

# Nanokristali s biološki aktivnim tvarima u dermalnoj primjeni

---

**Babić, Danijela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:163:341473>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-01**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Danijela Babić**

**Nanokristali s biološki aktivnim tvarima u  
dermalnoj primjeni**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Kozmetologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ivana Pepića.

*Svojem mentoru, doc. dr. sc. Ivanu Pepiću, zahvaljujem se na stručnom vodstvu, ukazanom razumijevanju i iznimnoj susretljivosti te prenesenom znanju i savjetima koji su mi pomogli u izradi ovog rada.*

*Posebnu zahvalnost željela bih iskazati svojim roditeljima i sestri. Hvala vam što se imali strpljenja za sve moje suze u teškim trenucima, no usprkos tome čvrsto vjerovali u moj uspjeh te bili neizmjeran oslonac i podrška tijekom cijelog studiranja. Hvala vam za svaku vožnju na vlak, svako "ranojutarnje" buđenje, svaku riječ motivacije prije polaganja ispita. Još jednom, hvala vam od srca!*

*Hvala mojim dragim kolegicama i kolegama s kojima je svaka jurnjava od Kovačićeve do Domagojeve bila brža, svaki trenutak u labosu zanimljiviji i svako polaganje ispita manje stresno.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. NANOKRISTALI .....	2
1.2. FIZIČKO-KEMIJSKA SVOJSTVA NANOKRISTALA.....	4
1.2.1. BRZINA OTAPANJA .....	4
1.2.2. DEBLJINA STACIONARNOG DIFUZIJSKOG SLOJA.....	4
1.2.3. TOPLJIVOST.....	5
1.3. SPECIFIČNA BIOFARMACEUTSKA SVOJSTVA DJELATNE TVARI U OBLIKU NANOKRISTALA.....	6
1.3.1. ADHEZIVNOST.....	6
1.3.2. APSORPCIJA .....	7
1.3.3. BIORASPOLOŽIVOST.....	8
1.3.4. DJELOTVORNOST .....	9
1.4. PREGLED FARMACEUTSKO-TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA OBRADJE TVARI U OBLIK NANOKRISTALA.....	9
1.4.1. METODE POVEĆANJA VELIČINE ČESTICA.....	10
1.4.1.1. METODA TALOŽENJA.....	10
1.4.2. METODE SMANJENJA VELIČINE ČESTICA .....	12
1.4.2.1. METODA VLAŽNOG MLJEVENJA.....	12
1.4.2.1.1. METODA NISKOENERGESTSKOG VLAŽNOG MLJEVENJA .....	13
1.4.2.1.2. METODA VISOKOENERGESTSKOG VLAŽNOG MLJEVENJA .....	14
1.4.2.2. METODA VISOKOTLAČNOG HOMOGENIZIRANJA .....	14
1.4.3. KOMBINIRANI POSTUPCI.....	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	20
3. MATERIJALI I METODE .....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	22
4.1. DERMALNA PRIMJENA.....	22
4.2. PROBLEMI ISPORUKE U DERMALNOJ PRIMJENI .....	23
4.3. POTENCIJAL NANOKRISTALA U DERMALNOJ PRIMJENI.....	23
4.4. PREDNOSTI NANOKRISTALA U ODNOSU NA KONVENCIONALNE PRIPRAVKE.....	26
4.4.1 KURKUMIN KAO MODEL .....	26
4.4.2. RUTIN KAO MODEL.....	27
4.5. STABILNOST .....	28

4.5.1. PROBLEM STABILNOSTI NANOKRISTALA DJELATNE TVARI.....	29
4.6. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI .....	30
4.6.1. SLABO TOPLJIVE BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI .....	32
4.6.1.1. KVERCETIN .....	32
4.6.1.2. RUTIN.....	33
4.6.2. SREDNJE TOPLJIVE BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI .....	33
5. ZAKLJUČAK .....	37
6. LITERATURA.....	38
7. SAŽETAK / SUMMARY .....	43
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

Stjecanje novih znanja, njihova primjena i razvoj te unapređenje već postojećih znanja, ključne su značajke vrlo brzog znanstvenog napretka cjelokupne farmaceutske industrije, a posebice njezine grane, farmaceutske tehnologije. Velik broj znanstvenika ulaže napore u potrazi za novim rješenjima koji bi osigurali zadovoljavajuću potrošačku njegu i podigli kozmetičke pripravke na najveću moguću ljestvicu učinkovitosti.

Međutim, jedna od glavnih prepreka razvoju vrlo moćnih farmaceutika je slaba topljivost mnogih lijekova u vodi (Chen i sur., 2011). Iz tog razloga uvedene su nove tehnike i novi pristupi kako bi se poboljšala učinkovitost djelatnih tvari, posebno onih koji imaju slabu topljivost u vodi.

Osim slabe topljivosti u vodi, jedan od izazova ujedno je i pitanje kako dostaviti određenu djelatnu tvar na točno određeno mjesto u točno određeni sloj kože. Postoje različiti načini kojima su znanstvenici pokušali riješiti te probleme, a posljednjih dvadesetak godina poseban značaj u rješavanju tih problema pokazuje tehnologija nanokristala.

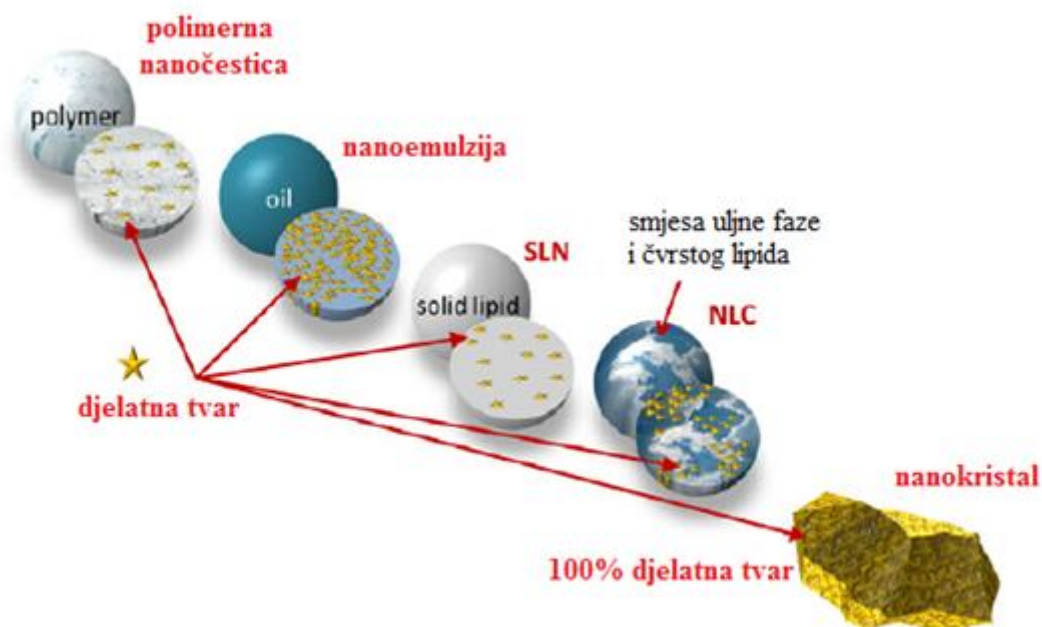
Nanokristali, kao primjer novog transportnog sustava, obećavajuće su rješenje za razvoj spomenutih formulacija i postizanje bolje učinkovitosti slabo topljivih biološki aktivnih tvari.

U razvoju formulacija važno je zadovoljiti tri osnovna čimbenika: sigurnost, učinkovitost i stabilnost. Iako je tehnologija nanokristala proučavana iznimno detaljno u posljednjih nekoliko godina, njihova primjena u farmaceutskoj industriji je prvenstveno ograničena zbog zabrinutosti za stabilnost. Kompetencija između potencijalne nestabilnosti nanokristala i sposobnost nanokristala kako bi se zadovoljili zahtjevi za održavanjem farmaceutske stabilnosti, promovirat će razvoj tehnologije nanokristala.

Stoga, valja napomenuti da će razvoj i primjena znanja nanotehnologije zasigurno doprinijeti učinkovitijem i sigurnijem liječenju brojnih stanja.

## 1.1. NANOKRISTALI

Nanokristali djelatne tvari pripadaju skupini suvremenih terapijskih nanosustava kojima se nastoje poboljšati farmaceutsko-tehnološka (primjerice topljivost, fizička i kemijska stabilnost) i/ili biofarmaceutska (primjerice permeabilnost i bioraspoloživost) svojstva djelatne tvari (Lovrić i sur., 2015). Razvoj nanokristala uslijedio je zbog nedostataka postojećih tehnika za dostavu djelatnih tvari u ciljanoj terapiji. U odnosu na druge terapijske nanosustave, gdje je omjer djelatne tvari prema drugim sirovinama koje čine nanonosač, nepovoljan zbog niskog uklapanja, nanokristali djelatne tvari građeni su gotovo u potpunosti od djelatne tvari, kao što prikazuje slika 1, dok samo mali dio takvih nanosustava čine pomoćne tvari (stabilizatori) koji su odobreni za izradu lijekova (Lovrić i sur., 2015).



**Slika 1.** Osnovna struktura polimernih nanočestica, nanoemulzija, čvrstih lipidnih nanočestice (SLN) i nanostrukturiranih nosača lipida (NLC) (= sve čestice matriksa) nasuprot nanokristalima lijeka. SLN su izrađeni samo od krutog lipida, NLC od smjese krutog i tekućeg lipida (ulja), ali oboje su čvrstog stanja na tjelesnoj temperaturi. Matriksni sustavi imaju djelatnu tvar raspodijeljenu u cijelom matriksu i / ili adsorbiranu na njihovu površinu ( $\ll$  100% djelatne tvari); nanokristali se sastoje od 100% djelatne tvari (prilagođeno prema Müller i sur., 2011).

Visoki udio djelatne tvari čini nanokristale vrlo učinkovitim u transportu lijeka u ili do stanice, dostižući dovoljno visoku terapijsku koncentraciju za farmakološki učinak (Müller i sur., 2011).

Osim toga, još jedna od istaknutih prednosti nanokristala je činjenica da se mogu isporučiti različitim transportnim putevima kako bi se stvorili sustavi s produljenim vremenom zadržavanja.

Nanokristali su nanonizirane čestice teško topljivih djelatnih tvari, odnosno čestice smanjene na veličinu manju od 1000 nm. To su agregati 100-10000 atoma udruženih u „klastere“ (Pepić, 2014).

Ove čestice mogu postojati i u amorfnom stanju, zbog čega se naziv „nanokristal“ smatra nedovoljno odgovarajućim. Da li će doći do stvaranja kristalne ili amorfne forme ovisiti će o proizvodnoj metodi i zahtjevima. Smanjivanjem veličine čestica krutine djelatne tvari povećava se broj čestica i specifična površina krutine, dok se istodobno smanjuje promjer čestica krutine (Lovrić i sur., 2015).

Nanokristali su izrađeni od djelatnih tvari koje su slabo topljive. Izradom slabo topljivih djelatnih tvari u oblik nanokristala omogućeno je rješavanje mnogobrojnih biofarmaceutskih problema kao što su primjerice preniska bioraspoloživost nakon oralne primjene, preniska penetracija u kožu (niska dermalna biodostupnost), preveliki volumen ubrizgavanja za intravensku primjenu te neželjene nuspojave nakon intravenske primjene klasičnih farmaceutskih oblika lijekova (npr. otopine sa solubiliziranom djelatnom tvari) (Müller i sur., 2011).

Značajke nanokristala, kao što su povećana topljivost, povećana brzina otapanja te povećana adhezivnost upravo su temelj prevladavanja gore spomenutih biofarmaceutskih problema. Takve značajke se javljaju jer prijenos čestica iz raspona makrodimenzija do nanodimenzija mijenja njihova fizičko-kemijska svojstva (Müller i sur., 2011).



## 1.2. FIZIČKO-KEMIJSKA SVOJSTVA NANOKRISTALA

### 1.2.1. BRZINA OTAPANJA

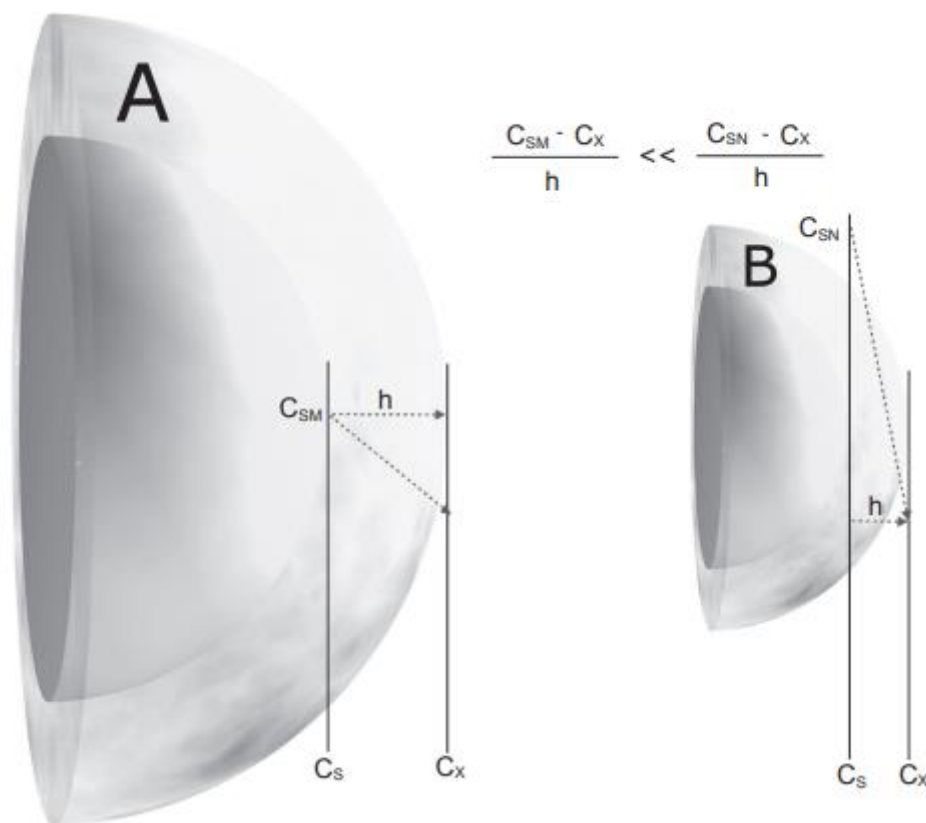
Brzina otapanja krutina u otapalu  $dc_x/dt$  može se opisati Noyes-Whitneyjevom jednadžbom:

$$\frac{dc_x}{dt} = k \times A \times (c_s - c_x)$$

gdje je  $k$  konstanta brzine otapanja (tzv. intrinzička konstanta koja uključuje viskoznost otopine; što je veća viskoznost manja je brzina otapanja),  $A$  specifična površina krutine koja se otapa,  $c_s$  topljivost krutine, a  $c_x$  koncentracija djelatne tvari u otopini u vremenu  $t$  (Lovrić i sur., 2015). Uzimajući u obzir zakonitost Noyes-Whitneyjeve jednadžbe vidljivo je da će smanjenje veličine čestice dovesti po povećane specifične površine krutine te u konačnici do povećane brzine otapanja. Smanjivanjem veličine jedne makročestice krutine djelatne tvari promjera 100  $\mu\text{m}$  na promjer od 10  $\mu\text{m}$  standardnim postupkom mikronizacije, u sustavu od jedne makročestice nastaje 1000 mikročestica pri čemu se istodobno 10 puta povećava specifična površina krutine djelatne tvari. Stoga, mikronizacija predstavlja prikladan način za uspješno poboljšanje bioraspoloživosti lijekova gdje je brzina otapanja ograničavajući korak. Međutim, ako se umjesto postupka mikronizacije primijeni postupak nanonizacije i veličina jedne makročestice promjera 100  $\mu\text{m}$  smanji do veličine od 200 nm, tada u sustavu od jedne makročestice nastaje 125 000 000 nanočestica pri čemu se istodobno 5 000 puta povećava specifična površina krutine djelatne tvari (Lovrić i sur., 2015).

