

# Fizičko-kemijska karakterizacija in situ gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata za nazalnu primjenu

---

Horvat, David

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:600277>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

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



**David Horvat**

**Fizičko-kemijska karakterizacija *in situ*  
gelirajućih nanosuspenzija  
flutikazonpropionata za nazalnu primjenu**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Anite Hafner. Ovaj je rad sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-4592.

*Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Hafner na stručnom vodstvu, prenesenom znanju, susretljivosti i strpljenju prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.*

*Hvala izv.prof.dr.sc. Ivanu Pepiću i asistenticama Lauri Nižić Nodilo, mag. pharm. te Mirni Perkušić, mag. pharm. na uloženom vremenu, trudu i pomoći koju su mi pružili tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji na podršci tijekom studija i života.*

*Hvala svim prijateljima i kolegama na lijepim trenucima tijekom studiranja.*

# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1. Nanosuspenzija kao farmaceutski oblik djelatne tvari .....   | 1         |
| 1.1.1. Metode pripreme nanokristala djelatne tvari.....   | 2         |
| 1.1.2. Prednosti i nedostaci nanokristala djelatne tvari.....   | 4         |
| 1.1.3. Flutikazonpropionat – djelatna tvar izbora za nanonizaciju.....  | 6         |
| 1.2. Putovi primjene nanosuspenzija.....  | 8         |
| 1.2.1. Oralna primjena.....   | 8         |
| 1.2.2. Parenteralna primjena .....  | 8         |
| 1.2.3. Pulmonalna primjena .....  | 9         |
| 1.2.4. Topikalna primjena .....   | 10        |
| 1.2.5. Nazalna primjena .....   | 10        |
| 1.3. Karakterizacija nanosuspenzija .....   | 13        |
| 1.3.1. Veličina čestica .....   | 13        |
| 1.3.2. Zeta potencijal.....   | 14        |
| 1.3.3. Reološka svojstva.....   | 15        |
| 1.3.4. Napetost površine.....   | 16        |
| 1.3.5. Osmolalnost .....  | 16        |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....   | <b>18</b> |
| 3.1. Materijali .....   | 18        |
| 3.2. Metode.....  | 18        |
| 3.2.1. Priprema <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata .....  | 18        |
| 3.2.2. Određivanje veličine i zeta potencijala čestica u <i>in situ</i> gelirajućim nanosuspenzijama flutikazonpropionata ..... | 19        |
| 3.2.3. Mjerenje površinske napetosti.....   | 20        |
| 3.2.4. Reološka mjerenja.....   | 21        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>23</b> |
| 4.1. Priprema <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata .....  | 23        |
| 4.2. Veličina čestica <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropiona .....  | 24        |
| 4.3. Zeta potencijal nanočestica flutikazonpropionata u <i>in situ</i> gelirajućim nanosuspenzijama.....                        | 25        |
| 4.4. Površinska napetost <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata.....                                    | 25        |
| 4.5. Reološka svojstva <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata.....                                      | 26        |
| 4.5.1. Viskoznost pri mirovanju .....   | 27        |
| 4.5.2. Test promjene amplitude .....  | 28        |
| 4.5.3. Vrijeme geliranja .....  | 29        |
| 4.5.4. Test promjene frekvencije .....  | 31        |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>6. LITERATURA</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....   | <b>39</b> |
| <b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>  |           |

# 1. UVOD

## 1.1. Nanosuspenzija kao farmaceutski oblik djelatne tvari

Više od 40 % novootkrivenih djelatnih tvari su slabo topljive u vodi, a samim time imaju i malu bioraspoloživost, zbog čega se javila potreba za razvojem novih načina primjene i tehnologija oblikovanja kojima bi se minimizirali ti problemi (Leone i Cavalli, 2015).

Prema biofarmaceutskoj klasifikaciji (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS) djelatne tvari su podijeljene u 4 skupine prema njihovoj topljivosti i permeabilnosti. Tvar se smatra dobro topljivom ukoliko je njezina najveća doza topljiva u manje od 250 ml vodenog medija u rasponu pH od 1,2 do 6,8 te pri temperaturi od 37 °C, a dobro permeabilnom ako je obim apsorpcije veći od 90 %. Prva skupina lijekova prema BCS klasifikaciji karakterizirana je dobrom topljivošću i dobrom permeabilnošću, druga skupina slabom topljivošću i dobrom permeabilnošću, treća skupina obrnuto, a skupinu četiri karakterizira slaba topljivost i slaba permeabilnost (Lovrić i sur., 2015). Najveći udio djelatnih tvari svrstan je u drugu skupinu po BCS klasifikaciji. Jedan od načina kako poboljšati topljivost i ubrzati otapanje djelatne tvari, odnosno prevesti je iz druge u prvu skupinu, jest primjena nanotehnologije u vidu izrade nanosuspenzije kao farmaceutskog oblika djelatne tvari (Leone i Cavalli, 2015).

Nanosuspenzija se definira kao disperzija čestica djelatne tvari pripravljena u vodenom mediju uz dodatak površinski aktivnih tvari i/ili polimera, u kojoj veličina suspendiranih čestica mora biti manja od 1 µm, a najčešće su one veličine od 200 do 600 nm (Goel S. i sur., 2019). Nanonizacija djelatne tvari rezultira povećanom topljivošću i brzinom otapanja, te posljedično povećanom bioraspoloživošću (Rabinow, 2004).

Stabilizacija nanosuspenzija postiže se uporabom: (i) površinski aktivnih tvari prikladne vrste i omjera s obzirom na fizička svojstva djelatne tvari, koje osiguravaju elektrostatsku stabilizaciju te (ii) polimera, čija je uloga stabilizirati sustav sterički (Lovrić i sur., 2015; Negrini i sur., 2017). Sredstva za stabilizaciju adsorbiraju se na površinu nanočestica djelatne tvari pomoću svojeg hidrofobnog lanca i osiguravaju ionsku i steričku stabilizaciju te sprječavaju koalescenciju nanočestica (Lovrić i sur., 2015), dok se hidrofilni dio orijentira prema vodenom mediju (Rabinow, 2004). Što je više surfaktanta na površini, to je stabilizacijski učinak jače izražen. Međutim, njegova koncentracija iznad kritične micelarne može rezultirati destabilizacijom sustava i rastom nanočestica. Na stabilnost nanosuspenzija uvelike utječe i temperatura jer njezinim rastom raste i sklonost sustava agregaciji (Wang L. i sur., 2013).

