

Određivanje mukoadhezivnih svojstva kationskih nanoemulzija

Šare, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:572173>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



Marija Šare

**Određivanje mukoadhezivnih svojstva kationskih
nanoemulzija**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasmine Lovrić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Jasmini Lovrić, na stručnom vodstvu, uloženom vremenu i savjetima prilikom pisanja ovoga rada.

Hvala Biseri Jurišić Dukovski, mag. pharm., na strpljenju i pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada i savjetima prilikom pisanja rada.

Hvala Danki Bračko, mag. pharm., na omogućavanju izrade nanoemulzija u suradnji s tvrtkom PLIVA d.o.o.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog studija.

SADRŽAJ

SADRŽAJ	3
1. UVOD	1
1.1. Izazovi topikalne oftalmičke primjene lijekova	1
1.1.1. Barijere prednjeg dijela oka	1
1.1.2. Nanoemulzije kao oftalmički pripravci	4
1.1.3. Mukoadhezivnost	6
1.1.4. Metode ispitivanja mukoadhezivnosti	9
1.2. Svojstva i karakteristike nanoemulzija	10
1.2.1. Veličina kapljica i indeks polidisperznosti	10
1.2.2. Optička svojstva	10
1.2.3. Stabilnost nanoemulzija	11
1.2.4. Reološka svojstva	13
1.2.5. Elektrokemijska svojstva	13
1.3. Metode izrade nanoemulzija	15
1.3.1. Visokoenergetske metode	15
1.3.2. Niskoenergetske metode	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Materijali	19
3.2. Metode	19
3.2.1. Izrada nanoemulzija	19
3.2.2. Ispitivanje reoloških svojstava	19
3.2.3. Određivanje pH	21
3.2.4. Određivanje površinske napetosti	21

3.2.5.	Određivanje veličine kapljica	22
3.2.6.	Određivanje zeta-potencijala	22
3.2.7.	Ispitivanje mukoadhezivnosti	23
4.	REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1.	Priprava nanoemulzija	25
4.2.	Karakterizacija nanoemulzija.....	25
4.2.1.	Ispitivanje reoloških svojstava	25
4.2.2.	Određivanje pH	27
4.2.3.	Određivanje površinske napetosti	28
4.2.4.	Određivanje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti	29
4.2.5.	Određivanje zeta - potencijala	30
4.3.	Ispitivanje mukoadhezivnosti	31
4.3.1.	Inkubacija nanoemulzija s 0,015 %-tnom disperzijom mucina	31
4.3.2.	Inkubacija nanoemulzija s 1 %-tnom disperzijom mucina.....	34
5.	ZAKLJUČCI	42
6.	LITERATURA	44
7.	SAŽETAK/SUMMARY	50
8.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Izazovi topikalne oftalmičke primjene lijekova

Topikalna primjena lijekova je najrašireniji i opće prihvaćen način liječenja velikog broja bolesti oka. Međutim, bioraspoloživost topikalnih oftalmičkih lijekova je mala zbog vrlo učinkovitih protektivnih mehanizama oka. Treptanje, suzenje oka i nazolakrimalna drenaža zaslužni su za brzo uklanjanje stranih tvari, uključujući i lijekova, s površine oka (Ludwig, 2005). Složena struktura očne jabučice, koja uključuje brojne barijere, također značajno ograničava bioraspoloživost lijekova za oftalmičku primjenu. Obično se manje od 5 % lijeka apsorbira kroz rožnicu i bijeloočnicu i dolazi do intraokularnih tkiva. Poboljšanje bioraspoloživosti oftalmičkih lijekova veliki je izazov (Gan i sur., 2013).

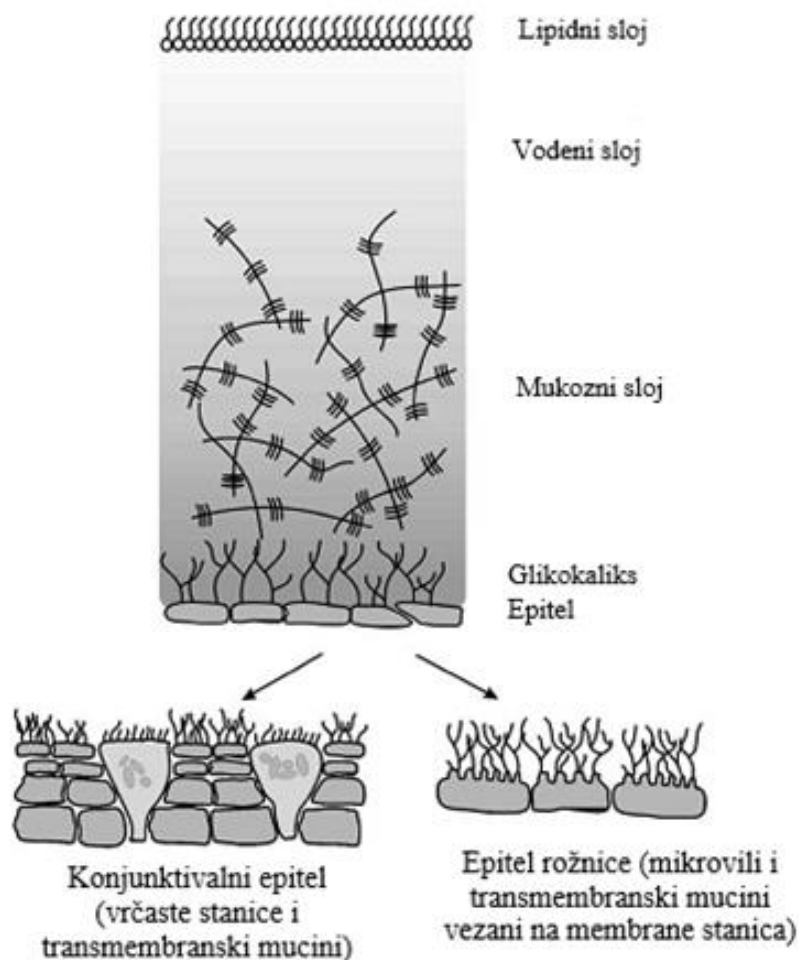
Konvencionalne kapi za oko, koje su najčešće u obliku vodenih otopina i suspenzija, brzo se uklanjaju iz prekornealnog područja. Iz tog razloga ovi farmaceutski oblici zahtijevaju učestalo doziranje kako bi se održala terapijska koncentracija lijeka na ciljnom području. Kako bi se postigla dostatna apsorpcija lijeka, potrebno je osigurati dovoljno dug kontakt pripravka i površine oka (Rathore, 2009).

1.1.1. Barijere prednjeg dijela oka

Suze se kontinuirano izlučuju sa svrhom vlaženja površine oka i ispiranja egzogenih tvari s površine oka te su stoga odgovorne za kratko vrijeme zadržavanja i slabu apsorpciju topikalno primijenjenih oftalmičkih lijekova (Lallemand i sur., 2012).

Suzni film se sastoji od tri sloja. Izvana prema unutra to su lipidni, vodeni te mukozni sloj koji je u kontaktu s epitelnim stanicama rožnice. Lipidni sloj od velike je važnosti za stabilnost suznog filma; omogućuje rasprostiranje suza po površini oka, sprječava isparavanje vodenog sloja te stabilizira suzni film smanjenjem površinske napetosti. Približno 90 % suznog filma čini vodeni sloj čija je funkcija vlaženje površine oka i opskrba epitelnih stanica rožnice kisikom. Vodeni sloj sadrži elektrolite, peptide i male molekule metabolita. Između vodenog i mukoznog sloja ne postoji stroga granica već je dio mucina dispergirani u vodenom mediju (topljivi mucini), a dio vezan na

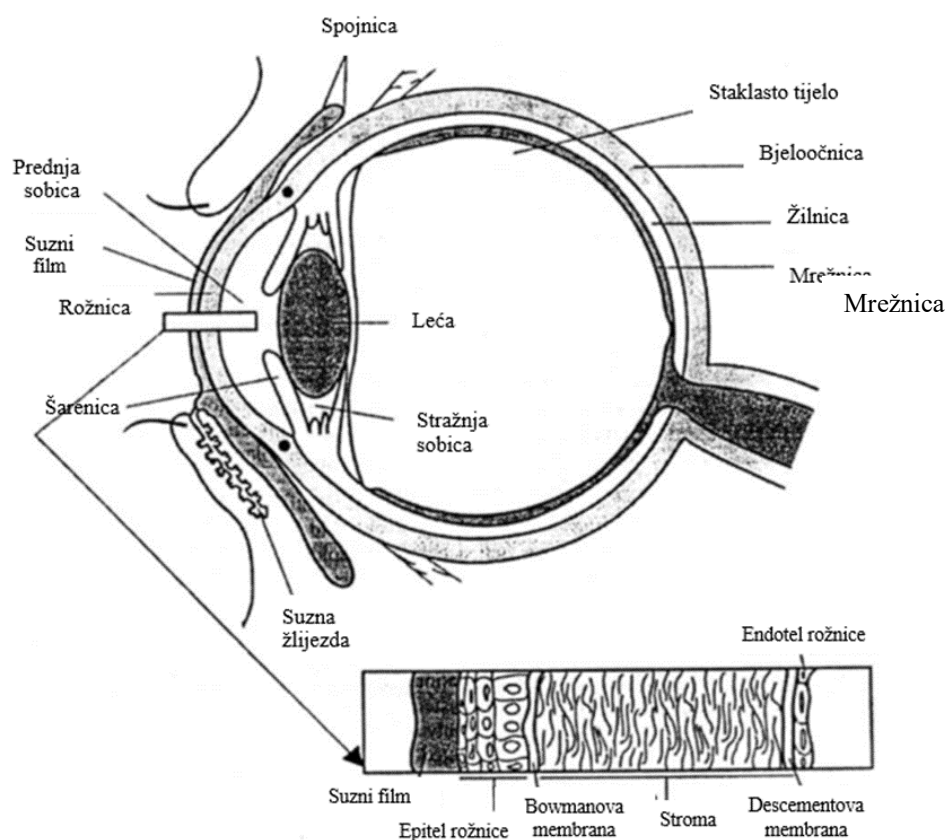
površinu epitelnih stanica rožnice i spojnice (transmembranski mucini) (Gan i sur., 2013; Zhou i Beuerman, 2012).



Slika 1. Građa suznog filma (preuzeto i prilagođeno iz: Ludwig, 2005)

Suzni sustav dijelimo na sekretorni i odvodni sustav. Sekretorni dio su suzne Źlijezde koje se nalaze u gornjem lateralnom fornixu. Izlučene suze preko suznih točki (punkta) dreniraju u odvodni sustav. Treptanje potiče kretanje suza prema punktima. Prilikom treptaja kontrakcija kruŹnog oćnog mišića (orbikularisa) vuče lateralni zid suzne vrećice šireći je lateralno. To stvara negativni pritisak i aspirira suze. Prilikom relaksacije nakon treptaja suzna vrećica kolabira, što tjera akumulirane suze u suznonosni (nazolakrimalni) kanal.

Sljedeća zaštitna barijera je rožnica. Rožnica je jedno od najosjetljivijih tkiva u tijelu, bogato je inervirana senzibilnim živčanim vlaknima te može detektirati promjene pH i osmolarnosti što inducira reflekse treptanja i suzenja oka. Rožnica predstavlja čvrstu strukturnu barijeru građenu od slojeva s naizmjeničnim hidrofilnim i lipofilnim svojstvima kako bi se spriječila apsorpcija neželjenih tvari s površine oka (Lallemand i sur., 2012). Rožnica je bistro, prozirno, avaskularno tkivo koje se hranjivim tvarima i kisikom opskrbljuje preko suza. Sastoji se od pet slojeva: lipofilni epitel, Bowmanov sloj, hidrofilna stroma, Descemetova membrana i lipofilni endotel. Epitel je građen od pet do šest slojeva stanica, a površinske stanice su blisko povezane, tvoreći ne samo djelotvornu barijeru za većinu mikroorganizama, već i za apsorpciju lijekova. Za slabu permeabilnost rožnice odgovorne su čvrste veze (engl. *tight junction*) između površinskih stanica (Ludwig, 2005). Rožnica stoga predstavlja važnu barijeru u apsorpciji lijekova, a kako bi je lijek uspješno prevladao mora imati i lipofilna i hidrofilna svojstva (Rathore, 2009).



Slika 2. Građa očne jabučice; detaljan prikaz pet različitih slojeva rožnice (preuzeto i prilagođeno iz: Ludwig 2005)

1.1.2. Nanoemulzije kao oftalmički pripravci

U široj literaturi, nanoemulzije su definirane kao bistre ili transparentne emulzije čije su kapljice unutarnje faze manje od 200 nm. Međutim, u farmaceutskoj literaturi termin nanoemulzije često podrazumijeva i mliječno-bijele emulzije s kapljicama promjera do 500 nm (Anton i Vandamme, 2009). Nanoemulzije mogu biti U/V tipa ako se radi o kapljicama ulja dispergiranim u vodi ili V/U ukoliko su kapljice vode dispergirane u ulju (McClements, 2012).

Na granici između vanjske i unutarnje faze nalaze se površinski aktivne tvari koje stvaraju elastičan film (smanjuju površinsku napetost i sprječavaju agregaciju kapljica) te pospješuju stabilnost nanoemulzija. Smještaj na granici faza omogućuje im njihova molekulska struktura jer se hidrofilni dijelovi molekule orijentiraju prema vodenoj, a hidrofobni prema uljnoj fazi. Na temelju udjela hidrofilnih i lipofilnih dijelova u ukupnoj molekulskoj masi odnosno HLB vrijednosti (engl. *Hydrophile-lipophile balance*), razlikujemo površinski aktivne tvari V/U tipa (HLB 3-8) ili U/V tipa (HLB 10-18) (Singh i sur., 2017; Rai i sur., 2017). Ovisno o naboju hidrofilne funkcionalne skupine, površinski aktivne tvari možemo podijeliti na kationske (stearilamin, oleilamin, benzalkonijev klorid, didodecil amonijev bromid), anionske (natrijev dodecil sulfat), amfoterne (fosfolipidi) i neionske (Poloksameri, Tyloxapol, Spanovi, Tweenovi) (Singh i sur., 2017; Tamilavanan i sur., 2004).

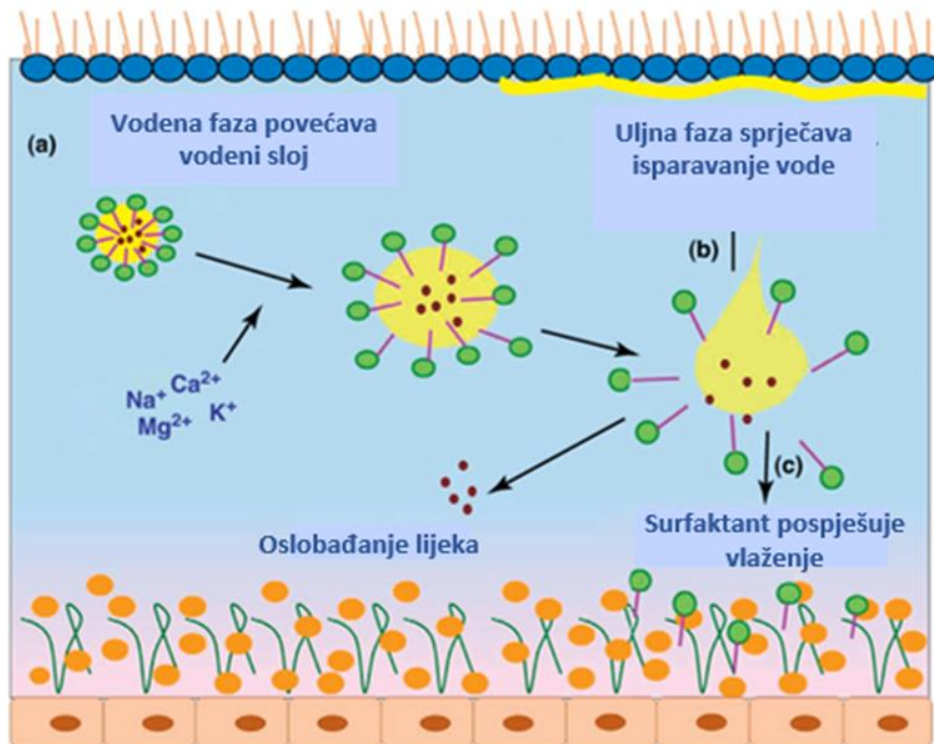
Kako bi se osigurala stabilnost nanoemulzija, sile odbijanja između kapljica moraju biti dovoljno jake da spriječe agregaciju kapljica. To se može postići steričkim i elektrostatskim odbijanjem, ili pak kombinacijom navedenih. Ionske površinski aktivne tvari povećanjem površinskog naboja povećavaju elektrostatske odbojne sile, a neionske osiguravaju stabilnost steričkom stabilizacijom (García-Celma i sur., 2016; McClements, 2002). Neionske površinski aktivne tvari su manje toksične i iritirajuće od ionskih, osobito kationskih. Vrlo često se koristi kombinacija različitih površinski aktivnih tvari. Za pripremu U/V nanoemulzija najprikladnije su neionski površinski aktivne tvari HLB vrijednosti 8-16 (Rai i sur., 2017).

