatibilnosti molekule aktivne tvari (Davis i Brewster, 2004). Nastajanjem inkluzijskog kompleksa ne dolazi do kidanja niti stvaranja kovalentnih veza, a njegovo nastajanje rezultira poboljšanjem topljivosti, stabilnosti i bioraspoloživosti uklopljenih molekula (Hu i sur., 2018).

Ciklodekstrini pokazuju vrlo veliki afinitet interakciji s lipidima kao što su masne kiseline, trigliceridi, fosfolipidi te kolesterol. U vodenoj je otopini topljivost kolesterola iznimno niska, dok interakcijom s ciklodekstrinom dolazi do značajnog povećanja topljivosti. Povećanje topljivosti ovisi o strukturi ciklodekstrina, uključujući veličinu centralne šupljine i stupanj supstitucije hidroksilnih grupa, koncentraciji ciklodekstrina i temperaturi. Tako će β -CD i njegovi derivati pokazivati veći afinitet stvaranja inkluzijskog kompleksa s kolesterolom, dok

će α -CD pokazati veći afinitet prema interakciji s masnim kiselinama. Pozitivan učinak CD je prikazan i na primjeru kompleksacije između polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i ciklodekstrina. Osim povećane stabilnosti pripravaka u uvjetima skladištenja, poboljšano je otapanje i bioraspoloživost što je rezultiralo povećanjem koncentracije PUFA na ciljnom mjestu (Szente i Fenyvesi, 2017).

Također, CD mogu stabilizirati emulzije koje sadrže masne kiseline ili trigliceride kao komponentu uljne faze. Tako stabilizirane jednostavne ili složene emulzije mogu se primjenjivati kao ljekoviti oblici (Szente i Fenyvesi, 2017). Dva su moguća mehanizma temeljem kojih CD stabiliziraju emulzije, a ovise o njihovoj koncentraciji u sustavu. Pri niskim koncentracijama CD, interakcijom CD i lipida nastaju kompleksi amfipatske strukture. Pritom, CD čini hidrofilni dio kompleksa koji se orijentira prema vodenoj fazi emulzije, a ostatak lipida čini hidrofobni rep i orijentiran je prema uljnoj fazi emulzije (Inoue i sur., 2009). Primjer ovakvog načina stabilizacije sustava je uporaba CAVAMAX® W6 α -CD za stabilizaciju emulzije sastavljene od vode i triglicerida. Nastajanje kompleksa između α -CD i triglicerida te orijentacija hidrofilne površine CD i lipofilnog ostatka triglicerida na granici faza ulje/voda nužna je za stabilizaciju nastale U/V emulzije (www.wacker.com). Također, proučavana je učinkovitost stabilizacije emulzije sastavljene od n-alkana i vode, u ovisnosti tipu korištenog CD, α -, β - ili γ -CD. Ustanovljeno je da α -CD lošije stabiliziraju emulzije n-alkana, dok je mjerenjem kuta močenja zaključeno kako β -CD stvaraju najstabilnije emulzije. Drugi je mehanizam stabilizacije emulzije uočen pri visokim koncentracijama CD u sustavu. Pri tome nastaju netopljivi kompleksi CD i lipida te se u obliku sitnih čestica talože na granici faza i stvaraju Pickering emulzije (Inoue i sur., 2009). Prvi korak je molekularna adsorpcija CD na granici faza, a potom stvaranje mikrokristala koji osiguravaju stabilnost emulzije (Wu i sur., 2016). Morfologija i veličina kapljica emulzije ovisit će o koncentraciji CD i vrsti uljne faze (Yang i sur., 2017), a tip nastale emulzije ovisi o kontaktnom kutu kojeg kompleks čini na granici faza. Za U/V tip emulzije iznosi $\theta < 90^\circ$ (Inoue i sur., 2008). Pripremljene su emulzije vode i n-tetradekana stabilizirane α -CD i β -CD. Uspješnost nastalih kompleksa u stabilizaciji emulzije zavisi o njihovoj morfologiji i veličini. Čestice kompleksa nalik štapićima osiguravaju bolju stabilnost od onih sferičnog oblika, a čestice kompleksa nastalih s α -CD su veće u odnosu na mikrokristala kompleksa β -CD i tetradekana. Nakon analize optičkim mikroskopom uočen je bogat sloj mikročestica oko kapljica uljne faze koji štiti od koalescencije i stabilizira emulziju, a uočeni su i u vodenoj fazi emulzije. Proučavajući veličinu nastalih mikrokristala i njihovu organizaciju na površini kapljica emulzije, zaključeno je kako β -CD i nastali kompleksi osiguravaju bolju stabilnost emulzije uslijed

bolje prilagodbe zaobljenoj površini kapljica i stvaranju gušćeg filma na granici faza (Mathapa i Paunov, 2013). Slični rezultati dobiveni su korištenjem α -CD i trigliceridi srednje duljine lanaca (eng. MCT). Nakon pripreme i analize emulzije, utvrđeno je da dolazi do spontanog stvaranja kompleksa, α -CD/MCT mikrokristala na granici faza i stabilizacije emulzije. Također, uočena je razlika u stabilnosti emulzija s različitom volumnom frakcijom ulja. Stabilnost emulzije opada sa smanjenjem udjela uljne faze, dok će nastajanje mikrokristala α -CD/MCT biti povećano u donjem sloju uzorka (Li i sur., 2014). Pickering emulzija nastala je i stabilizacijom emulzije n-alkanola i vode s α -CD. Nastajanje netopljivog kompleksa i stvaranje gustog filma na granici faza emulzije preduvjet su za stabilnost i ravnomjernu disperziju sustava (Hashizaki i sur., 2007).

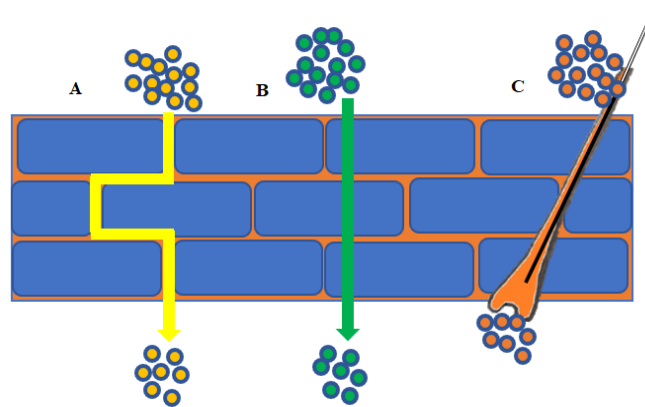
Slično emulzijama stabiliziranim tenzidima, kapljice disperzne faze emulzija stabiliziranih čvrstim česticama bit će sferičnog oblika što je rezultat smanjenja slobodne energije sustava. Nedavne studije pokazale su kako i kapljice emulzije nesferičnog oblika mogu biti ljekoviti oblici odgovarajuće stabilnosti i djelotvornosti. Na oblik kapljica utjecat će sadržaj ulja i ciklodekstrina. Smanjenjem udjela ulja ili povećanjem udjela CD stvara se više nesferičnih kapljica (Wu i sur., 2016).

1.3. Topikalna primjena emulzija stabiliziranih čvrstim česticama

1.3.1. Strukturna barijera kože

Primjena lijekova na kožu predstavlja izazov za izradu učinkovitog farmaceutskog oblika zbog ograničene penetracije kroz rožnati sloj i permeacije u dublja tkiva. Koža je najveći organ ljudskog tijela i štiti organizam od vanjskih štetnih čimbenika. Osim imunološke uloge, sprječava prekomjerni gubitak vode i apsorpciju kemikalija, pomaže u regulaciji tjelesne temperature i mjesto je sinteze vitamina D (Wickett i Visscher, 2006). Podijeljena je u dva dijela, epidermis i dermis. Epidermis čini pet slojeva, a najvažniji je rožnati sloj, stratum corneum, koji predstavlja fizičku barijeru kože (Baroni i sur., 2012). Sastoji se od 18 do 20 slojeva spljoštenih, keratiniziranih epidermalnih stanica odvojenih međustaničnim lipidima. Lipidni matriks ispunjava prostor između korneocita i sastoji se od smjese 13 vrsta ceramida te kolesterola i slobodnih masnih kiselina. Uloga lipidnog matriksa je regulacija propusnosti epidermalne barijere. Premda je funkcionalna barijera rožnatog sloja važna za zdravlje kože, ograničavajući je faktor transdermalnoj primjeni lijeka (Menon i sur., 2012).

Topikalno primijenjen lijek može polučiti lokalno, regionalno i sistemsko djelovanje. Ključni koraci u prijenosu aktivne tvari iz dermalnog pripravka u različite slojeve kože su oslobađanje aktivne tvari iz podloge, penetracija kroz rožnati sloj, permeacija u dermis i sistemska apsorpcija (Daniels i Knie, 2007). Prijenos aktivne tvari kroz rožnati sloj moguć je intracelularnim, intercelularnim i folikularnim putem (Slika 5). Međutim, prijenos kroz međustanične lipide, intercelularno, predstavlja glavni put dermalne penetracije i permeacije lijeka. Iako folikularni put prijenosa nije značajan, može biti koristan u postizanju usporene permeacije lijekova, naročito velikih molekularnih masa, npr. nanočestica (Lane, 2013).



Slika 5. Putevi prijenosa tvari kroz rožnati sloj kože: A) intercelularno B) intracelularno C) folikularno

Mehanizam prijenosa aktivnih tvari kroz rožnati sloj kože odvija se pasivnom difuzijom koju opisuje Fickov zakon difuzije, $J = (P \times D \times \Delta c) / h$. Prijenos aktivne tvari kroz kožu moguće je poboljšati povećanjem koeficijenta raspodjele (J), koeficijenta difuzije (D) ili udjela aktivne tvari u podlozi (Δc), dok h u jednadžbi označava debljinu rožnatog sloja u centimetrima (Martó i sur., 2016). Najjednostavniji način povećanja prijenosa tvari kroz barijeru kože je povećanje udjela vode u rožnatom sloju. Zadržavanje vode u površinskom sloju olabavi kompaktnu strukturu barijere i povećava njezinu permeabilnost. Učinak je postignut oslobađanjem vode iz podloge ili se okluzivnim učinkom pripravka koji blokira transepidermalni gubitak vode (Daniels i Knie, 2007). Dodavanje higroskopskih tvari poput glicerola može smanjiti sadržaj vode u koži, rezultirajući smanjenjem penetracije i kontroliranom dostavom lijeka (Otto i sur., 2009). Drugi način je primjena pojačivača prijenosa. Idealni kemijski pojačivači prijenosa ne izazivaju iritacije, alergije ili toksičnost, djeluju brzo i reverzibilno, bez farmakološkog učinka na kožu. To su tvari koje se prenose u rožnati sloj kože i mijenjaju barijerne značajke, a njihov učinak značajno ovisi o podlozi pripravka (Panthan i Setty, 2009). Interakcija između podloge, kože i aktivne tvari utječe na

formulaciju pripravka i oslobađanje aktivne tvari (Slika 6), što u konačnici utječe na učinkovitost, podnošljivost i primjenu pripravaka (Daniels i Knie, 2007).



Slika 6. Interakcija aktivne tvari, podloge i kože te utjecaj na prijenos aktivne tvari kroz kožu

1.3.2. Učinkovitost i prednosti topikalne primjene emulzija stabiliziranih bez primjene tenzida

Topikalni pripravci lijekova koriste se za lokalnu terapiju kožnih oboljenja, no mogu biti iskorišteni i u sistemske terapiji. Lokalnom se primjenom zaobilazi metabolizam prvog prolaska kroz jetru, smanjuju se sistemske nuspojave lijekova i povećava se adherencija pacijenata provođenju propisane terapije (Marku i sur., 2012). Emulzije su najčešće korišteni tehnološki oblici za dermalnu i transdermalnu primjenu lijekova, a mogu biti u obliku krema, losiona, pjena ili gelova. Za razliku od ostalih farmaceutskih oblika za topikalnu primjenu, emulzije su fizički, kemijski i biološki kompatibilnije s površinom kože (Lu i Gao, 2010), te posjeduju dobar kapacitet uklapanja hidrofilnih i lipofilnih lijekova (Otto i sur., 2009). Iako nije klinički značajno, veličina kapljica unutarnje faze emulzije može utjecati na penetraciju lijeka u kožu. Stoga je odabir prikladnog emulgatora i načina stabilizacije ključan korak u razvoju emulzije za topikalnu primjenu. Osim izbora odgovarajućeg tipa i koncentracije emulgatora te optimiranja procesa proizvodnje, na fizičku stabilnost konačnog pripravka može se utjecati povećanjem viskoznosti. Najčešće se koriste polimerni ekscipijensi poput ksantanske gume, hidroksietilceluloze i hidroksipropilmetilceluloze koja može imati ulogu emulgatora i stabilizatora u U/V emulzijama (Lu i Gao, 2010).

Za stabilizaciju emulzija najčešće se koriste sintetski surfaktanti, no dozvoljeni su u minimalnoj koncentraciji zbog remećenja fizičke barijere kože i izazivanja iritacija (Marto i sur., 2016). Primjena surfaktanata može potaknuti upalne procese u koži interakcijom surfaktanta i keratinocita, što dovodi do otpuštanja citokina i deplecije lipidnog matriksa što rezultira dehidracijom rožnatog sloja kože. Njihov utjecaj na permeaciju aktivne tvari ovisi o tipu i koncentraciji surfaktanta. Na primjer, permeacija diazepamom kroz kožu štakora

poboljšana je uz ionske surfaktante, dok dodatak neionogenih surfaktanata u vodenu otopinu smanjuje permeaciju benzokaina u kožu. Osim što remete normalnu barijeru kože, mogu stupati u interakcije s aktivnim tvarima i uklapanjem u micelle smanjiti termodinamičku aktivnost u podlozi, što nepovoljno utječe na transport lijeka u/kroz kožu (Otto i sur., 2009).

Zamjena tradicionalnih emulgatora s čvrstim česticama intenzivno se istražuje kao nova tehnologija za razvoj emulzija za topikalnu primjenu na kožu. Nastale Pickering emulzije su stabilnije, pokazujući manju sklonost flokulaciji, koalescenciji i Ostwaldovom zrenju. Također, prihvatljivije su za okoliš i manje štetne za ljudsko tijelo, što ih čini podnošljivim i učinkovitim lijekovima oblicima. Biokompatibilnost organskih čvrstih čestica i mogućnost kontroliranog oslobađanja lijekova predstavlja potencijal za razvoj novih topikalnih pripravaka (Martó i sur., 2016).

CD osim što fizički stabiliziraju emulziju, pridonose terapijskoj učinkovitosti uklopljenog lijeka, kao što je pokazano na primjeru emulzija s ekonazol nitratom koje su bile stabilizirane primjenom CD. Primjenom prirodnih CD (α -, β -, γ -CD) priređene su stabilne U/V emulzija koje su sadržavale ekonazol nitrat otopljen u uljnoj fazi. Rezultati antimikrobnih testova pokazuju da su emulzije stabilizirane primjenom CD učinkovitije u inhibiciji rasta vrsta *Candida albicans* i *Staphylococcus aureus* u odnosu na komercijalno dostupne polučvrste formulacije, koje su razvijene primjenom sintetskih surfaktanata. Pripravci stabilizirani CD polagano oslobađaju ekonazol nitrat koji slobodno difundira u testni medij i djeluje biocidno. Ovo istraživanje ukazuje na veliki potencijal primjene emulzija stabiliziranih CD u razvoju topikalnih formulacija s azolnim antifungalnim (Leclercq i Nardello-Rataj, 2016). Slični rezultati postignuti primjenom CD u razvoju emulzija s grizeofulvinom, gdje je zbog prirode lijeka potrebno uklopiti vrlo visoke koncentracije surfaktanta u pripravak, što može uzrokovati iritacije primjenom na kožu. Primjenom CD, odnosno stvaranjem inkluzijskog kompleksa β -CD i grizeofulvina postignuto je postepeno otpuštanje i penetracija grizeofulvina u kožu te produženo zadržavanje u rožnatom sloju kože čime se povećava terapijska učinkovitost lijeka (Noomen i sur., 2008). Još jedan primjer u tom smislu je stvaranje inkluzijskog kompleksa eugenola i β -CD, čime mu se povećava topljivost, stabilnost te antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje (Gong i sur., 2016).

