

Razvoj oftalmičkih nanoemulzija s kationskim lipidom cetiltrimetilamonijevim bromidom

Parac, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:228699>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

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



Petra Parac

**Razvoj oftalmičkih nanoemulzija s kationskim
lipidom cetiltrimetilamonijevim bromidom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Jasmine Lovrić. Rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2019-04- 2174 Nanoemulzije unaprijeđene biofarmaceutske vrijednosti za liječenje bolesti suhoga oka.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasmini Lovrić na uloženom vremenu, prenesenom znanju i stručnom vodstvu prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala asistentu Josipu Ljubici, mag. pharm., na svojoj pomoći i pristupačnosti tijekom eksperimentalnog rada koji je izrađen u sklopu njegovog doktorskog istraživanja. Hvala i osoblju Zavoda za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori, razumijevanju i strpljenju tijekom cijelog studija..

Veliko hvala svim mojim prijateljima jer su mi olakšali teške trenutke, a neopisivo uljepšali one dobre te bili neizmjerena podrška u svakom trenutku.

SADRŽAJ

UVOD	1
Bolest suhog oka	1
Izazovi oftalmičke primjene	2
Prednosti nanoemulzija u oftalmičkoj primjeni	3
Fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija	5
Sastav nanoemulzija	6
Uljna faza.....	6
Površinski aktivne tvari	6
Nositelj pozitivnog naboja.....	7
Karakterizacija nanoemulzija	8
Veličina čestica i indeks polidisperznosti.....	8
Zeta-potencijal	9
Mehanizmi destabilizacije NE.....	9
Metode pripreme nanoemulzija.....	10
Loteprenol etabonat.....	12
OBRAZLOŽENJE TEME	13
MATERIJALI I METODE	14
Materijali	14
Metode	14
Izrada nanoemulzija	14
Fizičko-kemijska karakterizacija nanoemulzija.....	18
REZULTATI I RASPRAVA	20
Prva faza razvoja nanoemulzija.....	20
Druga faza razvoja nanoemulzija	24
Treća faza razvoja nanoemulzija	25
Četvrta faza razvoja nanoemulzija - izrada kationskih nanoemulzija	27

ZAKLJUČAK	30
LITERATURA.....	31
SAŽETAK/SUMMARY	35

UVOD

Bolest suhog oka

Bolest suhog oka (engl. *Dry eye disease, DED*) je multifaktorijalna bolest površine oka koju karakterizira gubitak homeostaze suznog filma i simptomi kao što su nelagoda i poremećaj vida. Etiologija bolesti uključuje nestabilnost suznog filma i hiperosmolarnost, upalu i oštećenje površine oka te neurosenzorne abnormalnosti (Craig i ostali, 2017). Karakterizirana je nedostatkom stvaranja suza ili povećanim isparavanjem suza. Simptomi su suhoća oka, pečenje, svrbež, osjetljivost na svjetlo, bol, zamućenje vida, zamor oka, ljepljiv sekret (Zhang i ostali, 2021). Središnji mehanizam u podlozi patofiziologije DED-a je gubitak vode na površini oka radi smanjene sekrecije suza (hiposekrecijski oblik) ili prekomjernog isparavanja suznog filma (hiperevaporacijski oblik), što u konačnici dovodi do hiperosmolarnog stresa (Beckman i ostali, 2020). Međutim, DED je kompleksna multifaktorijalna bolest koja se ne može okarakterizirati jednim procesom, znakom ili simptomom, nego različitim međusobno povezanim uzrocima ili utjecajima (Craig i ostali, 2017). Nestabilnost suznog filma prati povećana osmolarnost koja zatim aktivira signalne putove stresa u površinskom epitelu oka i rezidentnim imunskim stanicama te pokreće proizvodnju upalnih molekula koje mogu dovesti do izraženije disfunkcije suznog filma i pogoršanja simptoma. Mnogi mehanizmi za održavanje homeostaze površine oka i žlijezda su poremećeni kod bolesti suhog oka, uz to brojni vanjski (npr. mala relativna vlažnost zraka, dugotrajna izloženost elektroničkim zaslonima, nošenje kontaktnih leća) i unutarnji čimbenici (npr. starenje, autoimunost, ženski spol) mogu pridonijeti upalnom ciklusu, stoga je teško pripisati jedan uzrok za većinu slučajeva DED-a (Pflugfelder i de Paiva, 2017).

Trenutne glavne terapijske opcije za DED su nadomještanje suza primjenom umjetnih suza te lokalna protuupalna terapija (Jurišić Dukovski i ostali, 2020). Ciklosporin A (CsA) se koristi u liječenju težih slučajeva DED-a i mora biti korišten u duljem vremenskom razdoblju, a pritom je početak njegovog djelovanja odgođen. Kratkotrajno prethodno liječenje lokalnim kortikosteroidima ili nesteroidnim protuupalnim lijekovima (engl. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) moglo bi dovesti do bržeg ublažavanja simptoma od samog lokalnog CsA u teškim slučajevima DED-a. Štoviše, lokalni kortikosteroidi ili NSAID imaju potencijal za učinkovito liječenje blage do umjerene DED. Razvoj formulacija s produljenim zadržavanjem na površini oka omogućio bi smanjenje potrebne doze kortikosteroida i NSAID-a, a tako bi se osigurao bolji omjer koristi i rizika za buduće oftalamičke lijekove (Jurišić Dukovski i ostali, 2020).

Izazovi oftalmičke primjene

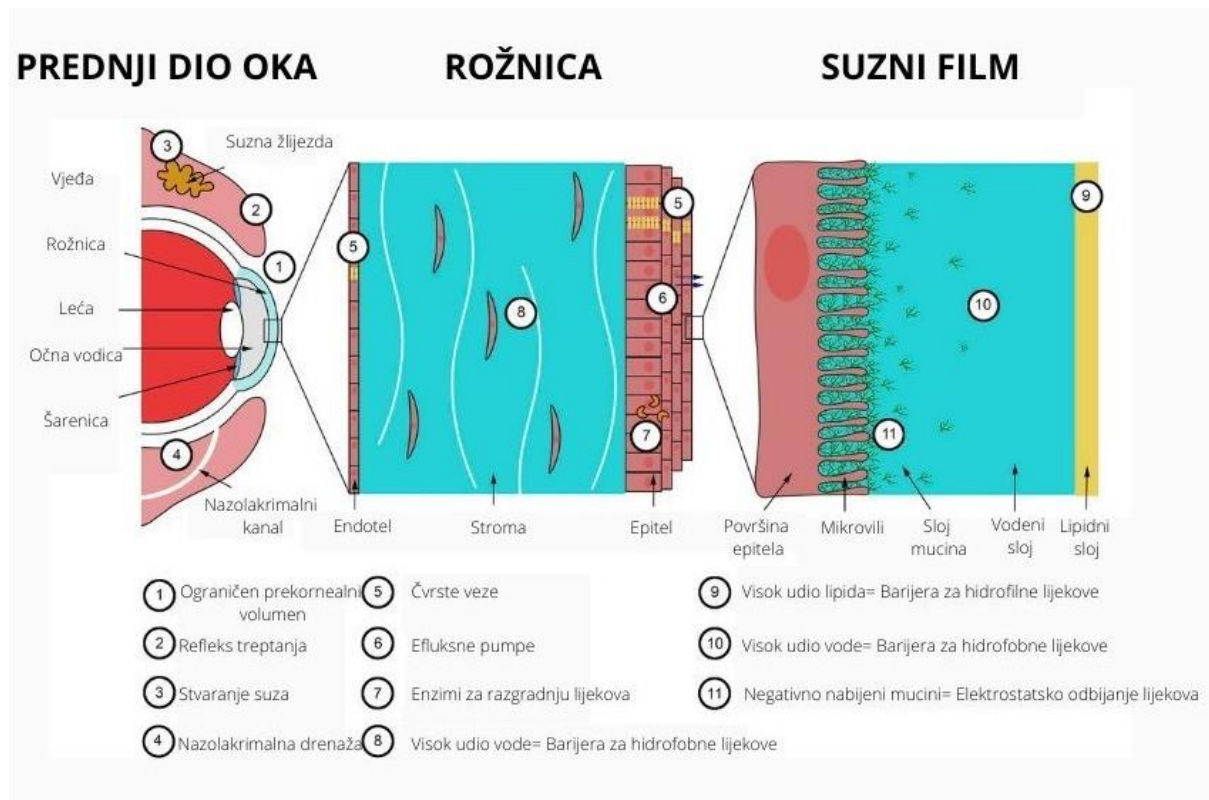
Iz perspektive oftalmičke primjene lijeka, oko se može podijeliti u četiri dijela: prekornealno područje (spojnica, vjeđe), rožnica, prednji segment (šarenica, cilijarno tijelo, leća) i stražnji segment (mrežnica, staklasto tijelo) (Mandal i ostali, 2017). Topikalna primjena je najjednostavniji, najmanje invazivan i najviše korišten način primjene lijekova u liječenju bolesti/poremećaja prednjeg segmenta oka (Janagam i ostali, 2017). Međutim, glavno ograničenje topikalne primjene je relativno mala učinkovitost jer je bioraspoloživost lijeka u oku ograničena jedinstvenim fiziološkim i anatomskim značajkama oka (Jumelle i ostali, 2020).

Suzni film je prva barijera oftalmičkoj primjeni lijeka. Suze su tekućina koju luče suzne žlijezde koje prekrivaju rožnicu, stvarajući film koji se sastoji od tri sloja vanjski lipidni sloj, srednji vodeni sloj i unutarnji sloj mucina. Vanjski lipidni sloj smanjuje isparavanje vode i osigurava odgovarajuće podmazivanje (Imperiale i ostali, 2018). Srednji vodeni sloj se sastoji od proteina i enzima koji mogu razgraditi lijekove. Unutarnji sloj suzne tekućine sastoji se od mucina, visoko glikoziliranih proteina koje luče epitelne stanice rožnice. Njihova primarna funkcija je zaštita površine oka od vanjskih štetnih podražaja i patogena. Mucini su negativno-nabijene makromolekule koje mogu ući u interakciju ili odbijati lijekove putem elektrostatske interakcije ovisno o naboju molekule lijeka ili terapijskog sustava (Jumelle i ostali, 2020).

Nakon topikalne primjene, suzne žlijezde proizvode višak suza koje ispiru površinu oka pritom odstranjujući lijek nazolakrimalnom drenažom, stoga je suzenje povezano s kratkim vremenom zadržavanja lijeka na površini oka (Imperiale i ostali, 2018). Poznato je da su kapi za oko najčešći farmaceutski oblik u liječenju bolesti prednjeg segmenta oka (Janagam i ostali, 2017). Uslijed anatomskih značajki oka samo ograničen volumen kapi za oko (oko 30 μ L) može se nanijeti na površinu oka (Jumelle i ostali, 2020). Za postizanje terapijskog učinka lijekova potrebne su odgovarajuće koncentracije lijeka u ciljnim dijelovima oka, stoga je za održavanje odgovarajuće koncentracije uobičajena česta primjena komercijalnih kapi za oko. Potreba primjene kapi za oko više puta na dan vodi slaboj adherenciji terapiji, a može uzrokovati nuspojave i oštećenje tkiva oka. Osim uklanjanja suzenjem i nazolakrimalnom drenažom mala raspoloživost topikalno primijenjenog lijeka proizlazi i iz neproduktivne apsorpcije te relativne nepropusnosti epitela rožnice (Janagam i ostali, 2017).

Rožnica je važan put za apsorpciju lijeka nakon topikalne primjene. Sastoji se od pet različitih slojeva: epitela, Bowmanove membrane, strome, Descemetove membrane i endotela. Epitel rožnice igra glavnu ulogu u ograničavanju transkornealne apsorpcije lijeka (Mandal i ostali,

2017). Bogat je lipidima što ograničava apsorpciju hidrofilnih lijekova. Nadalje, površinske epitelne stanice povezane su čvrstim vezama (engl. *tight junctions*) koje ograničavaju apsorpciju tvari paracelularnim prijenosom. Osim toga, efluksne pumpe su široko rasprostranjene u epitelu rožnice te su još jedan mehanizam kojim se smanjuje apsorpcija lijeka. S druge strane, stroma je vrlo hidrofilna i ograničava permeaciju vrlo lipofilnih lijekova. (Imperiale i ostali, 2018).