Nanoemulzije predstavljaju jedno od inovativnih farmaceutsko-tehnoloških rješenja prethodno navedenih izazova topikalne oftalmičke primjene lijekova. Naime, nanoemulzije su se pokazale kao sustavi za isporuku lijekova koji omogućuju produljeno zadržavanje lijeka na površini oka te kontrolirano oslobađanje lijekova, bilo malih lipofilnih molekula bilo oligonukleotida korištenih u

genskoj terapiji. Vrlo male uljne kapljice nanoemulzija bolje prodiru kroz rožnicu pa pogoduju boljoj apsorpciji topikalno primijenjenih lijekova (Sutradhar, 2013; Anton i Vandamme, 2009).

Prednosti nanoemulzija u odnosu na konvencionalne emulzije uključuju značajno veću stabilnost sustava, poboljšanu topljivost slabo topljivih lijekova, poboljšanu apsorpciju zbog manje veličine kapljica, a veće specifične površine u kontaktu s apsorpcijskom membranom što sve zajedno utječe na povećanje bioraspoloživosti uklopljenog lijeka (Rai i sur., 2017).

Za oftalmičku primjenu koriste se isključivo U/V nanoemulzije (Lallemand i ostali, 2012; Tamilvanan i Benita, 2004). Njihova su svojstva slična onima troslojnog suznog filma. Nakon primjene, kontinuirana (vodena) faza nanoemulzije povećava volumen vodenog sloja suznog filma i dodatno vlaži rožnicu. Raspadanjem kapljica uljne faze oslobađaju se uklopljene djelatne tvari, a uljna faza se spaja s prirodnim lipidnim slojem i tako pridonosi smanjenju gubitka vodenog sloja isparavanjem. Ulja koja se koriste za izradu emulzija visoko su pročišćena i pokazuju odličnu biokompatibilnost s okom, uz minimalne nuspojave.



Slika 3. Prikaz destabilizacije U/V nanoemulzija u suznom filmu (preuzeto i prilagođeno iz: Gan i sur., 2013)

Dokazano je da surfaktanti mogu povećati debljinu mukoznog sloja i pospješiti sposobnost vlaženja koju posjeduje suzni film. Ovakva svojstva nanoemulzija mogu se iskoristiti u liječenju bolesti suhog oka.

Pri topikalnoj oftalmičkoj primjeni nanoemulzije U/V tipa povećavaju bioraspoloživost lijeka na način da produljuju vrijeme kontakta i povećavaju permeabilnost rožnice (Gan i sur., 2013). Naime, oftalmički pripravci uglavnom se uklanjaju s površine oka u prvih 15-30 sekundi nakon primjene. Lipidne komponente iz U/V emulzija mogu stupiti u kontakt s lipidnim slojem suznog filma te tako omogućiti dulje vrijeme zadržavanja pripravka na površini oka te u konjunktivalnoj vrećici. Također, pokazano je da kut močenja između kapi pripravka i rožnice može biti smanjen upotrebom surfaktanata (Gan i sur., 2013). Smanjenjem kuta močenja poboljšava se širenje nanoemulzije po površini oka i sposobnost vlaženja.

Korištenjem kationskih surfaktanata, lipida ili polimera kapljice nanoemulzije postaju pozitivno nabijene. Posljedica toga su elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenih kapljica i negativno nabijene površine rožnice (Gan i sur., 2013). Time se dodatno poboljšava močenje rožnice te produljuje zadržavanje lijeka na površini oka.

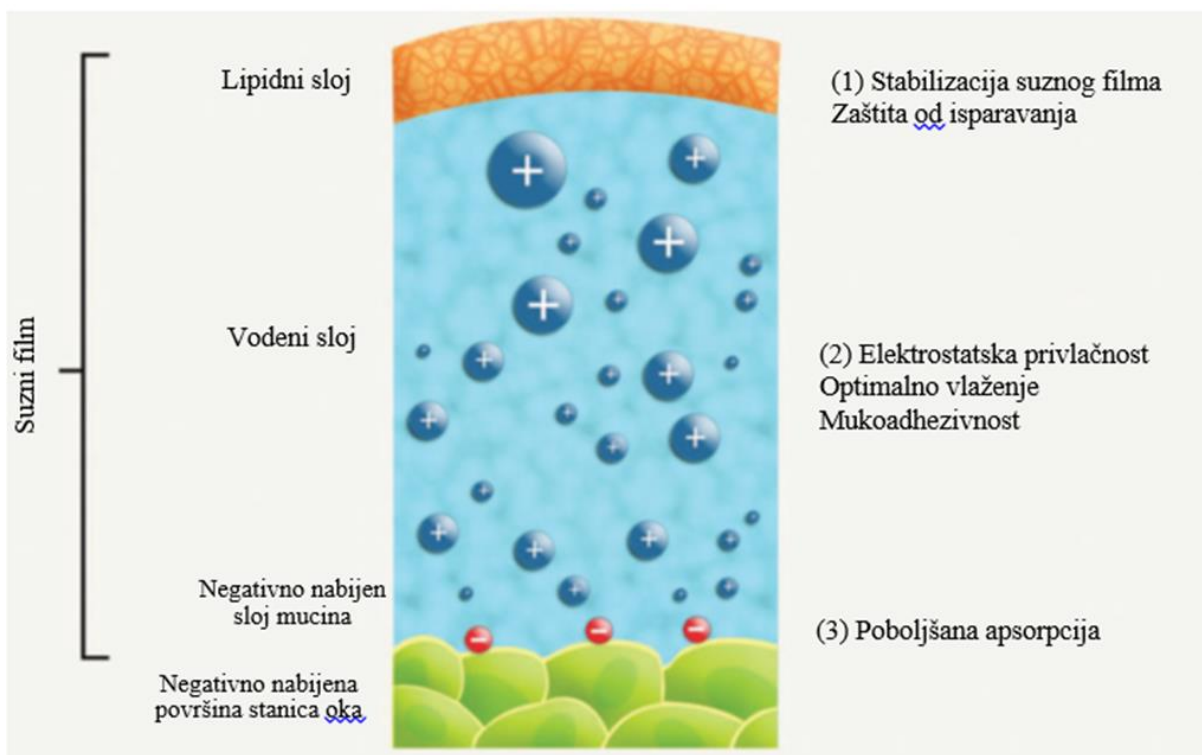
Osim što produljuje vrijeme zadržavanja na negativno nabijenoj površini oka, pozitivan naboj nanoemulzija pridonosi i stabilizaciji sustava budući da rezultira elektrostatskim odbijanjem među kapljicama ulja. Prvi izazov pri formuliranju kationskih emulzija je postizanje dovoljno visokog zeta-potencijala da bi se osigurala stabilnost sustava korištenjem najmanje potrebne količine kationskih surfaktanata kako se ne bi dovela u pitanje sigurnost pripravka. Naime, poznato je da kationski surfaktanti, u usporedbi s anionskim i neionskim, češće pokazuju toksična svojstva (Lallemand i sur., 2012).

1.1.3. Mukoadhezivnost

Kako bi se održala učinkovita doza lijeka u suznom filmu, odnosno na mjestu učinka potrebna je česta primjena kapi za oko, nekoliko puta na dan. Primjena otopina velike koncentracije lijeka nije moguća zbog toksičnosti te oštećenja epitelnih stanica površine oka. Kako bi se povećala količina lijeka koja dolazi do ciljnog tkiva potrebno je produljiti vrijeme zadržavanja lijeka u suznom filmu odnosno na površini oka. Osim toga, pripravci koji se primjenjuju jednom dnevno bi povećali

suradljivost pacijenata. Razvijene su brojne strategije kojima je cilj povećati bioraspoloživost lijeka produljenjem vremena kontakta oftalmičkog pripravka, a time i lijeka, i epitelnih stanica površine oka. Budući da se pokazao uspješnim kod oralne i bukalne primjene lijekova, koncept mukoadhezivnosti jedan je od mogućih odgovora na pitanje optimizacije oftalmičkih pripravaka. Ispitivane su interakcije prirodnih i sintetičkih polimera i mucina i dokazano je dulje zadržavanje pripravka u prekornealnom području. Objavljen je velik broj radova koji potvrđuju da mukoadhezivni polimeri, osim što povećavaju bioraspoloživost lijeka, imaju i ulogu u zaštiti i zacjeljivanju epitelnih stanica (Ludwig, 2005).

Epitelne stanice površine oka proizvode i izlučuju mucine koji, formirajući hidrofilnu barijeru, sudjeluju u zaštiti i vlaženju površine oka. Mucini su glikoproteini velike molekulske mase s polisaharidnim postraničnim lancima na čijim se završecima najčešće nalazi fukoza ili sijalinska kiselina (N-acetilneuraminska kiselina, $pK_a = 2,6$), zbog čega su negativno nabijeni pri fiziološkom pH. Vrijeme potrebno za izmjenu mukoznog sloja je približno 15 do 20 sati, što je znatno sporije u odnosu na vrijeme potrebno za izmjenu suza. Interakcija s mucinima (mukoadhezija) temelji se na vodikovim vezama, elektrostatskim interakcijama ili ispreplitanju polimernih lanaca sa slojem mucina (Ruponen i Urtti, 2015).



Slika 4. Interakcija kationskih nanoemulzija s negativno nabijenim stanicama rožnice. Pozitivni učinci kationskih emulzija su: (1) stabilizacija suznog filma, (2) elektrostatska interakcija s mucinima, (3) poboljšanje apsorpcije (preuzeto i prilagođeno iz: Lallemand i sur., 2012)

Stearilamin (oktadecilamin) se često uklapa u različite formulacije pa tako i nanoemulzije i jedan je od najčešće korištenih kationskih lipida koji se koristi kao nositelj pozitivnog naboja. Sadrži primarnu amino skupinu i ravni, zasićeni lanac od 18 ugljikovih atoma. Vrijednost pKa od 10,6 osigurava pozitivan naboj amino skupine unutar širokog raspona pH (Fraga i sur., 2008; Jeong i sur., 2001).



Slika 5. Struktura stearylamina (preuzeto s www.spectrabase.com)

Amfifilne molekule građene od lanca masne kiseline i pozitivno nabijene polarne skupine predstavljaju veliku skupinu potencijalnih nositelja pozitivnog naboja u nanoemulzijama. Osim kationskih lipida (stearilamin, oleilamin), tu ubrajamo molekule kao što su DOTAP (N-(1-(2,3-dioleoiloksi)propil)-N,N,N-trimetilamonij) klorid i DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamin). Ovi spojevi se dobro podnose i biorazgradivi su, no industrijska primjena je ograničena zbog kemijske nestabilnosti i potrebe za skladištenjem na jako niskim temperaturama. Nositelji pozitivnog naboja mogu biti i polimeri kao što su poli(etilenimin) (PEI) i poli-L-lizin (PLL). Budući da navedeni spojevi nisu opisani u farmakopeji te da nije dobro istražena njihova toksičnost, kao nositelji pozitivnog naboja uzeti su u obzir i ekscipijensi koji su već u primjeni. Primjer su kvarterni amonijevi spojevi kao što su cetrimid i benzalkonijev klorid koji se koriste kao konzervansi. Njihov je nedostatak što mogu oštetiti epitelne stanice na površini oka istim mehanizmom djelovanja kojim djeluju na mikroorganizme (Lallemand i sur., 2012).

1.1.4. Metode ispitivanja mukoadhezivnosti

Opisane su različite *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* metode ispitivanja mukoadhezivnih svojstava. Međutim, zbog nedostatka standardizacije teško je uspoređivati rezultate dobivene različitim metodama.

Vlačna čvrstoća je od 1984. godine najčešće korištena *in vitro* metoda za određivanje bioadhezivnih interakcija, a prikladna je za ispitivanja čvrstih i polučvrstih uzoraka (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Metoda se zasniva na mjerenju maksimalne sile i rada potrebnih za pucanje veza između mucina i mukoadhezivnog uzorka. Prilikom provođenja mjerenja potrebno je podesiti određene parametare (sila, vrijeme kontakta i brzina izvlačenja) ovisno o ispitivanom uzorku, a rezultati dobiveni za različite uzorke nisu usporedivi. Ova metoda nije prikladna za tekuće uzorke. Druga uobičajena *in vitro* metoda je reološka metoda koja može otkriti interakcije između mucina i polimera na temelju povećanja viskoznosti (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Povećana viskoznost je rezultat preraspodjele makromolekula nakon interakcije mucina i polimera iz uzorka (Bassi da Silva i sur., 2017).

Inovativna *in vitro* metoda ispitivanja mukoadhezivnosti zasniva se na mjerenju promjene veličine i zeta-potencijala kapljica nanosustava nakon inkubacije s mucinom (Pereira de Sousa i sur., 2015). Prikladna je za tekuće uzorke kako što su nanoemulzije, a koji sadrže pozitivno nabijene

čestice/kapljice, ali ne može se koristiti za ispitivanje mukoadhezije čvrstih ili polukrutih uzoraka niti uzoraka čija se mukoadhezivna svojstva ne temelje na elektrostatskoj interakciji.

1.2. Svojstva i karakteristike nanoemulzija

1.2.1. Veličina kapljica i indeks polidisperznosti

Osnovna svojstva nanoemulzija su veličina kapljica unutarnje faze te raspodjela veličina kapljica (polidisperznost). Kapljice nanoemulzija nisu uniformne pa se iz tog razloga ne mogu karakterizirati jednom vrijednosti već se govori o prosječnoj veličini. Polidisperznost je mjera heterogenosti veličine kapljica i proporcionalna je standardnoj devijaciji funkcije raspodjele veličine čestica (engl. *droplet size distribution*, DSD). Veća standardna devijacija ujedno znači i veći indeks polidisperznosti. Funkcija DSD najčešće se prikazuje dijagramima i histogramima te može imati jedan ili više, simetričnih ili asimetričnih pikova. Nanoemulzije obično pokazuju monomodalnu (jedan pik) i simetričnu log-normalnu funkciju raspodjele veličine. Neke od veličina koje se koriste za izražavanje polidisperznosti su indeks polidisperznosti PDI (engl. polydispersity indeks), koeficijent varijacije CV% i raspon (engl. *span*). Najčešće se upotrebljava PDI, a izračunava se iz standardne devijacije raspodjele veličine i prosječnog promjera prema formuli: $PDI = \left(\frac{\sigma}{D_{50}}\right)^2$ (Calderó i sur., 2016). Sustavi čiji je PDI manji od 0,2 smatraju se monodisperznima (Mason i sur., 2006).

1.2.2. Optička svojstva

Najvažnija optička svojstva koja se odnose na nanoemulzije su transparentnost i boja. Ovisno o veličini kapljica i koncentraciji, izgled može varirati od opalescentno–bijelog do transparentnog. Transparentnost pripravka je poželjna jer ne uzrokuje замуćenje vida nakon oftalmičke primjene, a postiže se smanjenjem kapljica unutarnje faze i smanjenjem razlike indeksa refrakcije dispergirane i kontinuirane faze. U svrhu usklađivanja indeksa refrakcije obično se dodaju suotapala i topljive tvari (Garcia-Celma i sur., 2016). Često se primijećuje plavkasta boja nanoemulzije, koja je posljedica Rayleighovog raspršenja svjetlosti (Mason i sur., 2006).

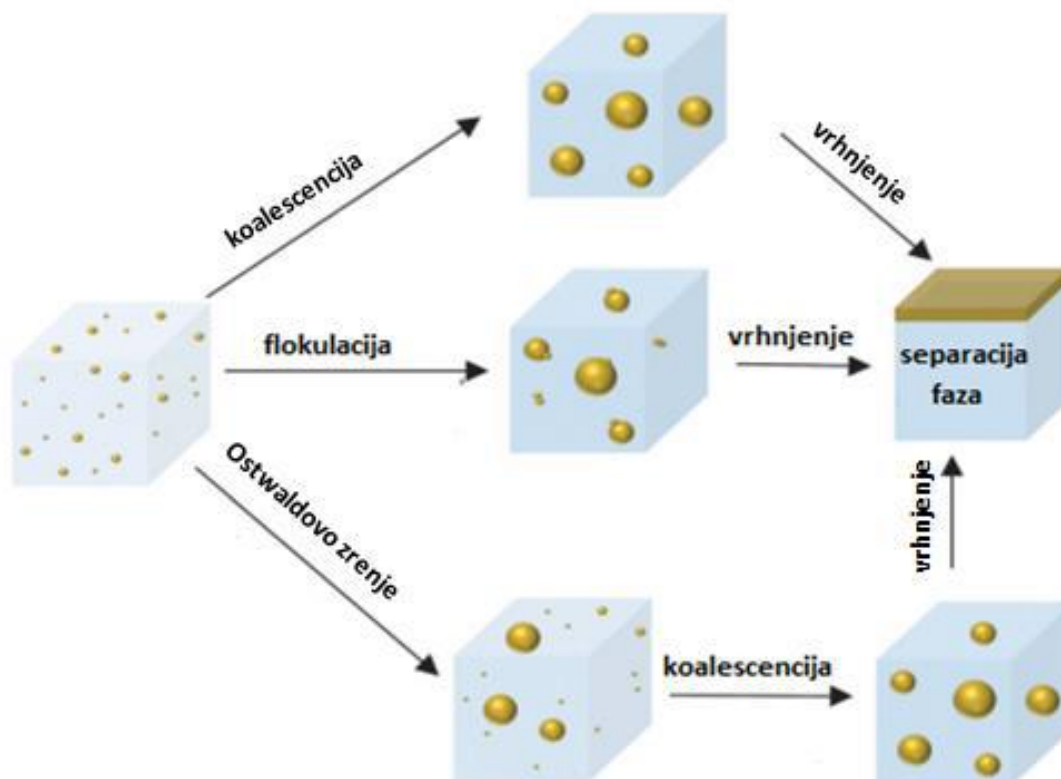
1.2.3. Stabilnost nanoemulzija

Stabilnost se može definirati kao sposobnost sustava da zadrži izvorna svojstva nepromijenjenima neovisno o vanjskim utjecajima. Budući da je za nastanak nanoemulzija potrebno dovesti energiju u sustav, slobodna energija koloidne disperzije, odnosno kapljica ulja dispergiranih u vodi, veća je od slobodne energije razdvojenih faza. Iz tog je razloga nastala nanoemulzija termodinamički nestabilna i teži razdvajanju faza. Ukoliko se osigura dovoljno velika energetska barijera između ova dva stanja, nanoemulzije mogu postati metastabilne odnosno kinetički stabilne. Veća energetska barijera osigurava dulje vrijeme tijekom kojeg će nanoemulzije ostati stabilne i zadržati svoja izvorna svojstva (Tadros, 2013; Koroleva i Yurtov, 2012; McClements, 2012). Visina energetske barijere je uglavnom određena fizičko-kemijskim fenomenima koji sprječavaju međusobno približavanje kapljica. Pod spomenutim fenomenima uglavnom se misli na odbojne steričke i elektrostatske interakcije između kapljica. Učestalost međusobne interakcije kapljica izravno utječe na težnju sustava za razdvajanjem faza.