Surfaktanti koji se najviše koriste u pripremi nanokristala su natrijev kolat, natrijev deoksikolat i natrijev laurilsulfat iz skupine anionskih surfaktanata, lecitini kao amfolitski te derivati celuloze, polivinil alkohol, polivinil pirolidon i polisorbati kao predstavnici neionskih površinski aktivnih tvari. Kako bi se proširila primjena na intravenski ili okularni put primjene i smanjila mogućnost iritacije ili toksičnosti, zahtijeva se sterilnost i apirogenost disperznog sredstva, što se najčešće postiže upotrebom gama zračenja. Veličina i površinski naboj nanočestica uvelike utječu na farmakokinetičke parametre (apsorpciju, raspodjelu, metabolizam i eliminaciju) nanosuspenzija, a bitna su i za predviđanje kako će se razvijeni sustav ponašati u živom organizmu (Wang i sur., 2016; Lovrić i sur., 2015).

Suvremena istraživanja dijelom su usmjerena na razvoj *in situ* gelirajućih nanosuspenzija kao inovativnog farmaceutskog oblika slabo topljivih lijekova. *In situ* gelirajući sustavi temeljeni su na polimernim otopinama te omogućuju laku primjenu i produljeno zadržavanje lijeka na sluznici. Naime, takvi sustavi u fiziološkom okruženju prelaze iz sol u gel stanje fizičkim ili kemijskim procesom. Kemijski se način, poput fotopolimerizacije, izbjegava zbog potencijalne toksičnosti prema organskom sustavu. Najčešći su mehanizmi geliranja koji uključuju stvaranje trodimenzionalne polimerne mreže u prisustvu iona, pri tjelesnoj temperaturi ili promjenom pH na mjestu primjene. U izradi *in situ* gelirajućih sustava najčešće se koriste poloksamer, kitozan, gelan guma, karbopol i niskometoksilirani pektin. Pektin se ističe po izrazitoj mukoadhezivnosti jer stvara sekundarne kemijske veze s mucinima u mukozni (Wang X. i sur., 2013).

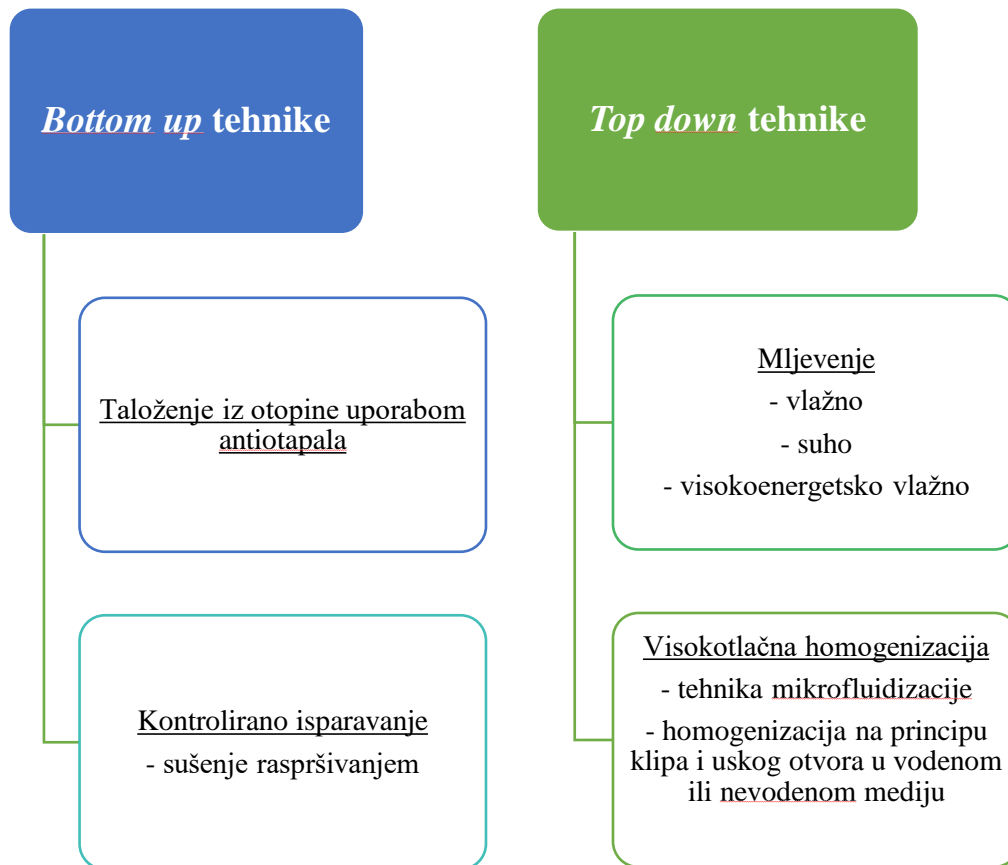
### **1.1.1. Metode pripreme nanokristala djelatne tvari**

Moderna nanotehnologija omogućila je usitnjavanje čestica tvari teško topljivih u vodi do veličine manje od 1000 nm koje se tada nazivaju nanokristalima. Nanokristali lijeka se pripremaju metodama povećanja veličine čestica (engl. *bottom up*) i metodama smanjenja veličine čestica (engl. *top down*) koje su prikazane na Slici 1.

Najpoznatija *bottom up* metoda uključuje otapanje lipofilnog lijeka u organskom otapalu i brzo dodavanje polarnog otapala (antiotapala) u kojem se lijek ne otapa, a koje se miješa s organskim otapalom. Rotacijom, mlaznim miješanjem (engl. *liquid jets*) ili višekanalnim vrtložnim miješanjem (engl. *multi-inlet vortex mixing*) potiče se nukleacija čestica. Na nju utječu brojni faktori poput koncentracije lijeka u otapalu, volumnog udjela antiotapala prema otopini djelatne tvari, temperature te dodatka stabilizatora.

Taloženje čestica se može postići i ultrazvučnim valovima, superkritičnim fluidom te uklanjanjem otapala. Vidljivo je da je kontrola uvjeta taloženja kompleksan proces, a nedostatak je i ostatno organsko otapalo u finalnom proizvodu (Lovrić i sur., 2015).

Kontrolirano isparavanje otapala druga je *bottom up* metoda, od koje je najpoznatije sušenje raspršivanjem gdje se brzim isparavanjem otapala iz raspršenih kapljica otopine lijeka pripremaju nanokristali (Leone i Cavalli, 2015).