Bupivakain je lokalni anestetik koji nakon oralne primjene izaziva kardiovaskularne i neurološke nuspojave. S ciljem smanjenja tih nuspojava, razvijen je topikalni oblik bupivakaina koristeći CD za stabilizaciju emulzija i postizanje postepenog oslobađanja lijeka. Ustanovljeno je kako razvijene formulacije mogu produžiti oslobađanje lijeka i poboljšati permeabilnost u dublja tkiva ovisno o izboru uljne faze (Hu i sur., 2018). Na primjeru

hidrofilnog lijeka, kofeina, pokazano je iznimno brže otpuštanje lijeka iz emulzije stabilizirane česticama silicijevog dioksida u odnosu na emulzije s tenzidima. Povećana apsorpcija iz Pickering emulzija je moguća zbog specifičnih interakcija emulzije i struktura kože. Kapljice vodene faze Pickering emulzije jače se vežu i uzrokuju brže oslobađanje lijeka u rožnati sloj (Frelichowska i sur., 2009).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Emulzije su sve češći tehnološki oblici u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji zbog svoje izvrsne sposobnosti uklapanja lipofilnih i hidrofilnih aktivnih tvari, te pogodnog učinka na kožu. S obzirom na konzistenciju, mogu biti u tekućem obliku kao losioni, ili polučvrsti oblici kao što su kreme. Emulzije su heterogeni sustavi sastavljeni od najmanje dvije tekućine koje se međusobno ne miješaju i pritom jedna tekućina čini kontinuiranu fazu u kojoj je, u obliku kapljica, raspršena disperzna faza (Otto, 2009).

Kako bi se osigurala stabilnost emulzija, dodaju se različiti surfaktanti. Neki surfaktanti, mogu pokazivati štetni učinak na kožu, npr. izazvati iritaciju kože, naročito primjenom u višim koncentracijama te su ekološki nepodesni. Surfaktanti bazirani na makrogolima često se koriste kao emulgatori u topikalnim pripravci i smatraju se relativnom sigurnima za primjenu na kožu. No, u literaturi se nailazi na podatke o reaktivnosti kože na derivate surfaktante bazirane na makrogolu. Može doći do kontaktne urtikarije i alergijskog kontaktnog dermatitisa, osobito kod derivata koji u strukturi sadrže makrogole niske molekularne mase (200-400 Da). Također, opisan je slučaj razvoja kontaktne urtikarije uzrokovane makrogol stearatom, što znači da su alergijske reakcije moguće i na emulgatore za koje se smatra da su relativno sigurni. Osim što su pojedini surfaktanti štetni za okoliš, problematična je njihova djelomična razgradnja, zbog čega se nagomilavaju u okolišu (Leclercq i Rataj, 2016).

Kako bi se izbjegli štetni učinci na kožu, surfaktante se nastoji zamijeniti čvrstim česticama, koje tvore tako zvane Pickering emulzije. U prisutnosti ulja i vode, čestice se adsorbiraju na granicu faza ulje/voda. Osim povoljnijeg učinka na kožu, emulzije stabilizirane čvrstim česticama fizički su stabilnije od emulzija stabiliziranih surfaktantima. Nastali tip emulzije ovisi o sposobnosti tekućina da održe kontakt s površinom čvrste čestice i opisuje se kutom močenja. Najčešće korištene čvrste čestice za stabilizaciju emulzija su silicijev dioksid, glina, kalcij karbonat, titanijev dioksid, lateks i škrob (Aveyard i sur., 2003).

Danas je u fokusu istraživanja primjena CD u svrhu stabilizacije emulzije. Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi dobiveni enzimskom razgradnjom škroba, a sastoje se od 6, 7 ili 8 glukopiranoznih jedinica po molekuli (α -, β - i γ -CD) povezanih α -1,4 vezama. Strukture su šupljeg krnjeg stošca i amfipatskog karaktera, -OH skupine šećernih jedinica osiguravaju hidrofilnost vanjske površine i dobru topljivost u vodi, a lipofilna unutrašnjost potencijal CD kao nosača lijekova (Marto i sur., 2016). U prisutnosti različitih vrsta ulja te pri relativno visokim koncentracijama CD, dolazi do stvaranja kompleksa između

sastavnica uljne faze i CD-a (Inoue i sur., 2008). Zbog slabe topljivosti kompleksi CD i lipida se talože u obliku sitnih čestica na granici faza i time stabiliziraju emulzije. Stabilizacija emulzija CD predstavlja dobru alternativu s potencijalom primjene u industriji hrane, farmaceutskoj industriji te u njezini koži, a dodatna prednost im je što su prirodni ciklodekstrini biorazgradivi i biokompatibilni (Mathapa i Paunov, 2013).

S obzirom na navedeno, cilj ovog istraživanja je razviti formulacije topikalnih emulzija stabiliziranih CD. U tu svrhu koristit će se 2 različita derivata, α -CD i HP- β -CD te će se vrednovati njihov potencijal fizičke stabilizacije emulzija koje su načinjene s tekućim parafinom, Miglyolom (smjesom triglicerida srednje duljine lanaca masnih kiselina) i izopropilmiristatom kao lipidnom fazom. Primjenjivat će se različite tehnološke mjere, kao što su homogenizacija visokoturažnom miješalicom i dodatak hipromeloze kao hidrokoloida koji stabilizira emulzije, s ciljem pripreme topikalnih emulzija koje su prikladne za primjenu na kožu. Proučavanjem stabilnosti tijekom tjedan dana čuvanja, odabrat će se dvije emulzije najprikladnije za primjenu na koži ispitanika, pri čemu će se pratiti promjena u sadržaju vlage rožnatog sloja kože.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U izradi emulzija kao vodena faza korištena je pročišćena voda, a kao uljna faza korišten je tekući parafin (Kemig, Hrvatska), izopropilmiristat (Kemig, Hrvatska) i Miglyol (Fagron, Hrvatska). Emulzije su stabilizirane ciklodekstrinima, α -CD (Wacker-Chemie GmbH, Njemačka) i 2-hidroksipropil- β -CD, HP- β -CD (Roquette, Francuska). Kao sredstvo za povećanje viskoznosti emulzija dodana je hipromeloza (Metolose 90SH, Shin-Etsu Chemical Co., Japan).

3.2. METODE

3.2.1. Izrada emulzija stabiliziranih primjenom CD

Pripremljene su emulzije koje su sadržavale 30% uljne i 70% vodene faze. Kao komponente uljne faze korišteni su tekući parafin, smjesa triglicerida srednje dužine kiselinskih lanaca trgovačkog naziva Miglyol te izopropilmiristat. Za fizičku stabilizaciju emulzija korišteni su α -CD u koncentracijama od 0,25%, 0,5%, 1% i 2,5% te HP- β -CD u koncentracijama 15%, 20%, 25% i 30%. Prilikom izrade emulzije, potrebna je količina ciklodekstrina otopljena u 35 mL pročišćene vode. Nakon potpunog otapanja ciklodekstrina dodano je 15 g odabranog ulja, a nastali sustav je miješan na magnetskoj miješalici pri 700 rpm na sobnoj temperaturi tijekom noći. Nakon toga su emulzije homogenizirane primjenom ultrazvučne miješalice IKA magic LAB opremljene s UTC modulom 18G (IKA Works GmbH & Co, Kina). Prvi ciklus homogenizacije je započeo na 1000 okretaja/min, zatim je u prvih 15 s povećano na 12000 okretaja/min, tijekom 1 min. Nakon analiziranja veličine čestica, proveden je drugi ciklus homogenizacije uzorka. Nakon analize uzoraka primarne emulzije su čuvane na 2-8°C, te im je stabilnost praćena tijekom tjedan dana.

3.2.2. Priprava emulzija s CD koje su ugušćene hipromelozom

Za pripremu emulzija ugušćenih dodatkom hipromeloze, 0,5 g polimera je najprije otopljeno u 35 mL pročišćene vode uz miješanje na magnetskoj miješalici pri 700 rpm. Nakon potpunog otapanja polimera, u nastali gel je dodano 7,5 g HP- β -CD ili 0,125 α -CD koji su otopljeni uz miješanjem propelerskom miješalicom IKA Eurostar na 200 rpm. Emulzije s tekućim parafinom i Miglyolom kao uljnom fazom izrađene su kao što je opisano u odjeljku

3.2.1. Nakon analize uzoraka, emulzije su čuvane na 2-8°C, te im je stabilnost praćena tijekom tjedan dana.

3.2.3. Mikroskopsko određivanje veličine kapljica ulja emulzija

Velićina kapljica uljne faze određena je mikroskopskom analizom slike korištenjem Olympus BH-2 mikroskopa spregnutog s digitalnom kamerom (CCD kamera ICD-42-E, Ikegami Tsushinki Co., Japan). Slike dobivene mikroskopskom analizom, obrađene su računalnim programom Optomax V (Cambridge, Velika Britanija). Uzorci su mjereni prije homogenizacije, te nakon prve i druge homogenizacije. Uzorak se nanosi u tankom sloju na predmetno stakalce i promatra na povećanju od 20X, u rasponu veličina od 1 do 50 µm.

3.2.4. Mjerenje pH vrijednosti

Pripremljenim preliminarnim emulzijama i emulzijama ugušćenima hipromelozom određen je pH korištenjem uređaja pH Meter & Sensor (Mettler Toledo, Sjedinjene Države), opremljen elektrodom InLab solids Pro IP67, za polučvrste pripravke. Prije početka mjerenja pH vrijednosti, uređaj je kalibriran. pH uzoraka mjen je nakon druge homogenizacije u duplikatu i bez razrjeđenja uzoraka, pri 25°C.

3.2.5. Određivanje zeta potencijala uzoraka

Zeta potencijal uzoraka određen je temeljem elektroforetske pokretljivosti u elektrićnom polju između suprotno nabijenih elektroda korištenjem uređaja Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, Velika Britanija). Zeta potencijal preliminarnih uzoraka mjen je nakon druge homogenizacije, bez razrjeđenja uzoraka. Zeta potencijal emulzija ugušćenih hipromelozom mjen je nakon druge homogenizacije i razrjeđenja uzoraka u omjeru 1:4 s proćišćenom vodom. Mjerenja su izvedena u duplikatu, pri temperaturi od 25°C.

3.2.6. Reološka karakterizacija uzoraka

U svrhu određivanja reoloških karakteristika uzoraka, provedeni su rotacijski i oscilacijski testovi korištenjem Anton Paar MCR 102 reometra (Anton Paar® GmbH, Austrija), a podaci su analizirani pomoću RheoCompass™ programskog sućelja. Karakterizirane su sve četiri emulzije s ciklodekstrinima ugušćene hipromelozom: dvije s

15% HP- β -ciklodekstrina te tekućim parafinom ili Miglyolom kao uljnom fazom, te dvije emulzije s 0,25% α -ciklodekstrina te tekućim parafinom ili Miglyolom kao uljnom fazom. Mjerenja su napravljena u duplikatu.

3.2.6.1. Mjerenje krivulje viskoznosti

Krivulje viskoznosti ugušćenih emulzija određene su rotacijskim testom pri brzinama smicanja ($\dot{\gamma}$) u području od 0,1 do 100 s⁻¹. Mjerenje je rađeno pri 34°C. Korišteno je mjerno tijelo mjerni stožac CP50-1 (engl. *cone plate*, promjera 50 mm i nagibnog kuta 1°), čija je udaljenost od donje ploče iznosila 0,102 mm.

3.2.6.2. Test promjene amplitude

Testom promjene amplitude (engl. Amplitude sweep test) je utvrđeno linearno viskoelastično područje (engl. linear viscoelastic range, LVE range) za ispitivane uzorke pri temperaturi od 25°C, kutnoj frekvenciji (ω) od 10 rad/s, te smičnoj deformaciji (γ) u intervalu od 0,01 do 100%. Korišteno je mjerno tijelo paralelna ploča PP50 (engl. parallel plate, promjera 50 mm), pri udaljenosti od donje ploče od 1,0 mm. Rezultati se prikazuju u obliku modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') u ovisnosti o kutnoj frekvenciji (ω).

3.2.7. Određivanje raspodjele vlage na površini kože

Za ovo istraživanje pribavljena je suglasnost Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, od 8. lipnja 2020. (Klasa: 643-02/20-01/02, Ur. broj: 251-62-03-20-19).

Raspodjela vlage na površini kože određena je korištenjem MoistureMap MM 100 uređaja (Courage+Khazaka electronic GmPH, Njemačka), a mjerenje se temelji na vizualizaciji pohranjenog električnog naboja, odnosno senzoru koji detektira promjene u vodljivosti kože. Ispitan je učinak emulzija s 15% HP- β -ciklodekstrina i Miglyolom, odnosno tekućim parafinom, ugušćene hipromelozom. Prije početka mjerenja, ispitanici su boravili najmanje sat vremena u prostoriji u kojoj se provodilo ispitivanje, kako bi se koža kondicionirala na uvjete u prostoriji. Uzorci ispitivanih emulzija nanoseni su na unutarnju stranu podlaktica lijeve i desne ruke ispitanika, a nanoseni su u količini od 2 mL i unutar polja 25x40 mm što odgovara dimenzijama senzora MoistureMap uređaja. Također, na koži

ispitanika ostavljena su i kontrolna polja koja omogućuju procjenu utjecaja uvjeta u prostoriji na stupanj hidratacije kože. Mjerenja se izvode u intervalima od 30 min, u ukupnom trajanju od 90 minuta.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Razvoj i karakterizacija preliminarnih emulzija stabiliziranih primjenom CD

Za izradu preliminarnih emulzija, korištena je pročišćena voda te tri vrste ulja različitih karakteristika i dvije vrste ciklodekstrina. Tekući parafin predstavlja smjesu pročišćenih, tekućih, zasićenih alifatskih i cikličkih ugljikovodnika, izopropilmiristat je ester izopropilnog alkohola i miristinske kiseline, a Miglyol je smjesa triglicerida zasićenih masnih kiselina. Emulzije su izrađene u količini od 50 grama, s 30% uljne te 70% vodene faze. Ispitivani CD primijenjeni su u 4 različite koncentracije. HP- β -CD izabran je zbog bolje topljivosti hidroksiliranog derivata u odnosu na prirodni β -CD. Koncentracije CD su se kretale u rasponu od najniže koja bi u teoriji mogla stabilizirati emulziju, do najviše koja je definirana topljivošću pojedinog CD u vodi. Kod izrade emulzija s HP- β -CD, korištene su koncentracije od 15%, 20%, 25% i 30%, dok su za stabilizaciju emulzija s α -CD korištene koncentracije od 0,25%, 0,5% i 1%.

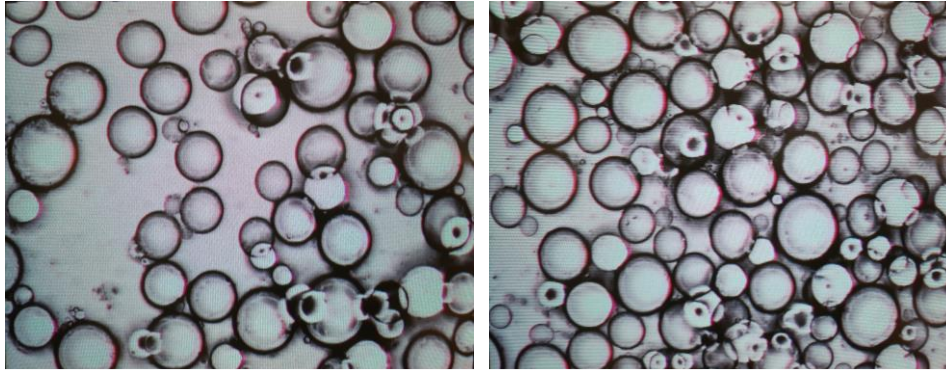
Veličina kapljica uljne faze preliminarnih emulzija s određena je mikroskopskom analizom prije homogenizacije te nakon prvog i drugog ciklusa homogenizacije. Praćena je distribucija veličina dobivenih sferičnih kapljica emulzija u rasponu promjera 1 – 50 μm . Rezultati su izraženi kao srednji promjer kapljica uljne faze za svaku pripremljenu emulziju s različitim komponentama uljne faze i različitim koncentracijama α -CD te su prikazani u Tablici 1, a mikrografije pripremljenih uzoraka su prikazane na Slikama 7 i 8.