Stabilnost nanoemulzija promatra se s dva aspekta: fizičko-kemijska stabilnost te kemijska stabilnost. U kojoj mjeri će doći do razgradnje/raspada sustava ovisi o sastavu samog sustava (o vrsti ulja, surfaktanta, relativnim koncentracijama, pH, o ionskoj jakosti i tipu otapala) i o uvjetima okoline (temperatura, vanjske sile) (McClements, 2012).

Kinetička stabilnost nanoemulzija posljedica je male veličine kapljica što im osigurava i relativnu otpornost na procese sedimentacije ili vrhnenja, a osnovni mehanizam destabilizacije nanoemulzija je Ostwaldovo zrenje. To je ireverzibilan proces u kojem dolazi do povećanja većih kapljica na račun manjih. Objasnjeno je Kelvinovim efektom iz kojeg proizlazi da molekule na površini manjih kapljica lakše odvajaju zbog slabijih kohezijskih sila, što je posljedica manjeg polumjera zakrivljenosti. Male kapljice difundiraju kroz vanjsku fazu i ulaze u veće kapljice, koje tada rastu. Budući da do prijenosa mase (molekula) dolazi kad molekule unutarne (uljne) faze putuju kroz kontinuiranu (vodenu fazu), topljivost unutarne faze u kontinuiranoj fazi je kritični faktor koji utječe na Ostwaldovo zrenje. Veća topljivost ujedno znači i lakše putovanje molekula unutarne faze kroz kontinuiranu fazu i lakši prijenos mase s malih na velike kapljice te, u krajnjem slučaju, razdvajanja faza (Gupta i sur., 2016). Osim toga, ključni parametri koje je potrebno kontrolirati u proizvodnji su veličina čestica, indeks polidisperznosti, zeta-potencijal te viskoznost vanjske faze (Koroleva i Yurtov, 2012).

U procesu flokulacije kapljice se potaknute privlačnim silama povezuju te se zatim gibaju zajedno. Koalescencija je ireverzibilan proces u kojem dolazi do fuzije kapljica unutarnje faze i formiranja većih kapljica što se nastavlja sve do potpunog razdvajanja faza. Budući da su kinetički stabilnije, nanoemulzije su manje sklone koalescenciji u odnosu na makroemulzije.



Slika 6. Mehanizmi destabilizacije nanoemulzija (preuzeto iz: Gupta i sur., 2016)

Kemijski procesi mogu uzrokovati promjenu sastava nanoemulzije a time i promjenu svojstava te stabilnosti sustava. Kemijske promjene su uglavnom posljedica kontakta s atmosferskim kisikom ili nekim drugim oksidansima. Osim toga, izloženost sunčevom svjetlu može dovesti do fotokemijskih reakcija u sustavu. Kako bi se spriječila oksidacija, nanoemulzijama se dodaju antioksidansi, a od sunčevog svjetla se obično zaštićuju posebnom ambalažom. Izloženost zraku

mogla bi rezultirati biorazgradnjom djelovanjem mikroorganizama, a kako bi se to izbjeglo nanoemulzijama se dodaju konzervansi (Garcia-Celma i sur., 2016).

1.2.4. Reološka svojstva

Već i male promjene u strukturi ili sastavu uzorka rezultiraju mjerljivim promjenama reoloških svojstava. Iz tog razloga reologija omogućuje praćenje stabilnosti nanoemulzija te prilagodbu važnih svojstava kao što su viskoznost, tekstura i konzistentnost. Reološka karakterizacija iznimno je važna ne samo tijekom razvoja nanoemulzija već i za kontrolu kvalitete gotovih pripravaka (Tadros, 2013).

Nanoemulzije pokazuju različita reološka svojstva u rasponu od Newtonovih fluida do viskoelastičnih sustava različite konzistencije. Povećanjem ukupnog volumena dispergirane faze dolazi do povećanja viskoznosti i promjene reoloških svojstava nanoemulzije od Newtonovog sustava (razrjeđeni uzorci) do pseudoplastičnog, tiksotropnog ili viskoelastičnog sustava (Garcia-Celma i sur., 2016).

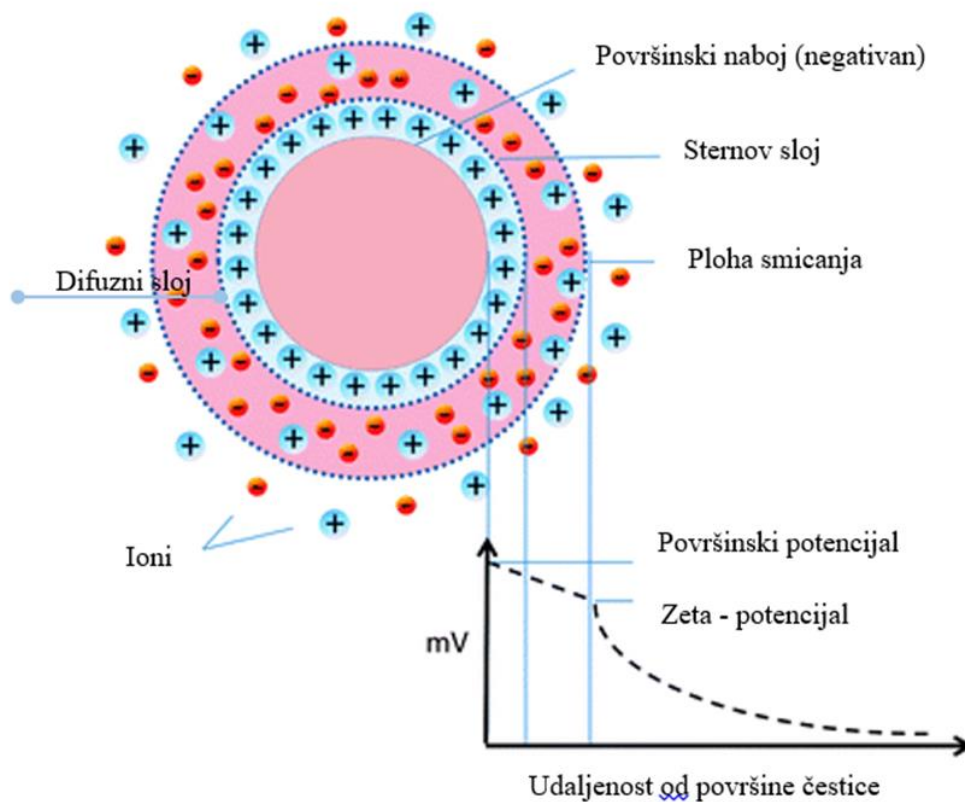
1.2.5. Elektrokemijska svojstva

Kapljice nanoemulzije mogu biti nabijene, a naboj najčešće dolazi od ionogenih surfaktanata, slobodnih masnih kiselina iz uljne faze ili od elektrolita (iz vanjske faze). Struktura i stabilnost sustava ovise o ravnoteži između privlačnih i odbojnih sila koje se javljaju među kapljicama nanoemulzije. Veličine koje se najčešće koriste za elektrokemijsku karakterizaciju nanoemulzija su specifična električna provodljivost (κ) i zeta-potencijal (površinski električni potencijal).

Specifična električna provodljivost je mjera sposobnosti materijala da provodi električnu struju, a može se koristiti i za određivanje tipa emulzija. Emulzije U/V tipa pokazuju visoke vrijednosti specifične provodljivosti dok su za V/U tip karakteristične vrlo niske vrijednosti. Zbog tih razlika moguće je proučavati procese inverzije faza mjerenjem promjene specifične provodljivosti do koje dolazi nakon promjene temperature ili koncentracije određenih komponenti emulzije.

Kapljice unutarnje faze mogu biti okružene ionskim surfaktantima ili amfoternim surfaktantima koji ioniziraju ovisno o okolini. Osim toga, kontinuirana faza može sadržavati elektrolite. Elektrokemijske teorije objašnjavaju premještanje iona suprotnog naboja iz vanjske faze u blizinu

kapljice s ciljem neutralizacije viška naboja na površini kapljice (Slika 7). Uz pozitivno nabijenu površinu nalaze se negativno nabijeni ioni u otopini, tako da ih je uz samu površinu čestice najviše, a zatim se, s udaljenošću od čestice prema dubini otopine, broj pozitivnih i negativnih iona izjednačava. Opisana pojava naziva se dvostrukim električnim slojem. Na taj način nastaje električni dvosloj. Unutrašnji sloj čine ioni suprotnog naboja čvrsto vezani na površinu kapljice i naziva se Sternov sloj. Vanjski je sloj difuzijski što znači da su ioni slabije vezani na površinu kapljice i taj je sloj pomičan, a naziva se Gouy-Chapmanov sloj (Garcia-Celma i sur., 2016). Unutar difuzijskog sloja postoji imaginarna granica i ioni unutar te granice su čvršće vezani. Kada se kapljica pokreće spomenuti ioni, kao i ioni iz Sternovog sloja, kreću se zajedno s njom. Potencijal izmjeren na ovoj imaginarnoj granici, odnosno granici hidrodinamičkog smicanja, naziva se zeta-potencijal. Veličina zeta-potencijala ukazuje na stabilnost sustava. Sustav se smatra stabilnim ako je vrijednost zeta-potencijala pozitivnija od +30 mV ili negativnija od -30 mV. U tom slučaju čestice se međusobno odbijaju i nemaju sklonosti za međusobnu interakciju koja bi mogla dovesti do razdvajanja faza.



Slika 7. Zeta-potencijal i električni dvosloj (Preuzeto iz: Herrada i sur., 2014)

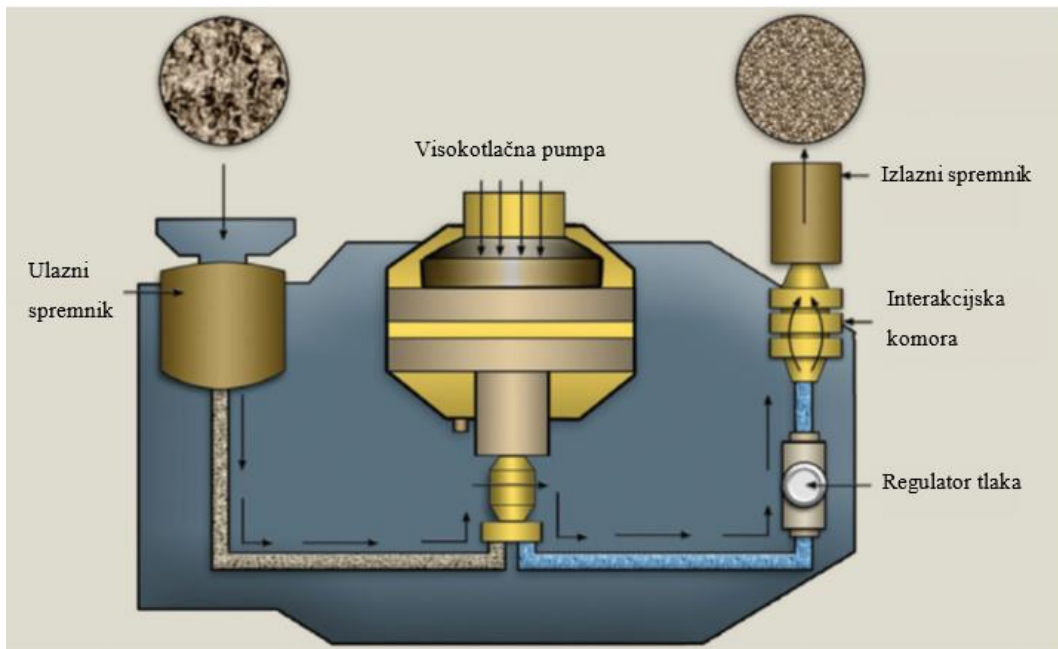
1.3. Metode izrade nanoemulzija

Metode za izradu nanoemulzija dijele se na dvije glavne skupine ovisno o energiji koju je sustavu potrebno dovesti da bi došlo do formiranja nanoemulzije. Razlikuju se visokoenergetske metode kod kojih je potrebna energija dobivena od vanjskog izvora i niskoenergetske kod kojih je potrebna energija pohranjena u samom sustavu (Garcia-Celma i sur., 2016).

1.3.1. Visokoenergetske metode

Prilikom izrade nanoemulzija visokoenergetskim metodama, potrebno je prvo napraviti grubu emulziju miješanjem uljne i vodene faze prethodno zagrijane na jednaku temperaturu. Dobivena primarna emulzija se zatim obrađuje mehaničkim uređajima koji stvaraju snažne sile s ciljem smanjenja veličine kapljica (Jumaa i Müller, 1999). Neki od najčešće korištenih mehaničkih uređaja su mikrofluidizatori, visokotlačni homogenizatori i ultrasonikatori.

Kod metode mikrofluidizacije koristi se visoki tlak za usmjeravanje emulzije kroz mikrokanale, a pokazano je da su rezultat homogenije nanoemulzije manjih kapljica unutarnje faze u odnosu na one pripravljene tradicionalnim metodama homogenizacije (Jafari i sur., 2006). Princip rada mikrofluidizatora zasniva se na sustavu za hidraulički prijenos snage koji, pod visokim tlakom, dovodi hidrauličko ulje do potisne visokotlačne pumpe koja pojačava hidraulički tlak te ga pretvara u tlak koji djeluje na uzorak. Za vrijeme usisavanja, pumpa uvlači uzorak iz ulaznog spremnika u tlačnu komoru preko ventila koji se zatim zatvara. Uzorak se tu izlaže konstantnim, visokim vrijednostima tlaka te tako stlačen ulazi u interakcijsku komoru. Kao posljedica prolaska kroz mikrokanale, dolazi do znatnog ubrzanja toka uzorka. Smanjenje veličine kapljica rezultat je dviju sila koje ovdje djeluju na uzorak: sile smicanja koja zbog doticaja sa stijenkama mikrokanalića pri visokim brzinama uzrokuje deformacije uzorka i sile sudara koja nastaje kad struja uzorka pri velikim brzinama djeluje sama na sebe. Nakon izlaska iz interakcijske komore, uzorak se dalje obrađuje prolaskom kroz pomoćne module za obradu. Grube emulzije moguće je propuštati kroz mikrofluidizator i više puta, dok se ne postigne željena veličina kapljica (Gupta i ostali, 2016; Sutradhar, 2013).



Slika 8. Princip rada mikrofluidizatora (preuzeto i prilagođeno iz: Sutradhar, 2013)

Visokotlačni homogenizator radi na sličnom principu. Nakon što se u kompresijskoj komori tlak poveća do najvećih predviđenih vrijednosti, uzorak se usmjerava prema homogenizacijskom ventilu. Ondje dolazi do usitnjavanja uzorka pod utjecajem turbulencije, lokalne kavitacije, smičnog naprezanja te sudara kapljica pri velikim brzinama (Gupta i sur., 2016)

Ultrasonikatori koriste zvučne valove visokih frekvencija kako bi stvorili turbulentnu silu koja razara kapljice (Gupta i sur., 2016; Anton i Vandamme, 2009).

Prednost visokoenergetskih metoda je činjenica da se pomoću ovih uređaja velik broj različitih ulja može koristiti za izradu nanoemulzija, a najvažnije ograničenje, osim visoke cijene uređaja, predstavlja i osjetljivost lijekova na velike sile te temperature koje se stvaraju u ovakvim uređajima.

1.3.2. Niskoenergetske metode

Niskoenergetske metode za stvaranje nanoemulzija koriste intrinzična fizičko-kemijska svojstva komponenti nanoemulzije, a dijele se na metode spontanog emulgiranja i fazne inverzije.

Postupak spontanog emulgiranja uključuje prethodnu odvojenu pripremu uljne i vodene faze. Uljnu fazu čini ulje otopljeno u vodotopljivom organskom otapalu. Takvo polarno organsko otapalo prilikom miješanja faza difundira iz uljne u vodenu fazu te nastaje sustav kapljica ulja dispergiranih u vodenoj kontinuiranoj fazi (Morales i sur., 2003). Na kraju procesa potrebno je ukloniti organsko otapalo isparavanjem. Nedostaci ove metode su toksičnost organskih otapala i mogući problemi s ostatnim otapalom. Opisani su i slučajevi pripreme nanoemulzija gdje, umjesto otapala, iz uljne u vodenu fazu difundira sam surfaktant (Solans i sur., 2015; Komaiko i McClements, 2014).