**Slika 1.** Metode pripreme nanokristala (alternativa prikazu iz Leone i Cavalli, 2015)

*Top down* tehnike obuhvaćaju usitnjavanje većih čestica visokotlačnom homogenizacijom ili mljevenjem. Mljevenje može biti suho (engl. *dry milling*) ili vlažno (engl. *wet milling*), a posljednje se najčešće koristi kako bi se dobile finije čestice. Mikronizirane čestice lijeka u disperzijskom sredstvu uz stabilizator bivaju podvrgnute smičnom naprezanju kojeg uzrokuju kuglice različitog promjera s mješačem na magnetskoj miješalici. Sam proces ovisi o koncentraciji stabilizatora, vremenu mljevenja, utrošku energije i čvrstoći čestica koje su podvrgnute mljevenju (Lovrić i sur., 2015). Pri suhom mljevenju teško se dobivaju submikronske čestice (Leone i Cavalli, 2015), a u industriji se najčešće primjenjuje visokoenergetsko vlažno mljevenje (engl. *high energy wet ball milling*) u kojem su čestice lijeka

izložene visokom tlaku i silama smicanja kroz kraće vrijeme. Pri takvom postupku je, zbog velike količine kuglica za mljevenje, samo 30 % prostora mlina dostupno za uzorak (Lovrić i sur., 2015). Pri mljevenju postoji opasnost od kontaminacije teškim metalima ili staklom, ovisno od kojeg materijala su izrađene kuglice za mljevenje (Goel i sur., 2019).

S druge strane, visokotlačna homogenizacija obuhvaća tehniku mikrofluidizacije i homogenizaciju na principu klipa i uskog otvora u vodenom ili nevodenom mediju (engl. *piston gap homogenization*). Mikrofluidizacija podrazumijeva protiskivanje čestica pri visokom tlaku koji uzorkuje koliziju istih. Proces je potrebno više puta ponavljati zbog niske efikasnosti jer se ulaže premalo energije. Homogenizacija na principu klipa i uskog otvora je tehnika u kojoj je priprema uzorka jednaka onoj za mljevenje, tj. čestice lijeka se dispergiraju u vodi s do 20 % udjela disperzne faze te na takav sustav djeluje tlak koji stupnjevito raste, a čestice se usitnjavaju zbog raspada mjehura zraka koji nastaju uslijed vrenja vode te smičnog naprezanja. Ukoliko se ne koriste vodene suspenzije, potrebne su manje vrijednosti temperature i tlaka što je našlo primjenu u radu s termolabilnim tvarima, a čestice se usitnjavaju zbog sila naprezanja i kolizije čestica. U ovim je tehnikama važno uzeti u obzir čvrstoću tvari koja se usitnjava kako bi se primijenio prikladan tlak (Lovrić i sur., 2015). Najčešće se pri izradi nanokristala kombinira više metoda odjednom, što se naziva nanotehnologijom druge generacije, a cilj je prevladati nedostatke pojedine metode (Leone i Cavalli, 2015).

### 1.1.2. Prednosti i nedostaci nanokristala djelatne tvari

Usitnjavanjem čestica krutine dobiva se veći broj jednakih čestica koje imaju manji promjer s ukupno gledano većom površinom krutine dostupnom otapalu za otapanje. Primjerice, ako se usitnjava jedna čestica čiji promjer iznosi 100  $\mu\text{m}$  na nanočestice kojima je promjer 200 nm, tada se iz jedne dobiva 125 000 000 nanočestica i površina se kumulativno poveća 5 000 puta, a promjer se smanji 500 puta. Nanočestice osiguravaju veću brzinu otapanja lijeka u odnosu na neusitnjene čestice uslijed veće topljivosti i veće površine čestica u kontaktu s otapalom, što je razvidno iz Noyes-Whitneyjeve jednadžbe (Jacob i sur., 2020; Lovrić i sur., 2015):

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

gdje je  $\frac{dc_x}{dt}$  brzina otapanja krutine,  $k$  konstanta brzine otapanja (uključuje viskoznost koja je obrnuto proporcionalna brzini otapanja),  $A$  specifična površina čestica krutine,  $c_s$  topljivost krutine, a  $c_x$  koncentracija djelatne tvari u vremenu  $t$  u kojem se prati otapanje (Lovrić i sur., 2015).



Usto, tijekom pripreme nanosuspenzija moguće je narušiti kristalnu strukturu lijeka i proizvesti više amorfnih oblika što još više povećava topljivost i brzinu otapanja lijeka. Ovisno o putu primjene, nanosuspenzije mogu osigurati kontrolirano (produljeno) oslobađanje lijeka, ciljani učinak, manju toksičnost i smanjenu učestalost doziranja što povećava adherenciju bolesnika (Goel S. i sur., 2019). Nanočestice zbog svoje veličine mogu permeirati kroz biološke barijere čime se otvara širok spektar primjene uključujući oralnu, intravensku, pulmonalnu, nazalnu, topikalnu i okularnu primjenu (Leone i Cavalli, 2015).