### 1.2.2. DEBLJINA STACIONARNOG DIFUZIJSKOG SLOJA

Nadalje, treba spomenuti smanjenje debljine stacionarnog difuzijskog sloja otapala oko nanokristala odnosu na klasične mikro- i makrokristale (slika 2), a to ujedno rezultira značajnim povećanjem koncentracijskog gradijenta (Lovrić i sur., 2015).



**Slika 2.** Usporedba mikrokristala (A) i nanokristala (B), njihove površinske zakrivljenosti i koncentracijskog gradijenta preko debljine stacionarnog difuzijskog sloja ( $h$ ) (prilagođeno prema Junghanns, 2008).

### 1.2.3. TOPLJIVOST

Topljivost djelatne tvari je glavni ograničavajući parametar koji određuje put i obim njezinog prijenosa kroz kožnu barijeru. Riječ je o fizičko-kemijskom svojstvu djelatne tvari koje se definira kao maksimalna količina djelatne tvari koja može biti otopljena u točno određenom otapalu na točno određenoj temperaturi. Međutim, usitnjavanjem takve tvari do nanometarskog raspona dimenzija njezina topljivost se povećava, a što je moguće objasniti Ostwald-Freundlichovom jednadžbom koja opisuje odnos između topljivosti krute tvari i njezine veličine čestica:

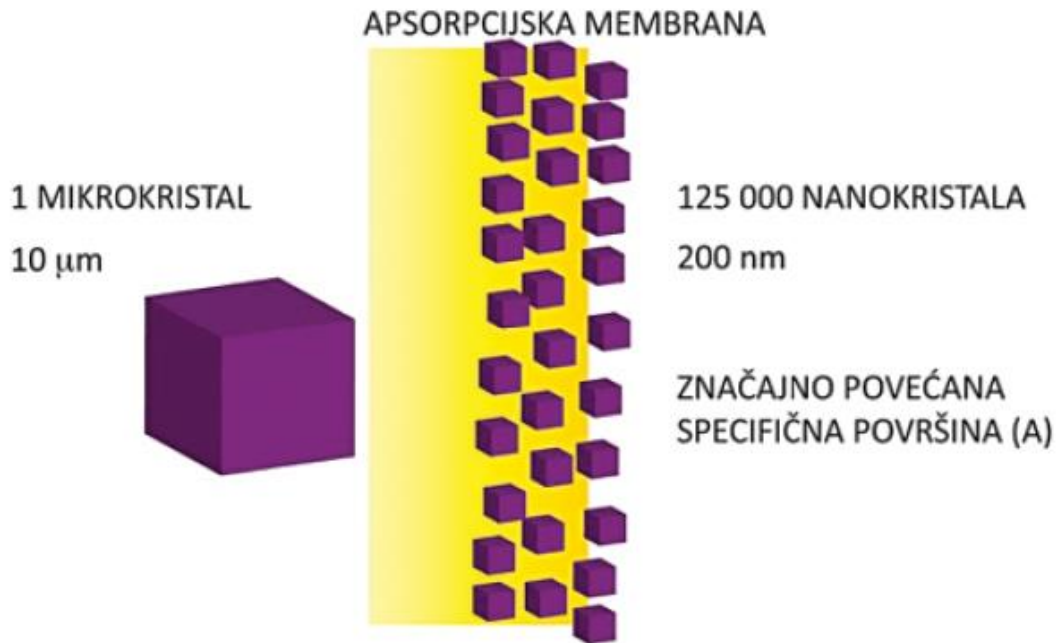
$$\log \frac{c_s}{c_x} = \frac{2sV}{2,303RTpr}$$

gdje je  $c_s$  topljivost krutine,  $c_x$  koncentracija otopine u vremenu  $t$ ,  $s$  površinska napetost na graničnoj površini čvrsto/tekuće,  $V$  molarni volumen čestica krutine,  $R$  opća plinska konstanta,  $T$  termodinamička temperatura,  $\rho$  gustoća krutine,  $r$  polumjer čestica krutine (Lovrić i sur., 2015). Iz jednadžbe se može zaključiti da je topljivost obrnuto proporcionalna veličini čestice djelatne tvari, prema tome smanjenjem veličine čestica krutine ( $r$ ) povećava njezina topljivost ( $c_s$ ). Osim o veličini čestice djelatne tvari, topljivost uvelike ovisi i o strukturi kristalne rešetke djelatne tvari. Poznato je da djelatna tvar u amorfnom stanju posjeduje bolju topljivost u odnosu na identičnu djelatnu tvar u kristaliničnom obliku, zahvaljujući većoj energiji kristalne rešetke.

### **1.3. SPECIFIČNA BIOFARMACEUTSKA SVOJSTVA DJELATNE TVARI U OBLIKU NANOKRISTALA**

#### **1.3.1. ADHEZIVNOST**

Usporedbom s mikročesticama, djelatne tvari u obliku nanokristala, posjeduju izuzetnu značajku povećanja adhezivnosti na površini stanice / membrane, odnosno ciljnom mjestu. Povećana adhezivnost nanokristala produžuje vrijeme kontakta, ali i vrijeme zadržavanja djelatne tvari na ciljnom mjestu te posljedično povećava sposobnosti prijanjanja i skraćuje vrijeme adsorpcije na ciljno mjesto. Poboljšanje adhezivnosti djelatne tvari u obliku nanokristala posljedica je značajnog povećanja broja čestica nanokristala i njihove specifične površine postupcima nanoniziranja (slika 3) (Lovrić i sur., 2015). Općenito vrijedi da veliki broj malih čestica puno bolje adsorbira na površinu membrane u odnosu na jedan kontakt koji ostvaruje mikročestica.

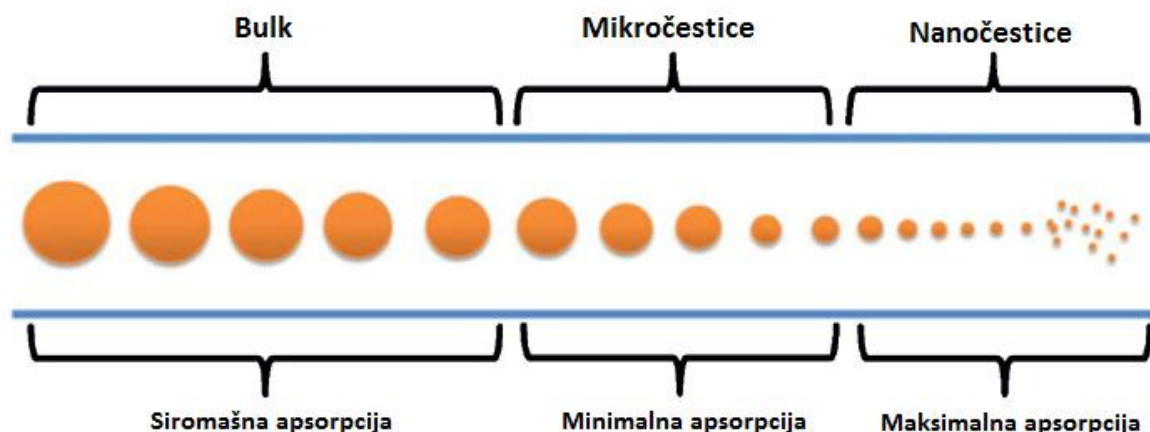


**Slika 3.** U odnosu prema jednom kontaktu čestice djelatne tvari veličine 100  $\mu\text{m}$ , smanjenjem veličine čestica djelatne tvari do 200 nm ostvaruje se 125 000 000 kontakata s apsorpcijskom membranom (prilagođeno prema Lovrić i sur., 2015).

Poboljšana svojstva adhezivnosti nanokristala djelatne tvari značajno utječu na njezina druga biofarmaceutska svojstva (primjerice, produljeno zadržavanje na apsorpcijskoj membrani, povećani obim apsorpcije, poboljšanu bioraspodivnost), posebno u slučaju oralnog i ne-parenteralnih načina primjene (primjerice, dermalne, pulmonalne, oftalmičke) gdje se djelatna tvar u primjerenom farmaceutskom obliku primjenjuje izravno na membranu preko koje se odvija njezina apsorpcija (Müller i sur., 2011).

### 1.3.2. APSORPCIJA

Dokazano je da veličina kristala djelatne tvari igra značajnu ulogu kod apsorpcije. Veliki kristali djelatne tvari imaju loša svojstva apsorpcije, za razliku od manjih čestica, bilo mikročestica ili nanočestica, koje rezultiraju boljom biodostupnošću pokazujući time značajno bolja svojstva apsorpcije (slika 4).



**Slika 4.** O veličini ovisna svojstva apsorpcije kristala djelatne tvari (prilagođeno prema Yallapu i sur., 2012).

Poboljšana apsorpcija djelatne tvari u obliku nanokristala posljedica je njihove povećane topljivosti ( $c_s$ ), brzine otapanja ( $dc_x/dt$ ) na mjestu apsorpcije te prethodno objašnjenih svojstava poboljšane adhezivnosti na apsorpcijskoj membrani (Lovrić i sur., 2015). U prilog tome pripisuje se i povećani koncentracijski gradijent između djelatne tvari uklopljene u oblik nanokristala i ciljanog područja u koji djelatna tvar stiže nakon prijenosa kroz apsorpcijsku membranu. Pored svega spomenutog treba napomenuti da će apsorpcija djelatne tvari u obliku nanokristala ponajviše ovisiti o specifičnim karakteristikama pojedinog mjesta primjene.

### 1.3.3. BIORASPOLOŽIVOST

Kao posljedica prethodno opisanih fizičko-kemijskih (povećana topljivost, brzina otapanja i specifična površina) i biofarmaceutskih (poboljšana svojstva adhezivnosti) značajki djelatne tvari u obliku nanokristala, bioraspoloživost je takve djelatne tvari značajno poboljšana u usporedbi s djelatnom tvari u mikrometarskom ili većem rasponu dimenzija (Lovrić i sur., 2015). Poboljšana bioraspoloživost djelatnih tvari u obliku nanokristala dovodi do smanjenja primjenjene doze i vremena, smanjenja mogućih nuspojava, a u konačnici rezultira većim zadovoljstvom i povjerenjem krajnjeg korisnika. Iz tog razloga uklapanje djelatne tvari u oblik nanokristala predstavlja zanimljivu i potencijalno korisnu metodu za poboljšanje bioraspoloživosti.

#### **1.3.4. DJELOTVORNOST**

Prilikom razvoja formulacije djelatne tvari u obliku nanokristala potrebno je kliničkim pokusom ispitati djelotvornost. Iz tog razloga, provode se brojna ispitivanja koja uključuju različite *in vitro* i *ex vivo* modele za ispitivanja. Korištenje organskog otapala prilikom razvoja zadane formulacije može stvarati probleme kada se rezultati ispitivanja *in vitro* nastoje potvrditi ispitivanjima *in vivo*. Učinak organskog otapala na rezultate ispitivanja na *in vivo* modelu ne bi trebalo zanemariti, a izostavljanje organskog otapala pri *in vivo* ispitivanjima najčešće rezultira taloženjem djelatne tvari zbog njezine ograničene topljivosti u fiziološkim tekućinama (Lovrić i sur., 2015). Imajući na umu navedena ograničenja, idealno rješenje za prevladavanje problema tijekom ranih faza istraživanja i razvoja novih djelatnih tvari pokazuje upravo tehnologija nanokristala. Smanjenjem veličine čestica do nanometarskih dimenzija postižu se zadovoljavajući rezultati za različita probirna *in vitro* ispitivanja, kao i za *in vivo* ispitivanja njegovog učinka. Brojnim *in vivo* ispitivanjima opažena su poboljšanja lokalne ili sistemske učinkovitosti nanonizirane djelatne tvari u usporedbi sa standardno usitnjenom djelatnom tvari (Lovrić i sur., 2015). Prethodno spomenuto poboljšanje objašnjava se svojstvima nanokristala djelatne tvari da se puno bolje apsorbiraju i postižu značajno veću bioraspoloživost. Iako im sva navedena svojstva idu u prilog, razvoj nanokristala djelatne tvari još uvijek je u relativno ranoj fazi.

#### **1.4. PREGLED FARMACEUTSKO-TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA OBRADE TVARI U OBLIK NANOKRISTALA**

Obzirom na izradu nanokristala djelatne tvari farmaceutsko-tehnološke metode moguće je podijeliti u dvije glavne skupine: (i) metode smanjenja veličine čestica (engl. *top - down methods*) te (ii) metode povećanja veličine čestica (engl. *bottom - up methods*) (Lovrić i sur., 2015).

Kako ni jedna ni druga metoda nisu u potpunosti savršene, u vidu prevladavanja određenih nedostataka razvijene su i kombinirane tehnologije.

U vidu individualizacije terapije ove metode otvaraju puteve izrade nanočestica po mjeri, nudeći pri tom zanimljive mogućnosti ugradnje višestrukih aktivnih djelatnih tvari u jedan nanonosac. Tablica prikazuje pregled raznih tehnologija za izradu nanokristala.

**TABLICA 1.** Pregled tehnologija korištene za nanokristalne formulacije (Liu, 2013).

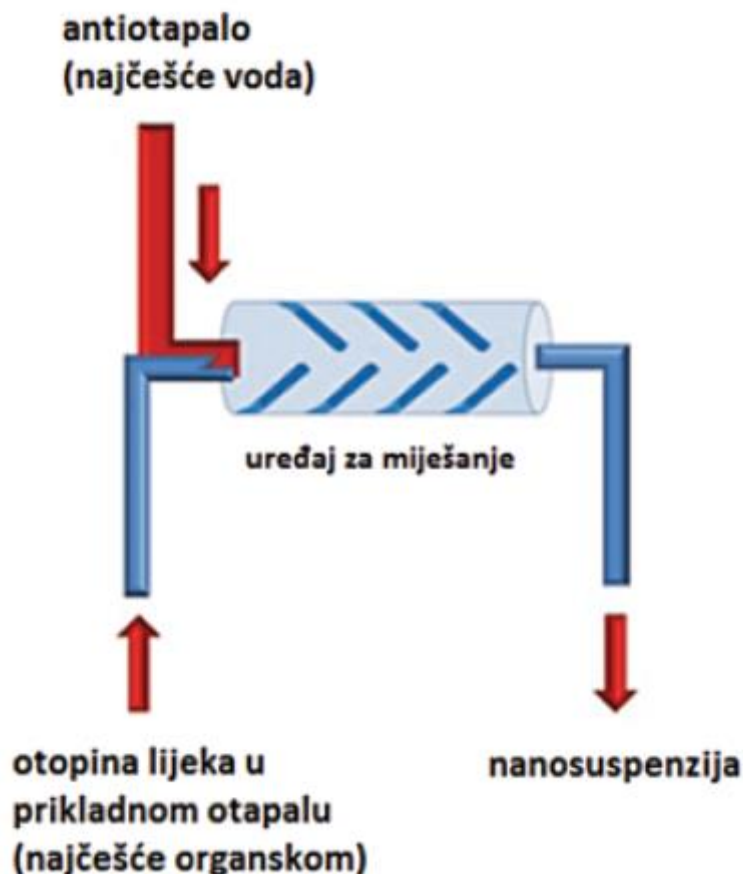
TEHNIKA		NANOKRISTAL	KOMPANIJA
Metoda taloženja	<i>Bottom-up</i>	Hydrosol <sup>®</sup>	Sandoz/ Novartis
Metoda taloženja	<i>Bottom-up</i>	Nanomorph <sup>®</sup>	Soligs/ Abbott
Metoda vlažnog mljevenja	<i>Top-down</i>	Nanocrystal <sup>®</sup>	NanoSystems/élan
Metoda visokotlačnog homogeniziranja	<i>Top-down</i>	IDD-P <sup>®</sup>	SkyePharma Canada Inc.
Metoda visokotlačnog homogeniziranja	<i>Top-down</i>	Dissocubes <sup>®</sup>	SkyPharma
Metoda visokotlačnog homogeniziranja	<i>Top-down</i>	Nanopure <sup>®</sup>	PharmaSol
Kombinirani postupci	-	NanoEdge <sup>®</sup>	Baxter
Kombinirani postupci	-	smartCrystal <sup>®</sup>	PharmaSol Berlin/ Abbott

#### 1.4.1. METODE POVEĆANJA VELIČINE ČESTICA

Metode povećanja veličine čestica djelatne tvari (engl. *bottom-up methods*) tehnike su kojom se nanokristali dobivaju taloženjem i kontroliranim rastom kristala, od otopljenih molekula do nanočestica.