Mjerenje dimenzija kapljica uljne faze preliminarnih emulzija s α -CD nije bilo moguće provesti prije homogenizacije uzoraka zbog razdvajanja faza emulzije. Nakon provedene homogenizacije, srednji promjer kapljica dobiven je u raspon od $2,32 \pm 4,78 \mu\text{m}$ do $12,02 \pm 4,50 \mu\text{m}$ nakon 1. homogenizacije, odnosno u rasponu od $1,98 \pm 2,75 \mu\text{m}$ do $7,54 \pm 10,62 \mu\text{m}$ nakon 2. homogenizacije. Srednja vrijednost promjera kapljica unutarnje faze emulzija zavisila je o komponenti koja je činila uljnu fazu emulzije te o udjelu CD u formulaciji. U pravilu, srednji promjer kapljica uljne faze smanjuje se s brojem primijenjenih ciklusa homogenizacije i porastom udjela α -CD, osim kod uzoraka s Miglyolom koji su sadržavali 1% α -CD, pri čemu ni nakon 2 ciklusa homogenizacije nije bilo moguće pripremiti fizički stabilnu emulziju. Najmanje dimenzije kapljica uljne faze su zabilježene za emulziju tekućeg parafina stabiliziranu primjenom 0,25% α -CD te onu Miglyola stabiliziranu s 0,5% α -CD.

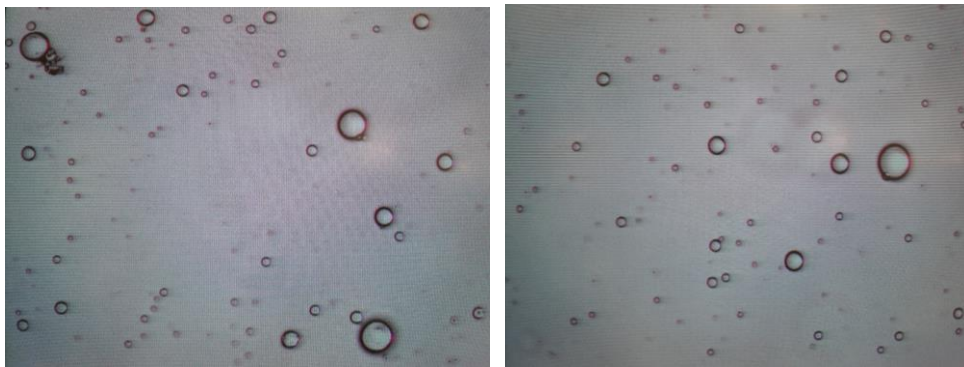
Tablica 1. Srednji promjer kapljica unutarnje faze, zeta potencijal (ζ) i pH vrijednost preliminarnih emulzija stabiliziranih primjenom α -CD.

Uzorci	Srednji promjer (μm)			ζ (mV) \pm SD	pH
	Prije homogenizacije	1. homogenizacija	2. homogenizacija		
Miglyol/0,25% α -CD/voda	-	3,38 \pm 4,32	4,47 \pm 6,67	3,22 \pm 0,34	5,45
Miglyol/0,5% α -CD/voda	-	2,32 \pm 4,78	2,71 \pm 6,19	-0,38 \pm 0,61	5,61
Miglyol/1% α -CD/voda	-	-	-	0,03 \pm 0,47	5,34
Izopropilmiristat/0,25% α -CD/voda	3,53 \pm 4,77	12,02 \pm 4,50	4,22 \pm 8,73	-7,52 \pm 0,30	6,40
Izopropilmiristat/0,5% α -CD/voda	-	3,27 \pm 5,61	6,24 \pm 9,58	-17,67 \pm 0,01	6,38
Izopropilmiristat/1% α -CD/voda	-	4,30 \pm 1,71	7,54 \pm 10,62	-3,16 \pm 0,47	6,16
Tekući parafin/0,25% α -CD/voda	-	2,74 \pm 3,94	1,98 \pm 2,75	-19,75 \pm 1,77	7,15
Tekući parafin/0,5% α -CD/voda	-	3,17 \pm 5,14	3,94 \pm 7,48	-10,30 \pm 0,58	8,1
Tekući parafin/1% α -CD/voda	-	2,87 \pm 5,23	3,38 \pm 6,37	1,13 \pm 0,70	7,93

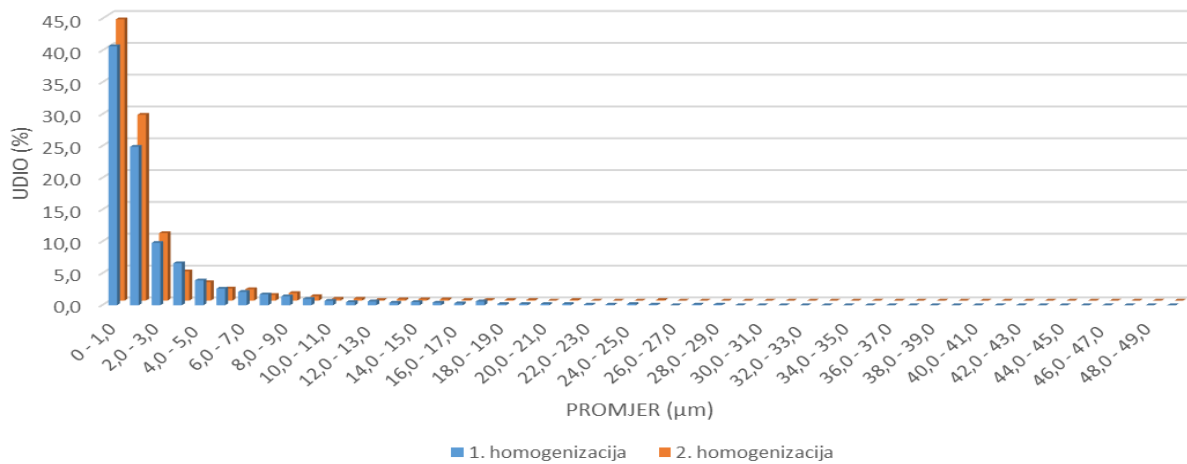
'-' označava neuspješno mjerenje srednjeg promjera kapljica zbog razdvajanja faza u uzorku prije homogenizacije



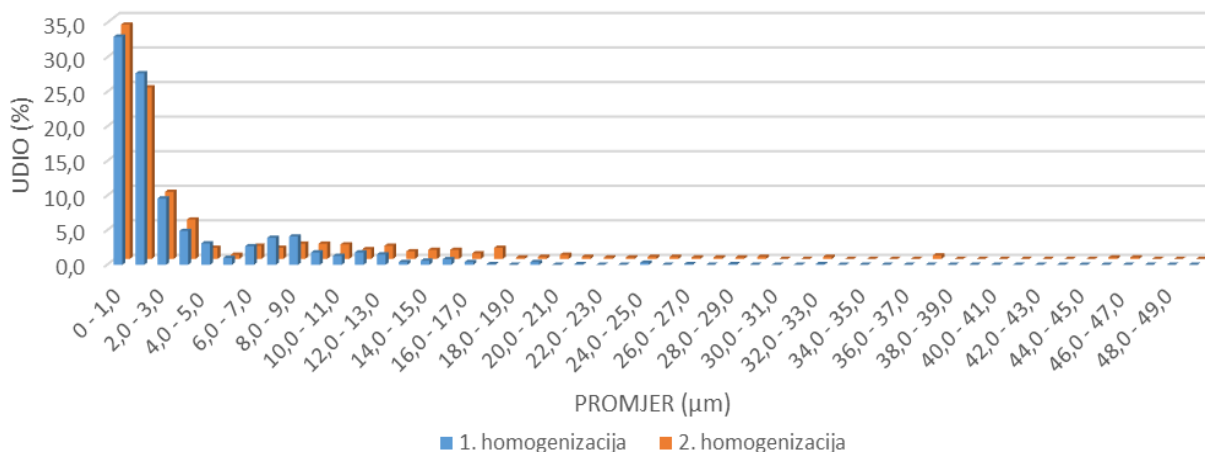
Slika 7. Mikrografije emulzije s tekućim parafinom i 0,25% α -CD – nakon 1. homogenizacije (lijevo) i 2. homogenizacije (desno) i promatrane pri povećanju od 20X.



Slika 8. Mikrografije emulzije s Miglyolom i 0,25% α -CD – nakon 1. homogenizacije (lijevo) i 2. homogenizacije (desno) i promatrane pri povećanju od 20X.



Slika 9. Raspodjela veličina kapljica unutarnje faze emulzija s tekućim parafinom i 0,25% α -CD



Slika 10. Raspodjela veličina i udio kapljica unutarnje faze emulzija s Miglyolom i 0,25% α -CD

Raspodjela veličina kapljica unutarnje faze emulzije s tekućim parafinom i 0,25% α -CD te emulzije s Miglyolom i 0,25% α -CD prikazana je na slikama 9 i 10. Za emulzije tekućeg parafina, nakon druge homogenizacije oko 91% kapljica uljne faze je u rasponu veličina od 1 do 5 μm , pri čemu su najzastupljenije kapljice manje od 1 μm , zastupljene s 44,2%. Za emulzije Miglyola, nakon druge homogenizacije uočava se bimodalna razdioba veličina kapljica uljne faze, pri čemu je oko 75% kapljica uljne faze je u rasponu veličina od 1 do 5 μm , dok je manji udio u rasponu od 6 do 17 μm . U uzorku su najzastupljenije kapljice manje od 1 μm , zastupljene s 33,9%. Usporedbom ove dvije emulzije, uočava se kako je za emulziju s tekućim parafinom i 0,25% α -CD dobivena uža raspodjela veličina kapljica emulzije.

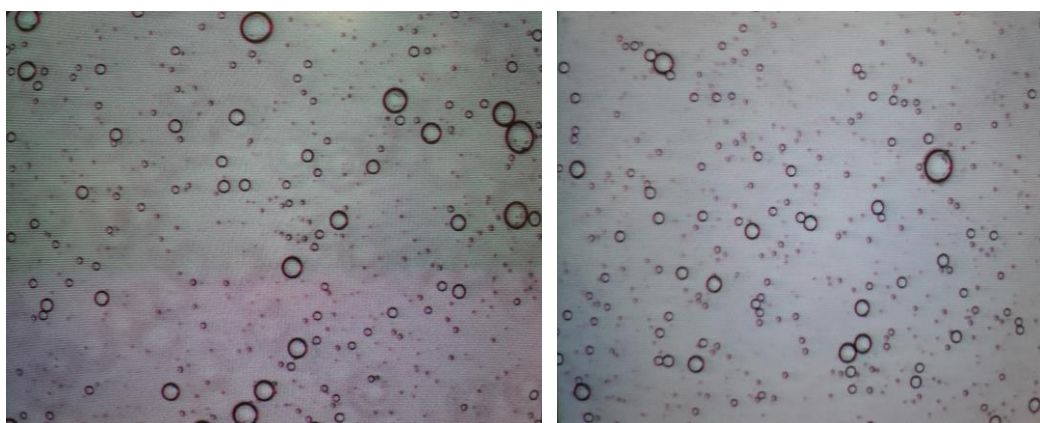
Rezultati dobiveni za uzorke stabilizirane primjenom HP- β -CD prikazani su u Tablici 2. Srednji promjer kapljica uljne faze preliminarnih emulzija stabiliziranih HP- β -CD prije homogenizacije dobiven je u raspon od $2,00 \pm 3,35$ do $7,76 \pm 10,11$ μm . S obzirom na uljnu komponentu, najmanji srednji promjer dobiven je za emulziju od koje je uljna faza bio izopropil miristat, stabilizirana s 30% HP- β -CD, dok emulzije Miglyola i tekućeg parafina su karakterizirane većim srednjim promjerom dispergiranih kapljica uljne faze. U pravilu, s porastom koncentracije HP- β -CD pada srednji promjer dispergiranih kapljica uljne faze, a taj je trend naročito uočljiv kod uzoraka s izopropilmiristatom kao uljnom fazom.

Tablica 2. Srednji promjer kapljica unutarnje faze, zeta potencijal (ζ) i pH vrijednost preliminarnih emulzija stabiliziranih primjenom HP- β -CD.

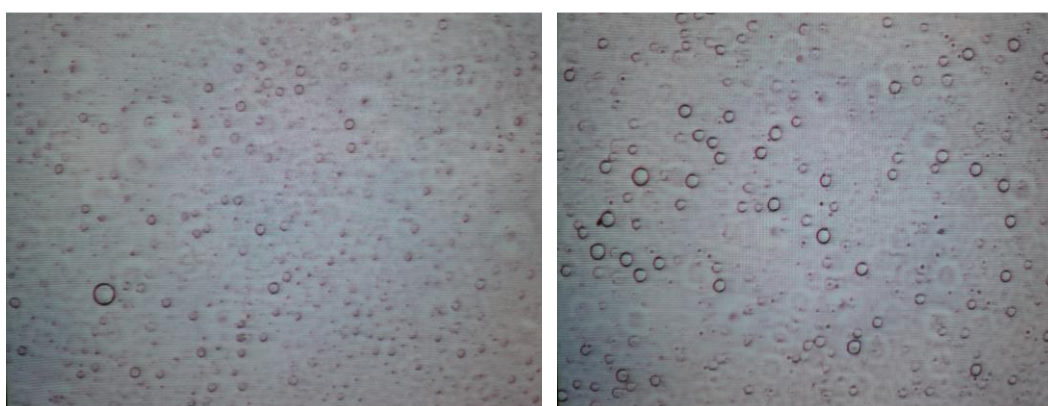
Uzorci	Srednji promjer (μm)			ζ (mV) \pm SD	pH
	Prije homogenizacije	1. homogenizacija	2. homogenizacija		
Miglyol/15% HP- β -CD/voda	4,54 \pm 6,00	1,70 \pm 2,02	1,49 \pm 1,45	-2,11 \pm 0,24	5,28
Miglyol/20% HP- β -CD/voda	7,76 \pm 10,11	1,61 \pm 1,82	1,51 \pm 1,41	-0,92 \pm 0,03	4,83
Miglyol/25% HP- β -CD/voda	2,38 \pm 3,65	1,21 \pm 1,00	1,33 \pm 0,98	-0,69 \pm 0,14	5,14
Miglyol/30% HP- β -CD/voda	4,76 \pm 7,45	1,20 \pm 0,98	2,04 \pm 2,84	-0,74 \pm 0,38	5,01
Izopropilmiristat/15% HP- β -CD/voda	5,08 \pm 8,15	2,26 \pm 3,25	2,65 \pm 4,00	-6,94 \pm 0,94	5,47
Izopropilmiristat/20% HP- β -CD/voda	3,97 \pm 6,30	2,25 \pm 3,36	2,40 \pm 3,78	-4,79 \pm 0,29	5,47
Izopropilmiristat/25% HP- β -CD/voda	3,51 \pm 6,76	1,93 \pm 2,54	2,10 \pm 2,75	-2,46 \pm 0,07	5,39
Izopropilmiristat/30% HP- β -CD/voda	2,00 \pm 3,35	2,17 \pm 3,77	1,91 \pm 2,29	-1,97 \pm 0,21	5,49
Tekući parafin/15% HP- β -CD/voda	7,39 \pm 7,55	2,36 \pm 2,29	2,00 \pm 2,03	-5,15 \pm 0,30	8,93
Tekući parafin/20% HP- β -CD/voda	5,36 \pm 6,21	2,56 \pm 2,87	2,33 \pm 2,60	-2,51 \pm 0,10	7,85
Tekući parafin/25% HP- β -CD/voda	4,88 \pm 6,87	2,69 \pm 3,23	2,55 \pm 3,12	-1,12 \pm 0,09	8,35
Tekući parafin/30% HP- β -CD/voda	5,86 \pm 6,80	3,09 \pm 3,65	2,62 \pm 3,33	-1,56 \pm 0,28	8,67

Primarne emulzije su zatim podvrgnute homogenizaciji, koja s provodila u 2 ciklusa. Pri tome, u odnosu na početne vrijednosti, dolazi do značajnog smanjenja srednjeg promjera dispergiranih kapljica emulzije. Srednji promjer kapljica uljne faze nakon prve homogenizacije je u rasponu od $1,20 \pm 1,00 \mu\text{m}$ do $3,09 \pm 3,65 \mu\text{m}$, a nakon druge homogenizacije u rasponu od $1,33 \pm 0,98 \mu\text{m}$ do $2,65 \pm 4,00 \mu\text{m}$. I nakon drugog ciklusa homogenizacije, srednji promjer dispergiranih kapljica uljne faze slijedi niz Miglyol < izopropilmiristat < tekući parafin. Pri tome, najmanje vrijednosti srednjeg promjer kapljica uljne faze dobivene su za preliminarne emulzije Miglyola i 25% HP- β -CD, izopropilmiristata i 30% HP- β -CD te tekućeg parafina i 15% HP- β -CD.