Najčešće se koristi metoda temperaturne fazne inverzije koja se zasniva se na različitoj topljivosti surfaktanata pri različitim temperaturama. Koriste se surfaktanti koji su pri nižim temperaturama topljivi u vodi, a na višim postaju slabije topljivi i prelaze u uljnu fazu. Prvo se pripremi U/V makroemulzija koja se potom zagrijava pri čemu surfaktant postaje sve lipofilniji. Iznad određene temperature (temperature fazne inverzije, engl. *phase inversion temperature*, PIT) dolazi do inverzije faza te nastaje V/U emulzija. Emulzija se zatim naglo hladi čime surfaktant ponovno postaje topljiv u vodi, a nagli i brzi prelazak iz uljne u vodenu fazu generira energiju za usitnjavanje kapljica do nano-veličina (Solans i sur., 2005; Morales i sur., 2003).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti kationsku nanoemulziju namijenjenu topikalnoj oftalmičkoj primjeni. Najveći izazov pri izradi kationske nanoemulzije je odabir nositelja pozitivnoga naboja i njegovog udjela u formulaciji kako bi se osiguralo produljeno vrijeme zadržavanja lijeka na površini oka. U ovom radu kationski lipid stearylamin odabran je kao nositelj pozitivnog naboja.

Specifični ciljevi diplomskog rada bili su:

- pripremiti nanoemulzije visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije;
- odrediti ključna fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija koja utječu na njihov klinički učinak uključujući veličinu kapljica, indeks polidisperznosti, zeta-potencijal, pH, profil viskoznosti formulacije kao funkcije primijenjene sile smicanja te površinsku napetost;
- ispitati mukoadhezivnost pripremljenih nanoemulzija ispitivanjem interakcije pozitivno nabijenih kapljica nanoemulzije i mucina mjerenjem zeta-potencijala i veličine kapljica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za izradu nanoemulzija korišteni su stearilamin (Sigma-Aldrich, Njemačka), Miglyol 812 (Kemig, Hrvatska), Kolliphor EL (BASF, Njemačka), glicerol (TTT, Hrvatska) i pročišćena voda.

Za potrebe ispitivanja mukoadhezivnosti dispergiran je mucin (tip 3, djelomično pročišćen, mucin iz želuca svinje; Sigma-Aldrich) u simuliranoj suznoj tekućini izrađenoj otapanjem KCl, NaCl, NaHCO₃ (Kemig, Hrvatska) te CaCl₂×2H₂O (Sigma-Aldrich, Njemačka) u pročišćenoj vodi.

3.2. Metode

3.2.1. Izrada nanoemulzija

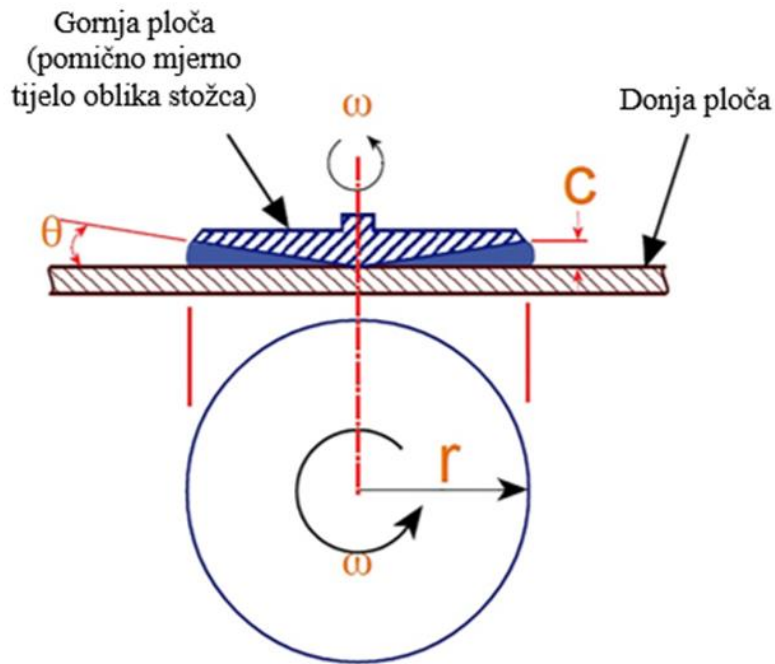
U sklopu ovog diplomskog rada izrađeno je pet U/V nanoemulzija s različitim koncentracijama stearilamina kao nositeljem pozitivnog naboja. Maseni udjeli stearilamina u pojedinim nanoemulzijama iznose redom 0, 0,01, 0,05, 0,1 i 0,3 %. Maseni udjeli ostalih sastavnica su jednaki u svim nanoemulzijama i iznose: 5 % Miglyol 812, 2,5 % Kolliphor EL i 2,5 % glicerol. Ostatak do 100 % mase činila je pročišćena voda.

Svi uzorci su pripremljeni su u duplikatu i istim postupkom. Sastavnice uljne i vodene faze izvagane su u odvojenim čašama te su se odvojeno zagrijavale uz stalno miješanje na magnetnoj mješalici s grijačem. Kada je u obje faze postignuta jednaka temperatura od 60 °C, vodena faza je dodana u uljnu. Dobivene grube emulzije zatim su obrađene na Ultra-Turraxu (ULTRA-TURRAX®, IKA®-Werke GmbH & Co., Staufen, Njemačka) pri 6000 rpm tijekom 5 minuta. Kako bi se dobile nanoemulzije, svaka emulzija je zatim propuštena kroz mikrofluidizator (Model M-110EH-30 Microfluidizer, Microfluidics, Newton MA, SAD) 10 puta pri tlaku od 14500 psi (1000 bara). Nanoemulzije su u zatvorenim staklenim bocama čuvane u hladnjaku na +4 °C.

3.2.2. Ispitivanje reoloških svojstava

Prilikom ispitivanja reoloških svojstava nanoemulzija korišten je uređaj Modular Compact Rheometer 102 (Anton Paar GmbH, Austria). S ciljem ispitivanja ovisnosti viskoznosti nanoemulzije o gradijentu brzine smicanja korištena je rotacijska metoda, kod koje se pomično

mjerno tijelo okreće uvijek u istom smjeru. Upotrebjeno je pomično mjerno tijelo stožac (CP50-1), pri čemu je njegova udaljenost od nepomičnog mjernog tijela iznosila 0,102 mm.



Slika 9. Princip rada rotacijskog reometra (preuzeto s www.rdmag.com)

Rotacijski reometar rotira pomično mjerno tijelo kontroliranom brzinom te mjeri zakretni moment (engl. *torque*) na stošcu. Iz zakretnog momenta uređaj zatim računa smično naprezanje (engl. *shear stress*). Izraz koji povezuje smično naprezanje i viskoznost glasi: $\eta = \frac{\tau}{D}$, gdje je η viskoznost, τ smično naprezanje, a D brzina smicanja (engl. *shear rate*). Sloj tekućine na donjoj ploči se ne pomiče, a sloj najbliži gornjoj ploči kreće se najbrže, brzinom kojom se rotira pomično mjerno tijelo. Brzina smicanja računa se tako da se brzina gornje ploče (u metrima po sekundi) podijeli s razmakom između dviju ploča (u metrima): $D = \frac{v}{h}$ (www.wiki.anton-paar.com).

Mjerenja su provedena pri gradijentu brzine smicanja u rasponu od 1 do 100 s⁻¹ i pri temperaturi 25 °C.

3.2.3. Određivanje pH

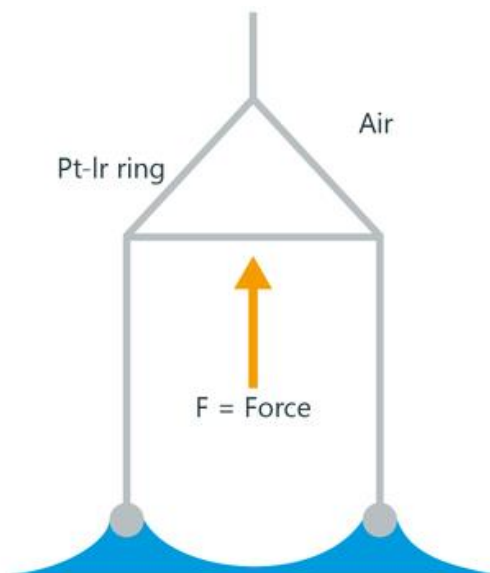
Vrijednosti pH nanoemulzija su određivane u duplikatu koristeći prethodno kalibriran Seven Multi pH/kondukto-metar (Mettler Toledo, SAD) pri temperaturi 25 °C.

3.2.4. Određivanje površinske napetosti

U svrhu određivanja površinske napetosti formulacija korišten je uređaj Force Tensiometer K-100 (Krüss, Njemačka). Mjerenje je vršeno Du Noüyevom metodom s prstenom.

Površinska napetost se računa prema formuli:
$$\sigma = \frac{F_{max}}{l \times \cos \theta}$$

Prsten se prvo uroni u ispitivani uzorak pa se kreće polagano izvlačiti. Maksimalna sila F_{max} nastaje kada se lamela, koja nastaje kada se prsten kreće kroz faznu granicu, poravna vertikalno s ravninom prstena. Tada je kontaktni kut θ jednak 0° ($\cos \theta = 1$). Duljina l označava zbroj unutarnjeg i vanjskog opsega prstena (<https://www.kruss-scientific.com>).



Slika 10. Određivanje površinske napetosti Du Noüyevom metodom otkidanja prstena od površine tekućine (preuzeto www.kruss-scientific.com)

Površinska napetost je određena pri 25 °C, uz pretpostavku da se vrijednosti značajno ne mijenjaju pri temperaturi površine oka koja iznosi 34 °C (Hotujac Grgurević i sur., 2016).

3.2.5. Određivanje veličine kapljica

Veličina kapljica unutarnje faze nanoemulzija, kao i raspodjela veličine kapljica, izmjerena je pomoću uređaja ZETASIZER ULTRA, Malvern Panalytical (Ujedinjeno Kraljevstvo). Primijenjena je tehnika dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering, DLS*). Prednosti metode dinamičkog raspršenja svjetlosti su brzina, točnost i ponovljivost. Također, metoda zahtjeva male količine uzorka i nije destruktivna.

Mjerenje je temeljeno na Brownovom gibanju, odnosno konstantnom, nasumičnom gibanju kapljica ulja u nanoemulziji. Kada se uzorak obasja laserskom zrakom, uslijed takvog gibanja, dolazi do promjena intenziteta raspršene svjetlosti. Uređaj detektira intenzitet raspršene svjetlosti pod kutem od 174,7° te na temelju izmjerenih vrijednosti određuje brzinu Brownovog gibanja, a zatim i veličinu kapljica koristeći Stokes-Einsteinovu jednadžbu: $D = \frac{k_B \times T}{6\pi\eta R_0}$

U navedenoj formuli k_B označava Boltzmannovu konstantu, T temperaturu, η viskoznost i te vrijednosti su nam poznate. Iz izmjerene brzine Brownovog gibanja, odnosno difuzijskog koeficijenta D , izračunava se radijus kapljica R_0 . Brzina takvog kaotičnog gibanja ovisi o veličini čestica te vrijedi da se manje čestice gibaju brže u odnosu na one većih dimenzija.

Za potrebe mjerenja korištene su kivete za jednokratnu upotrebu DTS0012, Sarstedt (Njemačka), a uzorci su prethodno razrijeđeni 100 puta pročišćenom vodom prethodno filtriranom kroz mikrobakteriološki filter od polietersulfona (PES) veličine pora 0,45 µm. Sva mjerenja su izvršena u duplikatu te su provedena pri temperaturi 25 °C.

3.2.6. Određivanje zeta-potencijala

Zeta-potencijal također je određen korištenjem uređaja ZETASIZER ULTRA. Metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. *Electrophoretic Light Scattering, ELS*) mjeri se elektroforetska pokretljivost kapljica u uzorku. ELS kombinira raspršenje svjetlosti s elektroforezom. Uzorak se stavlja u kivetu koja sadrži dvije elektrode preko kojih se primijenjuje

električno polje. U takvim uvjetima svaka će nabijena čestica u uzorku migrirati prema suprotno nabijenoj elektrodi potaknuta privlačnim elektrostatskim silama. Na čestice istovremeno djeluju i sile viskoznosti nastojeći se suprostaviti tom kretanju. Nakon uspostave ravnoteže između ove dvije suprotne sile, čestice se kreću stalnom brzinom. Brzina kretanja ovisi o jakosti električnog polja, viskoznosti disperznog sustava i dielektričnoj konstanti i zeta-potencijalu. Gibajući se, nabijene čestice raspršuju svjetlost. Promjenom brzine gibanja, dolazi do promjene frekvencije svjetlosti. Iz spektra frekvencija proizašlih iz detektiranih fotona svjetlosti dobije se vrijednost elektroforetske pokretljivosti, a iz nje zeta-potencijal.

Prije mjerenja, uzorci su razrijeđeni 100 puta 10 mM otopinom NaCl koja je prethodno filtrirana kroz mikrobakteriološki filter od polietersulfona (PES) veličine pora 0,45 μm . Sva su mjerenja provedena u duplikatu i pri temperaturi 25 °C. Korištena je kiveta DTS1070, Malvern Panalytical (Ujedinjeno Kraljevstvo).

3.2.7. Ispitivanje mukoadhezivnosti

Prilikom ispitivanja mukoadhezivnosti prvo je napravljena simulirana suzna tekućina (engl. *Simulated Tear Fluid, STF*). U pročišćenoj vodi su otopljene soli KCl (1,4 mg/mL), NaCl (6,8 mg/mL), NaHCO₃ (2,2 mg/mL) i CaCl₂ x 2H₂O (0,08 mg/mL) (Krtalić i sur., 2018). Dodatkom 1 M otopine HCl, pH STF-a je podešen na 7,4 kako bi odgovarao pH vrijednosti stvarne suzne tekućine.

Budući da se na površini oka nalaze i mucini (Ludwig, Reimann, 2015), idući je korak bila priprema disperzije mucina u STF-u. Mucin je dispergirao u STF-u te gruba disperzija ostavljena preko noći na magnetskoj mješalici. Izrađene su disperzije koje sadrže 0,015 i 1 % (*m/m*) mucina.

Ispitivanje mukoadhezivnosti izvršeno je metodom koju su opisali Pereira de Sousa i suradnici (Pereira de Sousa i sur., 2015) te su pritom nanoemulzije pomiješane s disperzijom mucina u omjeru 40:7 (*v/v*). Ovaj omjer je izabran kako bi se simulirali uvjeti na površini oka nakon primjene oftalmičkog pripravka budući da volumen jedne kapi primjenjenog pripravka iznosi oko 40 μL , a volumen suznog filma 7 μL (Krtalić i sur., 2018). Smjesa je inkubirana pri 25 °C uz stalno mješanje na magnetskoj mješalici brzinom od 300 rpm. Uzorci za mjerenje uzeti su nakon 5 i nakon 20

minuta inkubacije. Mjereni su zeta-potencijal, veličina kapljica te indeks polidisperznosti kao što je prethodno opisano.

U svrhu optimizacije metode korištene su disperzije s različitim koncentracijama mucina pa je tako svaka nanoemulzija bila posebno inkubirana s 0,015 te s 1 %-nom disperzijom mucina u STF-u. Također, mjerenja su vršena pri različitim razrjeđenjima pa su uzorci bili razrjeđeni s pročišćenom vodom ili 10 mM otopinom NaCl u omjeru 1:10 (v/v) te u omjeru 1:100 (v/v). Sva su mjerenja izvršena u duplikatu i pri 25 °C.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava nanoemulzija

Metodom mikrofluidizacije uspješno su pripravljene nanoemulzije s različitim koncentracijama stearilamina te nanoemulzija bez stearilamina koja je korištena kao negativna kontrola tijekom daljnjih ispitivanja. Nije primijećeno razdvajanje faza, a sve nanoemulzije su nakon propuštanja kroz mikrofluidizator poprimile mliječno bijelu boju s blago plavičastim odsjajem.