##### 1.4.1.1. METODA TALOŽENJA

Mehanizam ove metode uključuje solubilizaciju djelatne tvari u pogodnom otapalu, vrlo često u različitim organskim otapalima, nakon čega slijedi taloženje otopljenje djelatne tvari dodavanjem antiotapala (slika 5). Antiotapalo se mora miješati s otapalom u kojem je otopljena djelatna tvar, ali djelatna tvar ne smije biti topljiva u antiotapalu) (Lovrić i sur., 2015).



**Slika 5.** Shematski prikaz postupka izrade nanokristala djelatne tvari metodom taloženja (prilagođeno prema Lovrić i sur., 2015).

Miješanje otopine djelatne tvari i antiotapala provodi se u uređajima za miješanje koji se osnivaju na rotaciji, mlaznom miješanju (*engl.* liquid jets) ili višekanalnom vrtložnom miješanju (*engl.* multi-inletvortex mixing) (Lovrić i sur., 2015). Osim taloženja otapalo-antiotapalo, taloženje djelatne tvari može se postići i superkritičnim fluidima te kontroliranim uklanjanjem otapala (Shegokar i Müller, 2010). Polazeći od molekula u otopini, molekule se agregiraju tvoreći nanočestice koje mogu biti amorfne ili kristalne. Izrada nanokristala djelatne tvari metodom taloženja, metoda je, koja se odlikuje nekim prednostima. Prije svega to je jednostavnost izvedbe te isto tako ne manje važna ekonomičnost same izrade, budući da metoda zahtijeva opremu niže cijene. Glavni nedostaci izrade nanokristala metodom taloženja jesu složenost kontrole takvog postupka te uspostavljanje uvjeta kontroliranog taloženja (Lovrić i sur., 2015). Također, valja spomenuti da se otapala korištena za taloženje obično teško uklanjaju, stoga postoji mogućnost zaostajanja male količine organskog otapala u konačnom pripravku. Iz tog razloga potrebna je pravilna kontrola ostatnog otapala kako bi se



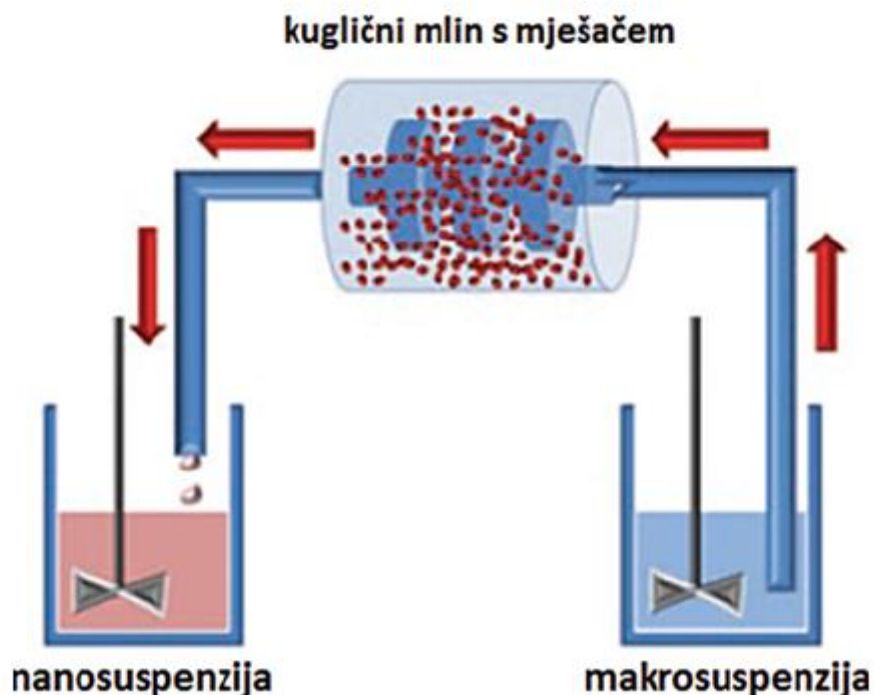
ograničila potencijalna toksičnost organskih otapala, odnosno u konačnici svela na minimum. Pravilno korištenje i pažljivo rukovanje organskim otapalima između ostalog bitno je i za sam konačni pripravak, kako bi se izbjegle potencijalne fizičke i kemijske nestabilnosti uzrokovane eventualno zaostalim otapalom te spriječile moguće promjene kristalnog stanja tijekom skladištenja.

#### **1.4.2. METODE SMANJENJA VELIČINE ČESTICA**

Metode smanjenja veličine čestica (*engl. top-down methods*) predstavljaju metode koje započinju od velikih kristala u mikrometarskim dimenzijama te se smanjuju do nanometarskih dimenzija umanjujući kristale. Ove metode mogu se podijeliti u dvije velike skupine: metode vlažnog mljevenja te metode visokotlačnog homogeniziranja. Riječ je o metodama koje koriste velike sile za smanjenje veličine čestica te mogu biti primjenjene na širok raspon djelatnih tvari s problemima topljivosti.

##### **1.4.2.1. METODA VLAŽNOG MLJEVENJA**

Vlažno mljevenje (*engl. wet milling*) najviše je korištena metoda izrade nanokristala djelatne tvari u farmaceutskoj industriji (Lovrić i sur., 2015). U početku se koristilo suho mljevenje (*engl. jet milling*) za smanjenje veličine čestica, međutim metoda nije bila dovoljno učinkovita za dobivanje čestica u nanometarskom rasponu. Upravo iz tog razloga, metoda suhog mljevenja postupno je zamijenjena metodom vlažnog mljevenja koja je ponudila bolje mogućnosti za postizanje nanonizacije. Metoda vlažnog mljevenja klasična je tehnologija koja uključuje komoru za mljevenje, disperzijski medij te odgovarajući stabilizator kako bi se postiglo odgovarajuće smanjenje veličine čestica. Ovisno o prirodi čestica djelatne tvari, metoda vlažnog mljevenja može se razvrstati na niskoenergetske i visokoenergetske procese.



**Slika 6.** Shematski prikaz postupka izrade nanokristala djelatne tvari metodom vlažnog mljevenja (prilagođeno prema Lovrić i sur., 2015).

#### **1.4.2.1.1. METODA NISKOENERGESTSKOG VLAŽNOG MLJEVENJA**

Komora za mljevenje, ispunjena kuglicama za mljevenje, stabilizatorom i disperzijskim medijem (npr. voda, pufer ili organsko otapalo), rotira u uređaju za mljevenje vrlo velikom brzinom (Liu, 2013). Prije samog pokretanja uređaja, sustav se puni djelatnom tvari u mikroniziranom obliku koja je dispergirana u disperzijskom sredstvu uz dodatak najmanje jednog stabilizatora (Lovrić i sur., 2015). Mljevenje, pomoću kuglica i mješača, kolizija čestica djelatne tvari s kuglicama za mljevenje te posljedično utjecaj jakih smičnih sila dovode do smanjenja čestica djelatne tvari u nanometarske dimenzije. Materijal upotrijebljen za izradu kuglica za mljevenje korištenih u ovoj metodi uključuje keramiku, nehrđajuđi čelik i staklo (Liu, 2013). Parametri o kojima će ovisiti rezultati ove metode brojni su, a ističu se: svojstva čestica djelatne tvari kao što su gustoća i čvrstoća, vrsta i koncentracija korištenog stabilizatora, viskoznost pripremljene suspenzije, količina djelatne tvari u komori za mljevenje kao i količina, promjer i gustoća kuglica za mljevenje te na kraju brzina i vrijeme samog procesa i utrošak energije (Liu, 2013).

Iako je sama metoda prilično učinkovita, ipak uključuje i neke nedostatke. Kako je riječ o jednoj niskoenergetskoj metodi, ona zahtijeva dugo vrijeme proizvodnje. Dugo trajanje procesa mljevenja dovodi do opasnosti od erozije kuglica za mljevenje tijekom samog procesa, a ujedno i povećava rizik mikrobiološke kontaminacije koja bi mogla u konačnici narušiti kakvoću konačnog pripravka. Također, veliki problem je i razdvajanje kuglica za mljevenje od konačnog produkta.

#### **1.4.2.1.2. METODA VISOKOENERGETSKOG VLAŽNOG MLJEVENJA**

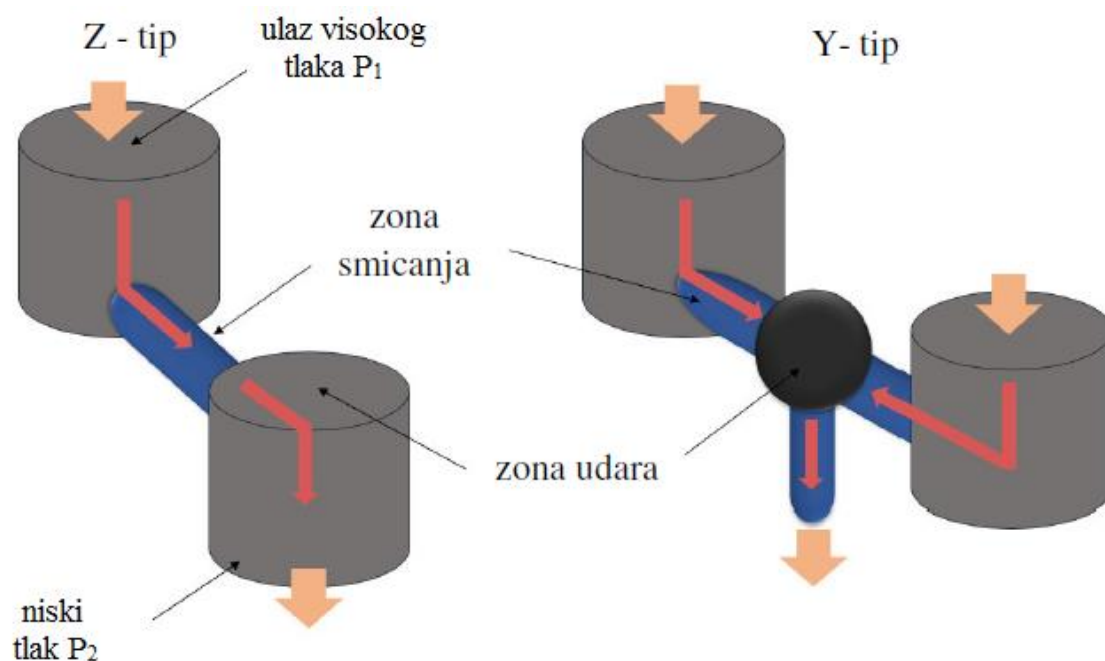
Alternativa gore opisanom postupku niskoenergetskog vlažnog mljevenja je visokoenergetsko vlažno mljevenje (*engl.* high energy wet ball milling) koje je zbog manjeg utroška vremena industrijski prikladnije (Lovrić i sur., 2015). Metoda uključuje potiskivanje suspenzije djelatne tvari pomoću crpke iz spremišne komore u komoru za mljevenje. Kao i kod metode niskoenergetskog vlažnog mljevenja, smanjenje veličine čestica djelatne tvari u metodi visokoenergetskog vlažnog mljevenja rezultat je djelovanja sila smicanja i tlaka unutar komore za mljevenje što nastaje kao posljedica utjecaja visoke energije. Kuglice za mljevenje u ovom su slučaju također izrađene od određenog materijala koji mora biti kompatibilan s drugim komponentama uređaja. Korištenje kuglica od cirkonijeva oksida može rezultirati onečišćenjem nanosuspenzije djelatne tvari zbog abrazije kuglica i/ili drugih dijelova uređaja. Zbog toga se kao materijal za mljevenje koriste kuglice načinjene od visoko umreženog polistirena izrazito elastičnih svojstva (Lovrić i sur., 2015).

#### **1.4.2.2. METODA VISOKOTLAČNOG HOMOGENIZIRANJA**

Metoda visokotlačnog homogeniziranja (*engl.* high-pressure homogenisation, HPH) jedna je od osnovnih metoda smanjenja veličine čestica, a ujedno i najviše korištena metoda za proizvodnju nanokristala. Razvijene su mnoge metode koje se zasnivaju na ovom principu, a one se razlikuju po uređaju i prirodi korištenih otopina, kao što su DissoCubes, Nanopure, Nanoedge, Nano-jet. Takvom metodom proizvodi se energija dovoljna za smanjenje čestica do nanometarskih dimenzija. Faktori koji mijenjaju veličinu čestica su tlak, broj ciklusa homogenizacije te osobine djelatne tvari. Tri su osnovne tehnologije obuhvaćene takvom metodom: (i) mikrofluidizacija (IDD-P™ tehnologija) (SkyePharma Canada), (ii) homogenizacija na principu klipa i uskog otvora (*eng.* piston gap homogenization) u vodenom (Dissocubes® tehnologija) (SkyePharma) ili nevodenom mediju (Nanopure® tehnologija)

(PharmaSol) (Lovrić i sur., 2015). Tijekom procesa visokotlačne homogenizacije, suspenzije djelatne tvari uvodi se u homogenizator visokog tlaka i prisiljena proći kroz vrlo uski homogenizacijski put, izložena je smanjenju pri visokom tlaku. Navedeni postupak sastoji se obično od tri koraka: (i) disperzija praškaste djelatne tvari u vodenoj otopini, (ii) smanjenje veličine čestica ultraturaznim miješanjem ili homogenizacijom pri niskim tlakom, (iii) homogenizacija visokim tlakom za postizanje željene veličine čestica i raspodjele veličine čestica (Lu i sur., 2016).

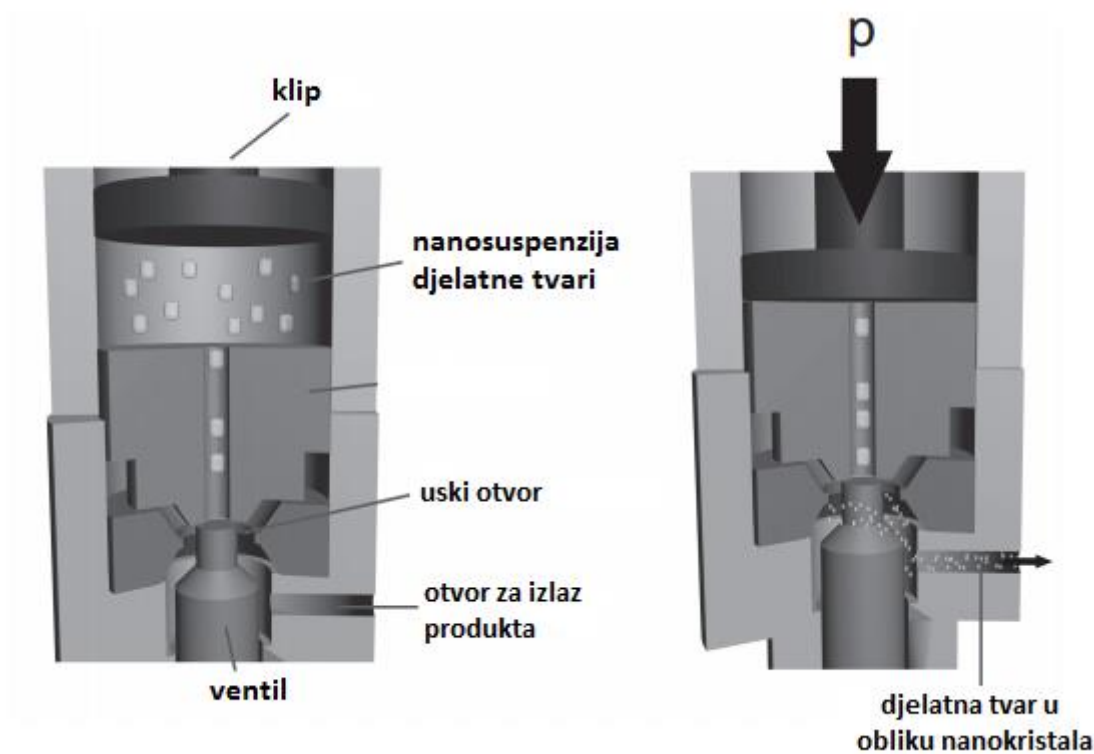
Tehnologija mikrofluidiziranja podrazumijeva proces smanjenja veličine čestica koji je temeljen na parno-mlaznom homogeniziranju (eng. jet steam homogenization) pri čemu se djelatna tvar pomoću crpke protiskuje pod tlakom od 1700 bar kroz sustav mikrofluidizatora. U komori mikrofluidizatora Z ili Y tipa (slika 7) čestice djelatne tvari se uslijed kolizije, smicanja i kavitacije smanjuju do nanometarskih dimenzija (Lovrić i sur., 2015).