Mikrografije preliminarne emulzija stabiliziranih HP- β -CD prikazane su na Slikama 11 i 12 te prikazuju relativnu promjenu u dimenzijama kapljica uljne faze nakon 1. i 2. ciklusa homogenizacije uzorka. Raspodjela veličina uljnih kapljica za navedene uzorke prikazana je na Slikama 13 i 14.

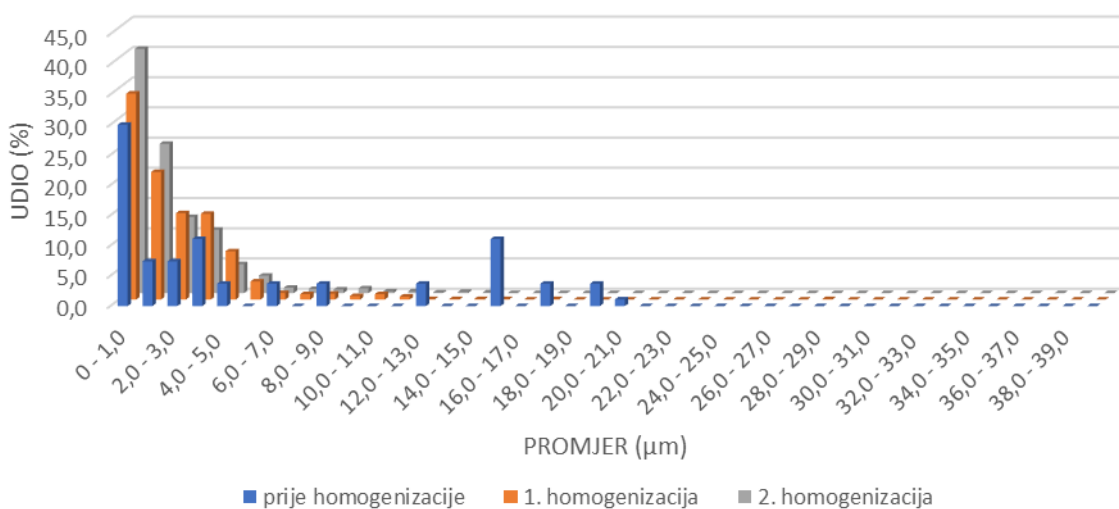


Slika 11. Mikrografije emulzije s tekućim parafinom i 15% HP- β -CD – nakon 1. homogenizacije (lijevo) i 2. homogenizacije (desno) i promatrane pri povećanju od 20X.

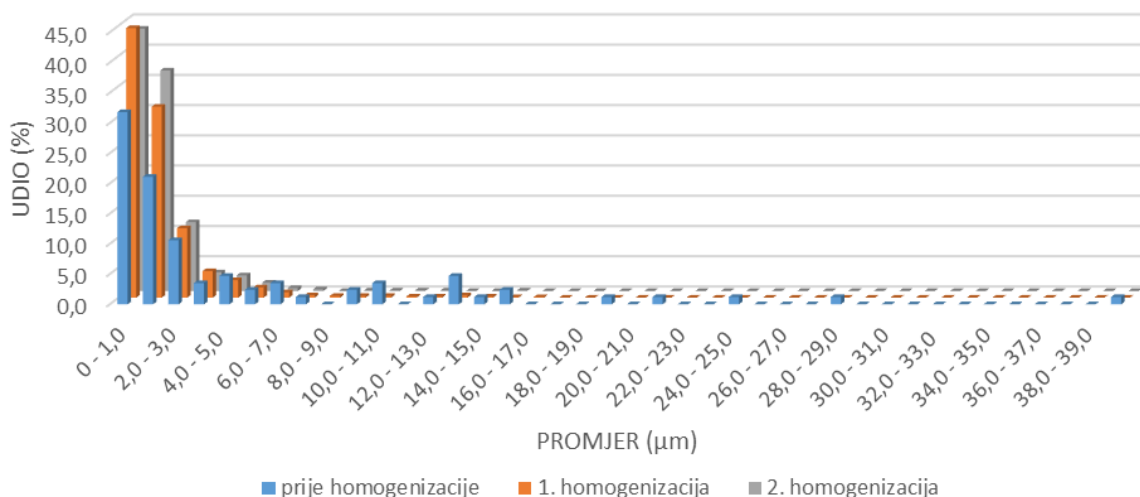


Slika 12. Mikrografije emulzije s Miglyolom i 15% HP- β -CD – nakon 1. homogenizacije (lijevo) i 2. homogenizacije (desno) i promatrane pri povećanju od 20X.

Analiza raspodjele veličina kapljica unutarnje faze emulzije s tekućim parafinom i 15% HP- β -CD te emulzije s Miglyolom i 15% HP- β -CD pokazuje da se nakon homogenizacije, udio kapljica uljne faze većih od 5 μm značajno smanjio, a porastao je udio kapljica u rasponu veličina od 1 do 3 μm . Za emulzije tekućeg parafina, nakon druge homogenizacije oko 88% kapljica uljne faze je u rasponu veličina od 1 do 5 μm , pri čemu su najzastupljenije kapljice manje od 1 μm , zastupljene s 40,4%. Za emulzije Miglyola, nakon druge homogenizacije oko 97% kapljica uljne faze je u rasponu veličina od 1 do 5 μm , pri čemu se najzastupljenije kapljice manje od 1 μm , zastupljene s 43,3%.



Slika 13. Raspodjela promjera kapljica unutarnje faze emulzije s tekućim parafinom i 15% HP- β -CD.



Slika 14. Raspodjela promjera kapljica unutarnje faze emulzije s Miglyolom i 15% HP- β -CD.

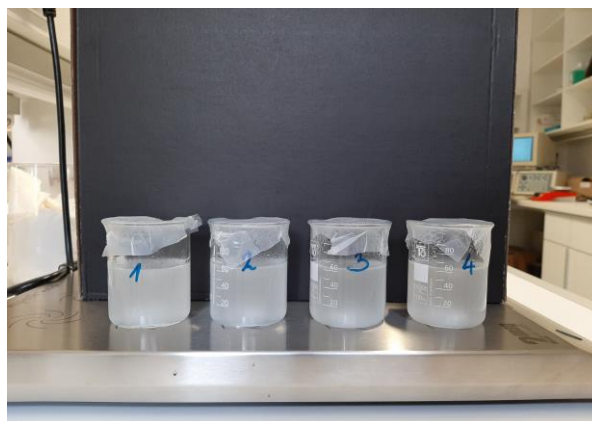
U literaturi nisu opisane emulzije koje bi svojim sastavom odgovarale onima ispitanim u okviru ovog diplomskog rada. Donekle slični sustavi su emulzije tekućeg parafina i izopropilmiristata stabilizirane primjenom α -CD i β -CD koje su u uljnoj fazi sadržavale otopljeni ekonazol, lipofilni antimikotik (Leclercq i Nardello-Rataj, 2016). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da α CD stvara stabilne emulzije U/V tipa kada je zastupljen u formulaciji u masenom udjelu od 0,25 do 0,5 te udjelu vodene faze u rasponu od 0,375 do 0,625. Za β -CD autori navode slične vrijednosti, iako nije jasno kako su priredili emulziju koja je sadržavala tako visoke koncentracije β -CD, s obzirom na njegovu ograničenu topljivost od 1,65 g/100 mL (Davis i Brewster, 2004). Srednji promjer kapljica uljne faze, uz maseni udio α -CD u formulaciji od 0,14 i sadržaj uljne faze od 0,42 iznosio je 16,1 i 9,2 μ m za uzorke se tekućim parafinom i izopropilmiristatom kao uljnom fazom, dok je za iste uzorke stabilizirane primjenom β -CD, srednji promjer kapljica uljne faze iznosio 15,6 i 13,7 μ m. To je značajno veće nego za uzorke opisane u ovom radu, a navedena se razlika može objasniti različitim udjelom komponenata formulacije te različitim postupcima homogenizacije koji su primijenjeni tijekom njihove izrade.

U svrhu odabira najprikladnijih emulzija za daljnja ispitivanja, praćena je njihova fizička stabilnost tijekom tjedan dana čuvanja na temperaturi 2-8°C. Pri tome se vizualno procjenjivalo razdvajanje faza. Kod svih uzoraka emulzije stabilizirane primjenom α -CD uočeno je razdvajanje faza nakon tjedan dana čuvanja pri temperaturi 2-8°C, kao i kod uzoraka stabiliziranih primjenom HP- β -CD koji su sadržavali izopropilmiristat kao uljnu fazu, dok drugih formulacija emulzija stabiliziranih HP- β -CD razdvajanje faza nije opaženo (Slike 15 do 18).

U literaturi postoje ograničeni podaci vezani uz fizičku stabilnost emulzija stabiliziranih primjenom CD tijekom skladištenja. Ranija istraživanja fizičke stabilnosti emulzija s tetradekanom, koje su stabilizirane primjenom α -CD i β -CD u koncentraciji od 10 mM pokazala su da stabilnost sustava ovisi o korištenom derivatu CD i udjelu uljne faze. Tako su emulzije stabilizirane primjenom α -CD uglavnom nestabilne te su pokazivale razdvajanje faza nakon 4 tjedna čuvanja pri sobnoj temperaturi, osim kod uzorka koji je sadržavao najniži volumni udio uljne faze ($\phi=0,1$). Emulzije stabilizirane primjenom β -CD su stabilnije, te je kod uzoraka kod kojih je volumni udio uljne faze u rasponu od 0,5 do 0,6, razdvajanje faza nije opaženo niti nakon 6 mjeseci čuvanja pri sobnoj temperaturi (Mathapa i Paunov, 2013). Naši rezultati donekle slijede taj trend, s obzirom da su se emulzije stabiliziranje primjenom α -CD pokazale nestabilnim, a one stabilizirane primjenom HP- β -CD su ipak stabilnije.



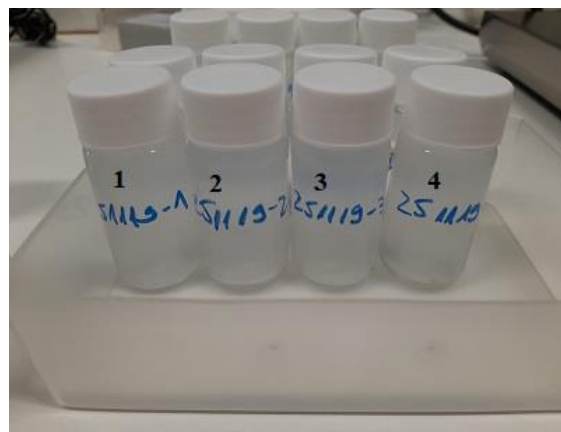
Slika 15. Emulzije s tekućim parafinom i 15% (uzorak 1) / 20% (uzorak 2) / 25 % (uzorak 3) / 30% (uzorak 4) HP-β-CD prije prve homogenizacije



Slika 16. Emulzije s Miglyolom i 15% (uzorak 1) / 20% (uzorak 2) / 25 % (uzorak 3) / 30% (uzorak 4) HP-β-CD prije prve homogenizacije



Slika 17. Emulzije s izopropilmiristatom i 15% (uzorak 1) / 20% (uzorak 2) / 25 % (uzorak 3) / 30% (uzorak 4) HP-β-CD prije prve homogenizacije



Slika 18. Emulzije s izopropilmiristatom i 15% (uzorak 1) / 20% (uzorak 2) / 25 % (uzorak 3) / 30% (uzorak 4) HP-β-CD nakon druge homogenizacije i tjedan dana praćenja stabilnosti na 2-8°C. Na dnu spremnika može se uočiti razdvajanje faza emulzije.

Rezultati ispitivanja stabilnosti mogu se dovesti u vezu sa vrijednost zeta potencijala za ispitivane sustave (Tablica 1 i 2). Zeta ili elektrokinetički potencijal je naboj koji se javlja na granici difuznog sloja čestice koloida i pokazatelj je stabilnosti koloidnog sustava. Općenito je prihvaćeno kako su emulzije s visokim zeta potencijalom, bilo negativnim ili pozitivnim, fizički stabilne. Emulzije s niskim vrijednostima zeta potencijala imaju tendenciju prema koalescenciji i flokulaciji, odnosno smatra se da su fizički nestabilne (Lu i Gao, 2010). No, zeta potencijal nije jedini pokazatelj stabilnosti emulzija (Roland i sur., 2003), naročito u slučaju emulzija kod kojih je vodena faza pripravka ugušćena dodatkom hidrokoloida ili lamelama površinski aktivne tvari niske HLB vrijednosti, kao što su cetostearyl (Aulton i Taylor, 2013). Zeta potencijal mijenja se zavisno o pH vrijednosti otopine te u pravilu postaje pozitivniji pri visokim pH vrijednostima (Bhattacharjee, 2016), a dodatkom elektrolita ili dekstroze koji snižavaju pH vrijednost pripravka, dolazi do smanjenja stabilnosti emulzija

uslijed komprimiranja dvostrukog električnog sloja i smanjenja zeta potencijala (Aulton i Taylor, 2013).

Rezultati mjerenja zeta potencijala preliminarnih emulzija s α -CD i HP- β -CD prikazani su u Tablicama 1 i 2. U svim ispitivanim slučajevima, izmjerena vrijednost je niža od ± 30 mV, što se smatra graničnom vrijednosti između stabilnih i nestabilnih sustava. Iz toga proizlazi da ispitivani uzorci nisu elektrokinetički stabilni, što se u konačnici reflektira i u opaženom razdvajanju faza tijekom skladištenja. Pri tome, u ispitivanim emulzijama može se uočiti trend smanjenja vrijednosti zeta potencijala s porastom koncentracije CD. To je naročito izraženo kod emulzije izopropilmiristata stabilizirane HP- β -CD gdje zeta potencijal emulzije stabilizirane s 15% HP- β -CD iznosi $-6,94 \pm 0,94$ mV i smanjuje se na $-1,97 \pm 0,21$ mV pri koncentraciji od 30% HP- β -CD. Slično je uočeno i kod emulzije tekućeg parafina i α -CD. Sniženje zeta potencijala porastom koncentracije CD može biti posljedica nakupljanja kompleksa CD i lipida, tj. u ovom slučaju izopropilmiristata i tekućeg parafina, na površini kapljica unutarnje faze.