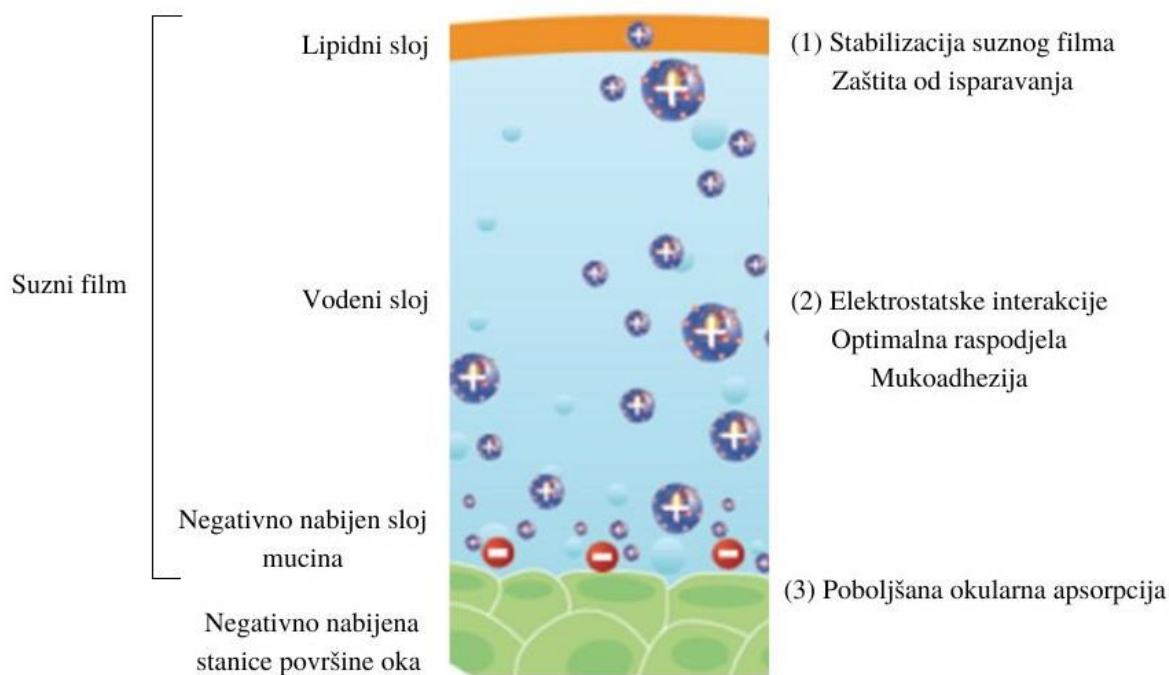
Slika 1. Prikaz glavnih barijera pri topikalnoj oftalmičkoj primjeni lijeka (preuzeto i prilagođeno prema Jumelle i ostali, (2020) uz dopuštenje izdavača)

Prednosti nanoemulzija u oftalmičkoj primjeni

Cilj većine terapijskih nanosustava je poboljšati terapijsku učinkovitost djelatne tvari i/ili smanjiti štetne učinke. Lijekovi koji su prethodno smatrani neučinkovitim radi lošeg farmakokinetičkog profila, nestabilnosti i/ili loše topljivosti, zahvaljujući razvoju terapijskih nanosustava, mogli bi postati dio održive terapije (Swierczewska i ostali, 2018). Zadnja dva desetljeća istražuju se novi terapijski sustavi temeljeni na nanotehnologiji radi povećanja biorasploživosti lijeka pri topikalnoj primjeni produljujući vrijeme zadržavanja na površini oka. To je i postignuto uklapanjem lijekova u različite nanosustave: čvrste lipidne nanočestice, nanostrukturirane lipidne nanočestice, nanoemulzije, liposome, niosome, kubosome i

nanomicelle. Primjena manje doze te smanjena učestalost primjene glavne su značajke takvih nanosustava, a koje vode poboljšanju suradljivosti pacijenata i smanjenju nuspojava (Lalu i ostali, 2017).

U/V nanoemulzije su nanosustavi niske toksičnosti i iritacije te velikog kapaciteta za uklapanje lijekova slabo topljivih u vodi (Naseema i ostali, 2021; Zhang i ostali, 2021). Od velikog su interesa u oftamologiji zbog lipofilne prirode rožnice (Silva i ostali, 2021). Nadalje, smatra se da uljne kapljice nanoemulzije djeluju kao spremnik lijeka iz kojeg se produljeno oslobađa lijek. Anionske U/V nanoemulzije s CsA (Restasis®, Allergan) koriste se u liječenju bolesti suhog oka, a one s difluprednom (Durezol®, Alcon) za liječenje upale i boli povezane s operacijom oka. U/V nanoemulzije istražuju se kao nosači i drugih lipofilnih lijekova, poput analoga prostaglandina (latanoprost ili tafluprost), ali i za isporuku lijekova nestabilnih u vodi (Daull i ostali, 2014). Nadalje, utvrđeno je da nanoemulzija nastala spontanom emulzifikacijom triacetina, izopropil miristata, etilnog alkohola i Tweena 80, može povećati topljivost, zadržavanje na površini oka i propusnost luteina (Singh i ostali, 2017). Cationorm® (Santen) je bila prva kationska nanoemulzija odobrena za liječenje umjerenog DED (Singh i ostali, 2020), a 2015. godine je kationska nanoemulzija s ciklosporinom A (Ikrevis®, Santen) dobila odobrenje za europsko tržište od strane Europske agencije za lijekove. Ikrevis® je indiciran za liječenje teškog keratitisa u odraslih bolesnika s DED-om koji se nije poboljšao unatoč nadomještanju suza. Zbog pozitivnog naboja nanokapljica ulja, vrijeme zadržavanja i bioraspoloživost CsA u oku su se pokazali većim kod kationske emulzije u odnosu na druge formulacije (Lallemand i ostali, 2017). Kationske nanoemulzije imaju sposobnost produljiti zadržavanje nanoemulzije na površini oka temeljem interakcije s negativno nabijenim mucinima, a time posljedično i povećati apsorpciju lijeka (Singh i ostali, 2020).



Slika 2. Prikaz kationske nanoemulzije u interakciji s negativno nabijenim stanicama rožnice. Kationska nanoemulzija (1) sadrži lipide koji stabiliziraju suzni film, (2) dovodi do elektrostatske interakcije s mucinima i (3) poboljšava okularnu apsorpciju (preuzeto i prilagođeno prema Lallemand i ostali, (2012) uz dopuštenje izdavača)

Fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija

Nanoemulzije su disperzni sustavi dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, a stabilizirani su površinski aktivnim tvarima (PAT). To su polutransparentni do mliječno bijeli, kinetički stabilni, ali termodinamički nestabilni sustavi veličine kapljica disperzne faze u rasponu od 20 do 500 nm (Singh i ostali, 2020). Razlog njihove termodinamičke nestabilnosti je velika površina kapljica unutarnje faze, a kinetička stabilnost može se objasniti Brownovim gibanjem kapljica unutarnje faze (Naseema i ostali, 2021).

Ovisno o sastavu, razlikujemo ulje u vodi (U/V) nanoemulzije u kojima su kapljice uljne faze raspršene u vodi (najčešće se istražuju za oftalmičku primjenu), zatim voda u ulju (V/U) nanoemulzije gdje je vodena faza dispergirana u ulju te višestruke emulzije koje mogu biti U/V/U ili V/U/V oblika (Tayeb i Sainsbury, 2018). Prema naboju na površini nanočestica, nanoemulzije dijelimo na neutralne, anionske i kationske (Rai i ostali, 2018).

Sastav nanoemulzija

Glavne komponente nanoemulzija su uljna faza, vodena faza, površinski aktivne tvari (PAT ili surfaktanti) i moguće kosurfaktanti (Singh i ostali, 2020). Odabir PAT, uljne faze i kosurfaktanta važan je jer ove pomoćne tvari ne smiju biti iritirajuće i toksične za rožnicu i spojnicu ili druga tkiva oka (Kaur i Kakkar, 2014).

Uljna faza

Obično se za uljnu fazu koriste srednje ili dugo lančani trigliceridi jer zbog dobre topljivosti lipofilnih lijekova (Singh i ostali, 2020). Topljivost lijeka u uljnoj fazi je ključna je značajka za odabir ulja.

Površinski aktivne tvari

PAT su amfifilne molekule, molekule koje sadrže hidrofobni i hidrofilni dio u svojoj strukturi. PAT smanjuju međufaznu napetost, površinsku energiju po jedinici površine između disperzne i kontinuirane faze, što omogućuje nastanak nanoemulzija i osigurava njihovu stabilnost (Tayeb i Sainsbury, 2018). Imaju tendenciju brze adsorpcije na površini između vodene i uljne faze, sprječavaju agregaciju kapljica (Singh i ostali, 2017) te smanjuju količinu vanjske energije potrebne za usitnjavanje kapljica disperzne faze (Tayeb i Sainsbury, 2018). Kako bi se opisao relativni značaj hidrofilnih i hidrofobnih skupina u PAT, koristi se HLB (engl. *hydrophilic-lipophilic balance*) vrijednost, a može se izračunati iz njihove kemijske strukture. PAT sa srednjom do visokom HLB vrijednošću (8-18) koriste se za pripremu U/V nanoemulzija, dok su za V/U nanoemulzije potrebni hidrofobniji PAT nižih HLB vrijednosti (3-6) (Qadir i ostali, 2016).

PAT se na temelju električkih svojstava dijele na neionske, anionske, kationske i zwitterionske vrste (Singh i ostali, 2020). Nanoemulzije mogu biti stabilizirane elektrostatskom i steričkom stabilizacijom ili njihovom kombinacijom (Nagarwal i ostali, 2009). Neionske površinski aktivne tvari stabiliziraju nanoemulzije vodikovim i dipolnim vezama kao i steričkim smetnjama, dok ionski surfaktanti stabiliziraju nanoemulzije elektrostatski (Singh i ostali, 2020).

Ponekad se uz PAT koriste kosurfaktanti koji dodatno smanjuju međufaznu napetost, povećavaju fluidnosti međufaza te entropiju sustava, reguliraju međufaznu zakrivljenost filma,

optimiziraju omjer viskoznosti disperzne i kontinuirane faze te omogućuju bolji prodor ulja unutar hidrofobnih skupina PAT (Singh i ostali, 2020).

Kolliphor® EL je neionska površinski aktivna tvar HLB vrijednosti 12-14. Makrogolglicerol ricinoleat 35 je glavna komponenta u njegovom sastavu i zajedno s polietilen glikolnim esterima masnih kiselina čini hidrofobni dio, dok manji hidrofilni dio čine slobodni polietilenglikoli i etoksilirani glicerol (www.pharma.basf.com). Odobren je za korištenje u oftalmičkim formulacijama u koncentracijama do 5% (FDA *Drug Databases, Inactive Ingredients in Approved Drug Products*).

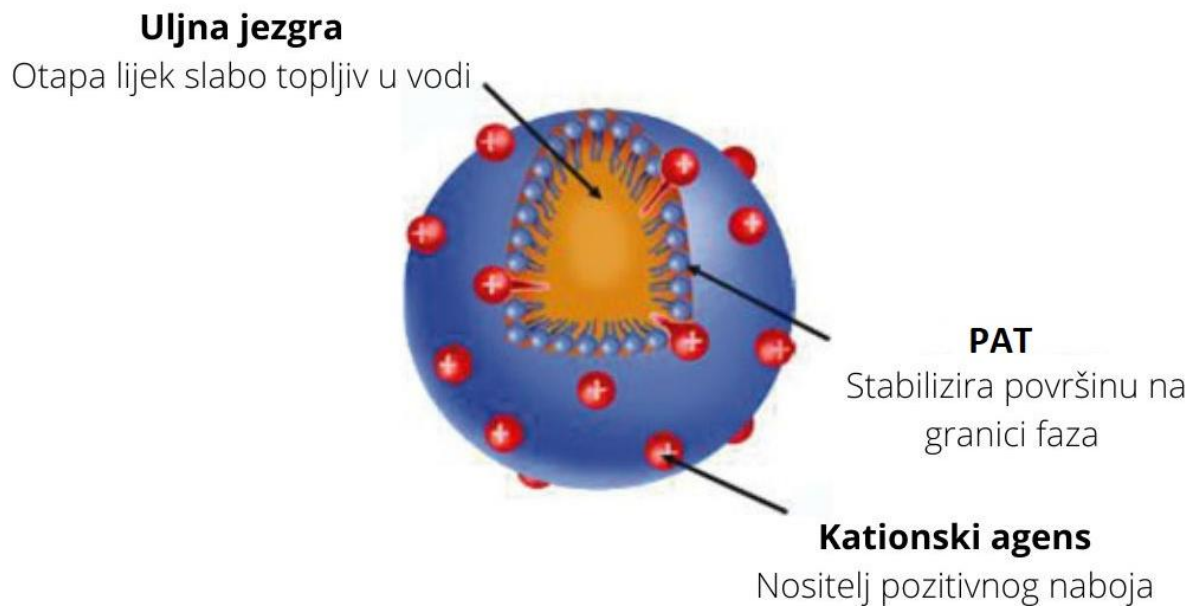
Poloksameri su neionski kopolimeri tipa ABA koji se sastoje od dvije različite jedinice, poli(etilen-oksida) i poli(propilen-oksida) (Koutsoviti i ostali, 2021). Polioksietilenski lanac je nositelj hidrofilnih svojstava, a ostatak molekule nositelj je hidrofobnih svojstava. Što je veći maseni udio poli(etilen-oksida) u molekuli, PAT ima višu HLB vrijednost i topljiviji je u vodenoj otopini (Jiao, 2008). U nazivu, prve dvije znamenke pomnožene sa 100 označavaju molekularnu masu poli(propilen-)oksida, a zadnja znamenka pomnožena s 10 maseni udio poli(etilen-oksida) (www.pharma.basf.com). U ovom radu korišteni su poloksamer 407 (HLB=18) i poloksamer 188 koji ima HLB vrijednost 29 te je stoga znatno hidrofilan. Poloksameri su korišteni u nekoliko formulacija komercijalnih kapi za oko i dokazana je njihova sigurnost (Jiao, 2008).