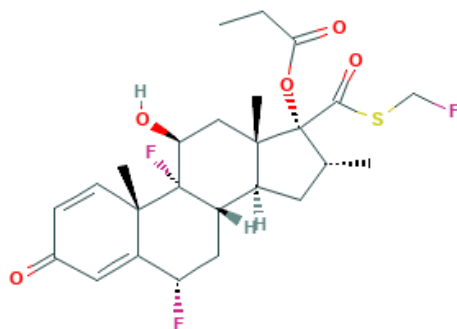
Sve važnije prednosti nanosuspenzija navedene su na Slici 2. Usitnjavanje do nanometarskih veličina reducira dozu lijeka u pripravku te smanjuje troškove proizvodnje (Jacob i sur., 2020). Međutim, javlja se moguća fizička nestabilnost nanosuspenzija u vidu sedimentacije, flokulacije ili aglomeracije čestica pri skladištenju te Ostwaldovo zrenje, tj. rast kristala (Goel i sur., 2019). Vezano uz sigurnost primjene nanosuspenzija, kao stabilizatori se mogu koristiti samo neki od polimera kao što su primjerice polisorbit 80, poloksamer 181, lecitin, natrijev glikolat i niskomolekulski polivinil piroolidon (Leone i Cavalli, 2015). Iako je polisorbit 80 naveden ovdje kao sigurna površinski aktivna tvar za stabilizaciju nanosuspenzija, zabilježene su neželjene reakcije preosjetljivosti te reakcije nefrotoksičnosti i neurotoksičnosti (Wang Y. i sur., 2013). Moguće je i mehaničko trošenje nanosustava koje se može izbjeći opreznim rukovanjem tijekom transporta. Isto tako, primijećena je promjena kristalnog stanja nanočestica što utječe na topljivost, stabilnost i učinkovitost djelatne tvari (Goel S. i sur., 2019). Ukoliko se čestice djelatne tvari nalaze u kristalnom obliku, nanosuspenzija je stabilnija, a ako su u amorfnom obliku, povećana im je topljivost, ali i mogućnost rasta kristala (Wang Y. i sur., 2013). Ukoliko je veličina nanočestica u suspenziji vrlo mala, moguća je njihova endocitoza, što se smatra prednošću za postizanje boljeg terapijskog odgovora, ali isto tako ne smije se isključiti moguća nanotoksičnost iz istog razloga, koja mora biti svedena na minimum (Wang i sur., 2016). Nestabilnost nanosuspenzija uslijed sedimentacije, aglomeracije i rasta kristala može se spriječiti njihovim prevođenjem u suhi oblik nanokristala sušenjem raspršivanjem ili sušenjem smravanjem (liofilizacijom). Liofilizacija je skuplji proces i zahtijeva primjenu niskih temperatura i krioprotektanata za sprječavanje agregacije čestica te se zbog toga češće koristi sušenje raspršivanjem gdje se uz visoku temperaturu uklanja otapalo (Chavhan i sur., 2011).



**Slika 2.** Prednosti uporabe nanosuspenzija u odnosu na konvencionalne suspenzije (alternativa prikazu iz Leone i Cavalli, 2015)

### 1.1.3. Flutikazonpropionat – djelatna tvar izbora za nanonizaciju

Flutikazonpropionat je glukokortikoid s protuupalnim, antialergijskim i antipruritičkim svojstvima. Djelujući inhibitorno na fosfolipazu A2, smanjuje produkciju prostaglandina i leukotriena, proupalnih medijatora u organizmu (Valečić, 2017). Samo ime sugerira kako je lijek ester flutikazona i propanske kiseline što je vidljivo na Slici 3. ([www.pubchem.com](http://www.pubchem.com)). Koristi se lokalno u terapiji respiratornih bolesti kao što su alergijski rinitis, nosni polipi i astma, a zbog niske sistemske raspoloživosti nakon lokalne primjene, sistemske su nuspojave minimalizirane. Javljaju se samo lokalne nuspojave poput suhoće nosne šupljine i grla te krvarenja iz nosa ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Velika prednost mu je i što aktivni metaboliti u organizmu nisu pronađeni (Harding, 1990).



**Slika 3.** Flutikazonpropionat (preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444036>)

Flutikazonpropionat je djelatna tvar netopljiva u vodi. Svi pripravci s flutikazonpropionatom odobreni u Republici Hrvatskoj formulirani su kao suspenzija u obliku spreja za nos, osim lijeka Flixonase koji je dostupan u obliku kapi za nos (Tablica 1.).

Nazalna primjena nanosuspenzija flutikazonpropionata do sada nije istraživana, međutim pulmonalna jest i uspoređujući rezultate s klasičnim suspenzijama, dokazano je da se usitnjavanjem čestica postiže dulje zadržavanje lijeka na mjestu primjene i time veći stupanj apsorpcije, što za posljedicu ima dulje djelovanje, a smanjeno uklanjanje mukocilijarnim čišćenjem. Lijek bi se mogao još dulje zadržati u plućima uklapanjem u fosfolipidne sustave, no tada se postavlja pitanje dostupnosti lijeka obzirom na teže oslobađanje (Tao-Tao i sur., 2019).

**Tablica 1.** Pripravci za nazalnu primjenu flutikazonpropionata odobreni u Republici Hrvatskoj ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr))

| Tržišno ime lijeka | Djelatne tvari                             | Doza flutikazonpropionata                 |
|--------------------|--|---|
| Dymista            | flutikazonpropionat, azelastin hidroklorid | 50 µg po potisku                          |
| Flixonase          | flutikazonpropionat                        | 50 µg po potisku, 400 µg po dozi u kapima |
| Rinoco             | flutikazonpropionat                        | 50 µg po potisku                          |
| Synaze             | flutikazonpropionat, azelastin hidroklorid | 50 µg po potisku                          |

## **1.2. Putovi primjene nanosuspenzija**

### **1.2.1. Oralna primjena**

Oralna primjena lijekova smatra se najsigurnijom, i najbolje je prihvaćena od strane bolesnika (Wang i sur., 2016). Suspenzija kao oralni farmaceutski oblik preferira se u pedijatriji i gerijatriji zbog jednostavnijeg gutanja u odnosu na čvrste oblike (tablete, kapsule), a pruža mogućnost maskiranja gorkog okusa djelatne tvari, osiguranja produljenog djelovanja i povećanja topljivosti, kao i bioraspoloživosti lijeka (Jacob i sur., 2020). Sam oblik prikladan je za lijekove koji su slabo topljivi u vodi te ako su druga otapala nedozvoljena. Nanonizacijom suspendiranih čestica povećavaju se topljivost i brzina otapanja, a posljedično i brzina i opseg apsorpcije lijeka (Jacob i sur., 2020). Istraživanjima je utvrđeno da apsorpcija lijeka nakon oralne primjene farmaceutskog oblika s nanokristalima lijeka može biti neovisna o tome uzima li se lijek u stanju gladi ili uz obrok, što povećava adherenciju bolesnika te smanjuje varijabilnost u bioraspoloživosti lijeka. Na primjeru naproksena dokazana je i smanjena iritacija probavnog sustava oblicima nanokristala lijeka u odnosu na suspenziju mikroniziranog lijeka (Leone i Cavalli, 2015).