**Slika 7.** Shematski prikaz posebno dizajniranih homogenizacijskih komora mikrofluidizatora: Z ili Y tip (prilagođeno prema Lu i sur., 2016).

Tehnologija temeljena na korištenju klipa i uskog otvora naziva se DissoCubes™ tehnologija. Riječ je o proizvodnji suspenzije nanočestica djelatne tvari u vodenom mediju pri sobnoj temperaturi. Početni korak obuhvaća predobradu djelatne tvari visokoturažnim miješanjem, nakon čega suspenzija djelatne tvari prolazi nekoliko visokotlačnih homogenizacijskih ciklusa. Suspenzija čestica djelatne tvari prolazi kroz mali otvor ( $\approx 5 \mu\text{m}$ ) pod tlakom ( $\approx 1500$

bar), što dovodi do velike brzine protoka, pri čemu jake sile smicanja i vrtložni protok smanjuju veličinu čestica djelatne tvari do nanometarskih dimenzija (slika 8). U ovom slučaju, tlak je ključan faktor za proizvodnju nanočestica djelatne tvari i može se raditi sa tlakovima od 100 do 1500 bara, ali se nekada može primjenjivati tlak i do 2000 bara. Tlak obično stupnjevito raste od 10 % do 100 % kako bi se izbjeglo začepljenje uskog otvora homogenizatora (5-20  $\mu\text{m}$ ), a s istim ciljem se provodi i predobrada suspenzije (Lovrić i sur., 2015). Prolazak suspenzije čestica djelatne tvari kroz otvor odvija se gotovo trenutačno, unutar nekoliko milisekundi. Stoga, energija koja se stvara u tako kratkom vremenu nije dovoljna za usitnjavanje svih čestica do ujednačenih nanokristala aktivne supstance, čak i pri najvećem dopuštenom tlaku te se homogenizacijski ciklusi moraju ponoviti nekoliko puta (Junyaprasert i Morakul, 2015). Prolaskom suspenzije djelatne tvari kroz uski otvor rezultira redukcijom statičkog tlaka ispod tlaka na kojem vrije voda, pri čemu dolazi do vrenja vode i nastanka mjehurića plina. Kada suspenzija djelatne tvari prođe kroz otvor, nađe se u prostoru normalnog tlaka, mjehurići implodiraju, a tim procesom stvaranja i implodiranja mjehurića, smanjuje se veličina čestica djelatne tvari zbog kavitacije. Sile implozije su dovoljno velike da razbiju mikročestice djelatne tvari do nano veličine (Yadollahi i sur., 2015). Osim kavitacije, smanjenje veličine čestica nastaje također kao rezultat kolizije čestica i visokih sila smičnog naprezanja. Naravno, korištenje vode kao medija može imati određene nedostatke, primjerice, hidroliza djelatnih tvari osjetljivih na vodu ili problema tijekom naknadnog koraka sušenja (Junghanns, 2008). Uzimajući obzir navedene nedostatke, razvijena je Nanopure® tehnologija. Homogeniziranje se osniva na principu klipa i uskog otvora, ali proces se odvija u nevodenom ili mediju sa smanjenim udjelom vode, čime je smanjena mogućnost hidrolize djelatne tvari. Proces se odvija pri nižim tlakovima i temperaturama zbog čega je izbjegnuta kavitacija, a sile smičnog naprezanja i kolizija čestica dovoljne su za zadovoljavajuće smanjenje veličine (Lovrić i sur., 2015). Obzirom na to da se ne koristi voda kao disperzijsko sredstvo, metoda je pogodna za djelatne tvari koje su podložne hidrolizi i termolabilnim djelatnim tvarima.



**Slika 8.** Osnovni princip visokotlačne homogenizacije na principu klipa i uskog otvora (Junghanns, 2008).

### 1.4.3. KOMBINIRANI POSTUPCI

S ciljem prevladavanja problema u vidu začepljenja dijelova uređaja pri obradi sirovina relativno velikih čestica (npr. u slučaju visokotlačnog homogeniziranja) i/ili problema relativno dugog vremena obrade (npr. u slučaju vlažnog mljevenja kada ukupno vrijeme obrade ovisi o dimenzijama opreme i značajno se povećava u proizvodnji velikih serija), razvijene su kombinirane tehnologije (Lovrić i sur., 2015). Zahvaljujući kombinaciji dviju različitih pojedinačnih metoda, omogućeno je njihovo provođenje na višoj i uspješnijoj razini. Općenito, takve tehnologije kombiniraju korak predobrade praćen visoko energetske procesom. Prvi takav kombinirani postupak razvio je Baxter, zaštićen pod nazivom NanoEdge™ tehnologija. Početni korak koji obuhvaća ova tehnologija je predobrada sirovine djelatne tvari taloženjem, a nakon što su kristali istaloženi, slijedi postupak smanjenja veličine čestica visokotlačnim homogeniziranjem. Kombinacijom ovih dviju metoda dobiva se manja veličina čestica djelatne tvari i veća stabilnost nanosuspenzije za kratko vrijeme. Precipitirana suspenzija je dodatno homogenizirana smanjenjem veličine čestica i time smanjenom mogućnosti rasta kristala (Patel i sur., 2016). Metode smanjenja veličine čestica kao prednost

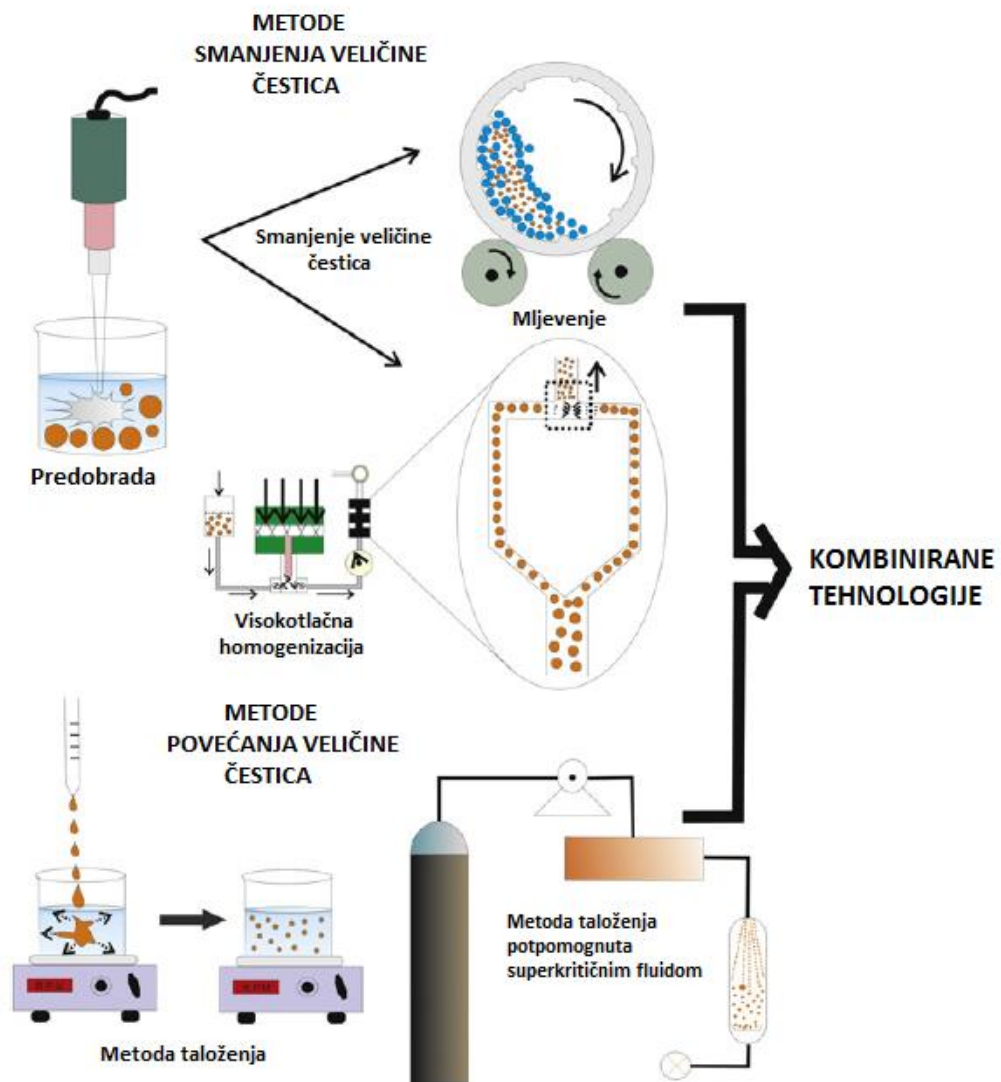
ističu odsutstvo otapala, međutim, Baxterova NanoEdge™ tehnologija gubi tu prednost upravo zbog koraka predobrade taloženjem, što se očituje prisutnošću nevedenog otapala u konačnoj suspenziji. Nevedeno se otapalo može ponašati kao suotapalo i tako nepovoljno utjecati na stabilnost konačnog oblika (Lovrić i sur., 2015). Iako se u konačnoj formulaciji pristupnost nevedenog otapala može tolerirati do određene mjere, poželjno je u potpunosti ukloniti takvo otapalo. Imajući na umu navedeni nedostatak, prednost ove tehnologije je u tome što pruža određenu slobodnu djelovanja i razvijanja obzirom na ostale postojeće karakteristike u području nanokristala.

U cilju prevladavanja gore spomenutih nedostataka NanoEdge™ tehnologije, razvijeni su alternativni kombinirani postupci zaštićeni pod nazivom smartCrystal® tehnologija. Riječ je o tehnologiji koja obuhvaća kombinaciju različitih procesa koji ili ubrzavaju proizvodnju obzirom na broj prolazaka kroz homogenizator ili vode do jako malih nanokristala veličine ispod 100 nm i na taj način omogućuju proizvodnju nanokristala točno optimiranih svojstava te poboljšane fizičke stabilnosti. Tehnologija obuhvaća predobradu sirovine sušenjem raspršivanjem (H42 postupak), taloženjem (H69 postupak), liofilizacijom (H96 postupak) ili vlažnim mljevenjem (CT postupak), a nakon čega slijedi glavni postupak visokotlačnog homogeniziranja (HPH postupak) ( Lovrić i sur., 2015).

Navedeni postupak prikladan je za industrijske razmjere i lako se uvećava. Nudi mogućnost stvaranja koncentriranije nanosuspenzije, uže distribucije veličine, poboljšane fizičke stabilnosti, manje veličine čestica i smanjenog vremena proizvodnje, u usporedbi s primjenom klasične visokotlačne homogenizacije.

Budući je riječ o drugoj generaciji metoda za proizvodnju nanokristala, takav je pristup još uvijek relativno nov i samim time nisu još u potpunosti razjašnjeni čimbenici koji utječu na poboljšanje smanjenja veličine čestica.

Stoga je važno imati na umu da svaki dodatni korak u proizvodnji pridonosi složenosti postupka obrade djelatne tvari i zbog toga se kombinirani postupci koriste samo ako nije moguće primijeniti rutinske postupke.



**Slika 9.** Kombinacija metode smanjenja veličine čestica i metode povećanja veličine čestica korištena u proizvodnji nanokristala (prilagođeno prema Pawar i sur., 2014).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Zahvaljujući širokom spektru djelovanja, biološki aktivne tvari prikladne su za primjenu kod različitih stanja. Uvođenje biološki aktivnih tvari u terapiju, ograničena je njihovom slabom topljivošću u vodi što predstavlja ograničavajući korak za postizanje adekvatne brzine otapanja. Takvi parametri mogu utjecati na obim apsorpcije slabo topljivih djelatnih tvari i tako onemogućiti postizanje odgovarajuće terapijske koncentracije. S ciljem prevladavanja problema i neprimjerene bioraspodjelivosti, pored klasičnih pristupa sve veće mjesto u rješavanju ovog problema zauzima tehnologija nanokristala, koja se pokazala kao obećavajući i učinkovit pristup rješenja.

Obzirom na barijeru kože, veliki je izazov razviti prikladnu formulaciju koja će osigurati dobru adheziju na površini kože kao i učinkovitu i sigurnu dostavu djelatne tvari do ciljanog mjesta. Zahvaljujući prednostima koje nudi, razvoj dermalne primjene lijekova intenzivno napreduje.

Nanokristali su od posebnog interesa kod dermalne primjene lijekova, odnosno općenito djelatnih tvari, upravo zbog mogućnosti kontroliranog oslobađanja uklopljenih djelatnih tvari. Zahvaljujući tom svojstvu, nanokristali kao suvremeni transportni sustav omogućuju da se djelatna tvar kontrolirano oslobađa.

Osnovni cilj ovog diplomskog rada bio je proučiti znanstvenu literaturu i pregledno izdvojiti najnovije informacije vezane uz tehnologiju nanokristala. Proučavane i opisane informacije o nanokristalima omogućit će razumijevanje mehanizma djelovanja ovog suvremenog transportnog sustava.

Nadalje, jedan od ciljeva ovog rada bio je proučiti prednosti i biofarmaceutske posebnosti koje pruža dermalna primjena djelatnih tvari u obliku nanokristala, ali isto tako izdvojiti pripadajuća ograničenja i probleme.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Pretraživanje literature online baza podataka obavljeno je elektroničkim putem pomoću umreženog računala koje ima online pristup bazama podataka. Pretražene su bibliografska baza podataka (PubMed) i baza podataka s cjelovitim tekstom (Science Direct).

Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za problematiku ovoga diplomskog rada. Literatura je pretraživana od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku ovoga diplomskog rada.