Lecitin je prirodna smjesa fosfolipida često korištena u pripravi terapijskih nanosustava te se smatra sigurnom i biokompatibilnom pomoćnom tvari. Zbog svoje lipofilne prirode, očekuje se da će osigurati relativno visoko uklapanje lipofilnih lijekova kao i produljeno oslobađanje (Hafner i ostali, 2015). Najzastupljeniji fosfolipidi su fosfatidilkolin i fosfatidiletanolamin. Amfifilne su molekule koje se često koriste kao emulgatori/PAT. Prirodni lecitini su među najsigurnijim emulgatorima/PAT na tržištu. Prirodni i enzimski modificirani lecitini imaju regulatorni GRAS (*Generally recognized as safe*) status stoga se mogu sigurno koristiti u razvoju nanoemulzija čak i za osjetljive puteve primjene (Klang i Valenta, 2011).

Nositelj pozitivnog naboja

Utvrđeno je da kationske nanoemulzije povećavaju terapijsku učinkovitost nakon topikalne oftalmičke primjene putem interakcija s negativno nabijenim mucinima na površini oka i poboljšanim vremenom zadržavanja formulacije na površini oka (Singh i ostali, 2020). Veći pozitivni naboj kationskog agensa, dovodi do veće stabilnosti nanoemulzije zbog

elektrostatskog odbijanja kapljica uljne faze nanoemulzije (Patel i ostali, 2016). Za postizanje visokog zeta-potencijala kationske nanoemulzije gotovo sav kationski agens mora biti zarobljen u nanokapljici ulja s pozitivnim nabojem na granici ulje-voda, a količine slobodno topljivih molekula kationskog agensa prisutne u vodenoj fazi trebaju biti minimalne jer mogu smanjiti zeta potencijal nanoemulzije (Daull i ostali, 2014).



Slika 3. Shematski prikaz nanokapljice ulja u kationskoj U/V nanoemulziji (preuzeto i prilagođeno prema Daull i ostali, (2014) uz dopuštenje izdavača)

Karakterizacija nanoemulzija

Vrsta PAT, veličina kapljica i zeta-potencijal izravno su povezani sa stabilnošću nanoemulzija. Njihov zajednički učinak određuje stabilnost nanoemulzije. Formulacija nanoemulzija obično se optimizira na temelju veličine kapljica, indeksa polidisperznosti, zeta potencijala, ali i topljivosti djelatne tvari, uspješnosti uklapanja te brzini oslobađanja (Rai i ostali, 2018).

Veličina čestica i indeks polidisperznosti

Veličina čestica određuje se dinamičkim raspršivanjem svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS). Uljne kapljice nanoemulzije se neprestano i nasumično gibaju. Takvo gibanje naziva se Brownovo gibanje, a brzina gibanja čestica ovisi o njihovoj veličini i temperaturi sustava (manje čestice se brže gibaju, a veće se gibaju sporije, a usto se pri većoj temperaturi

čestice brže gibaju). DLS je tehnika koja se koristi za mjerenje Brownovog gibanja, a povezuje brzinu gibanja i veličinu čestica kroz Stokes-Einsteinovu jednadžbu. Osvjetljavanjem čestica laserom i analizom promjene intenziteta raspršene svjetlosti, DLS omogućuje izračun veličina čestica. DLS omogućuje brzo određivanje prosječne veličine uljnih kapljica te raspodjele veličine kapljica (Qadir i ostali, 2016). Indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI) predstavlja mjeru rasapa veličine kapljica unutarnje faze oko prosječne vrijednosti. Potpuno ujednačene, monodisperzne nanoemulzije karakterizira PDI od 0, a polidisperzne nanoemulzije čije su kapljice unutarnje faze prisutne u vrlo različitim veličinama karakterizira PDI od 1 (Singh i ostali, 2017). Postoje dodatne različite metode za određivanje veličine i PDI od kojih se ističe asimetrično razdvajanje protočnim poljem (asymmetric flow field-flow fractionation, AF4)-metoda koja je osjetljivija i ima veću moć razlučivanja od DLS (Singh i ostali, 2020).

Prosječna veličina i PDI su važni parametri stabilnosti jer manja veličina kapljica nanoemulzije ujednačene raspodjele veličina, osigurava visoku razinu stabilnosti (Rai i ostali, 2018).

Zeta-potencijal

Naboj na površini kapljica nanoemulzije određuje se mjerenjem zeta-potencijala. Zeta-potencijal je potencijal smješten na plohi smicanja između dvostrukog električnog sloja kapljice, koja se kreće pod utjecajem električnog polja, i okolnog medija (Daull i ostali, 2014). Zeta-potencijal se ne mjeri izravno, već se iz izmjerene elektroforetske pokretljivosti kapljica računa pomoću Henry-jeve jednadžbe. O zeta-potencijalu ovisi stabilnost nanoemulzija te se podešavanjem zeta-potencijala može povećati stabilnost elektrostatski stabiliziranih nanoemulzija (Singh i ostali, 2017).

Naboj površine kapljica značajno utječe na interakciju nanoemulzije s površinom oka te posljedično na vrijeme zadržavanja formulacije na mjestu primjene (Jurišić Dukovski B. 2021).

Mehanizmi destabilizacije NE

Sukladno drugom zakonu termodinamike sustav će težiti najnižoj mogućoj razini energije, stoga će se destabilizacijski procesi pojaviti tijekom vremena (Klang i Valenta, 2011). Nanoemulzije su podložne istim mehanizmima nestabilnosti kao obične emulzije te im se s vremenom povećava prosječna veličina i polidisperznost, a u konačnici dolazi do razdvajanja faza. Međutim, mala dimenzija kapljica nanoemulzije rezultira značajno poboljšanom kinetičkom stabilnošću nanoemulzija u usporedbi s emulzijama (Helgeson, 2016).

Najznačajniji mehanizam destabilizacije nanoemulzija je Ostwaldovo zrenje. To je difuzijski fenomen gdje veće kapljice rastu na račun manjih što dovodi do rasta veličine kapljica i u konačnici odvajanja faza. Uzrokovan je Laplaceovim tlakom, što je razlika tlaka preko zakrivljene površine, a ovisi o površinskoj napetosti i površini kapljica (Singh i ostali, 2017). Manje kapljice disperzne faze imaju viši Laplaceov tlak i migriraju kroz kontinuiranu fazu u velike kapljice koje imaju niži tlak. Laplaceov tlak omogućuje prijenos mase s manjih na veće kapljice. Topljivost uljne faze u kontinuiranoj fazi igra glavnu ulogu u Ostwaldovom zrenju, a može se suzbiti odabirom uljne faze vrlo niske topljivosti u kontinuiranoj fazi (Tayeb i Sainsbury, 2018).

Drugi mehanizam destabilizacije nanoemulzije je koalescencija. Koalescencija je proces u kojim se dvije ili više kapljica spajaju tijekom kontakta i tvore jednu veću kapljicu. Temelji se na kinetičkim fenomenima kao što su vrhnjenje, sedimentacija i ponekad nasumične termodinamičke fluktuacije koje potiču sudaranje i udruživanje kapljica uljne faze što dovodi do povećanja veličine kapljica. Sedimentacija i vrhnjenje su reverzibilni procesi jer se kapljice mogu raspršiti protresanjem nanoemulzije (Singh i ostali, 2017). S druge strane, koalescencija je ireverzibilan proces kojim emulzija postaje grublja, čime se smanjuje količina Gibbsove slobodne energije smanjenjem površine i dovodi do konačnog odvajanja faza (Klang i Valenta, 2011). Može se izbjeći korištenjem hidrofilnijeg PAT ili upotrebom nabijenog PAT koji može pružiti elektrostatsku stabilizaciju osim uobičajene steričke stabilizacije (Singh i ostali, 2017).

Metode pripreme nanoemulzija

Priprava nanoemulzija zahtjeva veliku količinu energije. Minimalna energija koju je potrebno uložiti za njihovu izradu ovisi o međufaznoj napetosti između disperzne i kontinuirane faze, o volumnom udjelu disperzne faze i željenoj veličini kapljica. Metode izrade nanoemulzija prema izvoru energije dijelimo na visokoenergetske i niskoenergetske (Helgeson, 2016). Visokoenergetske metode uključuju korištenje mehaničkih uređaja za postizanje sila smicanja kako bi se disperzna faza usitnila do kapljica nanometarske veličine (mikrofluidizacija, visokotlačna homogenizacija, ultrasonifikacija), a niskoenergetske metode iskorištavaju unutarnji kemijski potencijal sustava koji čini nanoemulziju (spontano emulgiranje, fazna inverzija) (Tayeb i Sainsbury, 2018).

Mikrofluidizator je uređaj kod kojeg se gruba emulzija pod visokim tlakom propušta kroz uske mikrokanaliće interakcijske komore u kojoj, zbog sudara struja formulacije usmjerenih jedne prema drugoj, dolazi do smanjenja veličine kapljica. Obično se uzorak propušta više puta

(ponekad i do 100 ciklusa) kroz interakcijsku komoru do postizanja željene veličine kapljica disperzne faze. Energija nastala sudarom kapljica rasipa se u obliku topline i zahtijeva hlađenje. Utvrđeno je da mikrofluidizacija učinkovitija od visokotlačnih homogenizatora u proizvodnji stabilnih U/V nanoemulzija pri niskim koncentracijama PAT (Klang i Valenta, 2011).



Slika 4. Mikrofluidizator model LM20 Microfluidizer®

U visokotlačnom homogenizatoru uljna i vodena faza se puštaju kroz mali ulazni otvor između nepomičnog statora i rotora koji se okreće velikom brzinom, pri čemu se stvara veliki gradijent tlaka između mjesta ulaza i izlaza uzorka. Uslijed turbulencije i velikih sila smicanja dolazi do usitnjavanja kapljica do nanometarske veličine (Qadir i ostali, 2016).

Princip rada ultrasonikatora temelji se na visokofrekventnim zvučnim valovima. Ti instrumenti sadrže ultrazvučnu sondu koja na vrhu stvara intenzivnu razornu silu. Kada je sonda uronjena u uzorak, ultrazvučni valovi stvaraju kavitacijske mjehuriće koji rastu dok ne implodiraju te tako stvaraju udarne valove i mlazni tok koji u konačnici pritišću raspršene kapljice te tako smanjuju njihovu veličinu. Karakterizira ga najmanja potrošnja mehaničke energije, ali može doći do kontaminacije formulacije (Singh i ostali, 2017).

Niskoenergetska metoda fazne inverzije temelji se na specifičnom svojstvu PAT osjetljivih na temperaturu da promjene topljivost u vodi i ulju ovisno o temperaturi sustava (Rai i ostali, 2018). Spontano emulgiranje je provodi se bez posebne opreme. Za pripremu U/V nanoemulzija

voda se dodaje u otopinu ulja i PAT korak po korak na fiksnoj temperaturi uz lagano miješanje te se dolazi do spontane emulzifikacije. Ograničenje ove metode je manja količina uljne faze i prisutnost otapala (Naseema i ostali, 2021).

Niskoenergetskim metodama mogu u načelu pripremiti monodisperzne nanoemulzije s boljom kontrolom veličine u usporedbi s visokoenergetskim metodama. Međutim, one zahtijevaju značajnu kontrolu i razumijevanje ponašanja ravnoteže faza, te su stoga vrlo ograničeni sirovinama koje se mogu koristiti (Helgeson, 2016). Nasuprot tome, visokoenergetskim metodama gotovo bilo koje ulje može biti podvrgnuto nanoemulzifikaciji te su stoga primjenjivije u industrijskoj proizvodnji. Glavni nedostaci su veliki troškovi instrumenata i stvaranje visokih radnih temperatura što ponekad isključuje termolabilne lijekove (Singh i ostali, 2017).

Loteprenol etabonat

Loteprednol etabonat (LE) je lokalni kortikosteroid na bazi estera kojeg je odobrila Agencija za hranu i lijekove SAD-a (FDA) 1998. godine u obliku kapi za oko, suspenzije, za lokalno liječenje mnogih upalnih bolesti oka i upale nakon operacije katarakte (Patel i ostali, 2016), a 2020. odobren je za liječenje DED-a. LE ima nizak rizik od kortikosteroidom inducirano povećanog očnog tlaka tijekom kratkotrajne i dugotrajne primjene i pokazuje niže stope klinički značajnog povećanja očnog tlaka u usporedbi s drugim kortikosteroidima (Beckman i ostali, 2020). U liječenju DED-a, pokazano je da je primjena loteprednol etabonata (0,5 %) dva tjedna prije uvođenja terapije CsA značajno smanjila učestalost jakog peckanja povezanog s uporabom lokalnog CsA te brže i učinkovitije smanjila simptome DED-a od samog CsA i umjetnih suza. Povećana učinkovitost i smanjene komplikacija kombiniranjem LE i CsA bi trebale povećati postotak pacijenata koji će uspješno započeti i nastaviti liječenje CsA dulje vremenski razdoblje bez prekida (Sheppard i ostali, 2014).