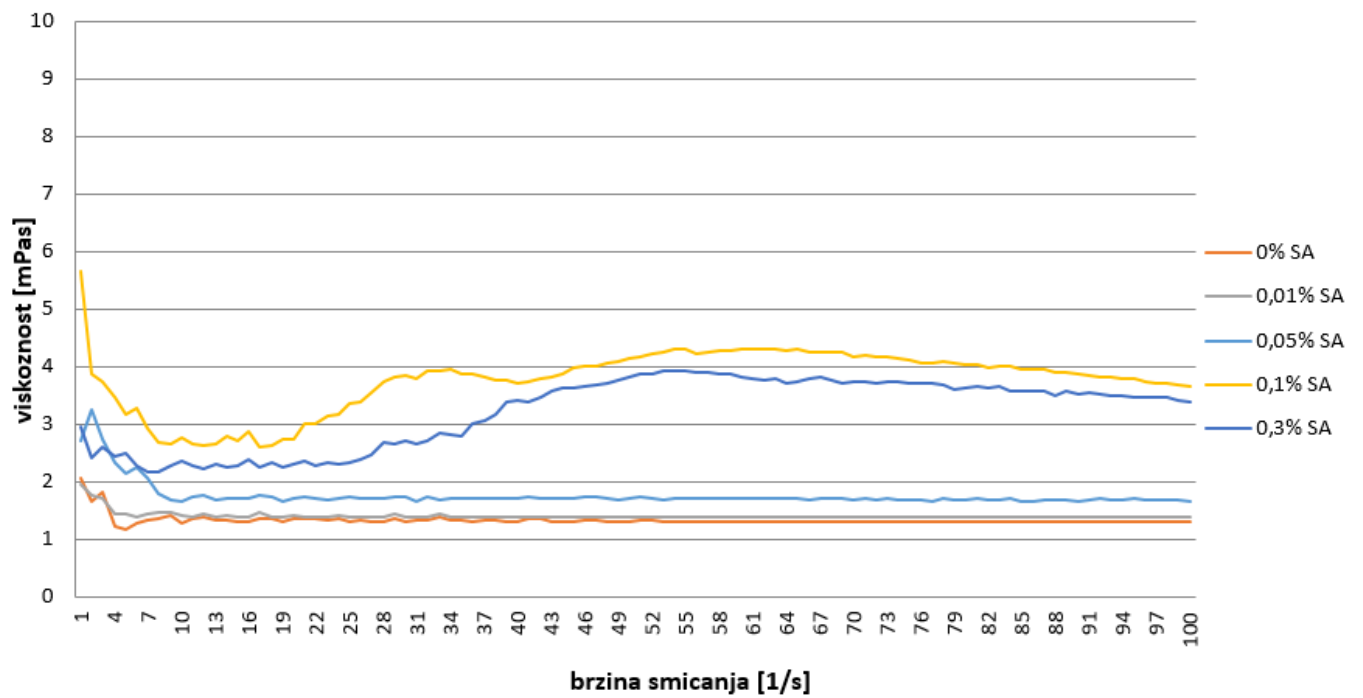
Uljnu fazu je osim stearilamina činio Miglyol 812, a vodenu fazu pročišćena voda, Kolliphor EL (neionogeni surfaktant) te glicerol koji je korišten za izotonizaciju formulacija. Neionogeni surfaktant zaslužan je za steričku stabilizaciju i dodan je uzorcima kako bi se osigurala stabilnost nanoemulzija u kojima koncentracija stearilamina nije dovoljna za postizanje elektrostatske stabilizacije.

4.2. Karakterizacija nanoemulzija

4.2.1. Ispitivanje reoloških svojstava

Mjerenjem viskoznosti uzoraka pri kontroliranoj brzini smicanja nastojalo se pokazati na koji način udio stearilamina u nanoemulziji utječe na njezinu viskoznost te odgovaraju li nanoemulzije Newtonovim sustavima. Odnos između smičnog naprežanja, τ , i gradijenta brzine smicanja, D , kod idealnih Newtonovskih tekućina je linearan. Iz toga proizlazi da se viskoznost ne mijenja, odnosno ostaje konstantna neovisno o sili koja djeluje na sustav.

Rezultati mjerenja ovisnosti prividne viskoznosti uzorka o gradijentu brzine smicanja prikazani su Slikom 11.



Slika 11. Ovisnost prividne viskoznosti uzorka o gradijentu brzine smicanja.

Mjerenjem ovisnosti prividne viskoznosti o gradijentu brzine smicanja uočeno je da nanoemulzije pokazuju karakteristike Newtonovih sustava. Kod uzoraka s većim udjelom stearilamina (0,1 % (*m/m*) i 0,3 % (*m/m*) stearilamina) uočena su blaga odstupanja vrijednosti prividne viskoznosti tijekom mjerenja, što bi se moglo objasniti taloženjem stearilamina iz nanoemulzija tijekom mjerenja.

Tablica 1. Ovisnost viskoznosti uzorka (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) o koncentraciji stearilamina. Rezultati su izračunati metodom regresije pomoću programa Rheo-Compass (Anton Paar).

Stearilamin (% , <i>m/m</i>)	Viskoznost [mPa·s]
0	1,324 \pm 0,015
0,01	1,390 \pm 0,036
0,05	1,709 \pm 0,067
0,1	3,803 \pm 0,818
0,3	2,797 \pm 0,298

U tablici 1 prikazan je utjecaj koncentracije stearilamina na viskoznost uzorka. Najmanja vrijednost viskoznosti zabilježena je kod nanoemulzija bez stearilamina dok uzorci koji sadrže stearilamin pokazuju veće viskoznosti. Najveća vrijednost izmjerena je za nanoemulzije s koncentracijom stearilamina od 0,1 % (*m/m*). Ovako niske vrijednosti viskoznosti, slične vrijednosti vode, omogućavaju jednostavnu primjenu te točnost doziranja kapi za oko (Walenga i sur., 2018).

4.2.2. Određivanje pH

Optimalna vrijednost pH oftalmičkih pripravaka jednaka je pH vrijednosti suzne tekućine i iznosi 7,4. Oko tolerira pripravke čiji je pH unutar raspona vrijednosti od 4 do 8, a ukoliko vrijednost pH izlazi izvan tog raspona, može doći do iritacije, nelagode pri upotrebi te do smanjene bioraspodivnosti primijenjenog lijeka zbog povećanog suženja oka (Baranowski i sur., 2014).

Rezultati mjerenja pH vrijednosti nanoemulzija prikazani su Tablicom 2.

Tablica 2. Ovisnost pH nanoemulzija (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) o koncentraciji stearilamina.

Stearilamin (% , <i>m/m</i>)	pH
0	4,89 \pm 0,04
0,01	6,15 \pm 0,03
0,05	7,28 \pm 0,21
0,1	8,41 \pm 0,14
0,3	9,07 \pm 0,01

Uočeno je da uzorak bez stearylamina ima najniži pH, a vrijednosti se povećavaju s povećanjem koncentracije stearylamina. Naime, stearylamin u svojoj strukturi sadrži amino skupinu koja teži protoniranju ($pK_a = 10,6$). Na taj način stearylamin pridonosi povećanju pH vrijednosti u uzorcima.

pH vrijednosti uzoraka s 0,1 % (*m/m*) i 0,3 % (*m/m*) stearylamina izlaze izvan raspona prihvatljivog za oftalmičku primjenu, a najpovoljnijim se pokazao uzorak s 0,05 % (*m/m*) stearylamina budući da je njegov pH gotovo identičan onom suzne tekućine.

4.2.3. Određivanje površinske napetosti

Površinska napetost na međupovršini zrak/suzna tekućina ima fiziološki raspon od 40 do 46 mN/m čime se osigurava optimalna stabilnost suznog filma. Više vrijednosti površinske napetosti su karakteristika sindroma suhog oka i povezuju se sa smanjenom stabilnošću suznog filma te njegovim preuranjenim pucanjem. Potrebno je da oftalmički pripravci budu kompatibilni sa suznom tekućinom u pogledu površinske napetosti kako bi se osiguralo primjereno širenje oftalmičkog proizvoda po površini oka i miješanje sa suznom tekućinom. Na taj način povećava se dodirna površina oftalmičkog proizvoda s površinom dostupnom za apsorpciju lijeka što rezultira poboljšanom bioraspoloživošću djelatne tvari u oku. Također, povećana je ugodnost primjene, a time i suradljivost pacijenata (Pepić i sur., 2004).

Rezultati mjerenja površinske napetosti uzoraka prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Ovisnost površinske napetosti nanoemulzija (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) o koncentraciji stearylamina.

Stearilamin (% <i>m/m</i>)	Površinska napetost [mN/m]
0	34,53 \pm 1,16
0,01	34,98 \pm 0,38
0,05	34,57 \pm 0,37
0,1	32,67 \pm 0,62
0,3	31,29 \pm 1,02

Opaženo je smanjenje vrijednosti površinske napetosti s povećanjem koncentracije stearilamina u uzorcima. Rezultati su u skladu s očekivanjima jer je poznata činjenica da stearilamin smanjuje površinsku napetost te se koristi kao surfaktant (Owen i Butler, 2011).

Manji broj zabilježenih studija ukazuje da bi pripravci za oko čija je površinska napetost manja od 35 mN/m mogli uzrokovati bol i neugodu prilikom primjene. Međutim, još uvijek nema dovoljno dokaza da se sa sigurnošću utvrdi je li to uistinu rezultat niske površinske napetosti ili prisutnosti određenih sastojaka u formulacijama (Grgurević i sur., 2016).

4.2.4. Određivanje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti

Određivanje veličine kapljica unutarnje faze te raspodjele veličine kapljica bitan je dio karakterizacije nanoemulzija. Na temelju ovih podataka donosimo zaključke o prikladnosti ispitivanih nanoemulzija za oftalmičku primjenu jer ta fizičko-kemijska svojstva određuju stabilnost i kvalitetu pripravka (Pereira i sur., 2015).

Rezultati mjerenja prikazani su Tablicom 4.

Tablica 4. Ovisnost veličine kapljica i indeksa polidisperznosti (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) o količini stearilamina u uzorku.

Stearilamin (% , <i>m/m</i>)	Veličina kapljica (nm)	PDI
0	94,27 \pm 0,67	0,114 \pm 0,012
0,01	92,32 \pm 1,09	0,131 \pm 0,007
0,05	95,59 \pm 2,18	0,187 \pm 0,014
0,1	111,95 \pm 0,91	0,190 \pm 0,007
0,3	92,25 \pm 1,68	0,212 \pm 0,018

Svi uzorci pokazuju veličinu kapljica u nanometarskom području, unutar raspona od 92 nm do 112 nm, ali nije uočen utjecaj koncentracije stearilamina na veličinu kapljica nanoemulzije. Najveća vrijednost prosječnog promjera kapljica izmjerena je kod nanoemulzija s 0,1% (*m/m*) stearilamina.

Rezultati mjerenja indeksa polidisperznosti ukazuju na usku raspodjelu veličine kapljica. Svi uzorci pokazuju vrijednosti PDI u rasponu od otprilike 0,1 do 0,2. Takvi rezultati ukazuju na kvalitetan i stabilan sustav. Uočen je blagi porast indeksa polidisperznosti proporcionalno s povećanjem koncentracije stearilamina u uzorku, no vrijednosti i dalje odgovaraju zadanim kriterijima.

4.2.5. Određivanje zeta - potencijala

Nanosustavi čiji je zeta-potencijal između -10 mV i $+10$ mV smatraju se približno neutralnima te zahtjevaju steričku stabilizaciju kako bi sustav bio stabilan. S druge strane, kod kapljica sa zeta-potencijalom negativnijim od -30 mV ili pozitivnijim od $+30$ mV, gustoća naboja na površini je dovoljna za značajnu elektrostatsku stabilizaciju.

Rezultati mjerenja zeta-potencijala su prikazani Tablicom 5.

Tablica 5. Ovisnost zeta-potencijala (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) o koncentraciji stearilamina.

Stearilamin (% , <i>m/m</i>)	Zeta-potencijal (mV)
0	$-1,64 \pm 1,92$
0,01	$3,19 \pm 0,55$
0,05	$16,53 \pm 1,23$
0,1	$23,36 \pm 2,57$
0,3	$36,15 \pm 1,55$

Porastom koncentracije stearilamina u uzorku, vidljiv je i porast zeta-potencijala. Uzorak koji ne sadrži stearilamin pokazuje blago negativne vrijednosti zeta-potencijala, što je rezultat prisutnosti negativno nabijenih slobodnih masnih kiselina u Miglyolu (smjesa triglicerida srednje duljine lanca). Sukladno očekivanjima, najveća je vrijednost izmjerena kod nanoemulzija s 0,3 % (*m/m*) stearilamina.

Dodatkom stearilamina u sustav nastojao se postići pozitivan potencijal koji bi omogućio mukoadhezivnost kapljica nanoemulzija kao i elektrostatsku stabilizaciju sustava. Stabilnost s

obzirom na zeta-potencijal postignuta je samo u sustavu s najvećom koncentracijom stearilamina gdje je izmjerena vrijednost bila veća od 30 mV. Međutim proučavani sustavi sadrže i neionski surfaktant (Kolliphor EL) koja pruža steričku stabilizaciju. Stoga se očekuje da će uzorci s zeta-potencijalom nižim od +30 mV također imati zadovoljavajuću stabilnost.

4.3. Ispitivanje mukoadhezivnosti

Kako bi se ispitala mukoadhezivnost, odnosno interakcija između pozitivno nabijenih kapljica nanoemulzija sa stearilaminom i negativno nabijenih lanaca mucina, nanoemulzije su inkubirane s disperzijama mucina u STF-u. Cilj ispitivanja mukoadhezivnosti bio je utvrditi postoji li promjena u veličini kapljica te njihovom zeta-potencijalu nakon inkubacije s disperzijama mucina.

Korištene su dvije različite koncentracije disperzije mucina – 0,015 % (*m/m*) i 1 % (*m/m*). Niža koncentracija odgovara stvarnoj koncentraciji mucina u suzama (Dohlman i sur., 1976), a viša je izabrana zbog mogućeg izraženijeg utjecaja na veličinu i zeta-potencijala kapljica, što bi olakšalo donošenje zaključaka o mukoadhezivnosti ispitivanih formulacija.

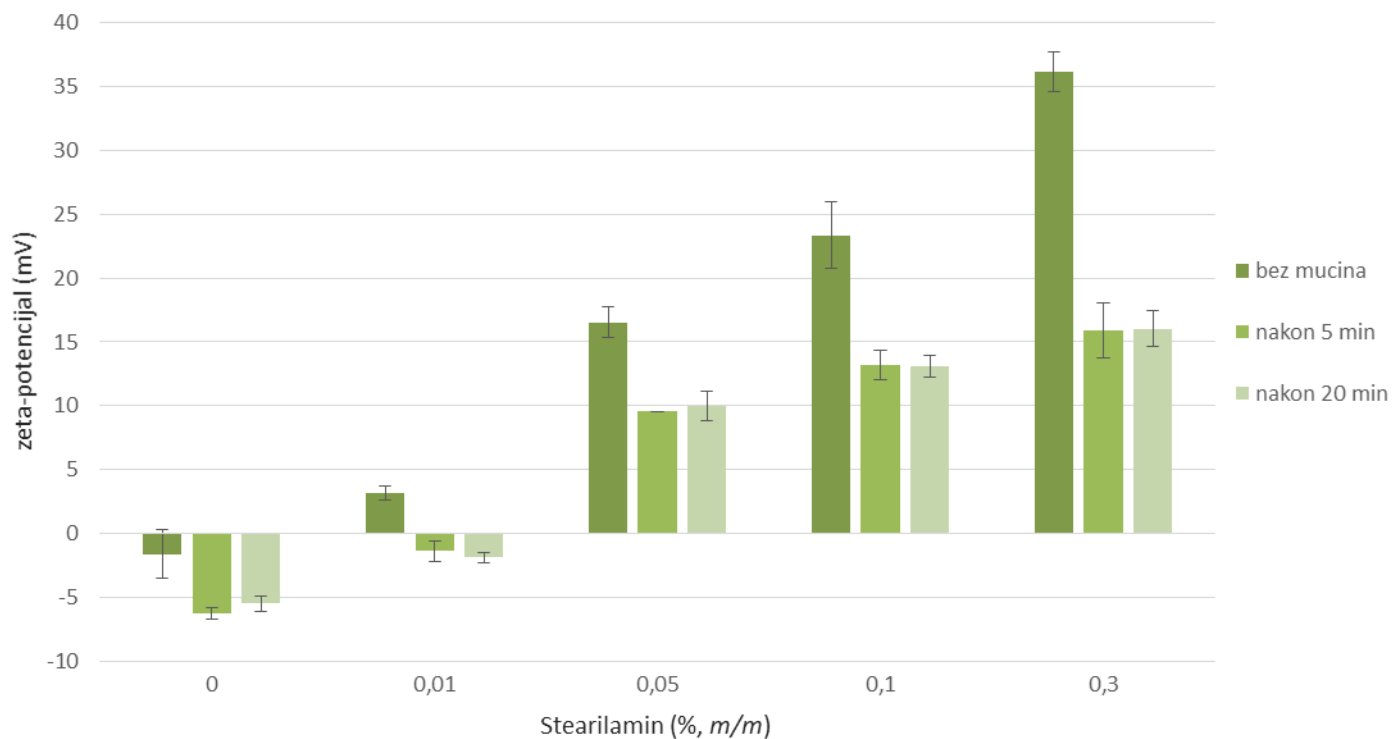
4.3.1. Inkubacija nanoemulzija s 0,015 %-tnom disperzijom mucina

Rezultati mjerenja veličine kapljica i indeksa polidisperznosti te zeta-potencijala nakon inkubacije u trajanju 5 odnosno 20 minuta prikazani su Tablicom 6.

Tablica 6. Rezultati mjerenja zeta-potencijala te veličine i indeksa polidisperznosti nakon 5 i nakon 20 minuta inkubacije emulzija s 0,015 %-tnom (*m/m*) disperzijom mucina.