U konačnici, preliminarne emulzije karakterizirane su mjerenjem pH-vrijednosti (Tablice 1 i 2). pH vrijednost zdrave kože varira u rasponu od 4,2 do 5,6, a dopuštene pH-vrijednosti za emulzije namijenjene topikalnoj primjeni su od 3 do 8. S obzirom na izmjerenu pH-vrijednost, većina pripremljenih uzoraka emulzije prikladni su za primjenu na kožu. To se u prvom redu odnosi na emulzije s Miglyolom i izopropilmiristatom, čije pH vrijednosti su u neutralnom do blago kiselom pH području. No, pH vrijednosti emulzija s tekućim parafinom ukazuju na blagu lužnatost pripravka te su izvan pH područja koje se smatra prikladnim za pripravke namijenjene topikalnoj primjeni na kožu. Taj je rezultat neočekivan, s obzirom da ispitivane formulacije u svom sastavu ne sadrže lužnate komponente. Jedan od razloga kojim bi se mogao objasniti ovaj neočekivani rezultat je u činjenici da su mjerenja pH vrijednosti provedena u nerazrijeđenim uzorcima koristeći specijalnu elektrodu namijenjenu upravo za tu svrhu. Moguće je da tekući parafin na neki način interferira s membranom elektrode, pridonoseći na taj način očitavanju viših pH vrijednosti od realnih. U prilog tome govore i rezultati koje su u svom istraživanju prikazali Leclercq i Nardello-Rataj (2016). Oni su ispitivali pH vrijednosti emulzija s tekućim parafinom i izopropilmiristatom kao uljnom fazom koje su bile stabilizirane primjenom 13,93% α -CD, odnosno β -CD. Te emulzije su sadržavale i ekonazol, koji je slaba baza, a bio je otopljen u uljnoj fazi emulzije. Takvi sustavi bili su karakterizirani pH vrijednostima u blago kiselom području. pH vrijednosti emulzija tekućeg parafina iznosile su 4,09 (stabilizirana α -CD) i 3,90 (stabilizirana β -CD), a za emulzije izopropilmiristata su 4,54 (stabilizirana α -CD) i 4,53 (stabilizirana β -CD) (Leclercq i

Nardello-Rataj, 2016). U svom istraživanju, autori su koristili standardnu pH elektrodu te prije mjerenja razrjeđivali uzorke u omjeru 1:100, što je standardna procedura za mjerenje pH vrijednosti polučvrstih pripravaka.

S obzirom na karakteristike uzoraka, u ovom radu za daljnji razvoj su odabrane emulzije tekućeg parafina i Miglyola. S obzirom na to da nije bilo razlike u srednjem promjeru kapljica unutarnje faze emulzija kod upotrebe različitih koncentracija CD, odabrane su one s najmanjom količinom, odnosno s 0,25% α -CD i 15% HP- β -CD.

4.2. Razvoj CD stabiliziranih emulzija ugušćenih hipromelozom

Dosadašnji rezultati pokazuju kako za ispitivane sustave primjena samo CD nije dostatna da se prirede fizički stabilne emulzije prikladne konzistencije. Iz tog razloga, pripremljeni su uzorci u kojima je vodena faza emulzije ugušćena dodatkom hipromeloze. Za ovu fazu razvoja kao komponente uljne faze odabrani su tekući parafin i Miglyol, a za stabilizaciju emulzija ciklodekstrinima je odabrana koncentracija od 15% HP- β -CD te 0,25% α -CD. Hipromelozom ugušćene emulzije konzistencijom su prikladnije za nanošenje na kožu.

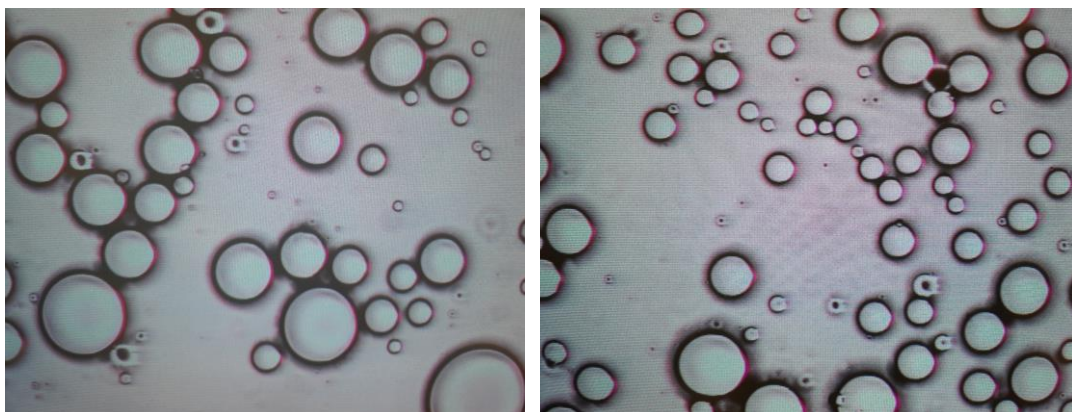
4.2.1. Usporedba veličina kapljica unutarnje faze emulzija ugušćenih hipromelozom

Rezultati mjerenja izraženi su kao srednji promjer kapljica za svaku pripremljenu emulziju s različitim komponentama uljne faze i dva tipa CD te su prikazani u Tablici 3. Srednji promjer kapljica uljne faze ugušćenih emulzija prije homogenizacije varira u raspon od $2,28 \pm 2,92$ do $5,78 \pm 10,79$ μm . S obzirom na uljnu komponentu, manji srednji promjer je izmjeren za emulzije s Miglyolom. Pri tome, svi uzorci kod kojih je kao stabilizator korišten α -CD ne pokazuju znakove razdvajanja faza, kao što je to uočeno kod preliminarnih emulzija bez hipromeloze. Zanimljivo je da homogenizacijom ne dolazi do značajnijeg smanjenja srednjeg promjera uljnih kapljica u ispitivani uzorcima. Za uzorke koji su stabilizirani primjenom HP- β -CD opaženo je neznatno smanjenje srednjeg promjera kapljica uljne faze, dok je za sustave stabilizirane primjenom α -CD opaženo blago povećanje srednjeg promjera kapljica uljne faze (Tablica 3). Mikrografije ugušćenih emulzija s α -CD i HP- β -CD prikazane su na Slikama 19, 20, 21 i 22.

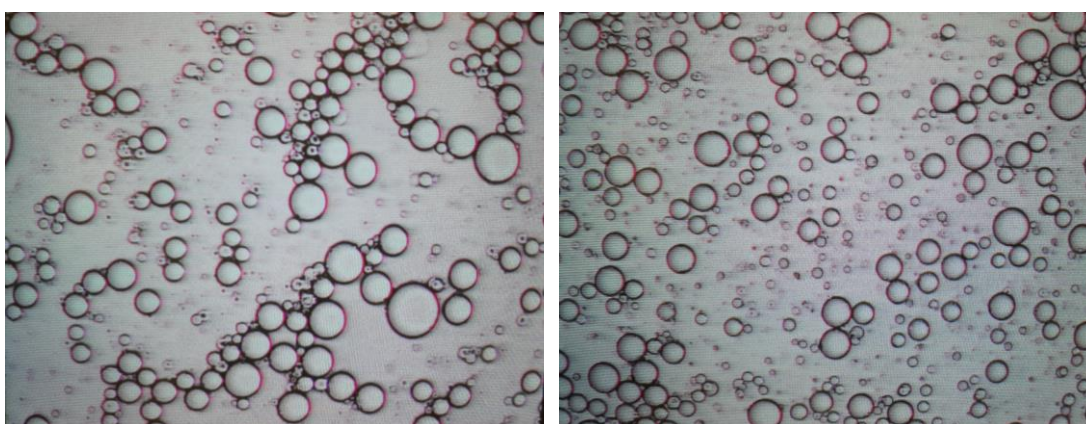
Tablica 3. Srednji promjer kapljica unutarnje faze, zeta potencijal (ζ) i pH vrijednost unutarnje faze emulzija ugušćenih hipromelozom.

Uzorci	Srednji promjer (μm)			ζ (mV) \pm SD	pH
	Prije homogenizacije	1. homogenizacija	2. homogenizacija		
Miglyol/0,25% α -CD/voda/1% hipromeloza	2,28 \pm 2,92	3,35 \pm 5,79	3,21 \pm 5,41	0,004 \pm 0,10	6,40
Tekući parafin/0,25% α -CD/voda/1% hipromeloza	5,78 \pm 10,79	5,46 \pm 9,31	7,26 \pm 10,92	-0,64 \pm 0,36	5,83
Miglyol/15% HP- β -CD/voda/1% hipromeloza	3,61 \pm 5,08	3,80 \pm 6,54	2,39 \pm 4,00	-0,07 \pm 0,12	5,65
Tekući parafin/15% HP- β -CD/voda/1% hipromeloza	-	6,40 \pm 9,25	5,57 \pm 8,87	-1,18 \pm 0,14	6,35

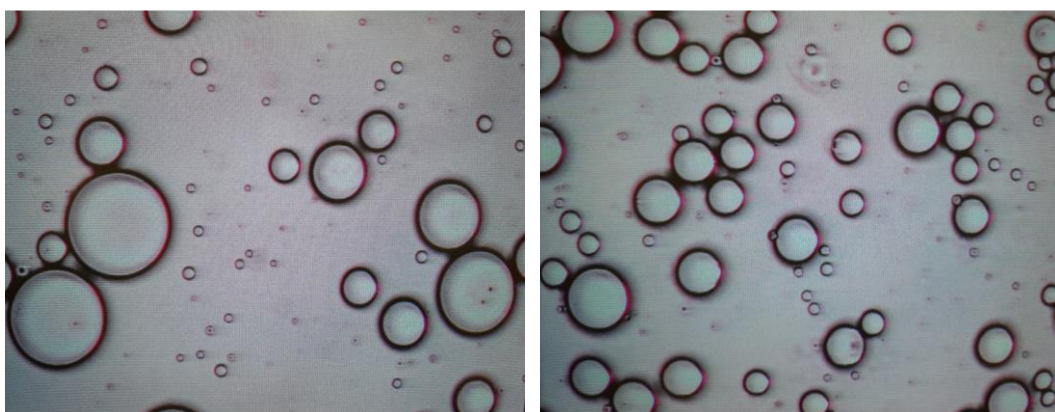
'-' označava neuspješno mjerenje veličine čestica zbog prevelike gustoće emulzije te nemogućnosti razrjeđivanja bez da se ne naruši struktura emulzije



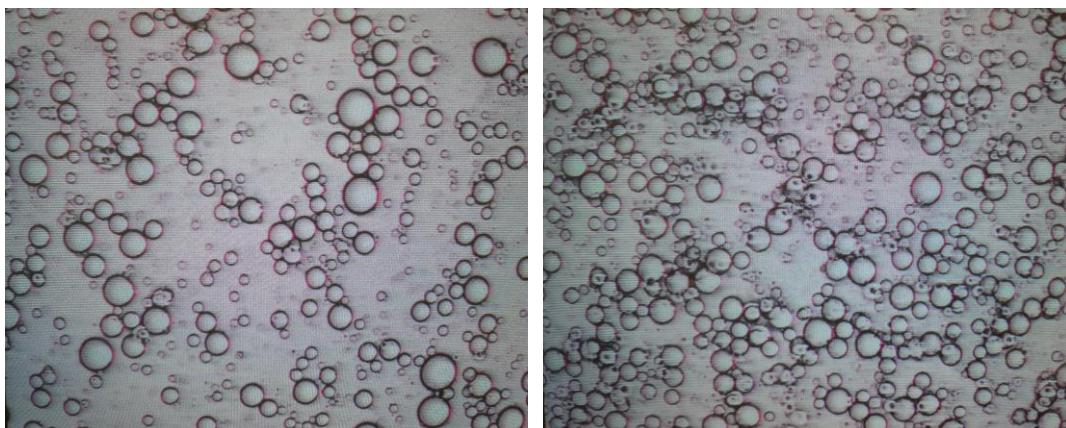
Slika 19. Mikrografije emulzije s tekućim parafinom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze – nakon 1. homogenizacije (lijevo) i 2. homogenizacije (desno) i promatrane pri povećanju od 20X.



Slika 20. Mikrografije emulzije s Miglyolom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze – nakon 1. homogenizacije (lijevo) i 2. homogenizacije (desno) i promatrane pri povećanju od 20X.

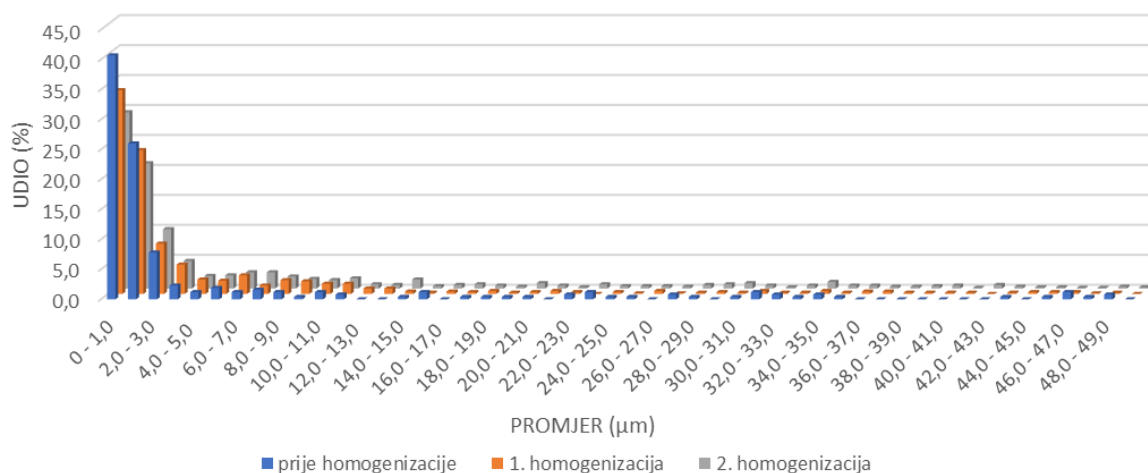


Slika 21. Mikrografije emulzije s tekućim parafinom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze – nakon 1. homogenizacije (lijevo) i 2. homogenizacije (desno) i promatrane pri povećanju od 20X.

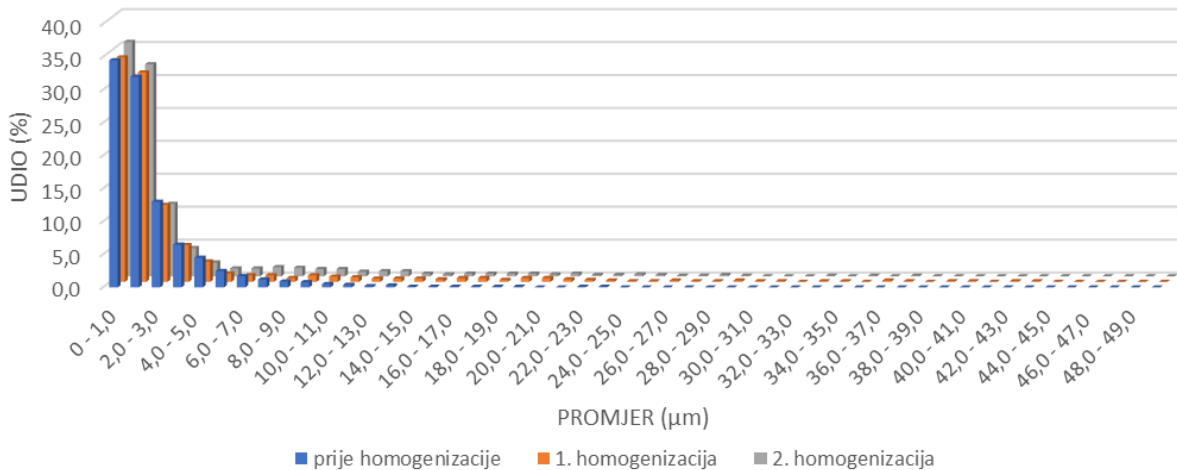


Slika 22. Mikrografije emulzije s Miglyolom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze – nakon 1. homogenizacije (lijevo) i 2. homogenizacije (desno) i promatrane pri povećanju od 20X.