OBRAZLOŽENJE TEME

DED je najčešći oblik kronične bolesti površine oka, uzrokuje kroničnu nelagodu, iritaciju i poremećaje vida te smanjuje kvalitetu života. Procijenjeno je da je od 5% do 35% stanovništva diljem svijeta zahvaćen blagom do umjerenom bolešću suhog okom (Sheppard i ostali, 2014). Današnja terapija je ograničena, a za blage do umjerene oblike bolesti nedostatna, stoga se javlja potreba za novim terapijskim pristupima. S druge strane, bolesti oka obično se liječe topikalnom primjenom lijekova u obliku kapi za oko radi njihove jednostavnosti, sigurnosti i prihvaćanja od strane pacijenata. Međutim složena struktura oka, koja uključuje brojne barijere, ograničava bioraspoloživost lijeka u oku. Poboljšanje bioraspoloživosti oftalmičkih lijekova veliki je izazov, a cilj je postići optimalnu koncentraciju lijeka na ciljanom mjestu (Gan i ostali, 2013). U posljednje vrijeme se kontinuirano istražuju različiti novi terapijski nanosustavi za sigurnu i poboljšanu terapiju bolesti oka. Nuspojave uzrokovane čestom primjenom i visokim dozama lijeka konvencionalnim formulacijama mogu se značajno smanjiti primjenom nanoemulzija kao topikalnih formulacija, a pokazano je i da nanoemulzije kao nanonosaci mogu povećati bioraspoloživot lijeka u oku (Singh i ostali, 2020).

Cilj ovog diplomskog rada je razvoj kationske U/V nanoemulzije za uklapanje loteprednol etabonata. Loteprednol etabonat je djelatna tvar odabrana za razvoj formulacije u ovom radu, a njegova topljivost je visoka u uljnoj fazi Capryol™ 90. Capryol™ 90 je propilenglikol monokaprilat tip II i ima HLB vrijednost 6 (Patel i ostali, 2016). Uočeno je da su oftalmičke nanoemulzije formulirane s Capryolom™ 90 pokazale veću bioraspoloživost brinzolamida nego nanoemulzije na bazi triacetina (Singh i ostali, 2020). Kao metoda pripreme nanoemulzija odabrana je visokoenergetska metoda mikrofluidizacije, a kao nosač pozitivnog naboja odabran je cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB). Specifični ciljevi rada su bili:

- Priprava nanoemulzija stabiliziranih neionskom PAT i njihova karakterizacija određivanjem veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala;
- Proučavanje utjecaja dodatka različitih vrsta lecitina na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal pripremljenih nanoemulzija;
- Proučavanje utjecaja različitih udjela lecitina na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal pripremljenih nanoemulzija;
- Priprava kationskih nanoemulzija i ispitivanje utjecaja dodatka CTAB-a na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal pripremljenih nanoemulzija;
- Ispitivanje stabilnosti pripremljenih nanoemulzija s obzirom na različite udjele sastavnica.

MATERIJALI I METODE

Materijali

Za izradu U/V nanoemulzija korišteni su propilenglikol monokaprilat (Capryol™ 90, Gattefosse, Francuska), neionske površinski aktivne tvari makrogolglicerol ricinoleat 35 (Kolliphor® EL, BASF, Njemačka) te kopolimeri poli(etilen-oksida) i poli(propilen-oksida): poloksamer 407 (Poloxamer® 407, BASF, Njemačka) i poloksamer 188 (Pluronic® F-68, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka). Nadalje, korišteni su lecitini (Lipoid® S45, S75 i S100, Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Njemačka), cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB, heksadeciltrimetilamonijev bromid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) kao nositelj pozitivnog naboja i ultračista voda.

Metode

Izrada nanoemulzija

Nanoemulzije različitih formulacija izrađene su homogenizacijom visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije. Nanoemulzije su zatim evaluirane vizualnim praćenjem i određivanjem veličine kapljica unutarnje faze, indeksa polidisperznosti te zeta-potencijala, odnosno odabranih svojstava za proučavanje stabilnosti i prikladnosti nanoemulzija u topikalnoj oftalmičkoj primjeni. Odabrana svojstva mjerena su instrumentom Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Malvern, UK).

Probir neionske površinske aktivne tvari

Razvoj nanoemulzije u ovom diplomskom radu proveden je u četiri faze. Prva faze obuhvaćala je izradu nanoemulzija s neionskim površinski aktivnim tvarima (PAT) radi probira PAT koja će osigurati pripremu nanoemulzija optimalnih svojstava. Izrađeno je 15 formulacija U/V nanoemulzija uljne faze Capryol™ 90 jednakog masenog udjela, dok su različiti maseni udjeli ultračiste vode i tri odabrane PAT: Kolliphor® EL, Poloxamer® 407 i Pluronic® F-68 činili vodenu fazu (Tablica 1). PAT otopljene su u ultračistoj vodi uz miješanje na magnetskoj miješalici (2MAG, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) pri sobnoj temperaturi i brzini miješanja od 500 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm) tijekom 15 minuta. Postupak je ponovljen za tri odabrane PAT u različitim masenim udjelima u rasponu od 0,10% do 2,50% (*m/m*). Nadalje je u svaku pojedinu otopinu dodano prethodno izvagano ulje u udjelu od 5% (*m/m*), nakon čega je slijedila pre-homogenizacija na visokoturažnoj miješalici (Ultra-Turrax®, IKA-Werke GmbH & Company, Staufen, Njemačka) pri brzini okretaja 6000 rpm (*revolutions per minute*) tijekom 3 minute. Tako dobivene grube emulzije homogenizirane su mikrofluidizatorom (LM20 Microfluidizer®, Microfluidics, Newton MA, SAD)

u 10 ciklusa pri tlaku od 1000 bara. Nanoemulzije su zatim skladištene u staklenim bočicama pri +4°C. Određivanjem i analizom odabranih fizičko-kemijskih svojstava (veličina kapljica, indeks polidisperznosti, zeta-potencijal i stabilnost), odabrane su dvije formulacije nanoemulzije s PAT Kolliphorom® EL koje su korištene u daljnjim fazama razvoja nanoemulzije.

Tablica 1. Sastav nanoemulzija s različitim neionskim površinski aktivnim tvarima

Formulacija	Uljna faza	Vodena faza		
	Capryol™ 90 (%, <i>m/m</i>)	PAT	Udio (%, <i>m/m</i>)	Udio ultračiste vode (%, <i>m/m</i>)
EL 1 - 5	5	Kolliphor® EL	0,10	94,90
			0,25	94,75
			0,50	94,50
			1,00	94,00
			2,50	92,50
P407 1 - 5		Poloxamer® 407	0,10	94,90
			0,25	94,75
			0,50	94,50
			1,00	94,00
			2,50	92,50
F68 1 - 5		Pluronic® F-68	0,10	94,90
			0,25	94,75
			0,50	94,50
			1,00	94,00
			2,50	92,50

Probir vrste lecitina

Druga faza razvoja nanoemulzija sastojala se od izrade nanoemulzija s neionskim PAT te lecitinima različitog tipa koji sadrže fosfolipide prisutne u suznom filmu. Pripravljeno je tri U/V nanoemulzije u kojima uljnu fazu čine Capryol™ 90 odabranog masenog udjela te lecitini različitog udjela fosfatidilkolina (Lipoid® S45, Lipoid® S75 i Lipoid® S100) u jednakom masenom udjelu, dok vodenu fazu čine neionski surfaktant Kolliphor® EL također odabranog

masenog udjela i ultračista voda. Pripravljena je i kontrolna nanoemulzija koja nije sadržavala lecitin (Tablica 2). Lecitin je otopljen u uljnoj fazi odnosno Capryol™-u 90 uz miješanje pri 500 rpm i sobnoj temperaturi tijekom 24 sata. Kolliphor® EL otopljen je u ultračistoj vodi također uz magnetsko miješanje brzine 500 rpm pri sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Zatim je uljna faza dodana u vodenu fazu nakon čega je slijedila homogenizacija prvo na visokoturažnoj miješalici pri brzini okretaja 6000 rpm tijekom 5 minuta, a zatim na mikrofluidizatoru pri 1000 bara u 10 ciklusa. Na temelju odabranih fizičko-kemijskih svojstava za daljnje faze razvoja odabran je Lipoid® S75 kao optimalni lecitin za pripravu oftalmičkih nanoemulzija.

Tablica 2. Sastav nanoemulzija s neionskom PAT te različitim vrstama lecitinima

Formulacija	Uljna faza (% , <i>m/m</i>)				Vodena faza (% , <i>m/m</i>)
	Capryol™ 90	Lipoid® S45	Lipoid® S75	Lipoid® S100	Kolliphor® EL
EL 5	5	-	-	-	2,5
EL 5 – S45		0,25	-	-	
EL 5 – S75		-	0,25	-	
EL 5 – S100		-	-	0,25	

Probir udjela neionskog surfaktanta i lecitina

Treća faza obuhvaćala je izradu nanoemulzija s odabranom neionskom PAT i odabranom vrstom lecitina. Nakon odabira lecitina, pripravljeno je šest U/V nanoemulzija u kojima su uljnu fazu činili Capryol™ 90, lecitin Lipoid® S75 u različitim masenim udjelima od 0,10% do 0,50% (*m/m*), a vodenu fazu činili su odabrana neionska PAT optimalnog masenog udjela određena u prvoj fazi (Kolliphor® EL) te ultračista voda. Pripravljene su i dvije kontrolne nanoemulzije koje nisu sadržavale lecitin, a sadržavale su Capryol™ 90, Kolliphor® EL i ultračistu vodu (Tablica 3). Izrada nanoemulzija provedena je na prethodno opisan način (u odjeljku Probir vrste lecitina). Određivanjem fizikalno-kemijskih svojstava odabrana je najprikladnija formulacija koja sadrži Kolliphor® EL i Lipoid® S75 koja je zatim korištena za pripravu kationskih emulzija.

Tablica 3. Sastav nanoemulzija s neionskom PAT i lecitinom Lipoidom® S75

Formulacija	Uljna faza		Vodena faza
	Capryol™ 90 (%, <i>m/m</i>)	Lipoid® S75 (%, <i>m/m</i>)	Kolliphor® EL (%, <i>m/m</i>)
EL 2 Lecitin 1 - 4	5	-	0,25
		0,10	
		0,25	
		0,50	
EL 3 Lecitin 1- 4	5	-	0,50
		0,10	
		0,25	
		0,50	

Probir udjela cetiltrimetilamonijeva bromida (CTAB)

Četvrta faza razvoja nanoemulzija obuhvaćala je izradu kationskih nanoemulzija s CTAB-om kao nositeljem pozitivnog naboja. Nanoemulzije su pripravljene korištenjem Capryola™ 90, optimalnog udjela Kolliphora® EL i lecitina Lipoida® S75 te CTAB-om u različitim masenim udjelima (Tablica 4). Za pripremu nanoemulzija, otopljen je Lipoid® S75 u uljnoj fazi Capryol™ 90 na magnetskoj miješalici pri 500 rpm i sobnoj temperaturi tijekom 24 sata. Kolliphor® EL otopljen je ultračistoj vodi također uz magnetsko miješanje, a u nastalu vodenu otopinu dodan je CTAB u različitim udjelima od 0,10% do 1,00 % (*m/m*) te otopljen uz miješanje pri 500 rpm i sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Zatim je uljna faza dodana u vodenu fazu nakon čega su dobivene smjese homogenizirane prvo na visokoturažnoj miješalici pri brzini okretaja 6000 rpm tijekom 5 minuta, a dalje propuštanjem kroz mikrofluidizator pri 1000 bara u 10 ciklusa. Dobivene nanoemulzije skladištene su pri +4°C, a zatim je slijedila njihova fizičko-kemijska karakterizacija određivanjem veličine čestica, indeksa polidisperznosti, zeta-potencijala i stabilnosti.

Tablica 4. Sastav nanoemulzija s različitim udjelima CTAB-a

Formulacija	Uljna faza		Vodena faza	
	Capryol™ 90 (%, m/m)	Lipoid® S75 (%, m/m)	Kolliphor® EL (%, m/m)	CTAB (%, m/m)
EL CTAB 1 - 4	5	0,5	0,25	0,10
				0,25
				0,50
				1,00

Fizičko-kemijska karakterizacija nanoemulzija

Određivanje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti

Veličina kapljica unutarnje faze i indeks polidisperznosti (PDI) određeni su instrumentom Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Malvern, UK) mjerenjem koje se temelji na principu dinamičkog raspršivanja svjetlosti. Pripravljene nanoemulzije razrjeđenja 1:500 (V/V) u ultračistoj vodi analizirane su u jednokratnim polistirenskim kivetama pri temperaturi od 25 °C. Kut detekcije kod mjerenja veličine kapljica i PDI iznosio je 175°. Mjerenja veličine kapljica provedena su u triplikatu te je određena aritmetička sredina izmjerenih vrijednosti. PDI vrijednost predstavlja omjer standardne devijacije i prosječne veličine kapljica te opisuje stupanj neujednačenosti raspodjele veličine čestica. Nanoemulzije su razrijeđene prije samog mjerenja jer kod visokih koncentracija dolazi do višestrukog raspršivanja svjetlosti, odnosno raspršena svjetlost s jedne čestice dolazi u interakciju s drugim česticama prije nego dosegne detektor te tako gubi na intenzitetu, odnosno utječe na rezultate mjerenja veličine kapljica i PDI (Bhattacharjee, 2016). Nadalje, najveća koncentracija pri kojoj je moguće provesti valjano određivanje veličine kapljica unutarnje faze određena je točkom u kojoj čestice zbog međusobnih interakcija ne mogu slobodno difundirati. Za čestice u rasponu veličine od 100 nm do 1 µm preporučeno je maksimalni maseni udio od 1 % (Zetasizer® Advance Series: Priručnik za uporabu, 2022.).