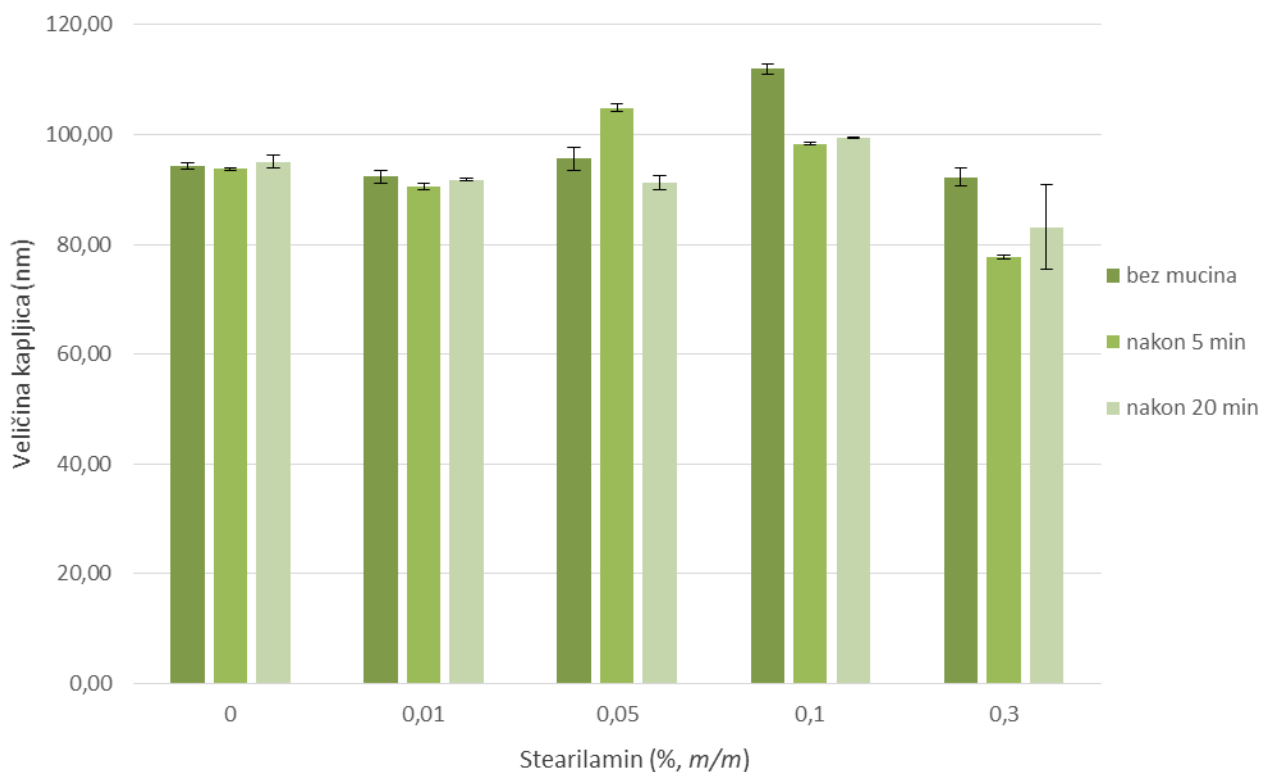
Uzorak	Nakon 5 minuta			Nakon 20 minuta		
	Zeta-potencijal (mV)	Veličina kapljica (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)	Veličina kapljica (nm)	PDI
N1	-6,3 ± 0,44	93,77 ± 0,25	0,112 ± 0,007	-5,51 ± 0,56	95,02 ± 1,17	0,091 ± 0,006
N2	-1,37 ± 0,81	90,48 ± 0,52	0,087 ± 0,009	-1,90 ± 0,40	91,79 ± 0,16	0,103 ± 0,021
N3	9,55 ± 0,00	104,9 ± 0,71	0,255 ± 0,003	9,97 ± 1,14	91,15 ± 1,26	0,185 ± 0,007
N4	13,2 ± 1,15	98,29 ± 0,26	0,127 ± 0,000	13,14 ± 0,86	99,46 ± 0,07	0,122 ± 0,014
N5	15,89 ± 2,15	77,68 ± 0,39	0,173 ± 0,014	16,05 ± 1,36	83,12 ± 7,66	0,236 ± 0,080

Ovi podatci su zatim uspoređeni s rezultatima mjerenja dobivenim mjerenjem veličine i zeta-potencijala samih nanoemulzija (Slike 12 i 13).



Slika 12. Usporedba srednjih vrijednosti zeta-potencijala nanoemulzija bez mucina i vrijednosti izmjerenih nakon 5 te nakon 20 minuta inkubacije s 0,015 %-tnom (*m/m*) disperzijom mucina.

Uočen je pomak vrijednosti zeta-potencijala prema negativnijim, odnosno manje pozitivnim vrijednostima nakon inkubacije nanoemulzija s disperzijom mucina. Takvi rezultati su očekivani s obzirom na negativan naboj mucina. Nema značajne razlike u zeta-potencijalima izmjerenim nakon 5 minuta i nakon 20 minuta (Slika 12).



Slika 13. Usporedba srednjih vrijednosti veličine kapljica unutarnje faze nanoemulzija bez mucina i vrijednosti izmjerenih nakon 5 i nakon 20 minuta inkubacije s 0,015 %-tnom disperzijom mucina.

Nije zabilježena značajna promjena veličine kapljica u prisutnosti mucina. Vrijednosti su uglavnom manje od 100 nm (Slika 13). Promjene indeksa polidisperznosti u odnosu na vrijednosti izmjerene prije inkubacije s mucinom su također zanemarive. Kod gotovo svih uzoraka izmjereni indeks polidisperznosti je manji od 0,2 (Tablica 7).

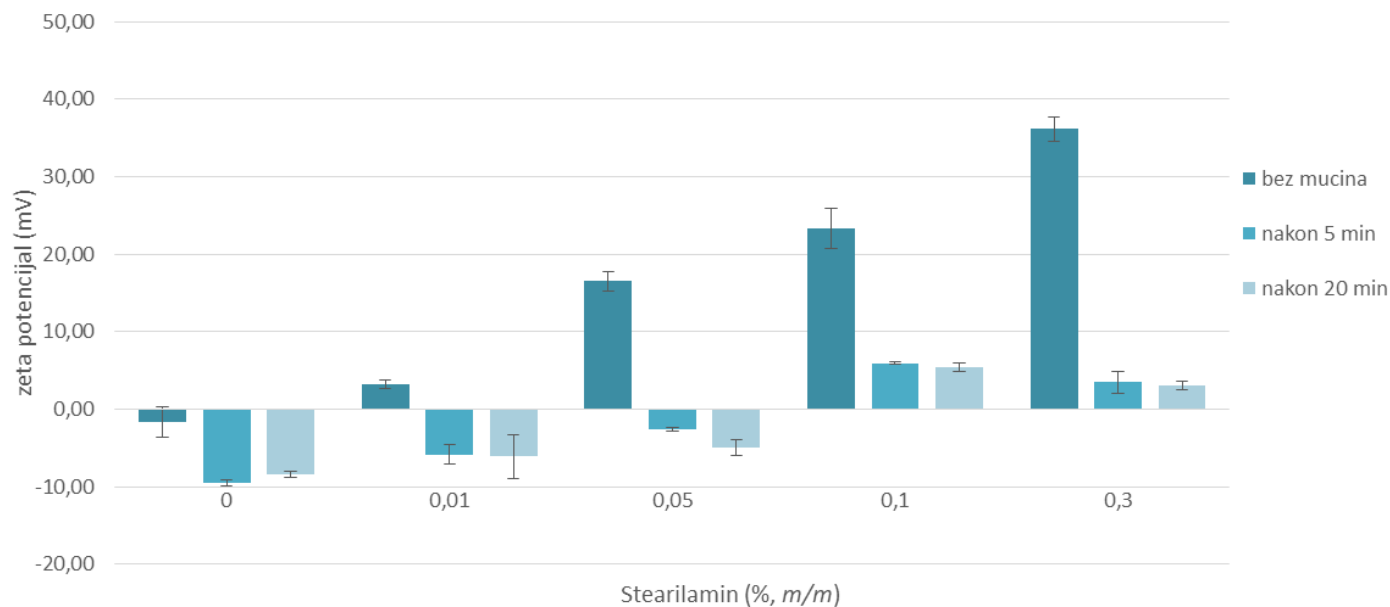
Bitno je napomenuti da su uzorci prije mjerenja razrijeđeni samo 10 puta (v/v) zbog niske koncentracije mucina i mogućnosti desorpcije molekula mucina s površine kapljica nanoemulzija kod većih razrjeđenja. Za razliku od toga, same nanoemulzije su bile razrijeđene 100 puta (v/v) prije mjerenja veličine kapljica, PDI i zeta-potencijala.

4.3.2. Inkubacija nanoemulzija s 1 %-tnom disperzijom mucina

Kako bi se ispitalo ima li razrijeđenje utjecaj na rezultat mjerenja, uzorci nanoemulzija inkubirani s 1 %-tnom (*m/m*) disperzijom mucina su razrijeđeni prvo 10 puta (*v/v*), a potom i 100 puta (*v/v*). Rezultati ovih mjerenja su uspoređeni međusobno te s rezultatima koji su dobiveni karakterizacijom samih nanoemulzija, bez prisutnosti mucina. Prvo su izvršena mjerenja veličine, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala kapljica gdje su uzorci bili razrijeđeni pročišćenom vodom odnosno 10 mM otopinom NaCl u omjeru 1:10 (*v/v*). Rezultati su prikazani Tablicom 7.

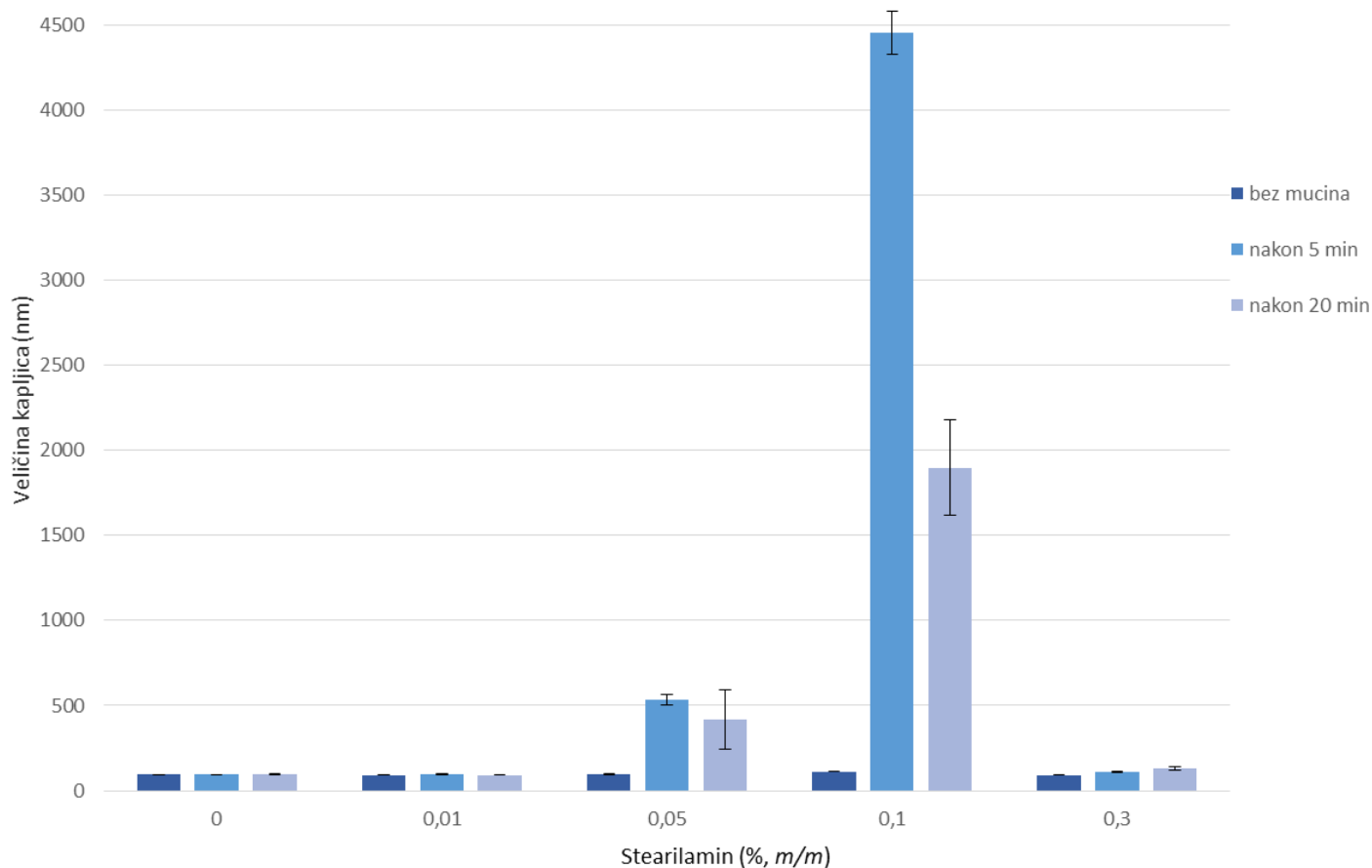
Tablica 7. Rezultati mjerenja zeta-potencijala te veličine i indeksa polidisperznosti nakon 5 i nakon 20 minuta inkubacije emulzija s 1 %-tnom (*m/m*) disperzijom mucina pri razrjeđenju 10 puta (*v/v*).

uzorak	nakon 5 min			nakon 20 min		
	Veličina kapljica (nm)	PDI	zeta-potencijal (mV)	Veličina kapljica (nm)	PDI	zeta-potencijal (mV)
N1	94,86	0,115	-9,48	97,34	0,141	-8,37
N2	93,45	0,149	-5,83	91,88	0,105	-6,13
N3	535,65	0,872	-2,61	417,10	0,796	-4,95
N4	4454,50	1,444	5,95	1900,00	1,346	5,36
N5	110,60	0,614	3,47	129,55	0,610	3,02



Slika 14. Usporedba srednjih vrijednosti zeta-potencijala nanoemulzija bez mucina i vrijednosti izmjerenih nakon 5 te nakon 20 minuta inkubacije s 1 %-tnom (m/m) disperzijom mucina pri razrjeđenju 10 puta (v/v).

U skladu s očekivanjima, kod svih ispitanih uzoraka zabilježeno je smanjenje zeta-potencijala u odnosu na nanoemulzije kojima nije dodana disperzija mucina (Slika 14). Vrijednosti su negativnije u odnosu na mjerenje s 0,015 %-tnom (m/m) disperzijom mucina.



Slika 15. Usporedba srednjih vrijednosti veličine kapljica unutarnje faze nanoemulzija bez mucina i vrijednosti izmjerenih nakon 5 i nakon 20 minuta inkubacije s 1 %-tnom (*m/m*) disperzijom mucina pri razrjeđenju 10 puta (*v/v*).

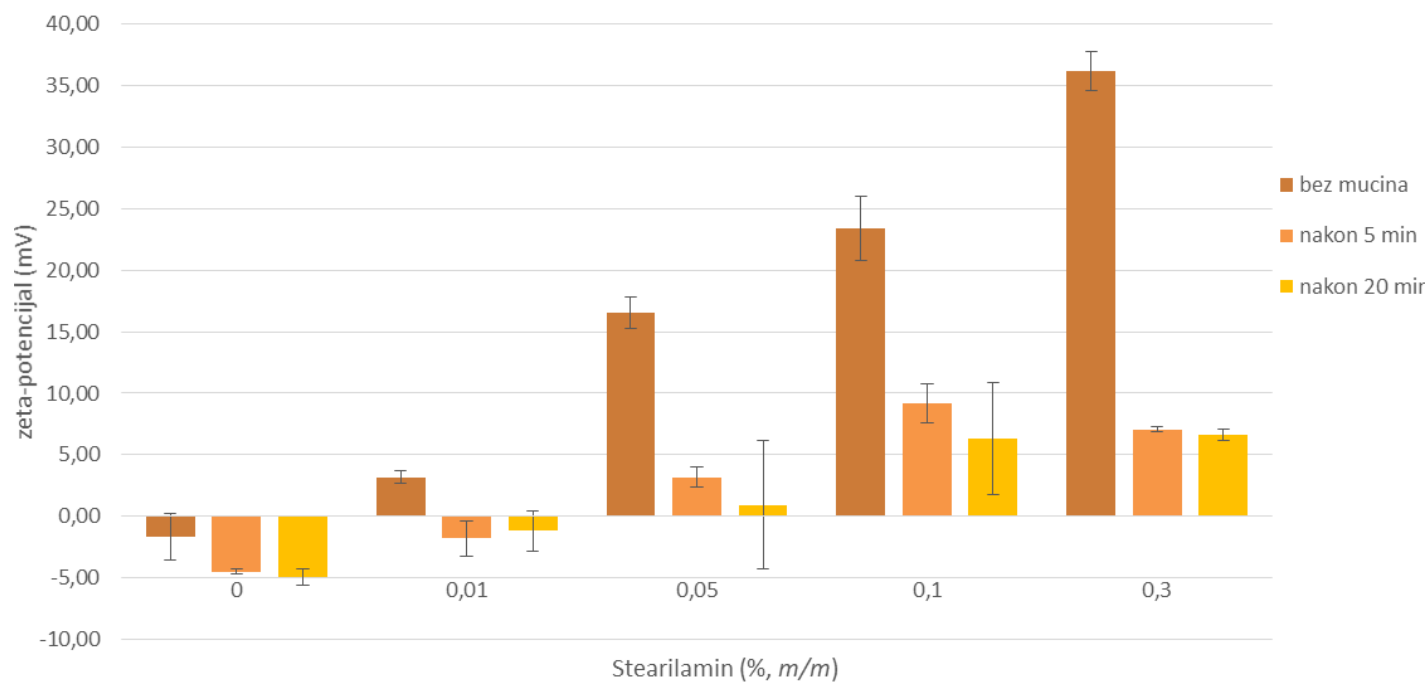
Kod uzorka bez stearylamina i kod uzorka s 0,01 % (*m/m*) stearylamina nije došlo do promjene veličine kapljica. Takvi rezultati su i očekivani za uzorak bez stearylamina budući izostaje pozitivan naboj koji bi uzrokovao adheziju mucina na kapljice. Mogući uzrok izostanka promjene kod uzorka s 0,01 % (*m/m*) stearylamina je premala koncentracija stearylamina. Kod uzorka s 0,05 % (*m/m*) stearylamina i 0,1 % (*m/m*) stearylamina zabilježeno je drastično povećanje srednje vrijednosti veličine kapljica. Uređaj Zetasizer Ultra detektirao je više populacija čestica različitih veličina. Zaključeno je da nastaju nakupine kapljica ulja i mucina koje su nepravilnih oblika i različitih veličina. Prikazana srednja vrijednost veličine je izračunata uzimajući u obzir sve nastale

populacije. Ovoj tvrdnji u prilog idu i visoke vrijednosti indeksa polidisperznosti koje su u nekim mjerenjima bile veće i od 1 (Tablica 8). Kod uzorka s 0,3 % (*m/m*) stearilamina nisu zabilježene značajne promjene.