Raspodjela veličina kapljica unutarnje faze u prikazanim uzorcima prikazana je na slikama 23, 24, 25 i 26. Za emulzije tekućeg parafina i α -CD, nakon druge homogenizacije oko 66% kapljica uljne faze je u rasponu veličina od 1 do 5 μm , pri čemu su najzastupljenije kapljice manje od 1 μm , zastupljene s 29,4%. No, u uzorku su prisutne veće kapljice, u rasponu od 5 do 13 μm , rezultirajući bimodalnom razdiobom. Za ugušćene emulzije Miglyola i α -CD, nakon druge homogenizacije oko 85% kapljica uljne faze je u rasponu veličina od 1 do 5 μm , pri čemu se najzastupljenije kapljice manje od 1 μm , zastupljene s 35,6%. Usporedbom ove dvije emulzije stabilizirane primjenom α -CD, može se uočiti da emulzija s Miglyolom sadrži veći udio manjih kapljica.

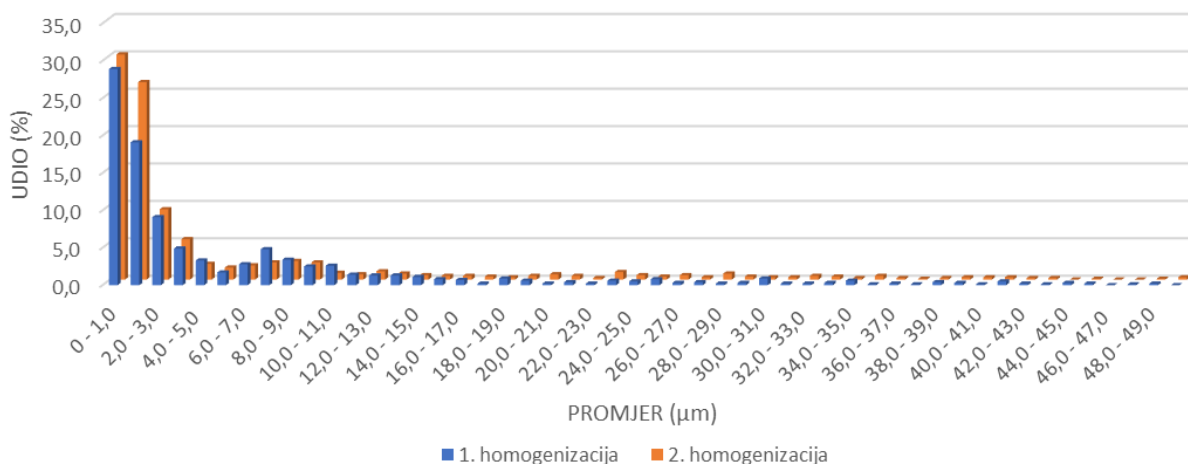


Slika 23. Raspodjela veličina kapljica unutarnje faze emulzije s tekućim parafinom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze.

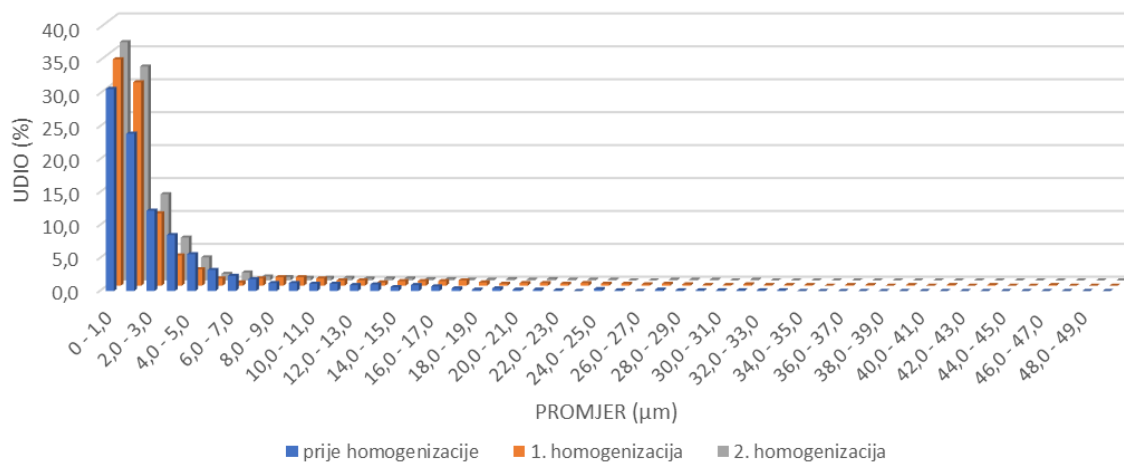


Slika 24. Raspodjela veličina kapljica unutarnje faze emulzije s Miglyolom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze

Kod uzoraka stabiliziranih primjenom 15% HP- β -CD, vidljivo je da se nakon homogenizacije, udio kapljica Miglyola većih od 5 μ m značajno smanjio, a porastao je udio kapljica u rasponu veličina od 1 do 3 μ m, pri čemu su najzastupljenije kapljice manje od 1 μ m, zastupljene s 36,2% (Slika 25). Kod emulzija s tekućim parafinom kao unutarnjom fazom dolazi do bimodalne razdiobe veličina kapljica (Slika 26). Pri tome, nakon druge homogenizacije oko 70% kapljica uljne faze je u rasponu veličina od 1 do 5 μ m, pri čemu su najzastupljenije kapljice manje od 1 μ m, zastupljene s 30,1%, a u uzorku su prisutne i veće kapljice, dimenzija u od 5 do 13 μ m. Usporedbom ove dvije emulzije, uočava se kako je za emulziju s Miglyolom i HP- β -CD dobivena uža raspodjela veličina kapljica emulzije, no srednji promjer kapljica uljne faze je otprilike 3,7 puta veći u odnosu na vrijednosti za preliminarnu emulziju sličnog sastava (Tablica 2).

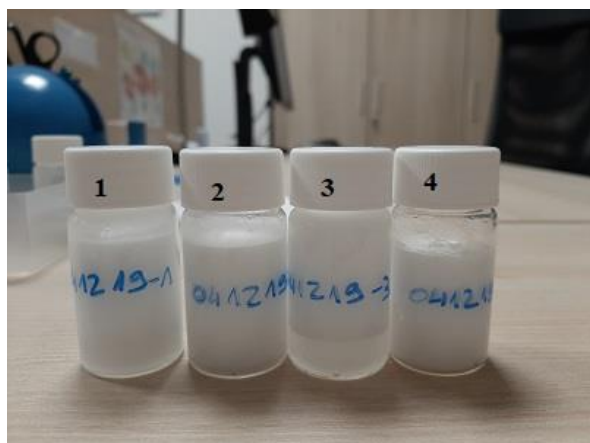


Slika 25. Raspodjela veličina kapljica unutarnje faze emulzije s tekućim parafinom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze.



Slika 26. Raspodjela veličina kapljica unutarnje faze emulzije s Miglyolom, 15% HP-β-CD i 1% hipromeloze.

I u ovom slučaju ispitana je fizička stabilnost razvijenih emulzija. Tijekom 10 dana ispitivanja uzorci su pokazali zadovoljavajuću stabilnost osim u slučaju emulzije s tekućim parafinom, 0,25% α-CD i 1% hipromeloze, kod koje je došlo do razdvajanja faza (Slika 27).



Slika 27. Emulzija s tekućim parafinom, 15% HP-β-CD i 1% hipromeloze (uzorak 1), emulzija s Miglyolom, 15% HP-β-CD i 1% hipromeloze (uzorak 2), emulzija s tekućim parafinom, 0,25% α-CD i 1% hipromeloze (uzorak 3), emulzija s Miglyolom, 0,25% α-CD i 1% hipromeloze (uzorak 4). Slika prikazuje emulzije nakon druge homogenizacije i praćenja stabilnosti na 2-8°C u periodu od 10 dana.

Pripremljeni uzorci karakterizirani su mjerenjem zeta potencijala (Tablica 3). U tu svrhu je bilo potrebno razrijediti uzorke u omjeru 1:4 kako bi konzistencijom bili prikladni za mjerenje, koje je provedeno nakon drugog ciklusa homogenizacije. Kod svih uzoraka izmjerena vrijednost zeta potencijala je blizu 0 mV. Takve su vrijednosti očekivane, s obzirom na neionsku prirodu hipromeloze. Također, valja napomenuti da je kod uzoraka s tekućim parafinom kao uljnom fazom došlo do značajnijeg smanjenja vrijednosti zeta potencijala u odnosu na vrijednosti koje su izmjerene za primarne emulzije, koje nisu

sadržavale hipromelozu, dok kod uzoraka s Miglyolom to smanjenje nije bilo toliko značajno. Za detaljnije objašnjenje ovog fenomena potreban su daljnja istraživanja, koja su izvan opsega ovog rada.

Rezultati mjerenja pH vrijednosti pripremljenih ugušćenih emulzija prikazani su u Tablici 3. Iz prikazanih podataka je vidljivo da su svi uzorci blago kiselog pH te su pogodni za primjenu na kožu. Pri tome, pH vrijednosti ugušćenih emulzija Miglyola ne razlikuju se znatno od vrijednosti dobivenih za preliminarne emulzije odgovarajućeg sastava, dok su za ugušćene emulzije tekućeg parafina dobivene su niže pH vrijednosti.

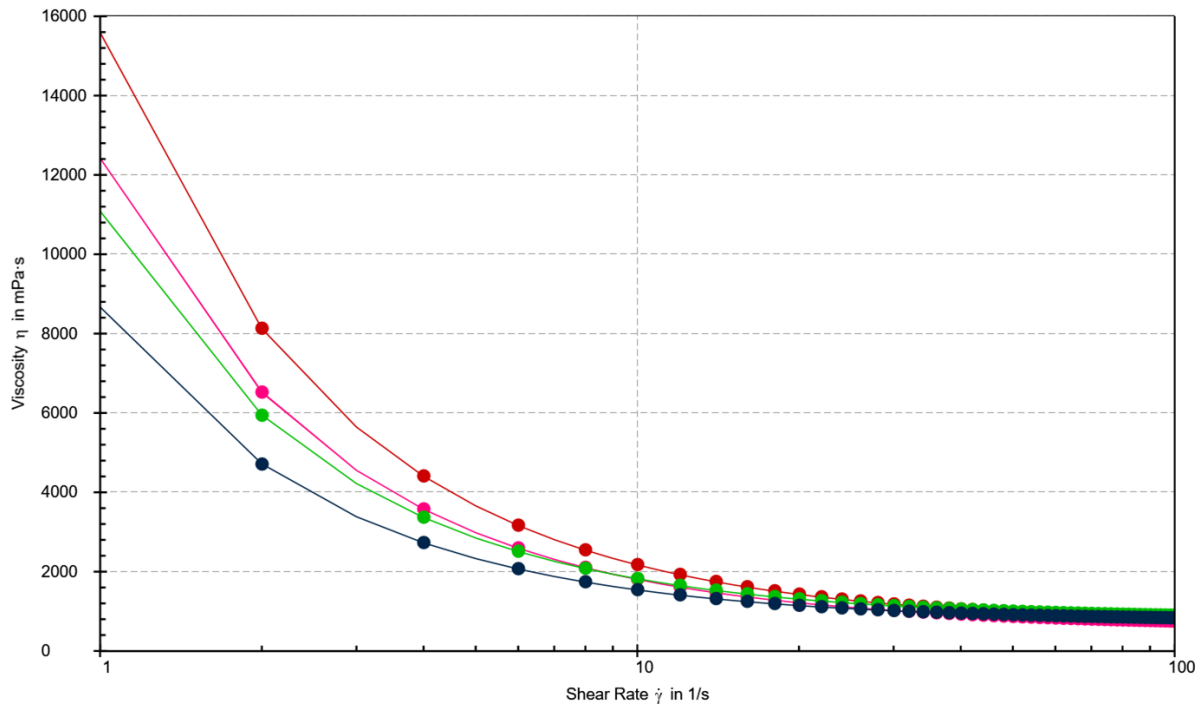
4.3. Reološka karakterizacija emulzija ugušćenih hipromelozom

U svrhu detaljne reološke karakterizacije pripremljenih emulzija, provedeni su rotacijski i oscilacijski testovi. Rotacijskim testom određena je krivulja viskoznosti ugušćenih emulzija, dok je s ciljem ispitivanja modula pohrane i gubitka rađen oscilacijski test promjene amplitude. Modul pohrane (G') predstavlja elastični dio viskoelastičnog ponašanja, koji opisuje kruto stanje uzorka. Modul gubitka (G'') karakterizira viskozni dio viskoelastičnog ponašanja, što se može predočiti kao ponašanje tekućeg stanja uzorka. Viskozno ponašanje proizlazi iz unutarnjeg trenja između molekula u sustavu. Trenje se posljedično pretvara u toplinsku energiju koju onda uzorak apsorbira te ona više nije dostupna za korištenje. Taj se gubitak energije naziva i rasipanje energije. Suprotno tome, elastični dio energije ostaje sačuvan u deformiranom materijalu. Kada se na sustav prestane primjenjivati vanjska sila, pohranjena energija djeluje kao pokretačka snaga za obnovu strukture u izvorni oblik. Modul pohrane (G') predstavlja pohranjenu energiju deformacije, a modul gubitka (G'') predstavlja raspršenu energiju tijekom unutarnjeg trenja (www.wiki.anton-paar.com). Istovremena primjena rotacijskih i oscilacijskih testova omogućava sveobuhvatnu reološku karakterizaciju ispitivanih sustava.

4.3.1. Određivanje krivulje viskoznosti

Krivulje viskoznosti (engl. *viscosity curve*) određene primjenom rotacijskih testova pokazuju kako se uzorak ponaša pri različitim brzinama smicanja ($\dot{\gamma}$). Mjerenje je rađeno pri 34°C, što je temperatura kože što nam omogućuje bolje predviđanje svojstva tečenja emulzija prilikom nanošenja na kožu. Rezultati provedenih rotacijskih testova prikazani su krivuljama viskoznosti (Slika 28). Utvrđeno je da se emulzije ponašaju kao pseudoplastični sustavi s

obzirom da im se viskoznost smanjuje s porastom brzine smicanja, pri gradijentu brzine smicanja od 1 do 100 s⁻¹.



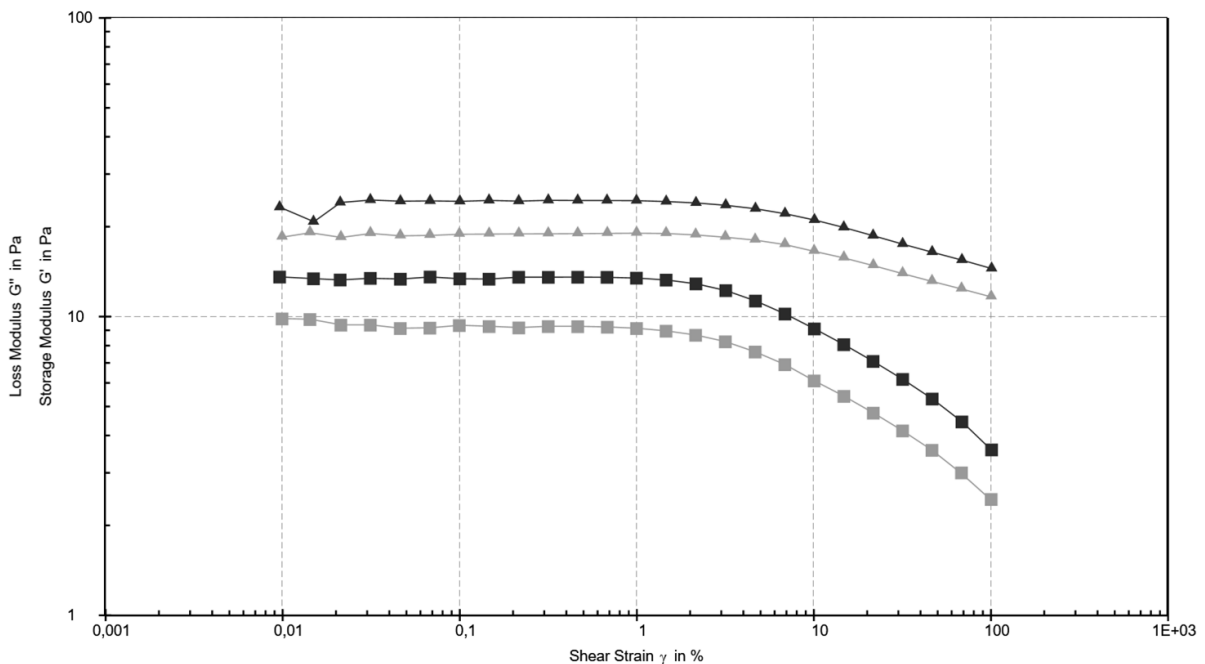
Slika 28. Krivulje viskoznosti za uzorke: emulzija s tekućim parafinom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze, emulzija s Miglyolom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze, emulzija s tekućim parafinom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze i emulzija s Miglyolom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze. Rezultati za emulziju s tekućim parafinom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze prikazani su crvenim kružićem, za emulziju s Miglyolom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze zelenim kružićem, za emulziju s tekućim parafinom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze prikazani su ružičastim kružićem te za emulziju s Miglyolom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze prikazani su crnim kružićem. Slika prikazuje rezultate mjerenja viskoznosti emulzija nakon druge homogenizacije i praćenja stabilnosti na 2-8°C u periodu od 10 dana.