Određivanje zeta-potencijala

Zeta-potencijal određen je instrumentom Zetasizer Ultra mjerenjem brzine elektroforetske pokretljivosti čestica. Pripravljene nanoemulzije razrjeđenja 1:100 (V/V) u 10 mM vodenoj otopini NaCl analizirane su u jednokratnim kivetama modela DTS1070 (Malvern Instruments). Mjerenje zeta-potencijala rađeno je u triplikatu te je određena aritmetička sredina dobivenih vrijednosti. Pri određivanju za razrjeđivanje uzoraka korištena je vodena otopina NaCl jer je dodatkom elektrolita poput natrijevog klorida i kalijevog klorida u destiliranoj vodi osigurava stalna provodljivost ispod 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Singh i ostali, 2020).

Vizualno praćenje stabilnosti

Ispitivana je stabilnost nanoemulzija vizualnim praćenjem u definiranim vremenskim točkama (0, 7 dana, 15 dana i 30 dana). Praćen je vizualan izgled i transparentnost nanoemulzija kroz određen vremenski period.

REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu je u četiri faze proveden razvoj oftalmičke kationske nanoemulzije s kationskim lipidom kao nositeljem pozitivnog naboja kao inovativnog farmaceutskog oblika s potencijalom primjene u liječenju bolesti suhog oka. U prvoj fazi proveden je probir neionske PAT, u drugoj fazi probir vrste lecitina, u trećoj fazi probir udjela neionske PAT i odabrane vrste lecitina, a u četvrtoj probir udjela kationskog lipida. Kao uljna faza odabran je Capryol™ 90, propilenglikol monokaprilat, zanimljiva pomoćna tvar jer je ujedno ulje i neionska PAT netopljiva u vodi (Savić i ostali, 2019). Nadalje, LE, djelatna tvari nedavno odobrena za liječenje bolesti suhog oka, dobro je topljiva u Capryol™ 90 (Patel i ostali, 2016). Kao kationski lipid odabran je CTAB. Kationski lipid osigurava stabilnost nanoemulzija, povoljna svojstva širenja formulacije na površini oka, interakciju kapljica ulja s negativno nabijenim mucinima u suznom filmu, stoga omogućava produženo zadržavanje kapljica u prekornealnom području. Neionska PAT uključena je u formulaciju zbog dodatne steričke stabilizacije NE uz elektrostatsku stabilizaciju koju osigurava kationski lipid. U formulaciju je uključen i lecitin, smjesa fosfolipida koji su normalno prisutni u suznom filmu i osiguravaju njegovu stabilnost. Nanoemulzije su pripravljene metodom mikrofluidizacije uz procesne parametre tlak od 1000 bara i 10 propuštanja kroz uređaj (10 ciklusa).

Prva faza razvoja nanoemulzija

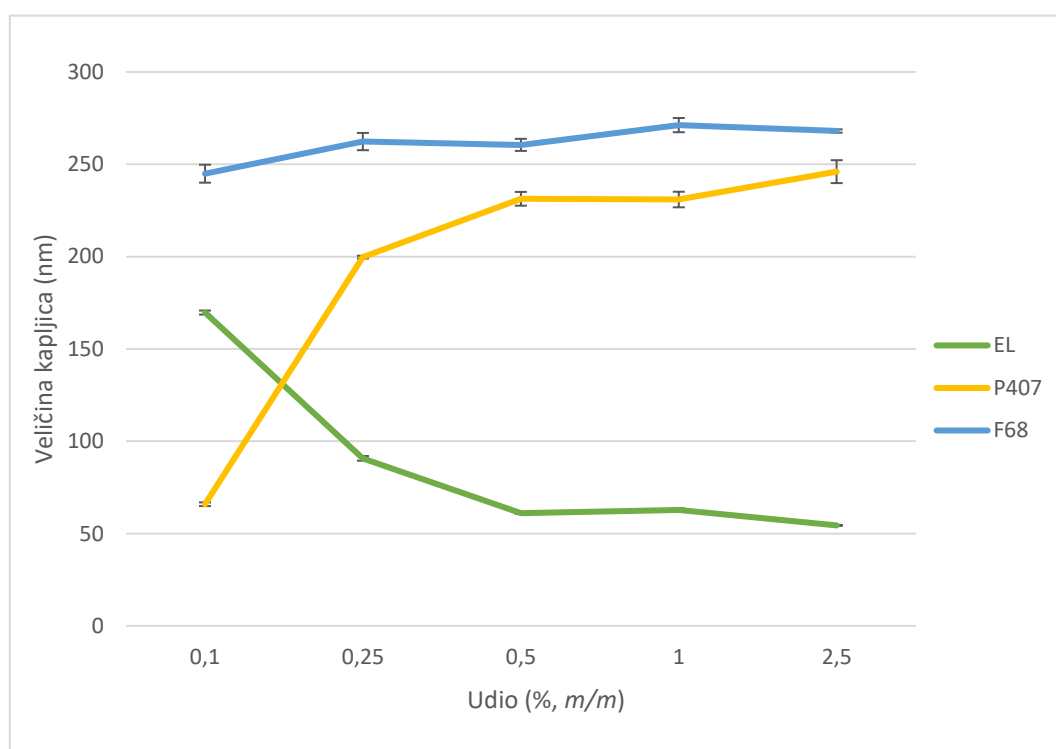
U prvoj fazi razvoja pripravljene su U/V nanoemulzije stabilizirane s tri neionske PAT: Kolliphor® EL (ester polioksietilena i ricinoleinske kiseline), poloksamer 407 (Poloxamer® 407) i 188 (Pluronic® F-68) (različiti kopolimeri poli(etilen-oksida) i poli(propilen-oksida)). Cilj ove faze razvoja bio je prirediti nanoemulziju stabiliziranu neionskom PAT male veličine kapljica unutarnje faze i dobre stabilnosti. Odabrani surfaktanti prikladni su za oftalmičku primjenu (*FDA Drug Databases, Inactive Ingredients in Approved Drug Products*). Za izradu U/V nanoemulzija, HLB vrijednosti surfaktanata trebaju biti veće od 10 (Singh i ostali, 2020; Zhang i ostali, 2020). Uspješna priprava nanoemulzija korištenjem predmetnih PAT opisana je u literaturi (Kolliphor® EL (HLB 12-14) (Jurišić Dukovski i ostali, 2020), Poloxamer® 407 (HLB=18) (Li i ostali, 2016) te Pluronic® F-68 (HLB= 29) (Jurišić Dukovski i ostali, 2019)).

Udio uljne faze u oftalmičkim nanoemulzija može biti do 10%, a ovisi o topljivosti djelatne tvari u uljnoj fazi (Jurišić Dukovski i ostali, 2020), viskoznosti formulacije (Tamilvanan i Benita, 2004) te optičkim svojstvima formulacije s ciljem izbjegavanja замуćenosti vida nakon primjene (Jurišić Dukovski i ostali, 2019). U ovom radu odabran je udio uljne faze Capryol™

90 od 5% (*m/m*), čime bi se s obzirom na topljivost loteprednol etabonata osigurala odgovarajuće doza lijeka u formulaciji.

Pripravljene su nanoemulzije s neionskim PAT udjela od 0,10 do 2,5%. Pripravljeno je ukupno 15 formulacija.

Veličina kapljica unutarnje faze je važan parametar za stabilnost nanoemulzija, k tome mala veličina kapljice osigurava veću površinu za interakciju s mucinima iz suznog filma kao i veću površinu za oslobađanje lijeka (Patel i ostali, 2016; Lallemand i ostali, 2012). Veličina čestica pripremljenih nanoemulzija određena je uređajem Zetasizer Ultra dan nakon njihove pripreve. Rezultati su prikazani u grafičkom prikazu:

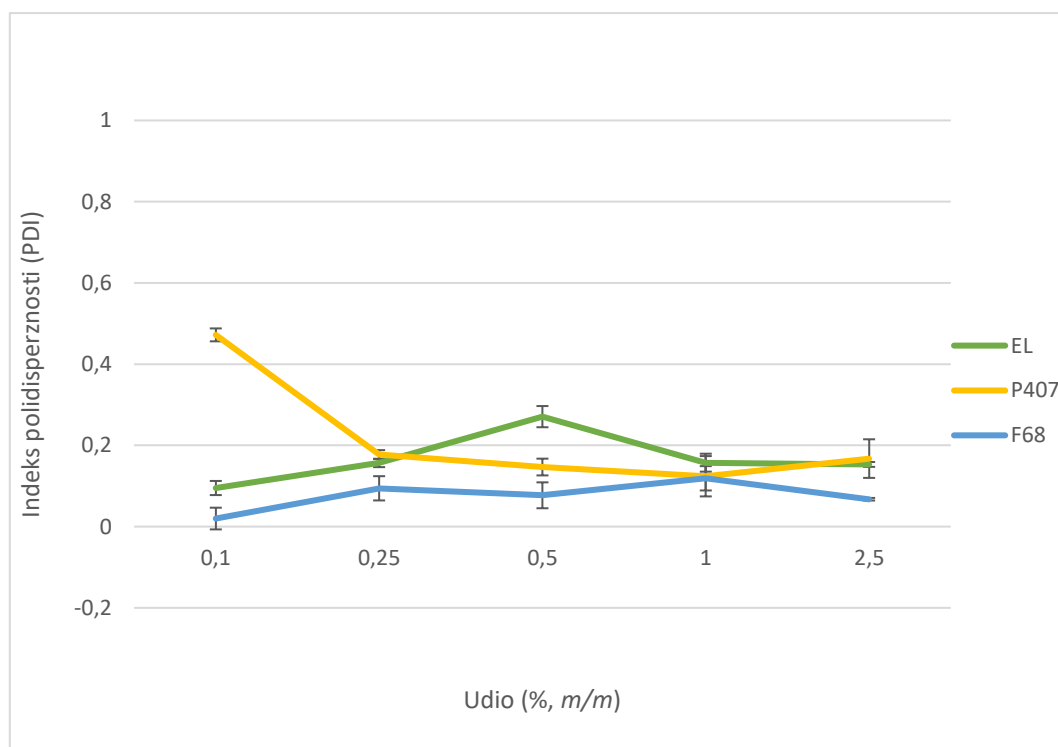


Slika 5. Ovisnost prosječne veličine kapljica nanoemulzija o udjelu neionske PAT: Kolliphora® EL, Poloxamera® 407 i Pluronica® F-68. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

Sve pripravljene nanoemulzije imale su prosječnu veličinu kapljica unutarnje faze manju od 300 nm. Nanoemulzije stabilizirane Kolliphorom® EL karakterizirala je najmanja prosječna veličina kapljica unutarnje faze, a zabilježeno je i očekivano smanjenje veličina kapljica s porastom udjela PAT. Očekivano smanjenje veličine kapljica tumači se povećanjem broja molekula PAT na granici faza ulje/voda te posljedičnim smanjenjem međufazne napetosti, što rezultira kapljicama manje veličine (Zhang i ostali, 2020). Nasuprot tome, dolazi do značajnog porasta prosječne veličine kapljica unutarnje faze nanoemulzija s Poloxamerom® 407 s

porastom koncentracije PAT. Nanoemulzije pripravljene s Pluronicom® F-68 karakterizira najveća prosječna veličina kapljica te nije uočen značajan utjecaj koncentracije PAT na veličinu kapljica.

Indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI) predstavlja mjeru rasapa veličine kapljica unutarnje faze oko prosječne vrijednosti, a vrijednosti se kreću od 0 do 1. Potpuno ujednačene, monodisperzne nanoemulzije karakterizira PDI od 0, a polidisperzne nanoemulzije čije su kapljice unutarnje faze prisutne u vrlo različitim veličinama karakterizira PDI od 1. S obzirom na to da nije moguće postići potpunu ujednačenost veličina kapljica, nanoemulzije se smatraju monodisperznima kada je njihov PDI manji od 0,2 (Singh i ostali, 2017). Ujednačenost veličine kapljica unutarnje faze vrlo je važan parametar stabilnosti nanoemulzija (Patel i ostali, 2016). Rezultati određivanja indeksa polidisperznosti s različitim neionskim PAT prikazani su slikom 6.