U slučaju oralne primjene kortikosteroida, česte su sistemske nuspojave poput supresije lučenja hormona adrenalne žlijezde, povećane učestalosti infekcija, hipertenzije, hipokalcemije, gastrointestinalnog krvarenja, razvoja osteoporoze te Cushingovog sindroma kao i poremećaja spavanja, anksioznosti, te hiperaktivnosti. U djece su najčešće prisutne psihološke nuspojave uz moguće zaostajanje u rastu ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

### **1.2.2. Parenteralna primjena**

Lijekovi se parenteralno najčešće primjenjuju u obliku vodenih otopina, no mikroemulzije ili suspenzije se mogu primjenjivati intramuskularno, supkutano i transdermalno ukoliko je veličina čestica disperzne faze manja od 5  $\mu\text{m}$ , čime se izbjegava rizik od opstrukcije kapilarne cirkulacije (Jacob i sur., 2020). Primijećeno je da nanosuspenzije nakon parenteralne primjene bivaju opsonizirane ukoliko su nanočestice veće od 300 nm (Wang i sur., 2016) i fagocitirane od Kupfferovih stanica u jetri. Na taj način navedene stanice osiguravaju zalihu lijeka, a isto tako i produljuju njegov učinak. Takvo saznanje primjenjivo je u liječenju oboljenja uzrokovanih patogenima koji prvotno napadaju makrofage i razmnožavaju se unutar njih (Jacob i sur., 2020).

Intravenskom primjenom nanokristala docetaksela uklopljenih u lecitin iz soje uočeno je povećano nakupljanje lijeka na mjestu nastanka tumora, što otvara dodatne mogućnosti u razvoju liječenja karcinoma (Leone i sur., 2015). No, prilikom parenteralne primjene nanosuspenzija mijenjaju se pH i ionska jakost mikrookoline suspendiranih čestica što utječe na promjenu zeta potencijala i može rezultirati njihovom agregacijom, a to je nepoželjan proces (Wang Y. i sur., 2013). U istraživanjima toksičnosti i bioraspodjele u organizmu nakon intravenske primjene određen je volumen nanosuspenzije koji može biti primijenjen bez negativnih posljedica kod životinja, a iznosi 2 ml/kg za bolus te 4 ml/kg za infuziju (Wang i sur., 2016).

### **1.2.3. Pulmonalna primjena**

Pulmonalna primjena nanosuspenzija istražuje se u liječenju respiratornih bolesti pružajući mogućnost ciljanog lokalnog djelovanja na pluća i povećanog stupnja izlječenja astme i kronične opstruktivne plućne bolesti (Yang i sur., 2008). Tim se putom primjene izbjegava prvi prolazak lijeka kroz jetru i sistemsko djelovanje koje nije nužno kod ovih bolesti (Leone i Cavalli, 2015). Da bi lijek dospio do nižih dijelova pluća, veličina čestica lijeka treba biti manja od 0,5  $\mu\text{m}$ , što nanosuspenzije čini prikladnim farmaceutskim oblikom lijeka za navedeni put primjene (Yang i sur., 2008). Odlaganjem lijeka u donje dijelove pluća, smanjena je pojava brzog klirensa i mukocilijarnog čišćenja iz gornjeg dijela respiratornog sustava. Isto tako, oblaganjem nanokristala lijeka različitim polimerima povećava im se afinitet za mukozne površine te se osigurava kontrolirano oslobađanje lijeka iz formulacije (Leone i Cavalli, 2015). Ono se zbiva i ukoliko su čestice lijeka veće od 3  $\mu\text{m}$  jer bivaju uspješno fagocitirane i tako se dulje zadržavaju u plućima (Rabinow, 2004). Nanočestice, međutim, mogu osigurati i ubrzani sistemski učinak zbog velike površine pluća koja su dobro prokrvljena i osiguravaju povećanu apsorpciju te difuziju kroz alveole do sistemskog krvotoka (Leone i Cavalli, 2015).

Pulmonalna primjena zahtijeva raspršenje nanosuspenzija nebulizatorima ili inhalerima s odmjerenom dozom. Veličina raspršenih kapljica/čestica i parametri disanja utječu na uspješnost provođenja terapije (Wang i sur., 2016). Raspršivanje nanosuspenzija rezultiralo je kapljicama/česticama boljih aerodinamičkih svojstava u odnosu na konvencionalne suspenzije, što je skratilo vrijeme provođenja terapije i rezultiralo boljom suradljivošću pacijenata (Tao-Tao i sur., 2019).

Protuupalno djelovanje flutikazona ispitivano je *in vivo* u laboratorijskih štakora i miševa induciranjem akutne upale pluća pomoću lipopolisaharida te je uspješnost intratrahealne terapije flutikazonom ovisila o tome koja se količina lijeka vezala za glukokortikoidne receptore i koliko dugo je lijek ostao za njih vezan (Tao-Tao i sur., 2019).

#### **1.2.4. Topikalna primjena**

Nanosuspenzije u oftalmičkoj primjeni osiguravaju povećanu topljivost lijeka u suznoj tekućini i dulje zadržavanje na mjestu primjene uz minimalnu iritabilnost. Isto tako, izbjegava se problem povećane osmolalnosti koji se javlja tijekom pripreme vodenih otopina lijeka (Jacob i sur., 2020).

Novija istraživanja pokazuju učinkovitost nanosuspenzija progesterona koje su bile primijenjene vaginalno s ciljem sprječavanja prijevremenog rođenja djeteta. Razvijene su i nanosuspenzije tretinoina za dermalnu i transdermalnu primjenu (Yang i sur., 2008). Nanosuspenzije su poboljšale penetraciju slabo topljivih lijekova u vodi kroz kožu, poput nanokristala rutina, resveratrola i hesperidina. Istraživan je i utjecaj nanokristala kofeina na rast kose te je primijećeno njegovo nakupljanje u dlačnim folikulima (Leone i Cavalli, 2015). Velik potencijal nanosuspenzija primijećen je i u ostalim putovima primjene, kao što su rektalna i sublingvalna (Wang i sur., 2016).

#### **1.2.5. Nazalna primjena**

Kad se govori o nazalnoj primjeni lijekova, potrebno je poznavati anatomiju i fiziologiju nosne šupljine. Nosna šupljina sastoji se od tri zone: vestibularne, olfaktorne i respiratorne. Vestibularna zona prva je barijera česticama iz zraka. Obložena je slabo vaskulariziranim epitelom koji se sastoji od skvamoznih i keratiniziranih epitelnih stanica te dlačica. Olfaktorni epitel jače je prokrvljen i ima ulogu u prepoznavanju mirisa, a respiratorni epitel najveći je zato što oblaže regiju pregrađenu s tri nosne školjke te je građen od cilindričnih epitelnih stanica prekrivenih mikrovilima. Dobro je prokrvljen i stvara sluz te pročišćava zrak koji ondje dolazi. Na respiratornu regiju nastavlja se nazofarinks (Bitter i sur., 2011). Primjenom lijeka u nosnu šupljinu moguće je osigurati lokalni učinak lijeka, sistemsku raspoloživost te izravnu dostavu lijeka iz nosne šupljine u mozak. Nazalnom primjenom postiže se lokalni učinak dekongestiva, antialergijskih lijekova i kortikosteroida. Lokalna nazalna terapija podrazumijeva primjenu malih doza lijeka, što je važna prednost pri primjeni kortikosteroida i antialergijskih lijekova jer se tako izbjegavaju sistemske nuspojave, a terapija je učinkovita (Bitter i sur., 2011).