Relevantni članci proučavani su analitično i kritično, a vezano uz: definiranje znanstvenog i/ili stručnog problema, istraživanje postojećih znanja o definiranom problemu (literaturni navodi), oblikovanje radne hipoteze, odabir eksperimentalnih metoda za ispitivanje hipoteze, prikaz i analizu rezultata te izvedene zaključke. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci, koji su prikazani ovim diplomskim radom. Na temelju proučavanih članaka izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike, koja sastavni su dio ovoga diplomskog rada.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. DERMALNA PRIMJENA

Koža (grč. dermis, lat. cutis) je najveći i najvidljiviji organ našeg organizma koji prekriva cijelu površinu tijela. Iz tog razloga čini barijeru između ljudskog organizma i okoliša. Posebnost kože upravo je njezina bifunkcionalna priroda i zahvaljujući učinkovitoj homeostatskoj barijeri koju osigurava, koža posjeduje niz značajnih funkcija. Prema tome, iznimno je važna funkcija kože kao ciljnog mjesta primjene i isporuke brojnih djelatnih tvari. Razlikuju se dva načina primjene lijeka preko kože obzirom na željeni terapijski cilj: dermalni (na površinu kože) za koji je karakterističan lokalni učinak i transdermalni (prijenos djelatne tvari kroz kožu u sistemsku cirkulaciju). Dermalna primjena ima za cilj djelovati na oboljelo mjesto i osigurati terapijsku dermalnu koncentraciju djelatne tvari (Kogan i Garti, 2006). U dermalnoj dostavi lijekova jedan od glavnih izazova predstavlja postizanje adekvatne brzine permeacije kroz kožu. Uzimajući u obzir anatomiju i fiziologiju kože, neke djelatne tvari neće ostvariti željeni farmakološki učinak nakon lokalne primjene na kožu. Kako koža predstavlja učinkovitu barijeru, razvoj formulacije za dermalnu primjenu nije moguć za sve djelatne tvari, te mora postojati razlog za razvoj ovoga oblika dostave. Uspjeh u dermalnoj dostavi ovisiti će osim o koncentraciji same djelatne tvari i o propusnosti djelatnih tvari kroz rožnati sloj budući je on kao iznimno kompaktan sloj ograničavajući faktor za proces penetracije djelatne tvari kroz kožu. Nadalje, prilikom razvoja i proizvodnje formulacije nanokristala za dermalnu primjenu potrebno je uzeti u obzir veličinu čestica kristala djelatne tvari te njihove površinske osobine. Također, treba istaknuti da se kod dermalne primjene lijekova preferiraju terapijski sustavi bez kemijskih promotora apsorpcije, radi održavanja normalne barijerne funkcije kože. Primjena kemijskih promotora apsorpcije, kao što su površinski aktivne tvari i organska otapala, može dovesti do smanjenja barijerne funkcije kože te do iritacija i pojave oštećenja na koži (Baroli, 2010). Zahvaljujući svojoj maloj veličini, nanokristali se gusto poredaju na površini kože, formirajući tako okluzivni sloj koji hidratizira kožu povećavajući penetraciju i propusnost djelatnih tvari. Raspršeni nanokristali se zadržavaju dovoljno dugo, kako bi se osiguralo polako otpuštanje djelatne tvari. Penetracija djelatne tvari kroz kožu između ostalog uključuje procese oslobađanja djelatne tvari u rožnati sloj (*stratum corneum*) te permeaciju i difuziju djelatne tvari iz tog sloja kroz ostale slojeve kože. Proces oslobađanja djelatne tvari u rožnati sloj ovisiti će o lipofilnim osobinama djelatne tvari, za razliku od difuzije iz rožnatog sloja kroz ostale slojeve kože koja će ovisiti o hidrofilnim osobinama djelatne tvari. Zbog toga,

djelatne tvari za dermalnu primjenu moraju imati afinitet i za lipofilne i hidrofilne faze, odnosno odgovarajuće log  $P$  vrijednosti (Shen i sur., 2015).

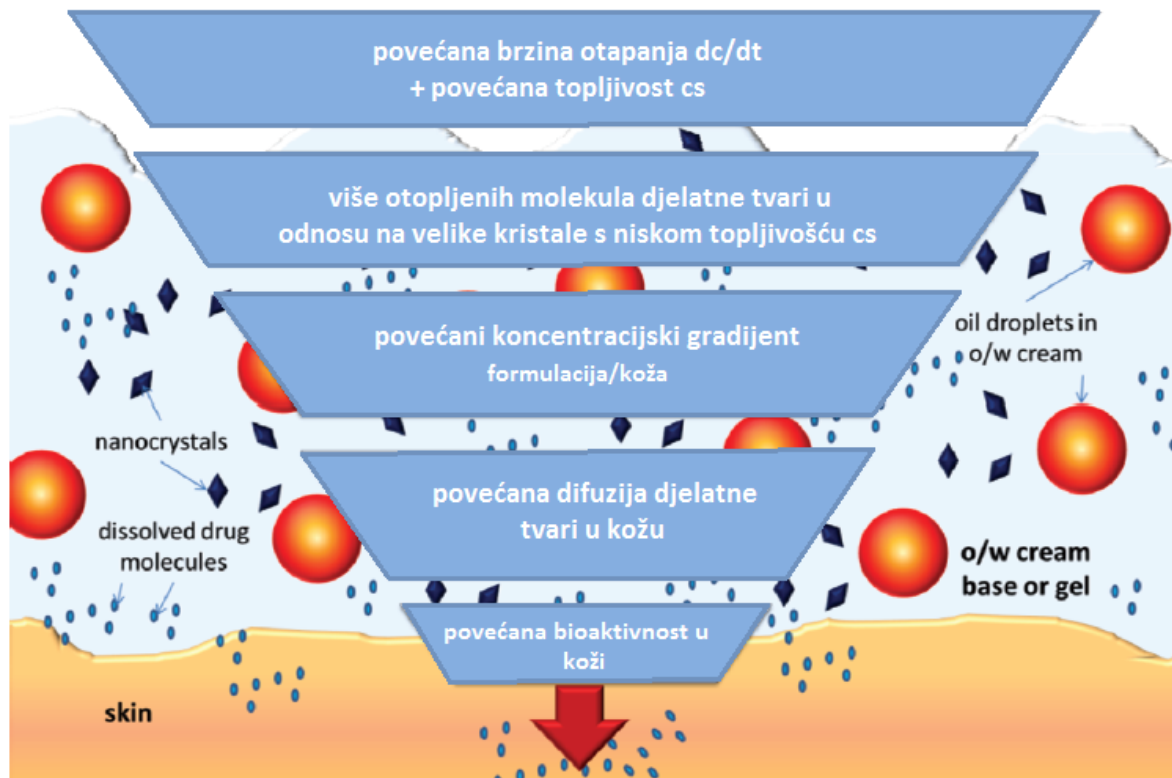
#### **4.2. PROBLEMI ISPORUKE U DERMALNOJ PRIMJENI**

Posljednjih nekoliko godina, slabo topljive biološki aktivne tvari pokazuju veliki značaj u dermalnoj primjeni, što dokazuje činjenica da su od sve većeg interesa za dostavu u kožu u kozmetici i njezi kože. Međutim, njihovo prodiranje u kožu izuzetno je nisko te relativno mali postotak djelatnih tvari dostiže svoj cilj kada se lokalno primjeni na kožu. Upravo iz tog razloga te tvari ne posjeduju dovoljnu bioraspodjelivost u koži. Glavni problem je da su te molekule slabo topljive u vodi te istodobno u uljima. U farmakokinetičkom pogledu to rezultira jako niskom topljivošću kao rezultat jako niskog koncentracijskog gradijenta između pripravka za kožu i same kože. Dugo vremena nije se pridavala pažnja pametnim transportnim sustavima za isporuku u kožu. Stvari su se promijenile kada se spoznalo da nije dovoljno samo uklopiti biološki aktivnu tvar kako bi se formirao konačni pripravak, već je potrebno to izvesti koristeći prikladni tehnički oblik koji osigurava dovoljnu bioraspodjelivost u koži. Stoga su pametni transportni sustavi za isporuku slabo topljivih biološki aktivnih tvari u kožu sve veći zahtjevi, ali i izazov farmaceutske industrije. Posebna je pažnja pritom usmjerena na nanočestice, zbog njihovog učinkovitijeg prodiranja kroz rožnati sloj kože i njihovog ciljanog djelovanja (Baroli, 2010).

#### **4.3. POTENCIJAL NANOKRISTALA U DERMALNOJ PRIMJENI**

Nanotehnologijom možemo utjecati na mehanizam penetracije lijeka kroz kožu, zbog toga što ona osigurava kontrolirano oslobađanje djelatne tvari, povećano zadržavanje djelatne tvari na koži, te pruža zaštitu djelatne tvari od kemijskih ili fizičkih nestabilnosti (Paese i sur., 2009). Zbog prednosti koje nudi, intenzivno se radi na njezinom razvoju. Iz tog razloga veliki izazov kojim se farmaceutska industrija već dugo suočava upravo je razviti formulaciju koja će osigurati prethodno navedene karakteristike, ali i poboljšati isporuku slabo topljivih djelatnih tvari. Kao jedno od mogućih rješenja navodi se uklapanje djelatnih tvari u oblik nanokristala. Formulacija djelatne tvari u obliku nanokristala dovest će do povećanog zasićenja topljivosti djelatne tvari, što će u konačnici dovesti do povećane difuzije djelatne tvari u kožu. Trenutačno, smatra se da je povećanje ravnotežne topljivosti mehanizam koji vodi do povećanja prodiranja formulacije nanokristala u kožu (Vidlarova i sur., 2016). To dovodi do

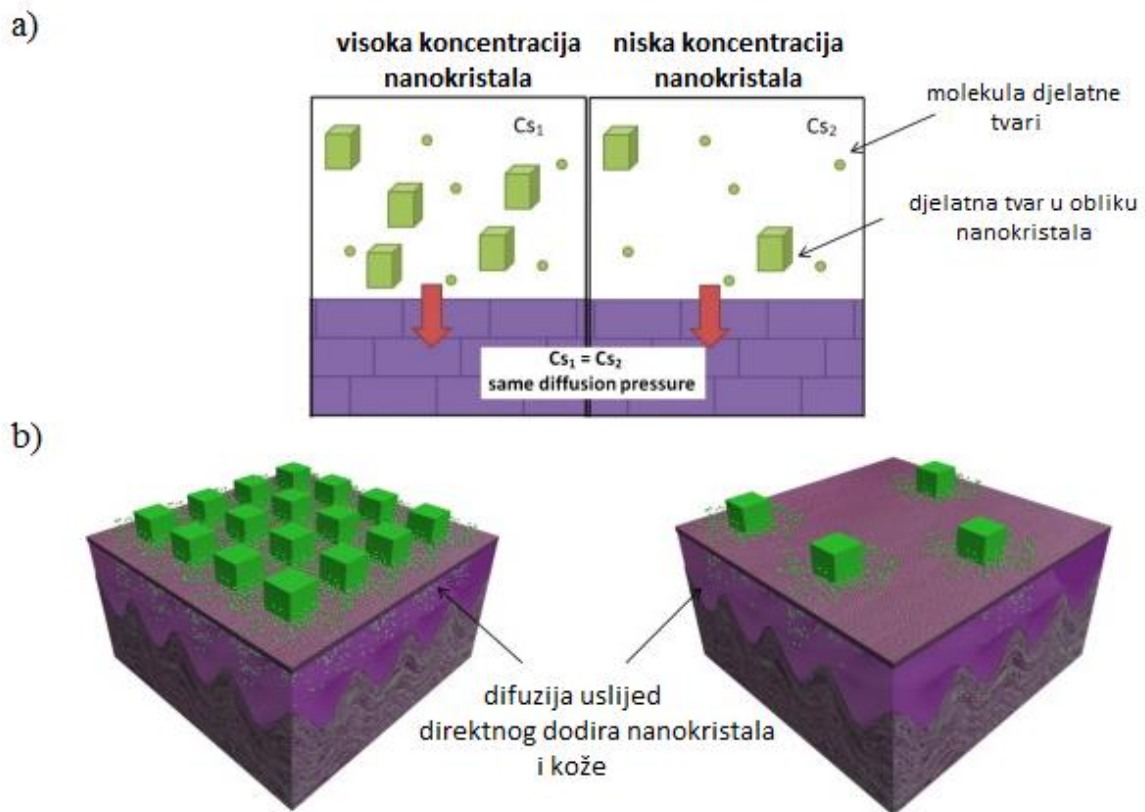
povećanog koncentracijskog gradijenta između dermalne formulacije nanokristala i kože, što rezultira povećanim fluksom djelatne tvari u kožu (slika 10).



**Slika 10.** Mehanizam prijenosa dermalno primijenjenih nanokristala (prilagođeno prema Kobierski i sur., 2011).

Međutim, ako bi se to smatrao kao jedini mehanizam, sve dermalno primijenjene formulacije nanokristala, koje sadrže nanokristale jednake veličine te stabilizirane jednakim surfaktantima, trebale bi teorijski pridonijeti istovjetnom prodiranju u kožu, neovisno koliko nanokristala sadrže, odnosno da sadrže nanokristale barem u mjeri koja bi osigurala depo i održala ravnotežnu topljivost. Kako bi se utvrdila postojanost te pretpostavke, Vidlarova i suradnici (2016) proveli su istraživanje kojim je ispitivana penetracija dermalnim formulacijama koje sadrže smanjene koncentracije nanokristala od 2,0%, 0,2%, 0,02% i 0,002%. Imajući na umu da u svim formulacijama postoji teorijski identična ravnotežna topljivost, očigledno je očekivati učinak koncentracije čestica. Kao moguće rješenje navodi se da kod smanjenja koncentracije, gustoća nanokristala po jedinici površine također pada. Suprotno tome, broj kontaktnih točaka između nanokristala i kože raste kako se povećava koncentracija nanokristala (povećana specifična površina). Osim difuzije na zasićenu površinu kože, molekule djelatne tvari također difundiraju iz čvrstih nanokristala izravno do lipidnog dijela rožnatog sloja te iz rožnatog sloja u daljnje slojeve kože (slika 11a).

Svaki nanokristal okružen je difuzijskim slojem otopljene djelatne tvari. Iz toga proizlazi, ako su nanokristali previše razrijeđeni, ne prekrivaju kožu učinkovito, difuzijski slojevi se ne preklapaju i posljedično je smanjeno prodiranje djelatne tvari u kožu (slika 11b).



**Slika 11.** Novi pretpostavljeni mehanizam prijenosa djelatne tvari iz nanokristala u kožu, gdje kombinacija učinka supersaturiranja (a) i dodirne površine nanokristala te kože s difuzijskim slojem oko svakog kristala (b), sinergistički pridonose prijenosu u kožu (prilagođeno prema Vidlarova i sur., 2016).

Povećani koncentracijski gradijent uzrokovan nanokristalima trenutno je opisan kao jedina pokretačka sila za poboljšano prodiranje u kožu. Na temelju studije koju su proveli Vidlarova i suradnici (2016), predložena su tri nova mehanizma i to redom: (i) povećani koncentracijski gradijent zbog veće ravnotežne topljivosti, (ii) minimalna potrebna gustoća nanokristala na površini kože radi gustog prekrivanja kože, (iii) dovoljno velika dodirna površina za izravni kontakt nanokristala i lipidnog dijela rožnatog sloja, uz prisustvo difuzijskog sloja oko nanokristala.

Uzimajući u obzir takve zaključke, omogućeno je bolje razumijevanje mehanizma prijenosa djelatne tvari u kožu i jednako važno optimiranje izrade nanokristalne formulacije za dermalnu primjenu.

#### **4.4. PREDNOSTI NANOKRISTALA U ODNOSU NA KONVENCIONALNE PRIPRAVKE**

##### **4.4.1 KURKUMIN KAO MODEL**

Kako bi se procijenilo poboljšanje penetracije preko barijere rožnatog sloja kože postignuto tehnologijom nanokristala, dermalni prijenos tekućih nanosuspenzija uspoređivan je s komercijalnim proizvodom sadržaja kurkumina od 0,0001%, što bi ujedno trebalo odgovarati topljivosti kurkumina. Dakle, formulacija otopine uspoređena je s formulacijom nanosuspenzije. Staro galensko pravilo glasi da djelatna tvar suspendirana u dermalnoj formulaciji daje značajno bolju penetraciju u usporedbi s formulacijom otopine (Vidlarova i sur., 2016). Kad se molekula otopi u okruženju koje "voli", odnosno u području gdje je dobro topljiva, mala je vjerojatnost da će prodrijeti u kožu, koja je za tu molekulu područje manje topljivosti. Tu činjenicu potvrđuju rezultati prema kojima uzorak komercijalnog proizvoda gotovo da nije pokazivao fluorescenciju, tj. prijenos u kožu i nakon 20 sati bilo je ispod granice određivanja. Da bi se ostvario određeni broj neotopljenih nanokristala, trebalo je odabrati koncentraciju iznad ravnotežne topljivosti od 0,0001%, u ovom slučaju 0,002% te 0,02%. Uzorak s 0,002% pokazivao je nešto malo fluorescencije, dok je značajnu razinu fluorescencije pokazivao uzorak s 0,02%.