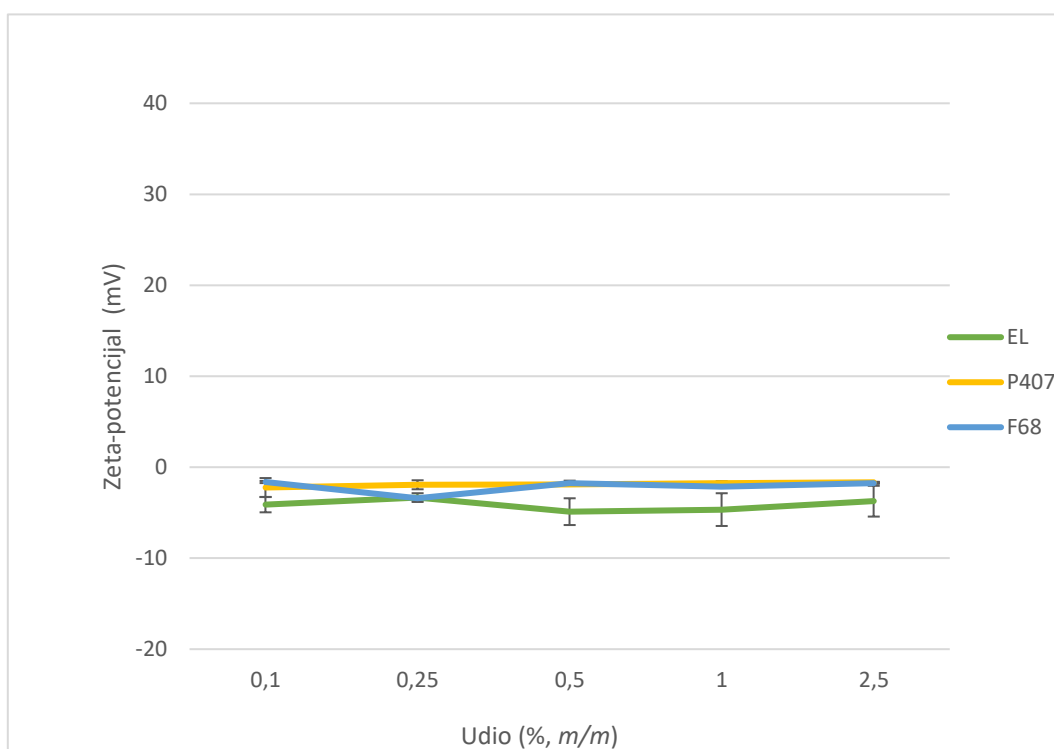
Slika 6. Ovisnost indeksa polidisperznosti (PDI) kapljica unutarnje faze nanoemulzija o udjelu neionske PAT: Kolliphora® EL, Poloxamera® 407 i Pluronica® F -68. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=3).

Dobivene vrijednosti indeksa polidisperznosti kapljica unutarnje faze nanoemulzija s Kolliphorom® EL manje su od 0,3. Korištenjem Poloxamera® 407 pri koncentracijama višim od 0,1% (m/m), vrijednosti PDI manje su od 0,2, dok je PDI kapljica unutarnje faze nanoemulzija s Pluronicom® F-68 bio manji od 0,15. Sve vrijednosti stoga ukazuju na relativno

usku raspodjelu veličine kapljica unutarnje faze. Iz grafičkog prikaza uočavamo da udio Kolliphora® EL i Pluronica® F-68 nema izrazitog utjecaja na indeks polidisperznosti, dok se porastom udjela u rasponu od 0,1% do 1% Poloxamera® 407 značajno smanjuje vrijednost PDI-a.

Zeta-potencijal je mjera elektrostatskog odbijanja ili odbijanja naboja između kapljica unutarnje faze nanoemulzija te je jedan od temeljnih parametara za koje se zna da utječu na stabilnost nanoemulzija koje su stabilizirane ionskim PAT, a veća vrijednost upućuje na bolju stabilnost sustava (Daull i ostali, 2014). Visoka vrijednost zeta-potencijala ne očekuje se kod nanoemulzija stabiliziranim neionskim PAT jer je glavni mehanizam stabilizacije neionskim PAT je sterička stabilizacija.

Odnos zeta-potencijala i različitih udjela neionskih PAT prikazan je slikom 7.



Slika 7. Ovisnost zeta-potencijala kapljica unutarnje faze nanoemulzija o udjelu Kolliphora® EL, Poloxamera® 407 i Pluronica® F-68. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

Iz grafičkog prikaza vidimo da su vrijednosti zeta-potencijala svih pripremljenih nanoemulzija blago negativne te ne ovise značajno o udjelu niti o vrsti PAT. Nanočestice koje imaju zeta-potencijal između -10mV i +10mV se smatraju neutralnima (Clogston i Patri, 2011), a dobiveni rezultati su između -4,886±1,47 mV i -1,627±0,12 mV. Nanoemulzije stabilizirane neionskim

PAT su očekivano neutralne, a niske negativne vrijednosti vjerojatno su rezultat negativnog naboja slobodnih masnih kiselina na površini kapljica.

Sve pripravljene nanoemulzije bile su homogene netransparentne tekućine, mliječno bijele boje. Vizualnim praćenjem stabilnosti uočeno je razdvajanje faza pojedinih nanoemulzija nakon 2 mjeseca čuvanjem pri +4°C. Razdvajanje se dogodilo kod nanoemulzija s Poloxamerom® 407 i Pluronicom® F-68 i kod nanoemulzije s najmanjom koncentracijom Kolliphora® EL (0,1% (*m/m*)) te navedene nisu razmatrane u daljnjim eksperimentima.

S obzirom da je za sigurnost oftalmičke primjene važno izbjegavati visoke koncentracije PAT (Li i ostali, 2016), temeljem fizičko-kemijske karakterizacije za daljnji razvoj odabrane su nanoemulzije s PAT Kolliphor® EL u udjelu od 0,25 i 0,50% (*m/m*).

Druga faza razvoja nanoemulzija

U drugoj fazi razvoja proveden je probir vrste lecitina. Lecitin je smjesa fosfolipida s primjesama glikolipida i ulja, pri čemu je najzastupljeniji fosfolipid fosfatidilkolin i fosfatidiletanolamin koji su sastavni dio prirodnog suznog filma i važni su za njegovu stabilnost (Jurišić Dukovski i ostali, 2020). Probir je napravljen između 3 vrste lecitina s različitim udjelom fosfatidilkolina: Lipoid® S45 (bezmasni sojin lecitin sa 45% fosfatidilkolina), Lipoid® S75 (bezmasni sojin lecitin sa 70% fosfatidilkolina) i Lipoid® S100 (fosfatidilkolin iz sojinog lecitina bez masti).

Radi probira lecitina odabran je jednak maseni udio lecitina (0,25 % (*m/m*)) te neionske PAT Kolliphora® EL (2,5 % (*m/m*)) u svim formulacijama za pripravu nanoemulzija. Pripravljena je i kontrolna nanoemulzija bez lecitina. Rezultati određivanja prosječne veličine kapljica, PDI i zeta-potencijala prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Prosječna veličina, PDI i zeta-potencijal kapljica unutarnje faze nanoemulzija s različitom vrstom lecitina.

Formulacija	Veličina kapljica (nm)	Indeks polidisperznosti	Zeta-potencijal (mV)
EL 5	56,14 ± 0,89	0,28 ± 0,03	-1,78 ± 0,66
EL 5 - S 45	63,40 ± 35,78	0,25 ± 0,12	-3,12 ± 0,42
EL 5 - S 75	74,89 ± 1,24	0,28 ± 0,02	-6,66 ± 0,34
EL 5 – S 100	185,60 ± 3,69	1,16 ± 0,03	-4,08 ± 0,11

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

Razvidan je porast prosječne veličine čestica i indeksa polidisperznosti s porastom udjela fosfatidilkolina. Veličina kapljica nanoemulzija pripremljenih s lecitinima Lipoid® S45 i S75 je optimalna, manja od 100 nm, a PDI vrijednosti su ispod 0,3. S druge strane, nanoemulzija s lecitinom Lipoid® S100 pokazuje najveću prosječnu veličinu čestica i vrlo široku raspodjelu veličine čestice te stoga nije razmatrana u daljnjim eksperimentima.

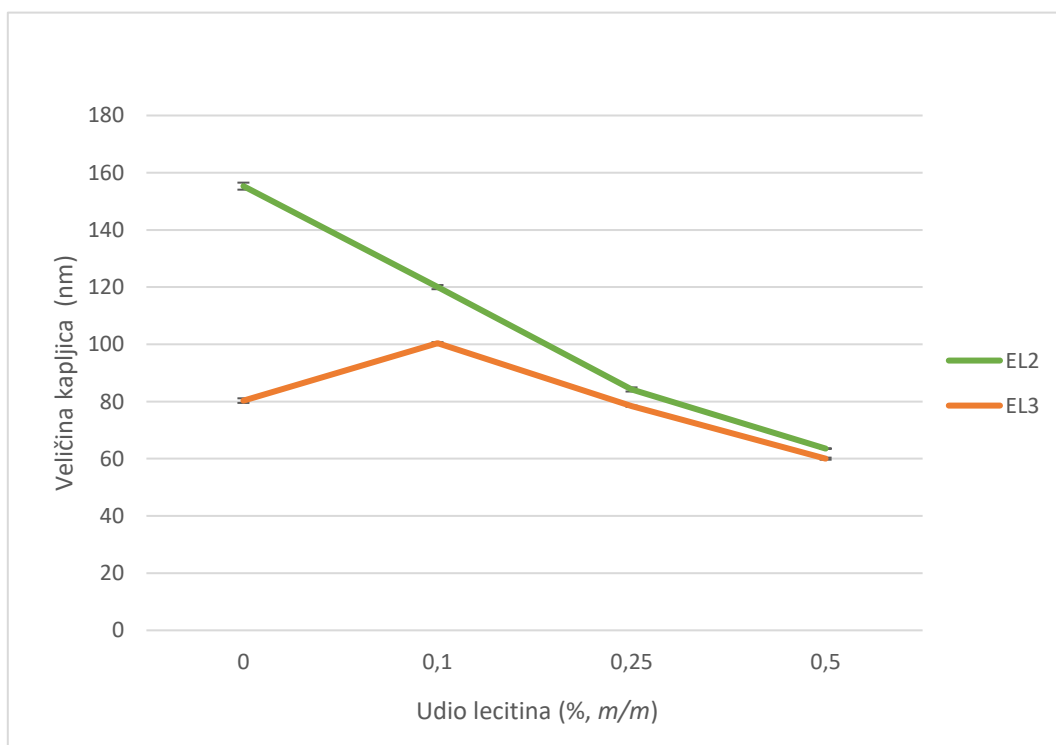
Zeta-potencijal svih pripremljenih nanoemulzija je bio blago negativan. Naime, kapljice unutarnje faze nanoemulzija s lecitinom imaju negativan naboj zbog prisutnosti negativno nabijenih fosfolipida, slobodnih masnih kiselina i fosfatidne kiseline (Klang i Valenta, 2011).

Za daljnji razvoj formulacije, odabran je Lipoid® S75 zbog većeg udjela fosfatidilkolina, a uz to dovoljno malu veličinu kapljica unutarnje faze ($74,89 \pm 1,24$).

Treća faza razvoja nanoemulzija

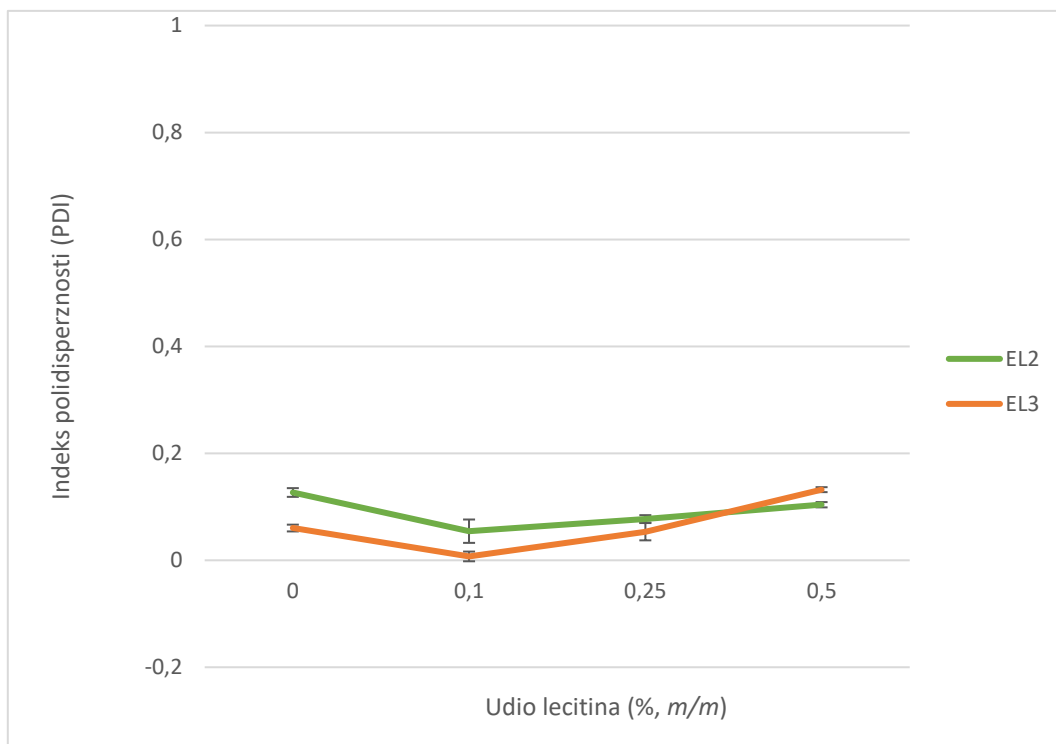
U trećoj fazi razvoja nanoemulzija proveden je probir udjela neionske PAT i udjela odabranog tipa lecitina Lipoida® S75. Udio lecitina Lipoida® S75 variran je u rasponu od 0,1 do 0,5% (*m/m*), a udio Kolliphora® EL u formulaciji iznosio je 0,25 i 0,5% (*m/m*).