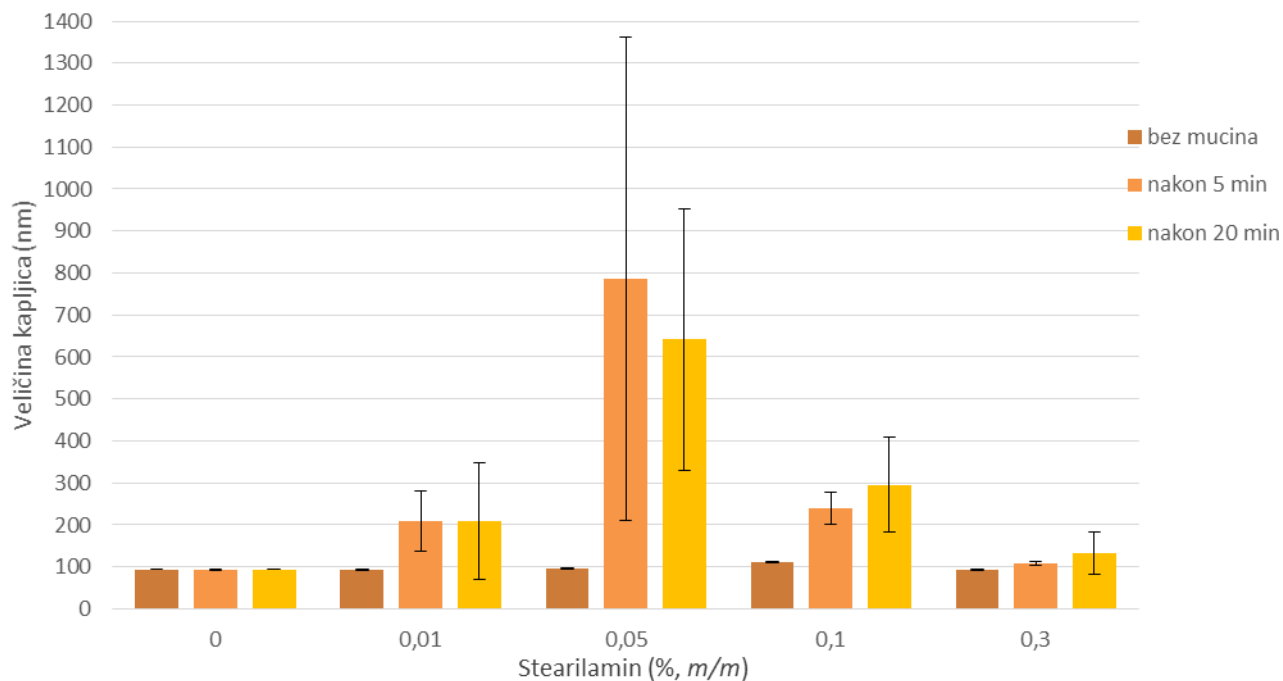
U svrhu optimizacije metode, izvršena su i mjerenja veličine, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala kapljica gdje su uzorci bili razrijeđeni pročišćenom vodom, odnosno 10 mM otopinom NaCl u omjeru 1:100 (*v/v*). Rezultati su prikazani Tablicom 8, a usporedba s vrijednostima izmjerenim prije inkubacije Slikom 16 i Slikom 17.

Tablica 8. Rezultati mjerenja zeta-potencijala te veličine i indeksa polidisperznosti nakon 5 i nakon 20 minuta inkubacije emulzija s 1 %-tnom (*m/m*) disperzijom mucina pri razrjeđenju 100 puta (*v/v*).

uzorak	nakon 5 min			nakon 20 min		
	Veličina kapljica (nm)	PDI	zeta-potencijal (mV)	Veličina kapljica (nm)	PDI	zeta-potencijal (mV)
N1	94,24	0,103	-4,47	94,04	0,111	-4,94
N2	209,03	0,650	-1,77	210,07	0,736	-1,15
N3	786,30	0,800	3,19	641,95	0,812	0,94
N4	239,65	0,469	9,16	295,95	0,488	6,34
N5	108,33	0,329	7,06	132,03	0,322	6,60

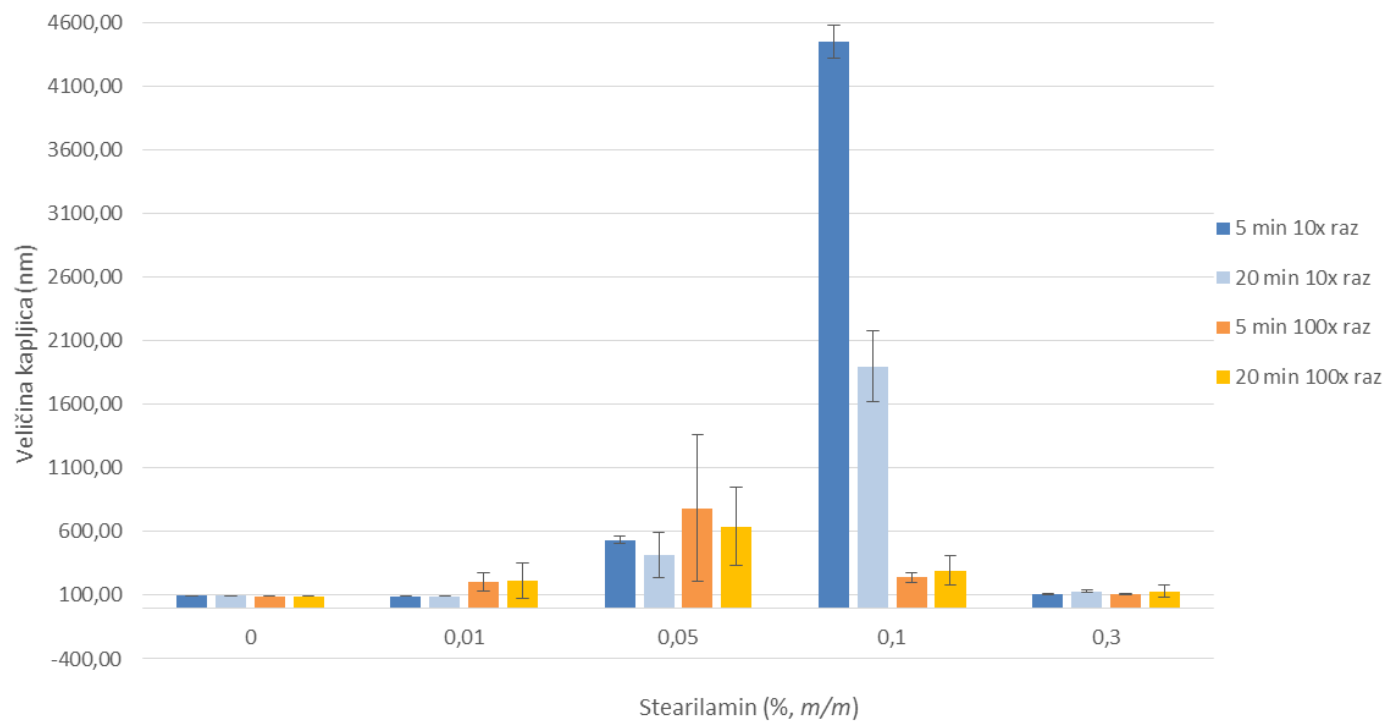


Slika 16. Usporedba srednjih vrijednosti zeta-potencijala nanoemulzija bez mucina i vrijednosti izmjerenih nakon 5 te nakon 20 minuta inkubacije s 1 %-tnom (*m/m*) disperzijom mucina pri razrjeđenju 100 puta (*v/v*).

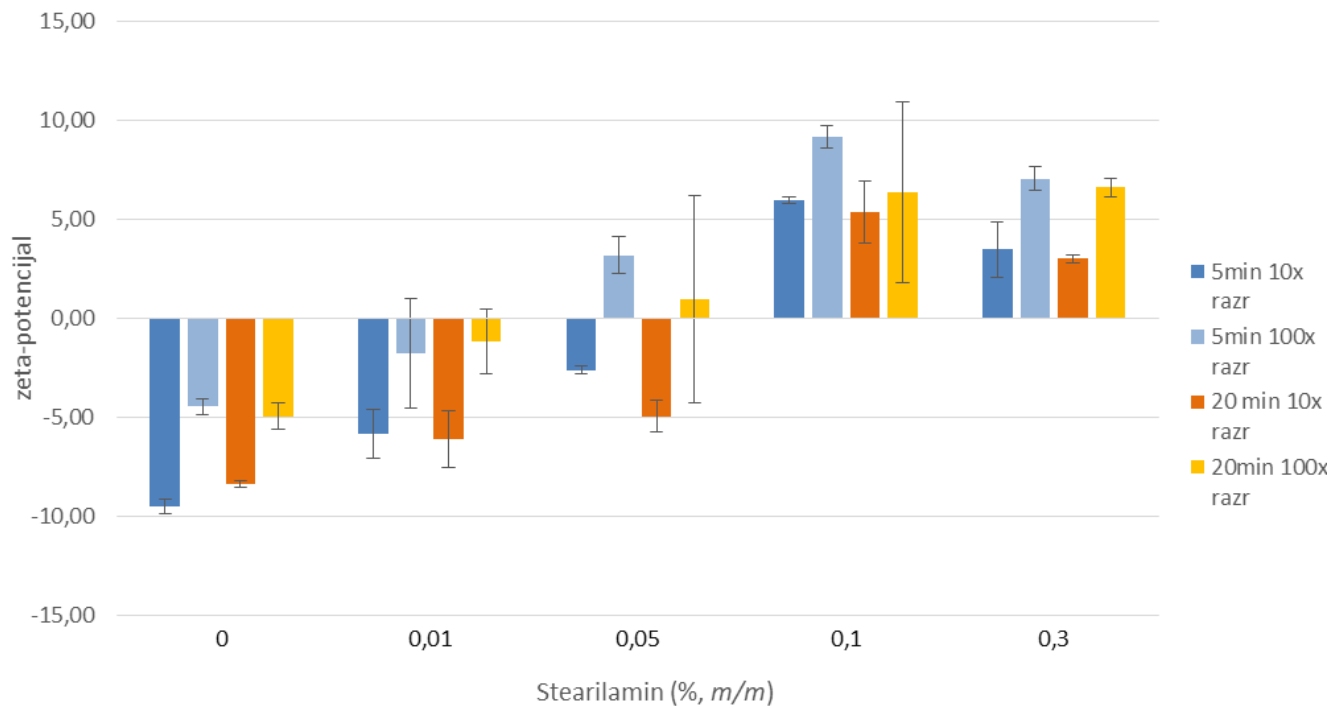


Slika 17. Usporedba srednjih vrijednosti veličine kapljica unutarnje faze emulzije bez mucina i vrijednosti izmjerenih nakon 5 i nakon 20 minuta inkubacije s 1 %-tnom (*m/m*) disperzijom mucina pri razrjeđenju 100 puta (*v/v*).

Mjerenja su izvršena pri različitim razrjeđenjima kako bi se ispitao utjecaj razrjeđenja na izmjerene veličine kapljica te na zeta-potencijal. Različita razrjeđenja vodom prilikom mjerenja veličine kapljica, mogla bi utjecati na desorpciju mucina s površine kapljica nanoemulzija ili stvaranje agregata. Najveće su razlike uočene kod uzorka s 0,1 % (*m/m*) staerilamina. Pri razrjeđenju 1:100 (*v/v*) nije došlo do stvaranja velikih agregata kao što je to bio slučaj pri razrjeđenju 1:10 (*v/v*) gdje su izmjerene veličine prelazile 4000 nm (Slika 18). Pri većem razrjeđenju, izmjereni zeta-potencijal bio je manje negativan odnosno pozitivniji kod svih uzoraka (Slika 19).



Slika 18. Usporedba mjerenja veličine nakon inkubacije nanoemulzija s 1 %-tnom (*m/m*) disperzijom mucina pri različitim razrjeđenjima.



Slika 19. Usporedba mjerenja zeta-potencijala nakon inkubacije nanoemulzija s 1 %-tnom (*m/m*) disperzijom mucina pri različitim razrjeđenjima.

5. ZAKLJUČCI

- Metodom mikrofluidizacije pripravljene su U/V nanoemulzije sa stearylaminom kao nositeljem pozitivnog naboja. Ispitivana su reološka svojstva, pH vrijednost, površinska napetost, zeta-potencijal te veličina i PDI navedenih nanoemulzija kako bi se utvrdilo koji udio stearylamina osigurava svojstva najpogodnija za oftalmičku primjenu.
- Nanoemulzije pokazuju karakteristike Newtonovih sustava, a kod uzoraka s većim udjelom stearylamina (0,1 % (m/m) i 0,3 % (m/m) stearylamina) uočena su blaga odstupanja vrijednosti prividne viskoznosti tijekom mjerenja, što bi se moglo objasniti taloženjem stearylamina iz nanoemulzija tijekom mjerenja.
- Niske vrijednosti viskoznosti, slične vrijednosti vode, omogućavaju jednostavnu primjenu te točnost doziranja kapi za oko.
- Porastom koncentracije stearylamina povećava se i pH vrijednost formulacije. Nanoemulzije s 0,1 % (m/m) i 0,3 % (m/m) stearylamina izlaze izvan zadanog raspona pH vrijednosti (između 4 i 8) te iz tog razloga ne bi bile prikladne za oftalmičku primjenu. Najprikladnijom se pokazala nanoemulzija s 0,05 % (m/m) stearylamina budući da njezin pH ($7,28 \pm 0,21$) gotovo u potpunosti odgovara pH suzne tekućine.
- Stearilamin smanjuje površinsku napetost pripravka, a ako se uzmu u obzir studije koje sugeriraju da pripravci čija je površinska napetost manja od 35 mN/m uzrokuju bol i nelagodu pri primjeni, nanoemulzije s 0,1 % (m/m) i 0,3 % (m/m) stearylamina ne bi bile pogodne za oftalmičku primjenu.
- Izmjerene veličine kapljica kod svih su uzoraka unutar nanometarskog područja, unutar raspona od 92 nm do 112 nm, te nije uočen utjecaj koncentracije stearylamina na veličinu kapljica nanoemulzije. Uočen je blagi porast indeksa polidisperznosti proporcionalno povećanju koncentracije stearylamina u nanoemulzijama, no vrijednosti su i dalje prihvatljive budući da su manje od 0,2 te ukazuju na stabilan sustav.
- Povećanjem koncentracije stearylamina u uzorcima povećava se i zeta-potencijal što je bilo očekivano zbog pozitivnog naboja stearylamina. Porast zeta-potencijala je poželjan jer pridonosi elektrostatskoj stabilizaciji sustava te ima pozitivan utjecaj na zadržavanje formulacije na površini oka zbog interakcije pozitivno nabijenih kapljica nanoemulzije i negativno nabijenih mucina iz suznog filma.

- Nakon inkubacije nanoemulzija s disperzijom mucina (0,015 %-tnom i 1 %-tnom), kod svih je uzoraka došlo do pomaka prema nižim vrijednostima zeta-potencijala.
- Nakon inkubacije s koncentriranijom disperzijom mucina (1 %-tna disperzija mucina u STF-u) uočen je porast veličine kapljica unutarnje faze nanoemulzija koje sadrže stearylamin. Najveće promjene veličine su zabilježene kod uzoraka s 0,05 % (*m/m*) i 0,1 % (*m/m*) stearylamina. Zaključeno je da dolazi do stvaranja velikih nakupina kapljica ulja i mucina te da ta dva sustava pokazuju najznačajnija mukoadhezivna svojstva.
- S obzirom na rezultate provedenih ispitivanja, formulacija s 0,05 % (*m/m*) stearylamina istaknula se kao optimalna. Fizičko-kemijska svojstva navedene formulacije zadovoljavaju sve kriterije za oftalmičku primjenu, a ispitivanjem mukoadhezivnosti je dokazano da stupa u interakciju s mucinima.