Emulzije svojim reološkim karakteristikama moraju odgovarati namjeni. Na primjer, ako je emulzija namijenjena za topikalno liječenje oštećene kože, gotova krema, losion ili gel mora se lako razmazivati po koži bez izazivanja boli, a istovremeno mora ostati na mjestu primjene kako bi ostvarila svoj terapijski učinak. To je obilježje pseudoplastičnih sustava, kod kojih uslijed djelovanja sile dolazi do strukturnih promjena, odnosno destrukuiranja sustava što rezultira smanjenjem viskoznosti sustava. Kako bismo dobili takav sustav, najčešće se u vodenu fazu U/V emulzija dodaju gume, gline, sintetski polimeri ili modificirani hidrokoloide koji osim što osiguravaju plastičnost ili pseudoplastičnost emulzije, dodatno fizički stabiliziraju emulziju. Prednost pseudoplastičnih sustava je u olakšanoj primjeni na kožu uslijed smanjenja viskoznosti pripravka koje uzrokuje smično naprezanje prilikom nanošenja. Ponovno strukturiranje pripravka i povećanje njegove viskoznosti po završetku nanošenja na

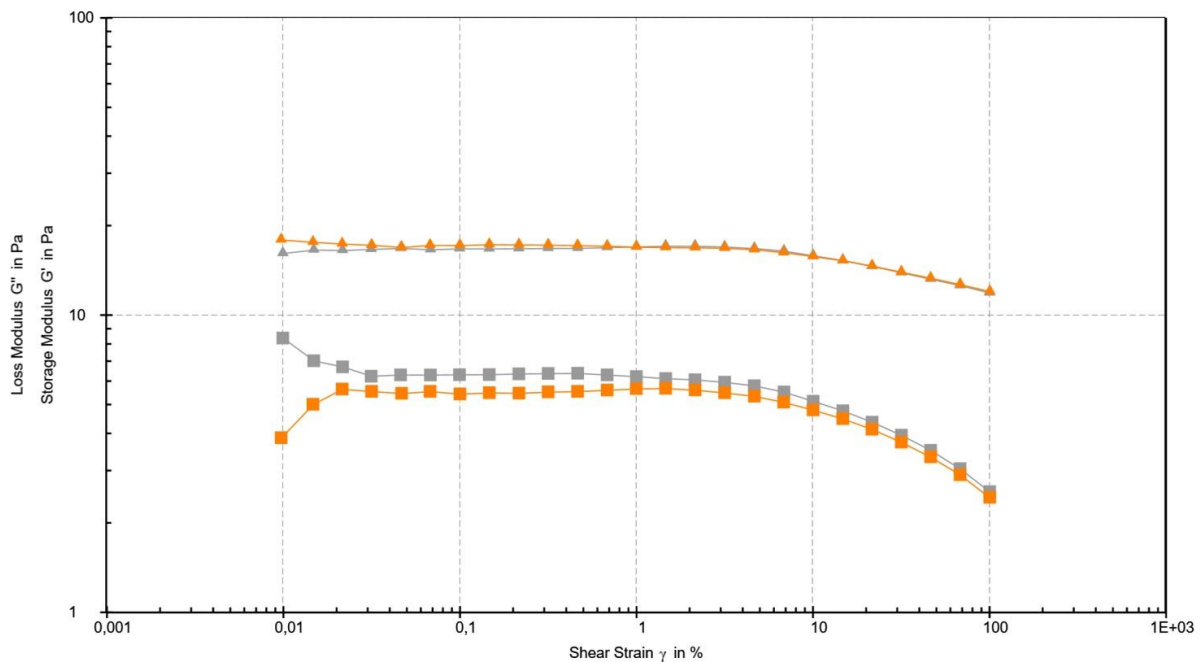
kožu osigurava zadržavanje pripravka na mjestu primjene i postizanje željenog učinka (Aulton i Taylor, 2013).

4.3.2. Test promjene amplitude

Oscilacijski test promjene amplitude rađen je pri temperaturi od 25°C, što je temperatura pri kojoj bi se emulzije skladištile. Rezultati se prikazuju u obliku modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') u ovisnosti o kutnoj frekvenciji (ω), a dobivene krivulje prikazane su na Slici 29 i 30.



Slika 29. Krivulje modula gubitka i modula pohrane za uzorke emulzija s tekućim parafinom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze i emulzija s tekućim parafinom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze. Rezultati za emulziju s tekućim parafinom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze prikazani su crnim oznakama, a za emulziju s tekućim parafinom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze prikazani su sivim oznakama. Slika prikazuje rezultate testa promjene amplitude na uzorcima emulzija nakon druge homogenizacije i praćenja stabilnosti na 2-8°C u periodu od 10 dana. (Modul gubitka (G'') je prikazan trokutom, dok je modul pohrane (G') prikazan kvadratom.)



Slika 30. Krivulje modula gubitka i modula pohrane za uzorke emulzija s Miglyolom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze i emulzija s Miglyolom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze. Rezultati za emulziju s Miglyolom, 15% HP- β -CD i 1% hipromeloze prikazani su sivim oznakama, a za emulziju s Miglyolom, 0,25% α -CD i 1% hipromeloze prikazani su narančastim oznakama. Slika prikazuje rezultate testa promjene amplitude na uzorcima emulzija nakon druge homogenizacije i praćenja stabilnosti na 2-8°C u periodu od 10 dana. (Modul gubitka (G'') je prikazan trokutom, dok je modul pohrane (G') prikazan kvadratom.)

Ovisno o rezultatu koji prikazuje koji je modul dominantan - modul pohrane (G') ili modul gubitka (G''), što se može iščitati iz grafa kao modul čija krivulja ima veću vrijednost, može se zaključiti o karakteristikama sustava. Za sve ispitivane uzorke je utvrđeno da je G'' modul dominantan te da se ispitivani sustavi pokazuju karakteristike ugušćenih tekućina, što je u skladu s vizualnim opažanjem ugušćenih emulzija (Slike 29 i 30).

Viskoelastične krutine, kao što su hidrogelovi, karakterizira vrijednost $G' > G''$ što se pripisuje postojanju kemijskih veza ili fizikalno-kemijskih interakcija unutar materijala kao što su. S druge strane, viskoelastične tekućine imaju $G'' > G'$ zbog nedostatka jakih veza između molekula. Testom promjene amplitude želi se opisati ponašanje uzoraka u ne-destruktivnom deformacijskom rasponu i utvrditi gornju granicu raspona. Također, zanimljivo je pratiti kako dolazi do razaranja strukture primjenom prevelike deformacijske energije (www.wiki.anton-paar.com).

4.4. Učinak razvijenih emulzija na raspodjelu vlage na površini kože

Emulzije tekućeg parafina, odnosno Miglyola stabilizirane HP- β -CD korištene su za ispitivanje učinka emulzija na raspodjelu vlage u koži. Proučavanjem stabilnosti tijekom 10 dana čuvanja i analizom dobivenih podataka o veličini kapljica unutarnje faze emulzija te vrijednosti zeta potencijala, zaključeno je da su te emulzije najprikladnije za primjenu u daljnjim ispitivanjima.

Od sredine 80-tih, razvijeno je nekoliko metoda za neinvazivno proučavanje svojstava zdrave i oštećene kože. Neke od njih, poput ultrazvučna slike ili magnetska rezonancije, temelje se na proučavanju strukture kože i mjerenju njezinih karakteristika. Osim metoda koje omogućuju istraživanje unutarnjih slojeva kože, postoje one koje svoje interese usmjeravaju na svojstva površinskog sloja kože. Stoga je razvijen novi način vizualizacije površine kože temeljen na mjerenju kapacitancije kože, odnosno mjerenju otpora kojeg koža pruža izmjeničnoj struji. Nova metoda omogućuje vizualizaciju sadržaja vlage na površini kože. Slika kapacitancije kože dobiva se putem senzora zaštićenog slojem silicijevog oksida, a koji je inicijalno bio razvijen za snimanje otisaka prstiju. Uređaj je nazvan SkinChip® (L'Oréal, Paris) i može se priključiti na bilo koje računalo putem USB priključka (Lévêque i sur., 2006).

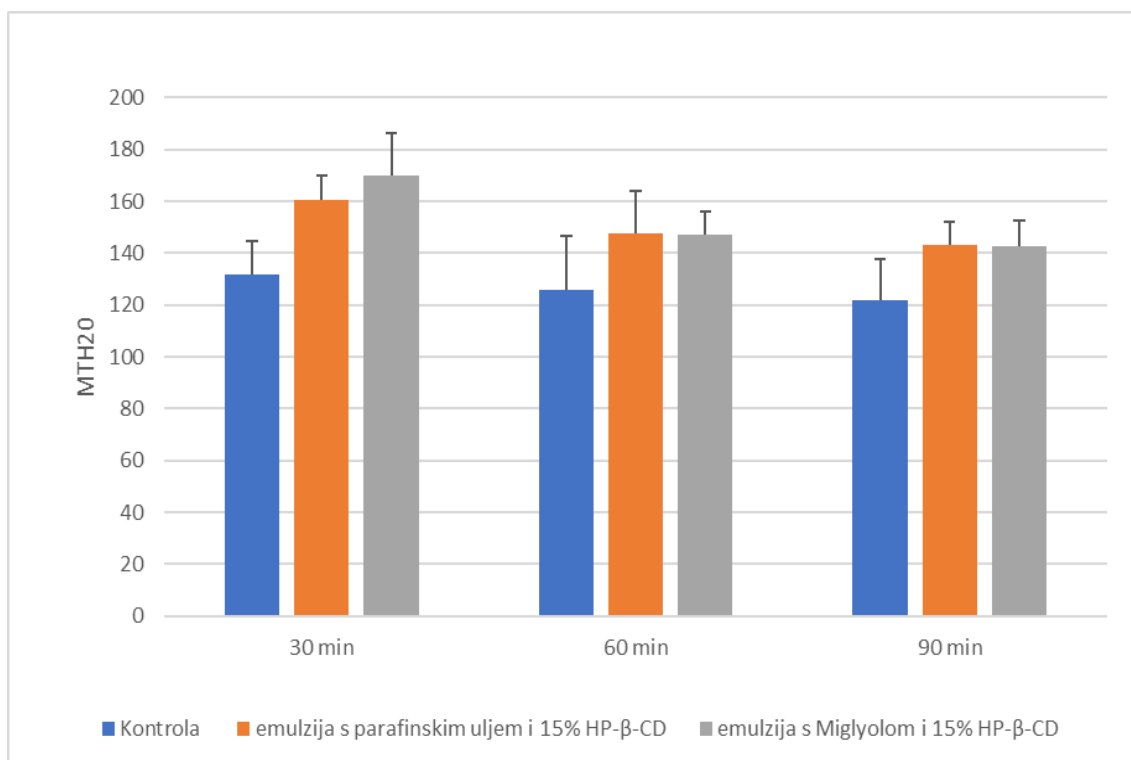
Senzor uređaja za ispitivanje sadržaja vlage na površini kože detektira promjenu u vodljivosti kože te šalje signale koji se pretvaraju u sliku. Dobiveni slikovni podaci obrađeni računalnim programom prikazuju se histogramom. Iz toga se tumači prosječni kapacitet površine kože (Qassem i Kyriacou, 2019). Mjesto na koži s većim sadržajem vlage rezultira povećanjem električnog kapaciteta i pojavom tamnih, sivih područja na slici. Smanjenje sadržaja vlage, rezultira svjetlijim tonovima na slici. Računalnom analizom slike dobiva se relativna distribucija hidratacije površine kože (Berardesca i sur., 2010).

Batisse i suradnici su provodili mjerenja raspodjele vlage na površini kože ramena 30 dobrovoljaca ženskog spola na 4 različita područja nakon primjene triju različitih proizvoda za hidrataciju kože. Svaki proizvod primijenjen je na isto mjesto, uz napomenu da je jedno područje bilo kontrolno kako bi isključili utjecaj uvjeta okoline na dobivene rezultate te su mjerenja ponovili nakon sat vremena od prve primjene proizvoda. Mjerenja su provodili uređajima Corneometer® CM 825 (Courage+Khazaka electronic GmPH, Njemačka) i SkinChip® (ST Microelectronics, Švicarska). Na uređaju Corenometer rezultati su prikazali povećanje električkog kapaciteta površine kože nakon primjene proizvoda, dok je na uređaju Skin Chip primjena proizvoda rezultirala pojavom tamnijih tonova na histogramu dobivenom

računalnom obradom podataka. Korelacija podataka dobivenih mjerenjem SkinChip i Corneometer uređajima je vidljiva, što omogućuje širu primjenu ove tehnologije za procjenu relativne hidratacije kože (Batisse i sur., 2006).

U našem eksperimentu ispitivani su učinci finalnih emulzija na raspodjelu vlage na površini kože, uz kontrolno područje na koži bez primijenjenog uzorka koji nam omogućuje procjenu utjecaja uvjeta u prostoriji na stupanj hidratacije kože. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti MTH20 i prikazani na Slici 31.

Iz rezultata je vidljivo da tijekom ispitivanja dolazi do blagog sniženja sadržaja vlage u koži dobrovoljaca koji su sudjelovali u istraživanju. Nanošenjem ispitivanih emulzija s Miglyolom i tekućim parafinom dolazi do povećanja u sadržaju vlage, koje su najizraženije kod kože tretirane formulacijom s Miglyolom. Formulacija s tekućim parafinom pokazuje nešto manju učinkovitost, no rezultati nisu statistički značajno manji u odnosu na one opažene za formulaciju s Miglyolom (Slika 31). Povećani stupanj hidratacije rožnatog sloja na tretiranim područjima opažen je i 90 minuta nakon primjene formulacije, što se može pripisati okluzivnom učinku tekućeg parafina i Miglyola.



Slika 31. Sadržaj vlage na površini kože prije primjene emulzija (kontrola), nakon primjene emulzije s tekućim parafinom, 15% HP-β-CD i 1% hipromeloze te emulzije s Miglyolom, 15% HP-β-CD i 1% hipromeloze.

5. ZAKLJUČCI

Emulzije su uspješno pripravljene korištenjem pročišćene vode i različitih vrsta ulja te stabilizacijom α -CD i HP- β -CD, uz hipromelozu kao sredstvo za povećanje viskoznosti. Riječ je o pseudoplastičnim sustavima koji pokazuju reološka svojstva tipična za viskozne tekućine te su kao takve prikladne za primjenu na kožu. Za postizanje finog raspršenja ispitanih komponenata uljne faze bilo je potrebno primijeniti 2 ciklusa homogenizacije primjenom visokoturažnih miješalica, a dodatkom hipromeloze u vodenu fazu priprema unaprijeđena je njegovala stabilnost. Ispitani CD nisu se pokazali prikladnima za izradu s izopropilmiristatom, dok su za emulzije u kojima je uljna faza bio tekući parafin ili Miglyol α -CD i HP- β -CD učinkovito stabilizirali emulzije pri koncentracijama od 0,25% i 15%. pH vrijednost ugušćenih emulzija varira u rasponu od 5,65 do 6,40 što je prikladno za ciljani put primjene. Nanošenjem na kožu, ispitivane formulacije pridonose produženoj hidrataciji površinskog, rožnatog sloja kože.