Rezultati određivanja prosječne veličine kapljica unutarnje faze o udjelu lecitina Lipoida® S75 i Kolliphora® EL prikazani slikom 8.



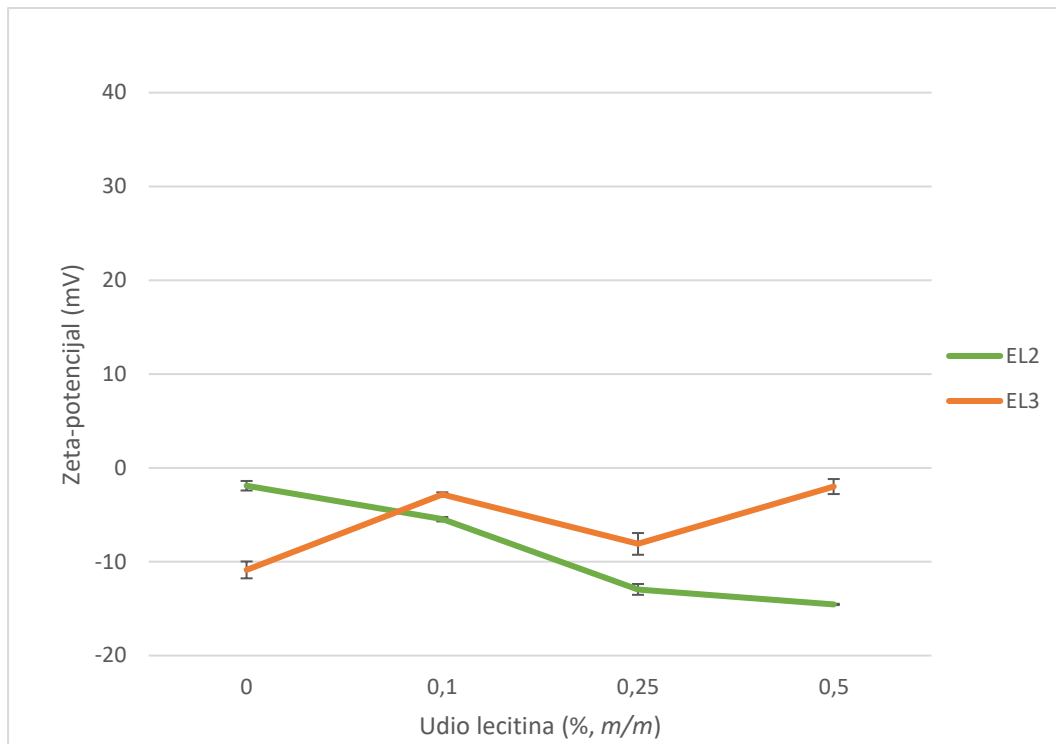
Slika 8. Ovisnost prosječne veličine kapljica unutarnje faze nanoemulzija o udjelu lecitina Lipoida® S45 i neionske PAT Kolliphora® EL. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=3).

Iz grafičkog prikaza uočavamo da prosječna veličina kapljica unutarnje faze opada s porastom udjela lecitina Lipoida® S75 (Slika 7). Poznato je da kombinacija lecitina s drugom hidrofilnijom PAT, u ovom slučaju Kolliphor® EL, može dovesti do stvaranja nanoemulzija sa smanjenom veličinom kapljica i povećanom stabilnošću (Jurišić Dukovski i ostali, 2020).



Slika 9. Ovisnost indeksa polidisperznosti (PDI) kapljica nanoemulzija o udjelu lecitina Lipoida® S45 i neionske PAT Kolliphora® EL. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=3).

Vrijednosti indeksa polidisperznosti su ispod 0,2 (Slika 9), stoga zaključujemo da su pripravljene nanoemulzije vrlo uske raspodjele veličina, a što upućuje na njihovu odgovarajuću stabilnost.



Slika 10. Ovisnost zeta-potencijala kapljica nanoemulzija o udjelu lecitina Lipoida® S45 i neionske PAT Kolliphora® EL. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$).

Iz grafičkog prikaza na Slici 10 uočavamo da se zeta-potencijal kapljica unutarnje faze nanoemulzija stabiliziranih s 0,25% (*m/m*) Kolliphora® EL smanjuje povećanjem udjela lecitina Lipoida® S75, dok kod nanoemulzija stabiliziranih s 0,5% (*m/m*) Kolliphora® EL dolazi do male pozitivne promjene zeta-potencijala o udjelu lecitina.

Pripravljene nanoemulzije bile su homogene, mliječno bijele tekućine. Vizualnim praćenjem nije uočeno razdvajanje faza i utvrđena je stabilnost nakon 2 mjeseca čuvanjem na $+4^{\circ}\text{C}$.

Za daljnji razvoj odabrana je formulacija s 0,5 % (*m/m*) lecitina Lipoida® S75 i 0,25 % (*m/m*) Kolliphora® EL zbog najmanje veličine kapljica uljne faze ($63,55 \pm 0,13$ nm) te najmanje vrijednosti PDI ($0,10 \pm 0,005$).

Četvrta faza razvoja nanoemulzija - izrada kationskih nanoemulzija

Konačan i ključan korak u razvoju formulacije je bio priprava kationskih nanoemulzija s ciljem osiguravanja elektrostatske interakcije pozitivno nabijenih kapljica unutarnje faze nanoemulzije s negativno nabijenom mucinima na površini oka te posljedično produljenog vremena zadržavanja kapljica u prekorealnom području (Silva i ostali, 2021; Lalu i ostali, 2017; Patel i ostali, 2016). Osim toga, pozitivan naboj kationskog lipida pridonosi stabilizaciji

nanoemulzije temeljem elektrostatskog odbijanja kapljica unutarnje faze (Lallemand i ostali, 2012).

Kao kationski lipid odabran je CTAB, kvarterna amonijeva sol koja je u literaturi korištena za uspješnu pripravu stabilnih nanoemulzija (Kurpiers i ostali, 2020; Fangueiro i ostali, 2014). CTAB je korišten u udjelu od 0,1 do 1,0% (*m/m*).

Tablica 6. Prosječna veličina, PDI i zeta-potencijal kapljica unutarnje faze nanoemulzija s kationskim lipidom cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB).

Formulacija	Udio CTAB-a (% , <i>m/m</i>)	Prosječna veličina čestica (nm)	Indeks polidisperznosti	Zeta-potencijal (mV)
EL CTAB 1	0,10	360,2 ± 20,50	0,3725 ± 0,004	29,42 ± 1,47
EL CTAB 2	0,25	347,3 ± 10,50	0,2757 ± 0,003	34,68 ± 0,75
EL CTAB 3	0,50	365,7 ± 2,17	0,2615 ± 0,022	47,22 ± 1,54
EL CTAB 4	1,00	349,5 ± 1,42	0,2711 ± 0,006	53,38 ± 1,43

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

Prosječna veličina kapljica unutarnje faze nanoemulzija s CTAB-om značajno je veća od prosječne veličine kapljica nanoemulzija bez njegovog dodatka te nije uočen trend utjecaja udjela CTAB-a na veličinu kapljica unutarnje faze (Tablica 6).

Dodatak CTAB uzrokovao je i značajno povećanje vrijednosti PDI (Tablica 6), pri čemu je najveći PDI bio za nanoemulzije pripravljene s najmanjim udjelom CTAB-a (0,1% (*m/m*)). Pri većem udjelu CTAB-a, PDI je manji od 0,28 što opisuje dovoljno usku raspodjelu veličina kapljica unutarnje faze koja može osigurati odgovarajuću stabilnost nanoemulzija.

Dodatkom CTAB-a očekivano je došlo do značajnog porasta zeta-potencijala. Porast vrijednosti zeta-potencijala ovisio je o udjelu CTAB-a i pri najvećem udjelu postignut je zeta-potencijal od čak 53,38 ± 1,43 mV. Visoke vrijednosti zeta-potencijala iznad ±30 mV pretpostavka su dugoročne stabilnosti nanoemulzija stabiliziranih kationskim lipidima (Nagarwal i ostali, 2009). Pripravljene nanoemulzije dodatno su sterički stabilizirane zbog prisutnosti neionske PAT Kolliphor® EL na površini kapljica unutarnje faze. Nadalje, opisano da je zeta-potencijal kapljica nanoemulzije u rasponu od +20 mV do +40 mV osigurava njihovo produljeno vrijeme zadržavanje u prekornealnom području (Zhang i ostali, 2020).

Vizualnim pregledom kroz 30 dana skladištenja pripremljenih kationskih nanoemulzija pri $+4^{\circ}\text{C}$ nije uočeno razdvajanje faza. Nanoemulzije zadržale su izgled homogene, mliječno bijele tekućine.

ZAKLJUČAK

- Visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije uspješno su pripravljene kationske nanoemulzije uljne faze Capryol™ 90 stabilizirane neionskom PAT Kolliphorom® EL, lecitinom Lipoid® S75 te kationskim lipidom cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB).
- Razvoj formulacije proveden je u četiri faze.
- Pripremljenim nanoemulzijama određena su fizičko-kemijska svojstva: veličina kapljica, indeks polidisperznosti, zeta-potencijal i stabilnost.
- U prvoj fazi izvršen je probir neionske PAT. Nanoemulzije pripravljene s Poloxamerom® 407 i Pluronicom® F-68 imale su preveliku veličinu kapljica i pokazale su se nestabilnima. Analizom dobivenih rezultata može se zaključiti da je optimalna PAT Kolliphor® EL. Porastom udjela Kolliphor® EL uočeno je očekivano smanjenje veličine kapljica unutarnje faze.
- U drugoj fazi razvoja uspješno su pripravljene nanoemulzije dodatkom različitih vrsta lecitina i uočen je trend rasta veličine kapljica unutarnje faze i indeksa polidisperznosti porastom udjela fosfatidilkolina u lecitinu. Najprikladnijim lecitinom pokazao se Lipoid® S75 sa 70% fosfatidilkolina.
- U trećoj fazi razvoja, porastom udjela Lipoida® S75 u formulaciji uočeno je očekivano smanjenje veličine kapljica unutarnje faze.
- U četvrtoj fazi razvoja uspješno su pripravljene kationske nanoemulzije dodatkom kationskog lipida CTAB, a rezultati pokazuju da porastom njegova udjela u formulaciji, vrijednosti zeta-potencijala očekivano rastu.
- Visoke pozitivne vrijednosti zeta-potencijala u rasponu od $29,42 \pm 1,47$ do $53,38 \pm 1,43$ mV upućuju na odgovarajuću elektrostatsku stabilizaciju, dok Kolliphor® EL u formulaciji osigurava i steričku stabilizaciju. Pripravljene kationske nanoemulzije mogu se smatrati stabilnima, a što je utvrđeno praćenjem stabilnosti u realnom vremenu.

LITERATURA

Beckman K, Katz J, Majmudar P, Rostov A. Loteprednol Etabonate for the Treatment of Dry Eye Disease. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2020, 36, 497–511.

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

Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol*, 2011, 697, 63–70.

Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, Liu Z, Nelson JD, Nichols JJ, Tsubota K, Stapleton F. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf*, 2017, 15, 276–283.

Dauil P, Lallemand F, Garrigue J-S, Jean-Sébastien Garrigue C, Pharma N. Benefits of cetalkonium chloride cationic oil-in-water nanoemulsions for topical ophthalmic drug delivery. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66, 531–541.

Fangueiro JF, Andreani T, Egea MA, Garcia ML, Souto SB, Silva AM, Souto EB. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: development, characterization and cytotoxicity. *Int J Pharm*, 2014, 461, 64–73.

Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, Liu J, Gan Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov Today*, 2013, 18, 290–297.

Hafner A, Lovrić J, Romić MD, Juretić M, Pepić I, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J. Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 75, 142–150.

Helgeson ME. Colloidal behavior of nanoemulsions: Interactions, structure, and rheology. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2016, 25, 39–50.

Imperiale JC, Acosta GB, Sosnik A. Polymer-based carriers for ophthalmic drug delivery. *J Control Release*, 2018, 285, 106–141.

Janagam DR, Wu L, Lowe TL. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 122, 31–64.

Jiao J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60, 1663–1673.