Prirodni faktor koji umanjuje zadržavanje lijeka na sluznici nosa jest mukocilijarno čišćenje koje ima za cilj izmjenom nosne sluzi spriječiti prolazak čestica iz udahnutog zraka do donjih dijelova dišnog sustava (Marttin i sur., 1998). Da bi se smanjio utjecaj mukocilijarnog čišćenja na vrijeme zadržavanja lijeka na nosnoj sluznici, razvijaju se *in situ* gelirajući tekući oblici koji se primjenjuju raspršivanjem, a u doticaju s nosnom sluznicom stvaraju gel koji se dulje zadržava na mjestu primjene u odnosu na konvencionalne tekuće oblike. Kortikosteroidi se koriste nazalno za liječenje alergijskog i nealergijskog rinitisa, nosnih polipa i kroničnog rinosinuitisa na način da djeluju na uzrok same bolesti. Usto što liječe simptome, smanjuju nosne polipe i sprječavaju povratak bolesti. Također, istražuju se i oblici produljenog oslobađanja djelatne tvari, odnosno oblici produljenog djelovanja (Nižić i sur., 2019).

Sistemska primjena lijeka putem nosne sluznice omogućuje izbjegavanje prvog prolaska kroz jetru (kojim se smanjuje udio lijeka kojeg tijelo može iskoristiti) te može osigurati brz početak djelovanja lijeka (Bitter i sur., 2011). Upotrebom mukoadhezivnih pomoćnih tvari nastoji se smanjiti brzina mukocilijarnog čišćenja koje umanjuje apsorpciju lijeka. Primjerice, natrijev hijaluronat produljuje vrijeme kontakta formulacije sa sluznicom, biokompatibilan je i nije imunogen za ljudski organizam. Ipak, mukocilijarni klirens ne može biti do kraja spriječen što treba uzeti u obzir pri određivanju nazalne doze lijeka (Alshweiat i sur., 2020). Preko nosne sluznice lakše će se apsorbirati hidrofobnije molekule, a hidrofilne bi trebale biti nenabijene uzimajući u obzir njihovu pK vrijednost, obzirom da pH na nosnoj sluznici iznosi od 5,5 do 6,5. Primijećeno je da molekule manje od 1 kDa transcelularno prolaze membranu i bivaju lakše apsorbirane, a potrebno je podesiti i osmolalnost formulacije fiziološkim uvjetima (Bitter i sur., 2011).

Moderna tehnologija omogućila je razvoj terapijskih sustava za izravnu dostavu nazalno primijenjenog lijeka u mozak putem olfaktornog i trigeminalnog živca koji inerviraju olfaktornu i/ili respiratornu regiju nosne šupljine (Bitter i sur., 2011). Razvijaju se i razna nazalna cjepiva što je mudar izbor s obzirom da je nazalna sluznica prva linija obrane od vanjskih patogena (Bitter i sur., 2011).

U Tablici 2. navedeni su lijekovi iz različitih terapijskih skupina, s potencijalom nazalne primjene u obliku nanosuspenzije.

**Tablica 2.** Značajke razvijenih nanosuspenzija za nazalnu primjenu

| Djelatna tvar | Stabilizator                                    | Nanosuspenzija/ <i>in situ</i> gel | <i>in vitro/in vivo</i>            | Zapažanja  | Ref.                  |
|---------------|---|------------------------------------|------------------------------------|--|-----------------------|
| donepezil     | kitozan   | nanosuspenzija                     | <i>in vitro,</i><br><i>in vivo</i> | veći AUC, $c_{max}$ , $t_{max}$ i tri puta veća koncentracija donepezila u mozgu u odnosu na konvencionalnu nazalnu suspenziju lijeka  | Bhavna i sur., 2014   |
| karvedilol    | polisorbat 80, poloksameri, Span 40, gelan guma | nanosuspenzija, <i>in situ</i> gel | <i>in vitro,</i><br><i>in vivo</i> | porastom udjela gelan gume smanjuje se brzina oslobađanja lijeka i postiže veća bioraspoloživost i $c_{max}$ u odnosu na oralnu primjenu lijeka  | Saindane i sur., 2012 |
| resveratrol   | deacetilirana gelan guma                        | nanosuspenzija, <i>in situ</i> gel | <i>in vitro,</i><br><i>in vivo</i> | brže oslobađanje i dvostruko veća bioraspoloživost u odnosu na konvencionalnu suspenziju lijeka; veća koncentracija resveratrola u mozgu nakon nazalne nego nakon intravenske primjene | Hao i sur., 2016      |
| zotepin       | pluronic F-127, HPMC, lecitin iz soje           | nanosuspenzija                     | <i>in vitro,</i><br><i>in vivo</i> | veća bioraspoloživost u odnosu na primjenu klasičnog oblika; veća koncentracija i $t_{1/2}$ u mozgu nakon nazalne primjene nanosuspenzija nego nakon intravenske                       | Pailla i sur., 2019   |



|           |                                      |                |                |   |                        |
|-----------|--------------------------------------|----------------|----------------|---|------------------------|
|           |                                      |                |                | primjene klasičnog oblika   |                        |
| loratadin | natrijev hijaluronat, poloksamer 188 | nanosuspenzija | <i>in vivo</i> | veća bioraspoloživost i plazmatska koncentracija u odnosu na klasični oralni oblik; lijek prisutan u plazmi i nakon 25 sati | Alshweiat i sur., 2020 |

AUC je površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije lijeka u plazmi o vremenu,  $c_{max}$  označava vršnu koncentraciju lijeka u plazmi, a  $t_{max}$  vrijeme koje je potrebno da se postigne  $c_{max}$ , HPMC je hidroksipropilmetilceluloza.