6. LITERATURA

Aulton M, Taylor K, Aulton's Pharmaceutics. London, Harcourt Publishers Limited, 2013, str. 436-464.

Aveyard R, Clint JH, Horozov TS. Aspects of the stabilisation of emulsions by solid particles: Effects of line tension and monolayer curvature energy. *Phys Chem Chem Phys*, 2003, 5, 2398-2409.

Aveyard R, Binks BP, Clint JH. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Adv Colloid Interface Sci*, 2003, 100-102, 503-546.

Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*, 2012, 257-262.

Batisse D, Giron F, Lévêque JL. Capacitance imaging of the skin surface. *Skin Res Technol*, 2006, 12 (2), 99-104.

Berardesca E, Loden M, Rodrigues LM. The revised EEMCO guidance for the in vivo measurement of water in the skin. *Skin Res Technol*, 2018, 24, 351-358.

Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release*, 2016, 235, 337-351.

CAVAMAX® W6 - Stable oil-in-water emulsions, 2012., <https://www.wacker.com>, pristupljeno 03.04.2020.

Daniels R, Knie U. Galenics of dermal products - vehicles, properties and drug release. *JDDG*, 2007, 5, 367-383.

Davarpanah L, Vahabzadeh F. Formation of oil-in-water (O/W) pickering emulsions via complexation between β -cyclodextrin and selected organic solvents. *Starch/Staerke*, 2012, 64, 898-913.

Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3, 1023-1035.

Frelichowska J, Bolzinger MA, Valour JP, Mouaziz H, Pelletier J, Chevalier Y. Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery. *Int J Pharm*, 2009, 368, 7-15.

Gong L, Li T, Chen F, Duan X, Yuan Y, Zhang D, Jiang Y. An inclusion complex of eugenol into β -cyclodextrin: Preparation, and physicochemical and antifungal characterization. *Food Chem*, 2016, 196, 324-330.

Hashizaki K, Kageyama T, Inoue M, Taguschi H, Ueda H, Saito Y. Study on preparation and formation mechanism of n-alkanol/water emulsion using α -cyclodextrin. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55, 1620-1625.

Hu JW, Yen MW, Chu IM. Effect of oil structure on cyclodextrin-based Pickering emulsions for bupivacaine topical application. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008, 161, 51-58.

Inoue M, Hashizaki K, Taguchi H, Saito Y. Formation and characterization of emulsions using β -cyclodextrin as an emulsifier. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56, 668-671.

Inoue M, Hashizaki K, Taguchi H, Saito Y. Preparation and characterization of n-alkane/water emulsion stabilized by cyclodextrin. *J Oleo Sci*, 2009, 58, 85-90.

Karp S, Wyrwicz J, Kurek M. Comparative analysis of the physical properties of o/w emulsions stabilised by cereal β -glucan and other stabilisers. *Elsevier BV*, 2019, 236-243.

Kibici D, Kahveci D. Effect of Emulsifier Type, Maltodextrin, and β -Cyclodextrin on Physical and Oxidative Stability of Oil-In-Water Emulsions. *J Food Sci*, 2019, 84, 1273-1280.

Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm*, 2013, 12-21.

Leclercq L, Nardello-Rataj V. Pickering emulsions based on cyclodextrins: A smart solution for antifungal azole derivatives topical delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 82, 126-137.

Lévêque JL, Xhauftaire-Uhoda E, Piérard GE. Skin capacitance imaging, a new technique for investigating the skin surface. *Eur J Dermatol*, 2006, 16, 500-506.

Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*, 2007, 1-11.

Li X, Li H, Xiao Q, Wang L, Wang M, Lu X, York P, Shi S, Zhang J. Two-way effects of surfactants on Pickering emulsions stabilized by the self-assembled microcrystals of α -cyclodextrin and oil. *Phys Chem Chem Phys*, 2014, 16, 14059-14069.

Lu GW, Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery, U: Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems. Kulkarni VS, urednik, Kidlington, Elsevier Inc, 2010, str. 59-94.

Marku D, Wahlgren M, Rayner M, Sjöo M, Timgren A. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *Int J Pharm*, 2012, 428, 1-7.

Marto J, Ascenso A, Ribeiro HM. Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 1093-1107.

Mathapa BG, Paunov VN. Cyclodextrin stabilised emulsions and cyclodextrinosomes. *Phys Chem Chem Phys*, 2013, 15, 17903-17914.

Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm*, 2012, 3-9.

Ng N, Rogers MA. Surfactants. *Ency Food Chem Elsevier*, 2018, 276-282.

Noomen A, Hbaieb S, Parrot-Lopez H, Kalfat R, Fessi H, Amdouni N, Chevalier Y. Emulsions of β -cyclodextrins grafted to silicone for the transport of antifungal drugs. *Mater Sci Eng C*, 2008, 28, 705-715.

Oscillation tests and viscoelasticity, 2010., <https://wiki.anton-paar.com>, pristupljeno 11.06.2020.

Otto A, Du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci*, 2009, 1-19.

Pathan IB, Setty CM. Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems. *Trop J Pharm Res*, 2009, 173-179.

Qassem M, Kyriacou P. Review of modern techniques for the assessment of skin hydration. *Cosmet*, 2019, 6, 1-28.

Roland I, Piel G, Delattre L, Evrard B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *Int J Pharm*, 2003, 263, 85-94.

Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 87-96.

Szente L, Fenyvesi É. Cyclodextrin-Lipid Complexes: Cavity Size Matters. *Strl Chem*, 2017. 479-492.

Tadros T. Polymeric surfactants in disperse systems. *Adv Colloid Interface Sci*, 2009, 281-299.

Tang J, Quinlan PJ, Tam KC. Stimuli-responsive Pickering emulsions: Recent advances and potential applications. *Soft Matter*, 2015, 3512-3529.

Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control*, 2006, 34, 98-110.

Wu L. Fabrication of non-spherical Pickering emulsion droplets by cyclodextrins mediated molecular self-assembly. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2016, 490, 163-172.

Wu L, Liao Z, Liu M, Yin X, Li X, Wang M, Lu X, Lv N, Singh V, He Z, Li H, Zhang J. Fabrication of non-spherical Pickering emulsion droplets by cyclodextrins mediated molecular self-assembly. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2016, 490, 163-172.

Yang Y, Fang Z, Chen X, Zhang W, Xie Y, Chen Y, Liu Z, Yuan W. An Overview of Pickering Emulsions: Solid-Particle Materials, Classification, Morphology, and Applications. *Front Pharmacol*, 2017, 8, 1-20.

Zhu F. Starch based Pickering emulsions: Fabrication, properties, and applications. *Trends Food Sci Tech*, 2019, 129-137.

7. SAŽETAK

Emulzije su disperzni sustavi dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, a sastoje se od unutarnje faze koja je u obliku kapljica raspršena u vanjskoj fazi. Danas se intenzivno proučavaju različite tehnologije izrade i fizičke stabilizacije različitih tipova emulzija. Odabir sastavnica emulzije utječe na raspodjelu veličine dispergiranih kapljica, fizičku stabilnost i reološka svojstva emulzije. Uljna faza emulzije može poslužiti kao nosač liposolubilnog lijeka ili sama po sebi imati povoljan učinak na kožu, djelujući emolijentno. Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi koji interakcijom s lipidima mogu fizički stabilizirati emulzije. Cilj ovo rada bio je pripremiti emulzije stabilizirane CD, prikladne za primjenu na kožu. Pripremljeni sustavi su karakterizirani s obzirom na raspodjelu veličina kapljica unutarnje faze emulzija, pH vrijednost, zeta potencijal i reološke karakteristike. U konačnici je ispitan učinak optimiranih emulzija na raspodjelu vlage na površini kože. Najprije su razvijene i karakterizirane preliminarne emulzije sastavljene od tri različite vrste ulja i stabilizirane različitim koncentracijama α -CD i HP- β -CD. U daljnja ispitivanja uključene su emulzije s tekućim parafinom, odnosno Miglyolom stabilizirane s 0,25% α -CD ili 15% HP- β -CD koje su ugušćene hipromelozom. Srednji promjer kapljica unutarnje faze smanjuje se homogenizacijom, a najzastupljenije su kapljice manje od 1 μ m, zavisno o vrsti ulja i CD-a. Zeta potencijal ugušćenih emulzija varira u rasponu od -1,18 do 0,05 mV, a pH vrijednost iznosi od 5,65 do 6,40, što ih čini prikladnim za primjenu na kožu. Reološkom karakterizacijom emulzija stabiliziranih CD i ugušćenih hipromelozom, utvrđeno je da se emulzije ponašaju kao pseudoplastični sustavi te da se mogu okvalificirati kao ugušćene tekućine. S obzirom na prihvatljivu stabilnost i odgovarajuće fizikalno-kemijske karakteristike, za daljnja ispitivanja odabrane su ugušćene emulzije stabilizirane s 15% HP- β -CD i Miglyolom odnosno tekućim parafinom kao uljnom fazom. Ugušćene emulzije primjenom na kožu povećavaju sadržaj vlage u rožnatom sloju i osiguravaju hidrataciju kože kroz duži vremenski period.

SUMMARY

Emulsions are dispersed systems of two immiscible liquids consisting of an inner phase dispersed in the form of droplets in the outer one. Today, different technologies of manufacturing and physical stabilization of emulsions are intensively studied. The choice of emulsion components affects the size distribution of the dispersed droplets, the physical stability and the rheological properties of the emulsion. The oil phase of the emulsion can serve as a carrier of liposoluble drug or alone might have a beneficial effect on the skin, acting emollient. Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides able to physically stabilize emulsions thru interaction with lipids. This study aimed to prepare topical emulsions stabilised by CDs. The characterisation of prepared systems containing different types of lipids and CDs was performed by measuring the droplet size of the emulsion inner phase, pH value and zeta potential followed by rheological characteristics of emulsions. The effect of optimal formulations on the skin surface moisture distribution was assessed. Preliminary emulsions composed of three different types of oil and stabilized with α -CD and HP- β -CD at different concentrations were first developed and characterized. Then the emulsions containing paraffin oil or Miglyol stabilized with 0,25% α -CD or 15% HP- β -CD and thickened with hypromellose were developed. The mean droplet diameter is reduced by homogenization, and the largest proportion of emulsion droplets was below 1 μ m in size, ranging from 29,4% to 36,2%, depending on the type of oil and CD. The zeta potential of the thickened emulsions was between -1,18 to 0,05 mV, with pH values in the range of 5,65 to 6,40, making them suitable for the skin application. Rheological characterization showed that the developed emulsions behave like pseudoplastic systems and can be qualified as thickened liquids. Considering the acceptable stability and the corresponding physicochemical characteristics, thickened emulsions stabilized with 15% HP- β -CD and Miglyol and liquid paraffin as the oil phase were selected for further tests. When applied to the skin, such emulsions increase the moisture content of the stratum corneum and ensure hydration of the skin over a longer time.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRIMJENA CIKLODESKSTRINA U FIZIČKOJ STABILIZACIJA EMULZIJA ZA PRIMJENU NA KOŽU

Ivana Buzina

SAŽETAK

Emulzije su disperzni sustavi dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, a sastoje se od unutarnje faze koja je u obliku kapljica raspršena u vanjskoj fazi. Danas se intenzivno proučavaju različite tehnologije izrade i fizičke stabilizacije različitih tipova emulzija. Odabir sastavnica emulzije utječe na raspodjelu veličine dispergiranih kapljica, fizičku stabilnost i reološka svojstva emulzije. Uljna faza emulzije može poslužiti kao nosač liposolubilnog lijeka ili sama po sebi imati povoljan učinak na kožu, djelujući emolijentno. Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi koji interakcijom s lipidima mogu fizički stabilizirati emulzije. Cilj ovo rada bio je pripremiti emulzije stabilizirane CD, prikladne za primjenu na kožu. Pripremljeni sustavi su karakterizirani s obzirom na raspodjelu veličina kapljica unutarnje faze emulzija, pH vrijednost, zeta potencijal i reološke karakteristike. U konačnici je ispitan učinak optimiranih emulzija na raspodjelu vlage na površini kože. Najprije su razvijene i karakterizirane preliminarne emulzije sastavljene od tri različite vrste ulja i stabilizirane različitim koncentracijama α -CD i HP- β -CD. U daljnja ispitivanja uključene su emulzije s tekućim parafinom, odnosno Miglyolom stabilizirane s 0,25% α -CD ili 15% HP- β -CD koje su ugušćene hipromelozom. Srednji promjer kapljica unutarnje faze smanjuje se homogenizacijom, a najzastupljenije su kapljice manje od 1 μ m, zavisno o vrsti ulja i CD-a. Zeta potencijal ugušćenih emulzija varira u rasponu od -1,18 do 0,05 mV, a pH vrijednost iznosi od 5,65 do 6,40, što ih čini prikladnim za primjenu na kožu. Reološkom karakterizacijom emulzija stabiliziranih CD i ugušćenih hipromelozom, utvrđeno je da se emulzije ponašaju kao pseudoplastični sustavi te da se mogu okvalificirati kao ugušćene tekućine. S obzirom na prihvatljivu stabilnost i odgovarajuće fizikalno-kemijske karakteristike, za daljnja ispitivanja odabrane su ugušćene emulzije stabilizirane s 15% HP- β -CD i Miglyolom odnosno tekućim parafinom kao uljnom fazom. Ugušćene emulzije primjenom na kožu povećavaju sadržaj vlage u rožnatom sloju i osiguravaju hidrataciju kože kroz duži vremenski period.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 52 stranice, 31 grafički prikaz, 3 tablice i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ciklodekstrini, tekući parafin, Miglyol, emulzije za topikalnu primjenu, reologija, hidratacija kože

Mentor: **Dr. sc. Mario Jug**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mario Jug**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Anita Hafner, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, izvanredni profesor/ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

APPLICATION OF CYCLODEXTRINS IN STABILIZATION OF EMULSIONS FOR TOPICAL ADMINISTRATION TO THE SKIN

Ivana Buzina

SUMMARY

Emulsions are dispersed systems of two immiscible liquids consisting of an inner phase dispersed in the form of droplets in the outer one. Today, different technologies of manufacturing and physical stabilization of emulsions are intensively studied. The choice of emulsion components affects the size distribution of the dispersed droplets, the physical stability and the rheological properties of the emulsion. The oil phase of the emulsion can serve as a carrier of liposoluble drug or alone might have a beneficial effect on the skin, acting emollient. Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides able to physically stabilize emulsions through interaction with lipids. This study aimed to prepare topical emulsions stabilised by CDs. The characterisation of prepared systems containing different types of lipids and CDs was performed by measuring the droplet size of the emulsion inner phase, pH value and zeta potential followed by rheological characteristics of emulsions. The effect of optimal formulations on the skin surface moisture distribution was assessed. Preliminary emulsions composed of three different types of oil and stabilized with α -CD and HP- β -CD at different concentrations were first developed and characterized. Then the emulsions containing paraffin oil or Miglyol stabilized with 0,25% α -CD or 15% HP- β -CD and thickened with hypromellose were developed. The mean droplet diameter is reduced by homogenization, and the largest proportion of emulsion droplets was below 1 μm in size, ranging from 29,4% to 36,2%, depending on the type of oil and CD. The zeta potential of the thickened emulsions was between -1,18 to 0,05 mV, with pH values in the range of 5,65 to 6,40, making them suitable for the skin application. Rheological characterization showed that the developed emulsions behave like pseudoplastic systems and can be qualified as thickened liquids. Considering the acceptable stability and the corresponding physicochemical characteristics, thickened emulsions stabilized with 15% HP- β -CD and Miglyol and liquid paraffin as the oil phase were selected for further tests. When applied to the skin, such emulsions increase the moisture content of the stratum corneum and ensure hydration of the skin over a longer time.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 52 pages, 31 figures, 3 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cyclodextrins, liquid paraffin, Miglyol, topical emulsion, rheology, skin moisture mapping

Mentor: **Mario Jug, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mario Jug, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Anita Hafner, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2020.