- Jumelle C, Gholizadeh S, Annabi N, Dana R. Advances and limitations of drug delivery systems formulated as eye drops. *J Control Release*, 2020, 321, 1–22.
- Jurišić Dukovski B, Bračko A, Šare M, Pepić I, Lovrić J. In vitro evaluation of stearylamine cationic nanoemulsions for improved ocular drug delivery. *Acta Pharm*, 2019, 69, 621–634.
- Jurišić Dukovski B, Juretić M, Bračko D, Randjelović D, Savić S, Crespo Moral M, Diebold Y, Filipović-Grčić J, Pepić I, Lovrić J. Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: Development and optimization for dry eye disease treatment. *Int J Pharm*, 2020, 576.
- Jurišić Dukovski B. Razvoj funkcionalnih kationskih nanoemulzija za liječenje bolesti suhog oka, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2021.
- Kaur IP, Kakkar S. Nanotherapy for posterior eye diseases. *J Control Release*, 2014, 193, 100–112.
- Klang V, Valenta C. Lecithin-based nanoemulsions. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2011, 21, 55–76.
- Kolliphor® EL, 2022., <https://pharma.basf.com/products/kolliphor-el>, pristupljeno 21.5.2022.
- Kolliphor® P407, 2022., <https://pharma.basf.com/products/kolliphor-el>, pristupljeno 21.5.2022.
- Koutsoviti M, Siamidi A, Pavlou P, Vlachou M. Recent Advances in the Excipients Used for Modified Ocular Drug Delivery. *Mater (Basel, Switzerland)*, 2021, 14.
- Kurpiers M, Wolf JD, Steinbring C, Zaichik S, Bernkop-Schnürch A. Zeta potential changing nanoemulsions based on phosphate moiety cleavage of a PEGylated surfactant. *J Mol Liq*, 2020, 316, 113868.
- Lallemant F, Daull P, Benita S, Buggage R, Garrigue J-S. Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb. *J Drug Deliv*, 2012, 2012, 1–16.
- Lallemant F, Schmitt M, Bourges JL, Gurny R, Benita S, Garrigue JS. Cyclosporine A delivery to the eye: A comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 117, 14–28.
- Lalu L, Tambe V, Pradhan D, Nayak K, Bagchi S, Maheshwari R, Kalia K, Tekade RK. Novel nanosystems for the treatment of ocular inflammation: Current paradigms and future research directions. *J Control Release*, 2017, 268, 19–39.

Li X, Muller RH, Keck CM, Bou-Chacra NA. Mucoadhesive dexamethasone acetate-polymyxin B sulfate cationic ocular nanoemulsion - Novel combinatorial formulation concept. *Pharmazie*, 2016, 71, 327–333.

Mandal A, Bisht R, Rupenthal ID, Mitra AK. Polymeric micelles for ocular drug delivery: From structural frameworks to recent preclinical studies. *J Control Release*, 2017, 248, 96–116.

Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, Maiti P, Pandit JK. Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery. *J Control Release*, 2009, 136, 2–13.

Naseema A, Kovooru L, Behera AK, Kumar KPP, Srivastava P. A critical review of synthesis procedures, applications and future potential of nanoemulsions. *Adv Colloid Interface Sci*, 2021, 287, 102318.

Patel N, Nakrani H, Raval M, Sheth N. Development of loteprednol etabonate-loaded cationic nanoemulsified in-situ ophthalmic gel for sustained delivery and enhanced ocular bioavailability. *Drug Deliv*, 2016, 23, 3712–3723.

Pflugfelder SC, de Paiva CS. The Pathophysiology of Dry Eye Disease: What We Know and Future Directions for Research. *Ophthalmology*, 2017, 124, S4–S13.

Qadir A, Faiyazuddin MD, Talib Hussain MD, Alshammari TM, Shakeel F. Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. *J Mol Liq*, 2016, 214, 7–18.

Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav NP. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J Control Release*, 2018, 270, 203–225.

Savić V, Ilić T, Nikolić I, Marković B, Čalija B, Cekić N, Savić S. Tacrolimus-loaded lecithin-based nanostructured lipid carrier and nanoemulsion with propylene glycol monocaprylate as a liquid lipid: Formulation characterization and assessment of dermal delivery compared to referent ointment. *Int J Pharm*, 2019, 569.

Sheppard JD, Donnenfeld ED, Holland EJ, Slonim CB, Solomon R, Solomon KD, McDonald MB, Perry HD, Lane SS, Pflugfelder SC, Samudre SS. Effect of loteprednol etabonate 0.5% on initiation of dry eye treatment with topical cyclosporine 0.05%. *Eye Contact Lens*, 2014, 40, 289–296.

- Silva B, São Braz B, Delgado E, Gonçalves L. Colloidal nanosystems with mucoadhesive properties designed for ocular topical delivery. *Int J Pharm*, 2021, 606, 120873.
- Singh M, Bharadwaj S, Lee KE, Kang SG. Therapeutic nanoemulsions in ophthalmic drug administration: Concept in formulations and characterization techniques for ocular drug delivery. *J Control Release*, 2020, 328, 895–916.
- Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, Chourasia MK. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*, 2017, 252, 28–49.
- Swierczewska M, Crist RM, McNeil SE. Evaluating Nanomedicines: Obstacles and Advancements. *Methods Mol Biol*, 2018, 1682, 3–16.
- Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58, 357–368.
- Tayeb HH, Sainsbury F. Nanoemulsions in drug delivery: formulation to medical application. *Nanomedicine (Lond)*, 2018, 13, 2507–2525.
- Zhang J, Liu Z, Tao C, Lin X, Zhang M, Zeng L, Chen X, Song H. Cationic nanoemulsions with prolonged retention time as promising carriers for ophthalmic delivery of tacrolimus. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 144, 105229.

SAŽETAK/SUMMARY

Bolest suhog oka najčešći je oblik kronične bolesti površine oka. Današnje su terapijske opcije ograničene, a lokalni kortikosteroidi, poput loteprednol etabonata, imaju potencijal za učinkovito liječenje blage do umjerene bolesti suhog oka. U posljednje vrijeme ističu se različiti terapijski nanosustavi za sigurnu i poboljšanu terapiju bolesti oka. U/V nanoemulzije niske su toksičnosti i iritacije te velikog kapaciteta za uklapanje lijekova slabo topljivih u vodi. Također, kationske nanoemulzije imaju sposobnost produljenja zadržavanja formulacije na površini oka temeljem interakcije s negativno nabijenim mucinima, a time posljedično i povećanja bioraspoloživosti lijeka.

U ovom je diplomskom radu proveden razvoj formulacije oftalmičke kationske nanoemulzije kao inovativni farmaceutski oblik s potencijalom primjene u liječenju bolesti suhog oka. Cilj diplomskog rada bio je razvoj formulacije kationskih U/V nanoemulzija prikladnih za uklapanje loteprednol etabonata. Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije, a njihova karakterizacija je obuhvaćala određivanje veličine kapljica unutarnje faze, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala. Razvoj je proveden u četiri faze: probir vrste i udjela neionske površinski aktivne tvari, probir vrste lecitina, probir udjela lecitina te ispitivanje utjecaja dodatka kationskog lipida u formulaciji. Uspješno su pripravljene kationske nanoemulzije uljne faze Capryol™ 90 stabilizirane neionskom površinski aktivnom tvari Kolliphorom® EL, lecitinom Lipoidom® S75 te kationskim lipidom cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB) kao nositeljem pozitivnog naboja. Rezultati pokazuju da visoke pozitivne vrijednosti zeta-potencijala pripremljenih nanoemulzija upućuju na odgovarajuću elektrostatsku stabilizaciju kationskim lipidom CTAB-om; Kolliphor® EL u formulaciji dodatno osigurava steričku stabilizaciju; Lipoid® S75 sadrži smjesu fosfolipida koji su sastavni dio prirodnog suznog filma i pridonose njegovoj stabilnosti.

Dry eye disease is the most common form of chronic ocular surface disease. Current therapy is limited, and topical corticosteroids such as loteprednol etabonate have the potential to effectively treat mild to moderate dry eye disease. Recently, various new therapeutic nanosystems have been highlighted for safe and improved treatment of eye diseases. O/W nanoemulsions are nontoxic and nonirritant and have a high capacity to incorporate poorly water-soluble drugs. Moreover, cationic nanoemulsions have the ability to prolong the retention on the surface of the eye due to interaction with negatively charged mucins, and consequently increase the bioavailability of the drug.

In this thesis, the development of the formulation of ophthalmic cationic nanoemulsion as an innovative pharmaceutical form with the potential in the treatment of dry eye disease was carried out. The aim of the thesis was the development of the formulation of cationic O/W nanoemulsions suitable for incorporating loteprednol etabonate. Nanoemulsions were prepared by microfluidization, and their characterization included the determination of the internal phase droplet size, polydispersity index and zeta-potential. The development was carried out in four phases: screening of the type and content of non-ionic surfactant, screening of the type of lecithin, screening of the lecithin content and screening of the cationic lipid content. Cationic nanoemulsions of oil phase Capryol™ 90 stabilized with nonionic surfactant Kolliphor® EL, lecithin Lipoid® S75 and cationic lipid cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as a positive charge carrier were successfully prepared. The results show that high positive zeta-potential values of the prepared nanoemulsions indicate adequate electrostatic stabilization by the cationic lipid CTAB; Kolliphor® EL in the formulation additionally provides steric stabilization; Lipoid® S75 contains a mixture of phospholipids that are an integral part of the natural tear film and contribute to its stability.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Razvoj oftalmičkih nanoemulzija s kationskim lipidom cetiltrimetilamonijevim bromidom

Petra Parac

SAŽETAK

Bolest suhog oka najčešći je oblik kronične bolesti površine oka. Današnje su terapijske opcije ograničene, a lokalni kortikosteroidi, poput loteprednol etabonata, imaju potencijal za učinkovito liječenje blage do umjerene bolesti suhog oka. U posljednje vrijeme ističu se različiti terapijski nanosustavi za sigurnu i poboljšanu terapiju bolesti oka. U/V nanoemulzije niske su toksičnosti i iritacije te velikog kapaciteta za uklapanje lijekova slabo topljivih u vodi. Također, kationske nanoemulzije imaju sposobnost produljenja zadržavanja formulacije na površini oka temeljem interakcije s negativno nabijenim mucinima, a time posljedično i povećanja bioraspoloživosti lijeka. U ovom je diplomskom radu proveden razvoj formulacije oftalmičke kationske nanoemulzije kao inovativni farmaceutski oblik s potencijalom primjene u liječenju bolesti suhog oka. Cilj diplomskog rada bio je razvoj formulacije kationskih U/V nanoemulzija prikladnih za uklapanje loteprednol etabonata. Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije, a njihova karakterizacija je obuhvaćala određivanje veličine kapljica unutarnje faze, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala. Razvoj je proveden u četiri faze: probir vrste i udjela neionske površinski aktivne tvari, probir vrste lecitina, probir udjela lecitina te ispitivanje utjecaja dodatka kationskog lipida u formulaciji. Uspješno su pripravljene kationske nanoemulzije uljne faze Capryol™ 90 stabilizirane neionskom površinski aktivnom tvari Kolliphor® EL, lecitinom Lipoid® S75 te kationskim lipidom cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB) kao nositeljem pozitivnog naboja. Rezultati pokazuju da visoke pozitivne vrijednosti zeta-potencijala pripremljenih nanoemulzija upućuju na odgovarajuću elektrostatsku stabilizaciju kationskim lipidom CTAB-om; Kolliphor® EL u formulaciji dodatno osigurava steričku stabilizaciju; Lipoid® S75 sadrži smjesu fosfolipida koji su sastavni dio prirodnog suznog filma i pridonose njegovoj stabilnosti.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 10 grafičkih prikaza, 6 tablica i 42 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kationska nanoemulzija, bolest suhog oka, kationski lipid, cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), propilenglikol monokaprilat, makrogol glicerol ricinoleat 35, lecitin

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Rad prihvaćen: kolovoz 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Development of ophthalmic nanoemulsions with cationic lipid cetyltrimethylammonium bromide

Petra Parac

SUMMARY

Dry eye disease is the most common form of chronic ocular surface disease. Current therapy is limited, and topical corticosteroids such as loteprednol etabonate have the potential to effectively treat mild to moderate dry eye disease. Recently, various new therapeutic nanosystems have been highlighted for safe and improved treatment of eye diseases. O/W nanoemulsions are nontoxic and nonirritant and have a high capacity to incorporate poorly water-soluble drugs. Moreover, cationic nanoemulsions have the ability to prolong the retention on the surface of the eye due to interaction with negatively charged mucins, and consequently increase the bioavailability of the drug.

In this thesis, the development of the formulation of ophthalmic cationic nanoemulsion as an innovative pharmaceutical form with the potential in the treatment of dry eye disease was carried out. The aim of the thesis was the development of the formulation of cationic O/W nanoemulsions suitable for incorporating loteprednol etabonate. Nanoemulsions were prepared by microfluidization, and their characterization included the determination of the internal phase droplet size, polydispersity index and zeta-potential. The development was carried out in four phases: screening of the type and content of non-ionic surfactant, screening of the type of lecithin, screening of the lecithin content and screening of the cationic lipid content. Cationic nanoemulsions of oil phase Capryol™ 90 stabilized with nonionic surfactant Kolliphor® EL, lecithin Lipoid® S75 and cationic lipid cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as a positive charge carrier were successfully prepared. The results show that high positive zeta-potential values of the prepared nanoemulsions indicate adequate electrostatic stabilization by the cationic lipid CTAB; Kolliphor® EL in the formulation additionally provides steric stabilization; Lipoid® S75 contains a mixture of phospholipids that are an integral part of the natural tear film and contribute to its stability.

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

Thesis includes: 36 pages, 10 figures, 6 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cationic nanoemulsion, dry eye disease, cationic lipid, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), propylene glycol monocaprylate, macrogolglycerol ricinoleate 35, lecithin

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

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

Dubravka Vitali Čepo, 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

The thesis was accepted: August 2022.