Stoga je izveden zaključak da ispitivani komercijalni proizvod, a vrlo vjerojatno i svi drugi komercijalni proizvodi koji se temelje na otopljenom kurkuminu ne pokazuju učinkovitu sposobnost penetracije preko barijere rožnatog sloja.

Između ostalog, dubina prodiranja 2%-tne suspenzije nanokristala kurkumina uspoređena je s prodorom iz viskoznog gela identične koncentracije nanokristala i zaključeno je da je dubina prodiranja slična. Također, vidljivo je da je kurkumin iz nanokristalne suspenzije i viskoznog gela lokaliziran u folikulima dlake, međutim stečen je dojam da je lokalizacija kurkumina iz viskoznog gela bila manje izražena.

Konačno, ispitan je i učinak koncentracije nanosuspenzija na folikularnu akumulaciju. Uzorak kurkumina dobiven iz 2%-tne nanosuspenzije uspoređen je s uzorcima kurkumina iz 0,02% i 0,002%-tne nanosuspenzije. Rezultati su pokazali slično prodiranje u folikul dlake za 2% i

0,02%-tnu suspenziju, međutim, 0,002%-tna nanosuspenzija pokazivala je vrlo slabe signale pri ispitivanju fluorescencije (Vidlarova i sur., 2016).

Na temelju svega navedenog, mogu se postaviti sljedeći zaključci: (i) koncentracija nanokristala koja omogućuje učinkovito prodiranje u kožu može biti jednaka 0,2%, a čak 0,02% u slučaju vrlo slabo topljivih djelatnih tvari, (ii) niska viskoznost dermalnih formulacija potiče prodiranje u kožu, (iii) folikularna akumulacija iz niskoviskoznih suspenzija (npr. kozmetičkih seruma) izraženija je u odnosu na upotrebu viskoznije formulacije (npr. gelova) (Vidlarova i sur., 2016).

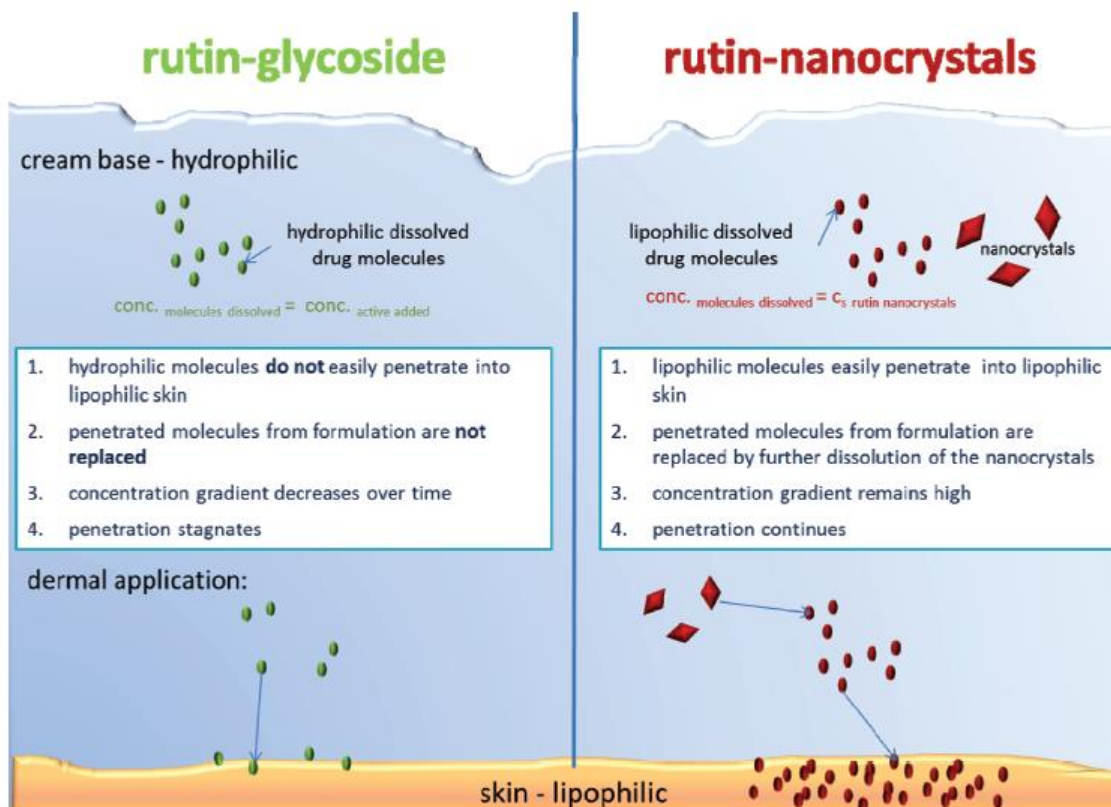
Uzimajući u obzir rezultate opisane studije, opaža se značajna superiornost i bolja dermalna bioraspoloživost nanokristalne formulacije.

#### **4.4.2. RUTIN KAO MODEL**

Zabilježen je porast bioaktivnosti slabo topljivog rutina u usporedbi s njegovim topljivim derivatom rutin-glikozidom te je zapažena dva puta veća aktivnost nanokristala rutina pri 500 puta nižoj koncentraciji (Kobierski i sur., 2011).

Slika 14 prikazuje mehanizam djelovanja dermalno primijenjenih nanokristala, a što je objašnjeno na primjeru rutina kao izvorne biljne biološki aktivne tvari i njegovog derivata rutin-glikozida. Zbog veće ravnotežne topljivosti aktivnog rutina u obliku nanokristala, postoji povećani koncentracijski gradijent između dermalne formulacije i kože, u usporedbi s kristalima rutina mikrometarskih dimenzija u emulzijskoj podlozi. Zahvaljujući izraženom koncentracijskom gradijentu osigurana je učinkovitija penetracija rutina u dublje slojeve kože. Rutin prenesen iz podloge u kožu u ravnoteži je s otapanjem rutina iz nanokristala koji u podlozi čine depo. Nanokristali rutina stvaraju prezasićenu otopinu u vodenoj fazi emulzijske podloge, dok depo čine neotopljeni nanokristali rutina u podlozi čime se postiže produljeni učinak. U usporedbi s hidrofilnim derivatom rutin-glikozidom, izvorna lipofilna molekula rutina, uklopljena u oblik nanokristala, može značajno bolje prodrijeti u kožu te pokazuje veći afinitet djelovanja u odnosu na sintetski modificiranu verziju. Na temelju spomenute usporedbe, utvrđeno je da postoje ukupno četiri potencijalna učinka koja dovode do povećane bioaktivnosti molekula u obliku nanokristala i to redom: (i) veća topljivost koja rezultira povećanim koncentracijskim gradijentom formulacija/koža, (ii) depo koji je ostvaren brzim otapanjem molekula iz formulacije nanokristala, (iii) bolje prodiranje u kožu u usporedbi s topljivim derivatima, (iv) veća aktivnost izvorne molekule na ciljanom mjestu u odnosu na topljivi derivat.





**Slika 12.** Mehanizam prijenosa nanokristala rutina iz podloge u kožu u usporedbi s topljivim derivatom rutina (prilagođeno prema Kobierski i sur., 2011).

#### 4.5. STABILNOST

Osnovne značajke djelatne tvari, a posljedično i formulacije u koju je djelatna tvar uklopljena, jesu sigurnost, učinkovitost i stabilnost. Osim toga, sigurnost i učinkovitost su barem djelomično ovisne o stabilnosti, stoga je dobra stabilnost bitan preduvjet za pouzdanu sigurnost i učinkovitost. Iz tog razloga, stabilnost je jedno od važnijih svojstava nanokristala. Unatoč tome što nudi impresivan niz prednosti, nanometarske dimenzije često mogu dovesti do zabrinutosti za stabilnost. Jasno je da pristup proizvodnje ima izravan utjecaj na stabilnost izrađene formulacije nanokristala, međutim, još uvijek se vrše ispitivanja s ciljem preciznog razjašnjavanja tih utjecaja i optimiranja procesnih parametara pri proizvodnji nanokristala (Wang i sur., 2013).

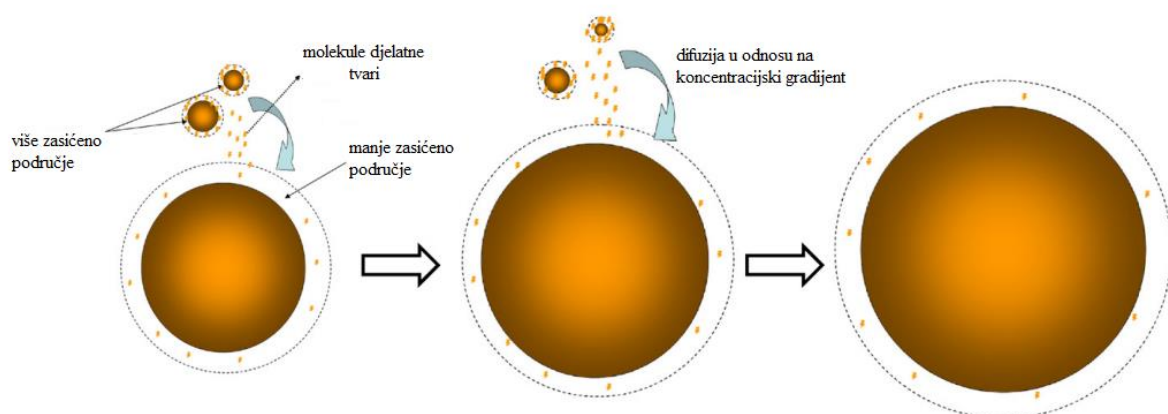
Postupcima nanoniziranja krutine djelatne tvari značajno se povećava specifična površina takve sirovine pri čemu je granična površina čvrsto/tekuće kao i slobodna Gibbsova energija nanosuspenzije značajno povećana. Uslijed toga nanosuspenzije su termodinamički nestabilni

sustavi s izraženom tendencijom stvaranja nakupina primarnih nanokristala (aglomerata) ili rasta kristala (Lovrić i sur., 2015).

Stabilnost nanokristala djelatne tvari je svojstvo na koje utječu brojni parametri: (i) dozni oblik (nanosuspenzija ili suha kruta tvar), (ii) disperzijsko sredstvo (vodeno ili nevodeno), (iii) put isporuke djelatne tvari, (iv) tehnika proizvodnje, (v) priroda djelatne tvari (mala ili velika molekula). Prema tome, stabilnost nanokristala djelatne tvari ostaje veliki izazov tijekom razvoja prikladnog farmaceutskog oblika, (Wu i sur., 2011).

#### 4.5.1. PROBLEM STABILNOSTI NANOKRISTALA DJELATNE TVARI

Kada su u nanosuspenziji prisutni nanokristali djelatne tvari različitih veličina unutar nanometarskog raspona dimenzija, manji nanokristali se otapaju brže i bolje u odnosu na veće nanokristale. Velika površinska energija nanokristala rezultira rastom veličine čestica, a navedeni fenomen poznat je pod nazivom Ostwaldov mehanizam zrenja nanosuspenzije (slika 13). Navedeni fenomen temelji se na većoj koncentraciji otopljenje djelatne tvari oko manjih nanokristala u odnosu na koncentraciju djelatne tvari oko većih nanokristala, što dovodi do stvaranja prezasićene otopine oko većih nanokristala te posljedično do kristalizacije djelatne tvari oko većih nanokristala i sukladno tome rasta velikih čestica. Difuzijom djelatne tvari iz područja manjih nanokristala u područje većih nanokristala ostvaruje se koncentracijski gradijent što u konačnici dovodi do nestanka manjih nanokristala (Lovrić i sur., 2015).



**Slika 13.** Shematski prikaz Ostwaldovog mehanizma zrenja nanosuspenzije (prilagođeno prema Wu i sur., 2011).

Poželjno je održati ujednačenu veličinu nanokristala kako bi se u najvećoj mogućoj mjeri smanjila razlika u zasićenju otapanja i prisutstvo koncentracijskog gradijenta i time spriječila mogućnost pojave Ostwaldovog mehanizma zrenja. Stoga je ograničavanje ili sprječavanje Ostwaldovog mehanizma zrenja važan aspekt razvoja nanosuspenzijskih farmaceutskih oblika. Opisani problem moguće je riješiti korištenjem stabilizatora, izradom relativno homogenih nanosuspenzija ili izradom suhih farmaceutskih oblika postupcima liofilizacije ili sušenja raspršivanjem, a koji se neposredno prije primjene (*ex tempore*) prevode u nanosuspenzije (Lovrić i sur., 2015).

#### **4.6. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI**

Biološki aktivne tvari zauzimaju važno mjesto u području farmacije. To potvrđuju i mnogobrojna ispitivanja, pokazujući da je više od 50 % odobrenih farmaceutskih oblika prirodnog porijekla. Međutim, fizičko-kemijska svojstva takvih djelatnih tvari vrlo često ograničavaju njihovu farmaceutsku uporabu. Jedan od razloga upravo je činjenica da su molekule biološkog podrijetla vrlo često nestabilne i podložne razgradnji. Nadalje, većina njih praktično je netopljiva u vodi te je potrebno primijeniti vrlo visoku dozu kako bi se ostvario željeni terapijski učinak.

S druge strane, neke biološki aktivne tvari srednje su topljive ili su vrlo dobro topljive u vodi i/ili imaju veliku molekularnu masu, zbog čega im je otežan prijenos kroz lipidne barijere, a što ograničava njihovu biorasploživost. Navedeni nedostaci pokušavaju se prevladati primjenom nanotehnoloških nosača za dostavu djelatnih tvari.

Uklapanjem djelatnih tvari u oblik nanokristala moguće je poboljšati njihovu topljivost i biodostupnost, povećati stabilnost, smanjiti toksičnost te poboljšati biološku aktivnost. Nakon uporabe u oralnim farmaceutskim proizvodima nanokristali su se u međuvremenu počeli primjenjivati za poboljšanje dermalne dostave biološki aktivnih tvari. Do sada, nanokristali su jedini transportni sustav za dermalnu primjenu slabo topljivih biološki aktivnih tvari (Zhai i sur., 2014). Ipak, dugo vremena nije se pridavala pažnja razvoju formulacije nanokristala za dermalnu primjenu. Stvari su se promijenile kad se ovaj princip počeo primjenjivati za poboljšanje dermalne biorasploživost biološki aktivnih tvari, rutina i hesperidina. Stoga, glavna je ideja načiniti formulaciju nanokristala od slabo topljivih biološki aktivnih tvari koja bi nakon primjene osigurala brzo otapanje djelatne tvari iz depoa, povećala ravnotežnu

topljivost te se posebno akumulirala u folikulima dlake, kako bi se dodatno povećala penetracija djelatne tvari u kožu.

Biološki aktivne tvari slabe topljivosti prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatne tvari (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS) pripadaju skupini II i skupini IV.

Značajke loše topljivosti ograničavaju terapijsku primjenu djelatnih tvari, ali ih također čini dobrim kandidatima za korištenje tehnologije nanokristala s ciljem povećanja topljivosti i unaprijeđenja njihovih biofarmaceutskih značajki. Slaba topljivost biološki aktivne tvari može biti ograničavajući čimbenik za njenu odgovarajuću brzinu i obim apsorpcije, odnosno bioraspoloživost (Singh i sur., 2016). Zbog toga je poznavanje biofarmaceutske klasifikacije djelatnih tvari od velike važnosti prilikom proizvodnje farmaceutskih oblika kako bi postigla odgovarajuća bioraspoloživost djelatne tvari i s njom povezani željeni terapijski učinak. Osim navedenih problema, loša topljivost biološki aktivnih tvari velika je prepreka za razvoj novih formulacija. Iz tog razloga, za slabo topljive i dobro permeabilne djelatne tvari II. BCS skupine koriste se različiti farmaceutsko-tehnološki pristupi poboljšanja topljivosti; primjerice, prilagodba kristalnog oblika djelatne tvari (priprava topljivijih kristalnih polimorfa, kristalnih soli ili kokristala), prilagodba pH oblika, izrada farmaceutskih oblika trenutnog oslobađanja djelatne tvari uz dodatak solubilizatora, izrada farmaceutskih oblika koji se osnivaju na lipidima (npr. samoemulgirajući sustavi, meke kapsule s uljnom otopinom ili suspenzijom djelatne tvari), prevođenje djelatne tvari u amorfnu stanje, uklapanje djelatne tvari u ciklodekstrinske komplekse (Lovrić i sur., 2015).