6. LITERATURA

Ablamowicz AF, Nichols JJ. Ocular Surface Membrane-Associated Mucins, *Ocul Surf*, 2016, 1-11.

Anton N, Vandamme TF. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int J Pharm*, 2009, 377, 142–147.

Baranowski P, Karolewicz B, Gajda M, Pluta J. Ophthalmic drug dosage forms: Characterisation and research methods. *Sci World J*, 2014, 1-14.

Basics of viscometry, 2018, <https://wiki.anton-paar.com> (pristupljeno 20.6.2019.)

Bassi da Silva J, Barbosa de Souza Ferriera S, de Freitas O, Bruschi ML. A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 1-34.

Calderó G, Montes R, Llinàs M, García-Celma MJ, Porrás M, Solans C. Studies on the formation of polymeric nano-emulsions obtained via low-energy emulsification and their use as templates for drug delivery nanoparticle dispersions. *Colloids Surf B*, 2016, 145, 922–931.

Daull P, Lallemand F, Garrigue JS. Benefits of cetalkonium chloride cationic oil-in-water nanoemulsions for topical ophthalmic drug delivery. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 66, 531-541.

de Araújo SC, de Mattos AC, Teixeira HF, Coelho PM, Nelson DL, de Oliveira MC. Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. *Int J Pharm*, 2007, 307-315.

Du Noüy ring method, <https://www.kruss-scientific.com> (pristupljeno 17.6.2019.)

Dohlman C. H, Friend J, Kalevar V, Yagoda D, Balazs E, The glycoprotein (mucus) content of tears from normals and dry eye patients. *Expe Eye Res*, 1976, 359–365.

Fabiano A, Chetoni P, Zambito Y, Mucoadhesive nano-sized supramolecular assemblies for improved pre-corneal drug residence time. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015, 2069-2076.

Fraga M, Laux M, Zandoná B, Santos GR, dos Santos Giuberti C, de Oliveira MC, Matte U, Teixeira HF. Optimization of stearylamine-based nanoemulsions obtained by spontaneous

emulsification process as nucleic acids delivery systems. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2008, 18, 398–403.

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.

García-Celma MJ, Homs M, Morales D, Solans C. Nanocolloids – A Meeting Point for Scientists and Technologists. U: CHAPTER 11 Nano-emulsions for Pharmaceutical Applications. Sanchez-Dominguez M, Rodriguez-Abreu C, urednici, Elsevier Inc., 2016, 365-388.

Greaves JL, Wilson CG. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 1993, 11, 349–383.

Green-Church KB, Butovich I, Willcox M, Borchman D, Paulsen F, Barabino S, Glasgow BJ. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction : Report of the Subcommittee on Tear Film Lipids and Lipid – Protein Interactions in Health and Disease. *IOVS*, 2011, 1979-1990.

Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. *Soft Matter*, 2016, 12, 2826–2841.

Herrada RA, Perez-Corona M, Shrestha RA, Pamukcu S, Bustos E. Electrokinetic Remediation of Polluted Soil Using Nano-materials : Nano-iron U Chapter 3 Peralta-Hernandez JM, Rodrigo MA, Martinez-Huitle CA. Evaluation of electrochemical reactors as a new way to enviromental protection, 2014, str. 41-57.

Honary S, Zahir F. Effect of Zeta-potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems. *Trop J Pharm Res*, 2013, 12, 255–264.

Hotujac Grgurević M, Juretić M, Hafner A, Pepić I, Lovrić J. Tear fluid-eye drops compatibility assessment using surface tension. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 275-282.

How to Characterize Ointment Flow Behavior, 2017, <https://www.rdmag.com> (pristupljeno 1.7.2019.)

Jafari SM, He Y, Bhandari B. Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization - A Comparison, *Int J Food Prop*, 2016, 475-485.

Jeong MW, Oh SG, Kim YC. Effects of amine and amine oxide compounds on the zeta-potential of emulsion droplets stabilized by phosphatidylcholine. *Colloids Surf A*, 2001, 181, 247–253.

Jumaa M, Müller BW. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. *Int J Pharm*, 1999, 183, 175–184.

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

Komaiko J, McClements DJ. Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: Hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems. *J Colloid Interface Sci*, 2014, 425, 59–66.

Koroleva MY, Yurtov E V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russ Chem Rev*, 2012, 81, 21–43.

Krtalić I, Radošević S, Hafner A, Grassi M, Nenadić M, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J, Pepić I, Lovrić J. D-Optimal Design in the Development of Rheologically Improved In Situ Forming Ophthalmic Gel. *J Pharm Sci*, 2018, 107, 1562–1571.

Lallemand F, Daull P, Benita S, Buggage R, Garrigue J. Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb, *J Drug Deliv*, 2012a, 1-16.

Lam SM, Tong L, Duan X, Petznick A, Wenk MR, Shui G. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *J Lipid Res*, 2014a, 55, 289–298.

Lam SM, Tong L, Reux B, Duan X, Petznick A, Yong SS, Boo C, Khee S, Lear MJ, Wenk MR, Shui G. Lipidomic analysis of human tear fluid reveals structure-specific lipid alterations in dry eye syndrome. *J Lipid Res* 2014b, 55, 299–306.

Lee VHL, Robinson JR. Review: Topical Ocular Drug Delivery: Recent Developments and Future Challenges. *J Ocul Pharmacol*, 1986, 2, 67–108.

Liu C, Lan Q, He W, Nie C, Zhang C, Xu T, Jiang T, Wang S. Octa-arginine modified lipid emulsions as a potential ocular delivery system for disulfiram: A study of the corneal permeation,

transcorneal mechanism and anti-cataract effect. *Colloids Surf B*, 2017, 160, 305–314.

Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57, 1595–1639.

Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *J Phys Condens Matter*, 2006, 18, 635–666.

McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 2012, 8, 1719–1729.

Morales D, Gutiérrez JM, García-Celma MJ, Solans YC. A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. *Langmuir*, 2003, 19, 7196–7200.

Octadecylamine compound, <https://spectrabase.com> (pristupljeno 20.6.2019.)

Owen T, Butler A. Metallosurfactants of bioinorganic interest: Coordination-induced self assembly. *Coord Chem Rev*, 2011, 255, 678–687.

Pepić I, Lovrić J, Cetina-Čižmek B, Reichl S, Filipović-Grčić J. Toward the practical implementation of eye-related bioavailability prediction models. *Drug Discov Today*, 2014, 31-44.

Pepić I. Problemi lokalne primjene pripravka za oči. *Farm Glas*, 2004, 60, 311-329.

Pereira de Sousa I, Steiner C, Schmutzler M, Wilcox MD, Veldhuis GJ, Pearson JP, Huck CW, Salvenmoser W, Bernkop-Schnürch A. Mucus permeating carriers: formulation and characterization of highly densely charged nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 97, 273–279.

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*, 2017, 270, 203-225.

Rathore KS, Nema RK. An insight into ophthalmic drug delivery. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 2009, 1, 1-5.

Ruponen M, Urtti A. Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 442-446.

Sasaki H, Yamamura K, Nishida K, Nakamura J, Ichikawa M. Delivery of Drugs to the Eye by Topical Application, *Prog Retin Eye Res*, 1996, 15, 583-620.

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.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2005, 30, 102-110.

Solans C, Sole I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2012, 17, 246-254.

Strydom SJ, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, Villiers MM De. Poly (amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*, 2013, 9, 85–93.

Sutradhar KB. Nanoemulsions : increasing possibilities in drug delivery. *Eur J Nanomed*, 2013, 5, 97–110.

Tadros TF, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci*, 2004, 10, 102-110.

Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs, *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58, 357–368.

Walenga RL, Babiskin AH, Zhang X, Absar M, Zhao L, Lionberger RA. Impact of Vehicle Physicochemical Properties on Modeling-Based Predictions of Cyclosporine Ophthalmic Emulsion Bioavailability and Tear Film Breakup Time. *J Pharm Sci*, 2018, 1–10.

Webb MS, Wheeler JJ, Bally MB, Mayer LD. The cationic lipid stearylamine reduces the permeability of the cationic drugs verapamil and prochlorperazine to lipid bilayers: Implications for drug delivery. *BBA - Biomembr*, 1995, 1238, 147–155.

Yasueda SI, Inada K, Matsuhisa K, Terayama H, Ohtori A. Evaluation of ophthalmic suspensions using surface tension. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57, 377–382.

Zetasizer Ultra - product brochure, 2018, <https://www.malvernpanalytical.com> (pristupljeno 17.6.2019.)

Zhou L, Beuerman RW. Progress in Retinal and Eye Research Tear analysis in ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31, 527–550.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Topikalna primjena lijekova je najrašireniji i opće prihvaćen način liječenja velikog broja bolesti oka. Međutim, bioraspoloživost topikalnih oftalmičkih lijekova je mala zbog vrlo učinkovitih protektivnih mehanizama oka. Sve se više istražuje primjena nanoemulzija čije kapljice nanometarskih dimenzija omogućuju svladavanje ovih barijera. Poseban se naglasak stavlja na kationske nanoemulzije koje stupaju u interakciju s negativno nabijenom površinom oka i tako pospješuju apsorpciju lijeka.

U sklopu ovog diplomskog rada istraživane su kationske nanoemulzije sa stearylaminom kao nositeljem pozitivnog naboja. Kako bi se odredila koncentracija stearylamina koja osigurava svojstva najpogodnija za oftalmičku primjenu ispitana su ključna fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija koja utječu na njihov klinički učinak uključujući veličinu kapljica, indeks polidisperznosti, zeta-potencijal, pH, profil viskoznosti formulacije kao funkcije primijenjene sile smicanja te površinsku napetost.

Utvrđeno je da sve nanoemulzije pokazuju karakteristike Newtonovskih sustava. Nanoemulzija s 0,05 % (*m/m*) stearylamina ima pH vrijednost najprikladniju za oftalmičku primjenu. Stearylamin smanjuje površinsku napetost nanoemulzije, a mjerenjem je utvrđeno da je 0,05 % (*m/m*) stearylamina u uzorku granična koncentracija koja neće uzrokovati nelagodu pri primjeni. Zeta-potencijal nanoemulzija raste proporcionalno s porastom koncentracije stearylamina. Nakon inkubacije s disperzijom mucina vrijednosti su se očekivano smanjile. Svi uzorci pokazuju prihvatljive veličine kapljica (~100 nm) i indekse polidisperznosti ($PDI < 0,2$). Zabilježen je porast veličine kapljica nanoemulzija koje sadrže stearylamin nakon inkubacije s disperzijom mucina, a promjene su najočitije kod uzoraka s 0,05 % (*m/m*) i 0,1 % (*m/m*) stearylamina pa su ti uzorci okarakterizirani kao najmukoadhezivniji. S obzirom na rezultate fizičko-kemijske karakterizacije i testa mukoadhezivnosti, formulacija s 0,05 % (*m/m*) stearylamina se istaknula kao najoptimalnija za oftalmičku primjenu.

Topical drug administration is the most widely used and commonly accepted treatment for many eye diseases. However, the bioavailability of topical ophthalmic drugs is low due to the highly effective protective mechanisms of the eye. As nanoemulsions can overcome these barriers, their application is increasingly being explored and particular emphasis is placed on cationic nanoemulsions that interact with the negatively charged surface of corneal epithelial cells and thus enhance drug absorption.

As part of this thesis, cationic nanoemulsions with stearylamine as a positive charge carrier were examined. In order to determine the concentration of stearylamine that provides the properties most suitable for ophthalmic administration, the key physicochemical properties of nanoemulsions that affect their clinical performance including droplet size, polydispersity index, zeta potential, pH, formulation viscosity profile as a function of applied shear force, and surface tension were examined. It was found that all nanoemulsions show the characteristics of Newtonian systems. A nanoemulsion with 0.05 % (*m/m*) stearylamine has a pH value most suitable for ophthalmic administration. Stearylamine reduces the surface tension of the nanoemulsion, and by measurement it was found that 0.05 % stearylamine in the sample is a concentration limit that will not cause discomfort when applied. The zeta-potential of nanoemulsions increases in proportion with the increase of stearylamine concentration, and after incubation with the dispersion of mucin, values decreased. All samples show acceptable droplet sizes (~100 nm) and polydispersity indexes (PDI < 0.2). An increase in the size of stearylamine-containing nanoemulsions after incubation with mucin dispersion was observed. Changes were most evident in the 0.05 % (*m/m*) and 0.1 % (*m/m*) stearylamine samples so it was concluded that these samples have the strongest mucoadhesive properties. Considering the results of the physico-chemical and mucoadhesive tests, the formulation with 0.05 % (*m/m*) stearylamine stood out as the most optimal for ophthalmic use.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Određivanje mukoadezivnih svojstva kationskih nanoemulzija

Marija Šare

SAŽETAK

Topikalna primjena lijekova je najrašireniji i opće prihvaćen način liječenja velikog broja bolesti oka. Međutim, bioraspoloživost topikalnih oftalmičkih lijekova je mala zbog vrlo učinkovitih protektivnih mehanizama oka. Sve se više istražuje primjena nanoemulzija čije kapljice nanometarskih dimenzija omogućuju svladavanje ovih barijera. Poseban se naglasak stavlja na kationske nanoemulzije koje stupaju u interakciju s negativno nabijenom površinom oka i tako pospješuju apsorpciju lijeka. U sklopu ovog diplomskog rada istraživane su kationske nanoemulzije sa stearylaminom kao nositeljem pozitivnog naboja. Kako bi se odredila koncentracija stearylamina koja osigurava svojstva najpogodnija za oftalmičku primjenu ispitana su ključna fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija koja utječu na njihov klinički učinak uključujući veličinu kapljica, indeks polidisperznosti, zeta-potencijal, pH, profil viskoznosti formulacije kao funkcije primijenjene sile smicanja te površinsku napetost. Utvrđeno je da sve nanoemulzije pokazuju karakteristike Newtonovskih sustava. Niska viskoznost nanoemulzija omogućavaju jednostavnu primjenu te točnost doziranja kapi za oko. Nanoemulzija s 0,05 % (*m/m*) stearylamina ima pH vrijednost najprikladniju za oftalmičku primjenu. Stearylamin smanjuje površinsku napetost nanoemulzije, a mjerenjem je utvrđeno da je 0,05 % (*m/m*) stearylamina u uzorku granična koncentracija koja neće uzrokovati nelagodu pri primjeni. Zeta-potencijal nanoemulzija raste proporcionalno s porastom koncentracije stearylamina. Nakon inkubacije s disperzijom mucina vrijednosti su se očekivano smanjile. Svi uzorci pokazuju prihvatljive veličine kapljica (~100 nm) i indekse polidisperznosti ($PDI < 0,2$). Zabilježen je porast veličine kapljica nanoemulzija koje sadrže stearylamin nakon inkubacije s disperzijom mucina, a promjene su najočitije kod uzoraka s 0,05 % (*m/m*) i 0,1 % (*m/m*) stearylamina pa su ti uzorci okarakterizirani kao najmukoadezivniji. S obzirom na rezultate fizičko-kemijskih testova i testa mukoadezivnosti, formulacija s 0,05 % (*m/m*) stearylamina se istaknula kao najoptimalnija za oftalmičku primjenu.

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

Rad sadrži: 51 stranica, 19 grafički prikaz, 8 tablica i 58 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanoemulzije, oftalmička primjena, stearylamin, mukoadezivnost

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

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

Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Rujan 2019.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Determination of mucoadhesive properties of cationic nanoemulsions

Marija Šare

SUMMARY

Topical drug administration is the most widely used and commonly accepted treatment for many eye diseases. However, the bioavailability of topical ophthalmic drugs is low due to the highly effective protective mechanisms of the eye. As nanoemulsions can overcome these barriers, their application is increasingly being explored and particular emphasis is placed on cationic nanoemulsions that interact with the negatively charged surface of corneal epithelial cells and thus enhance drug absorption. As part of this thesis, cationic nanoemulsions with stearylamine as a positive charge carrier were examined. In order to determine the concentration of stearylamine that provides the properties most suitable for ophthalmic administration, the key physicochemical properties of nanoemulsions that affect their clinical performance including droplet size, polydispersity index, zeta potential, pH, formulation viscosity profile as a function of applied shear force, and surface tension were examined. It was found that all nanoemulsions show the characteristics of Newtonian systems. Low formulation viscosity enables dosing accuracy and ease of eye-drop administration. A nanoemulsion with 0.05 % (*m/m*) stearylamine has a pH value most suitable for ophthalmic administration. Stearylamine reduces the surface tension of the nanoemulsion, and by measurement it was found that 0.05 % stearylamine in the sample is a concentration limit that will not cause discomfort when applied. The zeta-potential of nanoemulsions increases in proportion with the increase of stearylamine concentration, and after incubation with the dispersion of mucin, values decreased. All samples show acceptable droplet sizes (~100 nm) and polydispersity indexes ($PDI < 0.2$). An increase in the size of stearylamine-containing nanoemulsions after incubation with mucin dispersion was observed. Changes were most evident in the 0.05 % (*m/m*) and 0.1 % (*m/m*) stearylamine samples so it was concluded that these samples have the strongest mucoadhesive properties. Considering the results of the physico-chemical and mucoadhesive tests, the formulation with 0.05 % (*m/m*) stearylamine stood out as the most optimal for ophthalmic use.

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

This thesis includes: 51 pages, 19 figures, 8 tables and 59 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoemulsions, ophthalmic application, stearylamine, mucoadhesion

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

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

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

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

The thesis was accepted: September 2019.