### 1.3. Karakterizacija nanosuspenzija

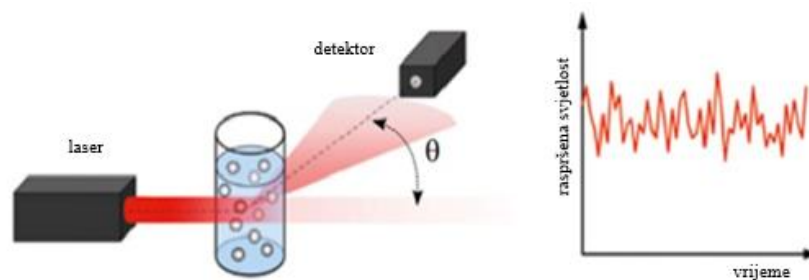
Proces razvoja nanosuspenzije započinje temeljnom fizičko-kemijskom karakterizacijom koja daje uvid u osnovna svojstva, stabilnost i primjenjivost formulacije. Među tim svojstvima važno mjesto zauzima veličina čestica o kojoj ovise topljivost i brzina otapanja lijeka koji dalje utječu na farmakokinetičke parametre. Stabilnost se procjenjuje na temelju veličine, polidisperznosti i zeta potencijala nanočestica lijeka, a promatra se i površinska napetost te reološka svojstva koja utječu na mogućnost formiranja kapljica prilikom raspršivanja farmaceutskog oblika. Fiziološko okruženje u koje se lijek primjenjuje određuje pH i osmolalnost koje formulacija treba zadovoljiti.

#### 1.3.1. Veličina čestica

Veličina čestica važno je svojstvo koje određuje brzinu otapanja čestica, topljivost, fizičku stabilnost i biološke karakteristike. Ovo se svojstvo najčešće karakterizira dinamičkim raspršivanjem svjetlosti, iako se koriste i druge tehnike od kojih svaka ima svoje prednosti i nedostatke (Chavhan i sur., 2011). DLS (engl. *dynamic light scattering*) ili dinamičko raspršivanje svjetlosti je tehnika pri kojoj se dispergirane čestice obasjavaju monokromatskom svjetlošću, koja se, zbog različite veličine i oblika čestica, raspršuje u različitim smjerovima (Slika 4.) (Goel i sur., 2019).

Glavno ograničenje ove tehnike je nemogućnost mjerenja istaloženih čestica pa tada rezultat nije relevantan, a analizator veličine čestica treba biti visoke osjetljivosti jer mjeri veličinu čestica u nanometrima i to pri vrlo niskim koncentracijama. Kako nanosuspenzija sadrži više različitih nanočestica, konačni rezultat obrade podataka je odraz najvećih ili najprisutnijih čestica u uzorku (Goel i sur., 2019).

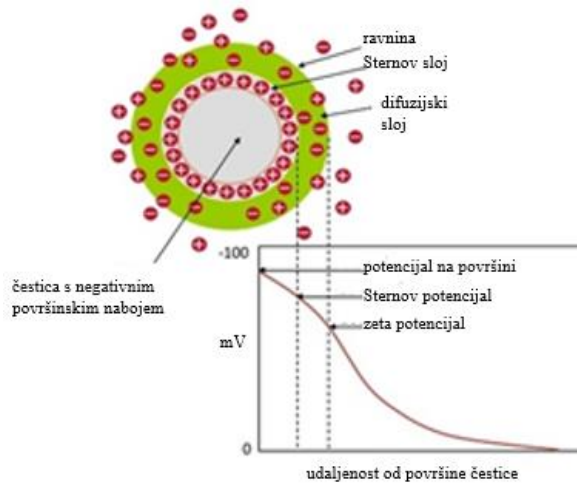
Osim veličine čestica, parametar koji se mjeri, a odražava fizičku stabilnost nanosustava je indeks polidisperznosti te što je on manji (0,1-0,25), raspon veličina čestica u uzorku je uži, a sustav je stabilniji. Ako je indeks polidisperznosti veći od 0,5, to znači da se u uzorku nalazi široki spektar čestica različitih veličina (Chavhan i sur., 2011).



**Slika 4.** Princip dinamičkog raspršenja svjetlosti (preuzeto s <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/##data-imagegroup-39782>)

### 1.3.2. Zeta potencijal

Zeta potencijal mjeri se kako bi se okarakterizirala priroda i intenzitet površinskog naboja raspršenih nanočestica u nanosuspenziji, a definira se kao razlika potencijala između površine čvrstih čestica i otapala u sustavu (Slika 5.). Zeta potencijal definira prirodu same tvari te govori o mogućim interakcijama s drugim tvarima u organizmu i stabilnosti tijekom skladištenja (Goel i sur., 2019). Da bi se nanosuspenzija smatrala fizički stabilnom, potrebna je vrijednost zeta potencijala od minimalno  $\pm 30$  mV (Wang i sur., 2016). Vrijednost zeta potencijala ovisi o samom lijeku i površinski aktivnoj tvari. U slučaju da je nanosuspenzija stabilizirana elektrostatski i sterički, za dostatnu stabilizaciju trebala bi biti dovoljna vrijednost zeta potencijala od  $\pm 20$  mV (Chavhan i sur., 2011). Što je apsolutna vrijednost zeta potencijala veća, to je sustav fizički stabilniji pri istim uvjetima (Ali i sur., 2009).



**Slika 5.** Zeta potencijal čestica (alternativa prikazu <https://analytik.co.uk/zeta-potential-what-is-it-and-how-can-it-be-characterised/>)

### 1.3.3. Reološka svojstva

Reologija je znanost o tečenju, odnosno o deformaciji materijala (Picout i Ross-Murphy, 2003). Tvari se s obzirom na deformaciju dijela na Newtonove viskozne tekućine i Hookeove elastične krutine. Viskoznost ( $\eta$ ) je definirana kao koeficijent proporcionalnosti između smičnog napreznja ( $\tau$ , Pa) i brzine smicanja ( $\dot{\gamma}$ ,  $s^{-1}$ ) pri konstantnoj temperaturi ( $\tau = \eta * \dot{\gamma}$ ), a za Newtonove sustave je neovisna o brzini smicanja te je konstantna obzirom na vrijeme smicanja. Ukoliko se viskoznost povećava ili smanjuje uslijed smicanja riječ je o ne-Newtonovim sustavima. Potonji sustav naziva se pseudoplastični, a ukoliko viskoznost raste povećanjem brzine smicanja, riječ je o dilatantnom sustavu. Promatrajući viskoznost u ovisnosti o vremenu, uslijed konstantne brzine smicanja viskoznost može padati i rasti. Ako u mirovanju ponovno raste nakon što se smicanje prekine sustav nazivamo tiksotropnim, a ako pada reopektnim. Hookeov zakon elastičnosti govori da je modul smicanja ( $G$ ) koeficijent proporcionalnosti između smičnog napreznja ( $\tau$ , Pa) i smične deformacije ( $\gamma$ ) ( $\tau = G * \gamma$ ). Modul smicanja sastoji se od modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) gdje prvi govori o pohranjenoj energiji tijekom deformacije i elastična je komponenta sustava, a modul gubitka definira se kao izgubljena energija tijekom deformacije i viskozna je komponenta sustava. Ovisno koji modul prevladava, takvim se sustavom raspolaže. Viskoelastična svojstva sustava ispituju se oscilacijskim testovima promjene amplitude (engl. *Amplitude sweep*) i frekvencije (engl. *Frequency sweep*). Rotacijskim se testovima ispituju svojstva sustava pri konstantnom okretnom momentu ili konstantnoj brzini rotacije (Willenbacher i Georgieva, 2013).