Terapijska učinkovitost većine biološki aktivnih tvari u velikom broju slučajeva ograničena je njihovom slabom topljivošću u vodi i posljedično smanjenom brzinom otapanja. Odras ovih parametara vidljiv je na ciljanom mjestu djelovanja djelatne tvari, zbog nemogućnosti dostizanja adekvatne terapijske koncentracije spomenute djelatne tvari. Kako su topljivost i brzina otapanja u bliskom odnosu, slabo topljive djelatne tvari ponekad imaju toliko nisku topljivost, da je brzina njihovog otapanja, čak i s površine vrlo malih nanokristala, relativno spora. Zbog toga je razvijen novi sustav koji djelatne tvari klasificira u nešto drugačije kategorije, ovisno o tome je li bioraspoloživost djelatne tvari ograničena brzinom otapanja, topljivošću ili permeabilnošću. Takva se klasifikacija naziva razvojno-formulacijska klasifikacija (engl. *Developability Classification System*; DCS), a djelatne tvari unutar II. BCS skupine klasificira na one čija je bioraspoloživost ograničena brzinom otapanja (DCS IIa) i one čija je bioraspoloživost ograničena topljivošću (DCS IIb) (Lovrić i sur., 2015).

Prednosti primjene biološki aktivnih tvari u obliku nanokristala očituju se u brzom otapanju, povećanom kinetičkom zasićenju otapanja te adheziji na biološke membrane, što rezultira pojačanom permeabilnosti molekule djelatne tvari.

#### **4.6.1. SLABO TOPLJIVE BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI**

Dobar primjer slabo topljivih biljnih biološki aktivnih tvari su flavonoidi. Zbog njihovih mnogobrojnih korisnih učinaka, flavonoidi imaju veliki potencijal za primjenu u različitim stanjima. Međutim, njihova primjena ograničena je slabom topljivošću, ograničavajući tako njihov puni antioksidacijski potencijal, kao i njihovu biodostupnost. Mnoga su ispitivanja pokazala da se njihovom obradom korištenjem tehnologije nanokristala može očekivati povećana biodostupnost. Kako bi se prevladao taj problem, potrebno je povećati topljivost takvih djelatnih tvari. Stoga su razvojni proces proizvodnje i pronalaženje nove primjene nanokristala bitan fokus brojnih istraživanja. (Patel i sur., 2016).

##### **4.6.1.1. KVERCETIN**

Kvercetin je sekundarni metabolit biljaka te pripada skupini spojeva koje nazivamo flavonoidi. Kvercetinu su dokazani brojni pozitivni učinci, iako se posebno ističe njegov visoki antioksidacijski kapacitet. Međutim, slaba topljivost kvercetina rezultira poteškoćama u njegovom otapanju i isporuci do ciljnog mjesta.

U usporedbi s pronalaženjem prikladne metode za proizvodnju najmanjih nanokristala, vrlo je malo studija učinjeno kako bi se diferencirali nanokristali različitih veličina te u konačnici istražili *in vitro* učinci korištenjem različitih staničnih linija. Stoga, cilj studije koju je proveo Chen (2013) bio je izraditi prilagođene nanokristale (*engl. tailor-made nanocrystals*) kvercetina u seriji različitih veličina te istražiti *in vitro* učinak produkta u ljudskim stanicama neuroblastoma. U teoriji, topljivost se povećava smanjenjem veličine nanokristala, a navedeno svojstvo posebno je izraženo za nanokristale veličine manje od 100 nm kojima se tlak i brzina otapanja eksponencijalno povećavaju (Chen,2013).

Prilagođeni nanokristali uspješno su izrađeni procesom visokotlačne homogenizacije, a kontrolom brojnih procesnih parametara izrađeni su kristali veličine od 172 nm do 602 nm.

Pokazalo je da veličina nanokristala jako utječe na biološku bioaktivnost aktivne tvari. Manji nanokristali ostvaruju veći broj kontakata sa staničnom membranom što rezultira boljom biološkom aktivnošću. Također, jedna od prednosti manjih nanokristala ujedno je i puno bolja apsorpcija. Prema tome, veća koncentracija i manja veličina, čine nanokristale kvercetina više

potentnima, međutim i toksičnima. Stoga je izrazito važno odrediti ispravnu koncentraciju i veličinu nanokristala kako bi se potencijalna toksičnost smanjila na minimum (Chen, 2013). Rezultati opisanih istraživanja pokazali su da nanokristali kvercetina u određenim okolnostima pokazuje prooksidacijske i citotoksične učinke. Nadalje, rezultati predstavljene studije podupiru ideju da je neurotoksičnost nanokristala kvercetina posljedica prooksidativnog utjecaja kvercetina. Ipak, za točniju prosudbu predložene su daljnje studije, inače bi uklapanje biološki aktivnih tvari u formulacije nanokristala mogao postati "dvostruki mač" (Chen, 2013).

#### **4.6.1.2. RUTIN**

Rutin je dobro poznat antioksidans iz skupine flavonoida. Međutim njegova uporaba u kozmetičkim proizvodima ograničena je zbog slabe topljivosti. Kako bi se prevladalo spomenuto ograničenje, potaknuta je proizvodnja nanokristala rutina ARTcrystal<sup>®</sup> tehnologijom.

ARTcrystal<sup>®</sup> tehnologija je nova tehnologija za učinkovitiju proizvodnju nanokristala u industrijskom mjerilu proizvodnje. Sastoji se od koraka predobrade visokoturažnim miješanjem i naknadne visokotlačne homogenizacije pri smanjenom tlaku i brojem homogenizacijskih ciklusa. Proces je brži i isplativiji u odnosu na klasičnu visokotlačnu homogenizaciju ili kombinirane postupke.

Veličine čestica dobivenih ARTcrystal<sup>®</sup> tehnologijom slične su veličini čestica dobivenih uobičajenim metodama visokotlačne homogenizacije, vlažnog mljevenja ili kombinacije takvih postupaka. Vrijeme potrebno za proizvodnju je manje od zahtjeva konvencionalnih metoda. Nadalje, metoda je jednostavna i troši manje energije, u između ostalog izbjegava teške uvjete proizvodnje. Stoga je nova metoda obećavajuća alternativa za proizvodnju nanokristala biološki aktivnih tvari.

#### **4.6.2. SREDNJE TOPLJIVE BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI**

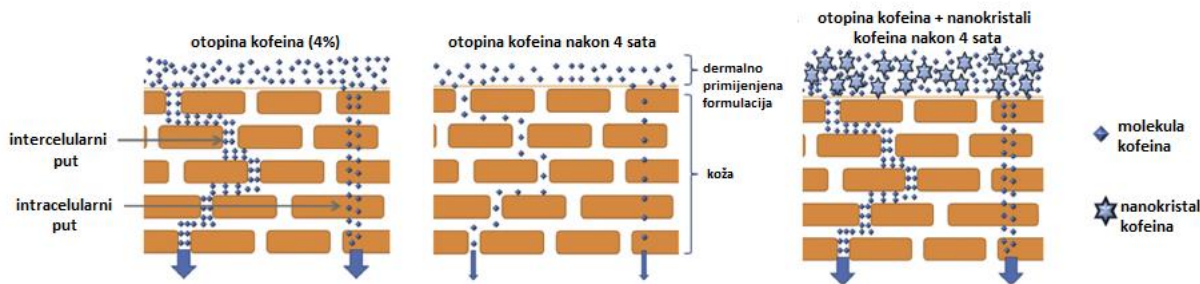
Zhai i suradnici (2014) u svome radu upotrijebili su kofein kao modelnu tvar koja je relevantna za proizvode na tržištu, a razvijen je određeni proces za proizvodnju nanokristala kofeina s ciljem prevladavanja učinka rasta kristala i formiranja vlakana povezanih sa superzasićenjem, tipično za srednje topljive spojeve (Zhai i sur., 2014).

Na prvi pogled, činilo se da uopće nema smisla obraditi srednje topljive djelatne tvari u oblik nanokristala, budući da su ionako topljivi. Međutim, od velikog značaja biti će spojevima

poput kofeina, kojima je penetracija u kožu uglavnom funkcija aktivne koncentracije primijenjene dermalne formulacije. Zbog prijenosa u kožu, smanjuje se koncentracija kofeina u primijenjenoj formulaciji, posljedično smanjuje se i penetracija u kožu. Stoga, izrada nanokristala kofeina ima smisla, osiguravajući pri tome depo za otapanje kako bi se održao konstantni koncentracijski gradijent i time odgovarajuća penetracija u kožu. Procjenjuje se da su folikuli dlake važni u perkutanom prodiranju topikalno primijenjene djelatne tvari. Utjecaj veličine čestica na penetraciju djelatne tvari putem folikula dlake u odnosu na dubinu prodiranja procijenjena je korištenjem mnoštva modela. Utvrđeno je da nanočestice s veličinom u rasponu od 650 do 750 nm penetriraju dublje od manjih ili većih (Patzelt i sur., 2011). Stoga, razvoj nanokristala kofeina s optimiranom veličinom može dodatno povećati prijenos djelatne tvari u kožu putem akumulacije u folikule dlake. Proizvodnja nanokristala iz srednje topljivih djelatnih tvari izazovnija je nego iz slabo topljivih djelatnih. U procesu proizvodnje, ravnotežna topljivost povećava se smanjenjem veličine. Učinak superzasićenja može prouzročiti izrazitu rekristalizaciju i rast kristala.

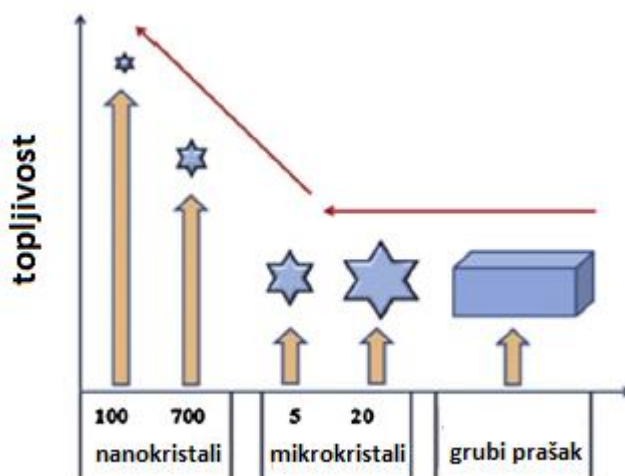
Cilj istraživanja Zhaia i suradnika (2014) bio je razviti specifičan proizvodni proces koji omogućava proizvodnju fizički stabilnih nanokristala iz djelatne tvari srednje topljivosti. Kako kofein pokazuje takva svojstva, odabrana je kao modelna tvar u ovoj studiji. Ideja kojom su se vodili znanstvenici bila je uklopiti srednje topljivu djelatnu tvar, u ovom slučaju kofein, u oblik nanokristala kako bi se povećala penetracija u kožu.

Prodiranje kofeina u kožu može se pojačati povećanjem koncentracije kofeina u dermalno primijenjenoj formulaciji, tj. povećanjem od 1% do 4%. Nakon određenog vremena od primjene, tj. nakon 4 sata, koncentracija kofeina u formulaciji (4%) smanjila se zbog prijenosa u kožu. To je dovelo do smanjene penetracije uslijed smanjenog koncentracijskog gradijenta. Primjenom pripadajuće nanokristalne formulacije kofeina, prijenos kofeina u kožu dopunjeno je brzim otapanjem kofeina iz depoa nanokristala, u podlozi. Obradom kofeina u oblik nanokristala, osigurava se depo te se može izbjeći smanjenje koncentracije kofeina u formulaciji čime se održava konstantni koncentracijski gradijent i posljedično konstantni prijenos u kožu (slika 14) (Zhai i sur., 2014).



**Slika 14.** Suvremeni koncept nanokristala s ciljem povećanja isporuke srednje topljivih djelatnih tvari u kožu (prilagođeno prema Zhai i sur., 2014).

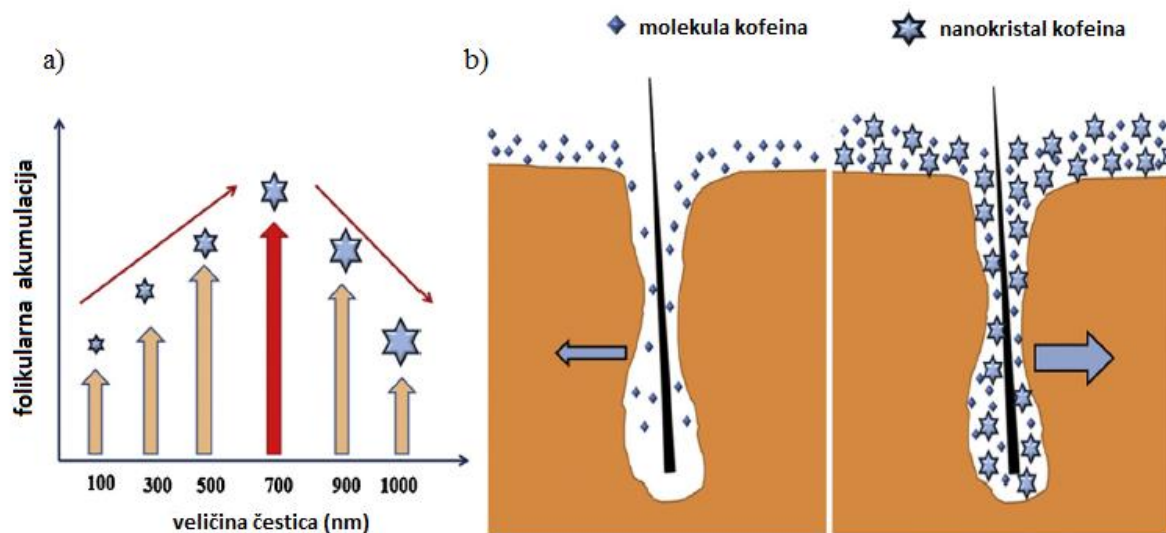
Prednost nanokristala je ta da pokazuju veću ravnotežnu topljivost u usporedbi s mikroniziranim kristalima, kao i svojstvo bržeg otapanja (slika 15) (Müller i sur., 2011).



**Slika 15.** Shematski prikaz utjecaja nanonizacije grubog praška djelatne tvari na topljivost i brzinu otapanja (prilagođeno prema Zhai i sur., 2014).

Nedavna istraživanja pokazala su da folikuli dlake igraju značajnu ulogu u prodiranju djelatne tvari u kožu. Nanokristali s odgovarajućom veličinom čestica (približno 700 nm) mogu prodrijeti u ili biti zarobljeni unutar folikula dlake do specifičnih dubina (slika 16a). Nanonizacija kofeina povećava ravnotežnu topljivost i koncentracijski gradijent i s tim povezano prodiranje u kožu putem intercelularnih i transcelularnih puteva je povećano. Nadalje, prilagodbom veličine nanokristala kofeina u folikulima dlake, povećava se penetracija u okolne stanice (slika 16b) (Patzeltet i sur., 2011).





**Slika 16.** Shematski prikaz kombinacije novog nanokristalnog koncepta i folikularne akumulacije (prilagođeno prema Zhai i sur., 2014).

Proizvodnja nanokristala iz srednje topljivih aktivnih tvari predstavlja problem zbog pretjerane rekristalizacije i s njom povezanim rastom kristala. Istraživanje kofeinom kao modelnim spojem pokazalo je da se i srednje topljive djelatne tvari mogu obraditi u oblik nanokristala. Rast kristala uzrokovan višestupanjskim učincima može biti značajno smanjen kombinacijom odgovarajućih uvjeta proizvodnje i sastava formulacije (npr. niskoenergetski proces, niska dielektrična konstanta disperzijskog sredstva te korištenje optimalnog stabilizatora). Istaživanjem je pokazano da postoji određena granica topljivosti iznad koje nastupa rast kristala. Tipična topljivost slabo topljivih djelatnih tvari su je u rasponu od 1 do 10 mg / mL, dok u slučaju kofeina iznosi oko 10 mg / mL. Međutim, treba napomenuti da je potrebno korištenje nisko energetskog procesa mljevenja, kao i dodatak stabilizatora. Prilikom samog postupka nanoniziranja djelatne tvari nastaju nove granične površine i s njima povezana povećana površinska energija. Netom pripremljeni nanokristali djelatne tvari su termodinamički nestabilni te imaju tendenciju stvaranja aglomerata. Za razliku od slabo topljivih djelatnih tvari gdje rekristalizacija predstavlja manji problem u odnosu na njihovu slabu topljivost, u slučaju srednje topljivih djelatnih tvari fenomen rekristalizacije ima značajan utjecaj na stabilnost. U ovom slučaju, stabilizator treba pokazati dvostruko djelovanje u sprječavanju agregacije zbog: (i) povećane površinske energije (ii) otapanja i učinka rekristalizacije. Stoga, izbor odgovarajućeg stabilizatora ima ključnu ulogu u stabilizaciji nanokristala djelatne tvari.

## 5. ZAKLJUČAK

Unatoč mnogobrojnim izazovima, nanokristali djelatne tvari predstavljaju vrlo obećavajući, općenito prihvatljivi pristup za povećanje topljivosti i brzine otapanja slabo topljivih i netopljivih djelatnih tvari. Osim toga, jedinstven su i učinkovit pristup rješavanja prisutnih problema kao što su slaba bioraspoloživost povezana s isporukom slabo topljivih djelatnih tvari. Problemi otapanja slabo topljivih djelatnih tvari uglavnom se rješavaju kako bi se poboljšala apsorpcija i bioraspoloživost djelatne tvari. Na temelju provedenih istraživanja i analize prikupljenih literaturnih podataka, izvedeni su sljedeći zaključci:

- Nanokristali djelatne tvari osiguravaju kontrolirano oslobađanje djelatne tvari i povećano zadržavanje djelatne tvari na koži te pružaju zaštitu djelatne tvari od kemijskih ili fizičkih nestabilnosti.
- Povećana brzina otapanja, poboljšana bioraspoloživost, mogućnost prilagodbe značajki površine, relativna jednostavnost izrade konačnih farmaceutskih oblika proširile su mogućnost primjene biološki aktivnih tvari u obliku nanokristala.
- Zahvaljujući povećanoj topljivosti, povećanoj brzini otapanja i posljedično povećanoj adhezivnosti na površini apsorpcijskih barijera formulacija djelatne tvari u obliku nanokristala pokazuje značajnu superiornost i bolju dermalnu bioraspoloživost u odnosu na konvencionalne pripravke.
- Nanokristali biološki aktivnih tvari osiguravaju depo u podlozi čime se održava konstantni koncentracijski gradijent i posljedično konstantan prijenos preko barijere kože nakon primjene.

## 6. LITERATURA

Anissimov YG, Jepps OG, Dancik Y, Roberts MS. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, 65, 169-190.

Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *J Pharm Sci*, 2010, 99, 21-50.

Chen H, Khemtong C, Yang X, Chang X, Gao J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discov Today*, 2011, 16, 354-360.

Chen R. Tailor made antioxidative nanocrystals: production and in vitro efficacy. Ph. D. Thesis, Freie Universität Berlin, Germany, 2013, [https://refubium.fuberlin.de/bitstream/handle/fub188/2524/Dissertation\\_Chen\\_Run.pdf?sequence=1](https://refubium.fuberlin.de/bitstream/handle/fub188/2524/Dissertation_Chen_Run.pdf?sequence=1), pristupljeno 15.01.2018.

Čajkovac M. Kozmetologija, Jastrebarsko, Naklada slap, 2000, str. 25-53.

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

Degim IT. New tools and approaches for predicting skin permeability. *Drug Discov Today*, 2006, 11, 517-523.

Gao L, Zhang D, Chen M. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J Nanopart Res*, 2008, 10, 845-862.

Geerligs, M. Skin layer mechanics. The Netherlands, TU Eindhoven, 2010, str. 13 - 19.

Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: the years of enlightenment. *Int J Pharm*, 2005, 305, 2-12.

Junyaprasert VB, Morakul B. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Asian J Pharm Sci*, 2015, 10, 13-23.

Junghanns J-UAH, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*, 2008, 3, 295-310.

Karadzovska D, Brooks JD, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Predicting skin permeability from complex vehicles. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, 65, 265-277.

Keck, CM, Müller, RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 62.1, 3-16.

Kobierski S, Ofori - Kwakye K, Müller RH, Keck CM. Resveratrol nanosuspensions: interaction of preservatives with nanocrystal production. *Pharmazie*, 2011, 66, 942-947.

Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci*, 2006, 123, 369-385.

Lipozenčić J. Uloga kože, razvitak kože, pregled građe i funkcije kože. U: J.Lipozenčić(ur) i sur. *Dermatovenerologija*, Zagreb, Medicinska naklada 2004.

Lovrić, J., Hafner, A., Radiković, M., Juretić, M., Dürriegl, M., Perina Lakoš, G., Pepić, I. Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva. *Farm Glas*, 2015, 71, 355-384.

Lu Y, Li Y, Wu W. Injected nanocrystals for targeted drug delivery. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6, 106-113.

Mauludin R, Müller RH, Keck CM. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *Int J Pharm*, 2009, 370, 202-209.

Mishra PR, Shal LA, Müller RH, Keck CM. Production and characterization of hesperitin nanosuspensions for dermal delivery. *Int J Pharm*, 2009, 371, 182-189.

Moschwitz J, Müller RH. Drug nanocrystals - the universal formulation approach for poorly soluble drugs. U: Nanoparticulate drug delivery systems, Thassu D, Deleers M, Pathak Y, urednici, New York: Informa Healthcare, 2007, str. 71-88.

Müller RH, Shegokar R, Gohla S, Keck CM. Nanocrystals: Production, Cellular Drug Delivery, Current and Future Products, in Intracellular Delivery. U: Fundamentals and Applications, Prokop A, ured, Berlin, Springer Science+Business Media, 2011, str. 411-432.

Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals-special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 78, 1-9.

Nagare SK, Ghurghure SM, Khade AB, Jadhav SG, Salunkhe SB. A Review on: Nanosuspensions - An Innovative Acceptable Approach in Novel Delivery System. *Indian J Nov Drug Deliv* 2012, 4, 189-201.

Paese K, Jäger A, Poletto FS, Pinto EF, Rossi-Bergmann B, Pohlmann AR, Guterres SS. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: effectiveness, in vitro photostability and immune response. *J Biomed Nanotechnol*, 2009, 5, 1-7.

Patel HM, Patel BB, Shah CN. Nanosuspension: A novel approach to enhance solubility of poorly water soluble drugs - A review. *Int J Adv Pharm*, 2016, 5, 21-29.

Patzelt A, Richter H, Knorr F, Schäfer F, Lehr CM, Dähne L, Sterry W, Lademann J. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J Control Release*, 2011, 150, 45-48.

Paul W, Sharma CP. Advances in Wound Healing Materials: Science and Skin Engineering,U: The Anatomy and Functions of Skin, Shawbury UK, Smithers Rapra Technology Ltd, 2015, str. 25-32.

Pawar VK, Singh Y, Meher JG, Gupta S, Chourasia MK. Engineered nanocrystal technology: in-vivo fate, targeting and applications in drug delivery. *J Control Release*, 2014, 183, 51-66.

Peng L. Nanocrystal formulation for poorly soluble drugs. Ph. D. Thesis, Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki, Finland, 2013, <https://core.ac.uk/download/pdf/18616586.pdf>, pristupljeno 15.01.2018.

Pireddu R, Caddeo C, Valenti D, Marongiu F, Scano A, Ennas G, Lai F, Fadda AM, Sinico C. Diclofenac acid nanocrystals as an effective strategy to reduce in vivo skin inflammation by improving dermal drug bioavailability. *Colloid Surface B*, 2016, 143, 64-70.

Prow TW, Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W, Wurm EMT, Yoong C, Robertson TA, Soyer HP, Roberts MS. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2011, 63, 470-491.

Pyo SM, Meinke M, Klein AF, Fischer TC, Müller RH. A novel concept for the treatment of couperosis based on nanocrystals in combination with solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm*, 2016, 510, 9-16.

Sharma R, Jain S, Tiwari R. Nanoparticle technology: formulating poorly water - soluble compounds. *Int J Pharm Sci Res*, 2015, 6, 57.

Shegokar R., Müller HR. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Nanomedicine*, 2010, 399, 129-139.

Shen C, Li R, Shen B, Shen G, Wang L, Zheng J, Li X, Min H, Han J, Yuan H . Influence of drug physicochemical characteristics on in vitro transdermal absorption of hydrophobic drug nanosuspensions. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41, 1997-2005.

Singh CK, Tiwari V, Shankar R, Mishra CP, Jain S, Jaiswal S. A short review on oral fast dissolving film containing cefpodoxime proxetil nanoparticle. *World J Pharm Pharm Sci*, 2016, 5, 1549-1577.

Vidlarova L, Romero GB, Hanus J, Stepanek F, Müller RH. Nanocrystals for dermal penetration enhancement - Effect of concentration and underlying mechanisms using curcumin as model. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 104, 216-225.

Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J Control Release*, 2013, 172, 1126-1141.

Wu L, Zhang J, Watanabe W . Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63, 456-469.

Yadollahi R, Vasilev K, Simovic S. Nanosuspension technologies for delivery of poorly soluble drugs. *J Nanomater*, 2015, 1-13.

Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov Today*, 2012, 17, 71-80.

Zhai X, Lademann J, Keck CM, Müller RH. Nanocrystals of medium soluble actives - novel concept for improved dermal delivery and production strategy. *Int J Pharm*, 2014, 470, 141-150.

## 7. SAŽETAK

Nanokristali djelatne tvari pripadaju skupini suvremenih terapijskih nanosustava kojima se nastoje poboljšati farmaceutsko-tehnološka i/ili biofarmaceutska svojstva biološki aktivne tvari. Obzirom na izradu nanokristala farmaceutsko-tehnološke metode moguće je podijeliti u dvije glavne skupine: (i) metode smanjenja veličine čestica (engl. *top-down methods*) i (ii) metode povećanja veličine čestica (engl. *bottom-up methods*). Osnovni cilj ovog diplomskog rada bio je proučiti znanstvenu literaturu i pregledno izdvojiti najnovije informacije vezane uz tehnologiju izrade nanokristala i njihovu dermalnu primjenu. Učinkovitost dermalne primjene ovisi o složenom međuodnosu značajki biološki aktivne tvari, podloge i kože. Fizičko-kemijske značajke biološki aktivnih tvari vrlo često ograničavaju njihovu primjenu. Primjenom tehnologije nanokristala moguće je osigurati bolju učinkovitost slabo topljivih biološki aktivnih tvari nakon dermalne primjene. Zahvaljujući povećanoj topljivosti, povećanoj brzini otapanja i posljedično povećanoj adhezivnosti farmaceutski oblik s uklopljenim nanokristalima pokazuje poboljšanu dermalnu bioraspoloživost u odnosu na konvencionalne pripravke. Daljnji razvoj i primjena tehnologije nanokristala biološki aktivnih tvari zasigurno će pridonijeti učinkovitijem i sigurnijem liječenju različitih oboljenja kože.



## **SUMMARY**

Drug nanocrystals belong to a group of modern therapeutic nanosystems seeking to improve pharmaceutical and/or biopharmaceutical properties of biologically active ingredients. Pharmaceutical-technological methods can be divided into two main groups, according to the type of development of drug nanocrystals: (i) top-down methods and (ii) bottom-up methods. The main aim of this diploma thesis was to study scientific literature and abstract the latest information on nanocrystal technology and dermal application of nanocrystals. The efficacy of dermal application depends on the complex interrelationship of the properties of biologically active ingredients, substrates properties and skin properties. The physicochemical properties of biologically active ingredients often limit their application. By using nanocrystal technology, it is possible to provide better efficacy of poorly soluble biologically active ingredients after their dermal application. Due to increased saturation solubility, increased dissolution velocity and, consequently, increased adhesiveness, pharmaceutical form with embedded nanocrystals shows improved dermal bioavailability, compared to the conventional formulations. Further development and application of nanocrystal technology of biologically active ingredients will certainly contribute to more effective and safer treatment of various skin diseases.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### NANOKRISTALI S BIOLOŠKI AKTIVNIM TVARIMA U DERMALNOJ PRIMJENI

Danijela Babić

#### SAŽETAK

Nanokristali djelatne tvari pripadaju skupini suvremenih terapijskih nanosustava kojima se nastoje poboljšati farmaceutsko-tehnološka i/ili biofarmaceutska svojstva biološki aktivne tvari. Obzirom na izradu nanokristala farmaceutsko-tehnološke metode moguće je podijeliti u dvije glavne skupine: (i) metode smanjenja veličine čestica (engl. *top-down methods*) i (ii) metode povećanja veličine čestica (engl. *bottom-up methods*). Osnovni cilj ovog diplomskog rada bio je proučiti znanstvenu literaturu i pregledno izdvojiti najnovije informacije vezane uz tehnologiju izrade nanokristala i njihovu dermalnu primjenu. Učinkovitost dermalne primjene ovisi o složenom međudodnosu značajki biološki aktivne tvari, podloge i kože. Fizičko-kemijske značajke biološki aktivnih tvari vrlo često ograničavaju njihovu primjenu. Primjenom tehnologije nanokristala moguće je osigurati bolju učinkovitost slabo topljivih biološki aktivnih tvari nakon dermalne primjene. Zahvaljujući povećanoj topljivosti, povećanoj brzini otapanja i posljedično povećanoj adhezivnosti farmaceutski oblik s uklopljenim nanokristalima pokazuje poboljšanu dermalnu bioraspoloživost u odnosu na konvencionalne pripravke. Daljnji razvoj i primjena tehnologije nanokristala biološki aktivnih tvari zasigurno će pridonijeti učinkovitijem i sigurnijem liječenju različitih oboljenja kože.

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

Rad sadrži: 44 stranica, 16 grafičkih prikaza, 1 tablica i 44 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanokristali, biološki aktivne tvari, dermalna primjena

Mentor: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### NANOCRYSTALS WITH BIOLOGICAL ACTIVE INGREDIENTS IN DERMAL APPLICATION

Danijela Babić

#### SUMMARY

Drug nanocrystals belong to a group of modern therapeutic nanosystems seeking to improve pharmaceutical and/or biopharmaceutical properties of biologically active ingredients. Pharmaceutical-technological methods can be divided into two main groups, according to the type of development of drug nanocrystals: (i) top-down methods and (ii) bottom-up methods. The main aim of this diploma thesis was to study scientific literature and abstract the latest information on nanocrystal technology and dermal application of nanocrystals. The efficacy of dermal application depends on the complex interrelationship of the properties of biologically active ingredients, substrates properties and skin properties. The physicochemical properties of biologically active ingredients often limit their application. By using nanocrystal technology, it is possible to provide better efficacy of poorly soluble biologically active ingredients after their dermal application. Due to increased saturation solubility, increased dissolution velocity and, consequently, increased adhesiveness, pharmaceutical form with embedded nanocrystals shows improved dermal bioavailability, compared to the conventional formulations. Further development and application of nanocrystal technology of biologically active ingredients will certainly contribute to more effective and safer treatment of various skin diseases.

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

Thesis includes: 44 pages, 16 figures, 1 table and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nanocrystals, biological active ingredients, dermal application

Mentor: **Ivan Pepić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Pepić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasmina Lovrić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2018.