U reološkim testovima koristi se paralelno mjerno tijelo čija se udaljenost od donje mjerne ploče na kojoj se nalazi uzorak može mijenjati, te stožasto mjerno tijelo na fiksnoj udaljenosti od donje mjerne ploče gdje stožac djeluje na ispitivani sustav pod manjim nagibom (Willenbacher i Georgieva, 2013).

Provođenjem reoloških testova moguće je procijeniti ponašanje nanosuspenzija pri raspršivanju te stabilnost nanosuspenzija. Sustavi s potpuno dispergiranim nanočesticama imaju manju viskoznost od sustava u kojem su nanočestice podlegle agregaciji (Li i sur., 2018). Postupci reološke karakterizacije primjenjivi su i pri *in vitro* ispitivanjima mukoadhezivnosti nanosuspenzija, s obzirom na mogućnost stvaranja kemijskih i fizičkih sila između formulacije lijeka i mucina kojima se mijenjaju reološka svojstva sustava (Alsweiat i sur., 2020).

#### **1.3.4. Napetost površine**

Napetost površine je rad tekućine uložen da se molekula iz unutrašnjosti dovede na površinu podijeljen s povećanjem površine tekućine (Herak, 2001). Ovo je svojstvo osobito važno za tekućine niske viskoznosti, dakle, u sustavima koji sadrže vodu. Uočeno je da je površinska napetost vode u trenutku novoformirane površine veća u odnosu na onu mjerenu nakon postizanja ravnoteže. Površinska napetost varira ovisno o koncentraciji soli i pH u sustavu. Što je pH niži, prije će se neutralizirati hidroksilni ioni i na površini će ostati oksonijevi koji pridonose povećanju površinske napetosti (Hauner i sur., 2017). Ona ovisi i o koncentraciji pojedinih polimera zbog kohezivnih sila, a što su one veće, povećava se i kut raspršenja, što smanjuje razmazivost formulacije (Jullaphant i sur., 2018).

Svaka tekuća formulacija lijeka ima manju površinsku napetost od vode koja iznosi oko 70 mN/m i obično se za nazalne sprejeve vrijednosti kreću od 30 do 44 N/m (Shrestha i sur., 2020).

#### **1.3.5. Osmolalnost**

Osmolalnost se definira kao broj molova otopljene tvari po kilogramu otapala, a važno ju je podesiti kako se ne bi narušila homeostaza sluznice nosa. Vrijednosti koje se uzimaju kao referentne za osmolalnost nazalnih pripravaka kreću se od 290 do 500 mOsm/kg. Hipotonične otopine se ne bi smjele primjenjivati zbog ciliotoksičnosti, a hipertonične samo kod hitnih stanja, npr. kod edema sluznice, dok se izotonične otopine mogu koristiti u kroničnoj uporabi (Bitter i sur., 2011).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nazalna primjena postaje sve učestaliji put primjene raznih skupina lijekova. Osim što osigurava lokalni učinak lijeka u liječenju bolesti nosne sluznice, nazalna primjena pruža i mogućnost sistemske dostave lijeka te izravne dostave lijeka iz nosne šupljine u mozak. Pacijentima je nazalna primjena lijeka prihvatljiva jer je neinvazivna i jednostavna čime se u budućnosti mogu poboljšati suradljivost i samoliječenje bolesnika, koji se navode kao problematični parametri liječenja (Wang i sur., 2013).

Ograničavajući faktor nazalne primjene lijeka je mukocilijarno čišćenje koje skraćuje vrijeme kontakta lijeka sa sluznicom nosa, zbog čega se klasične otopine brzo eliminiraju iz nosa. Viskozni se sustavi pak teže primjenjuju i doziraju. Iz toga proizlaze prednosti *in situ* gelirajućih otopina/suspenzija koje se kao tekući oblici lako primjenjuju raspršivanjem, a u dodiru sa sluznicom prelaze u gel koji se ondje dulje zadržava (Nižić i sur., 2019). U slučaju suspenzija, usitnjavanjem čestica lijeka do nanometarskih veličina povećava se topljivost i brzina otapanja lijeka, čime se povećava raspoloživost lijeka na mjestu djelovanja (Rabinow, 2004).

Cilj ovog rada bio je pripremiti *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata, kortikosteroida s lokalnim učinkom, korištenjem polisorbata 80 kao površinski aktivne tvari, manitola kao sredstva za izotonizaciju te polimernih otopina natrijevog hijaluronata i *in situ* gelirajućeg pektina (Nižić i sur., 2019). Ispitivan je utjecaj omjera lijeka i surfaktanta u *in situ* gelirajućim nanosuspenzijama flutikazonpropionata na uspješnost mljevenja (veličinu nanočestica), zeta potencijal nanočestica, površinsku napetost *in situ* gelirajućeg sustava, viskoznost pri mirovanju, vrijeme geliranja i svojstva gela formiranog pri miješanju s umjetnim nosnim fluidom.

Specifični ciljevi:

- Pripremiti *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata s polisorbitom 80 u različitim omjerima (9 uzoraka) u otopini polimera pektina (0,9 %, *m/m*) i natrijevog hijaluronata (0,02 %, *m/m*) uz manitol kao sredstvo za izotonizaciju (4 %, *m/m*)
- Ispitati uspješnost vlažnog mljevenja mjerenjem veličine čestica i fizičku stabilnost mjerenjem zeta potencijala
- Razjasniti utjecaj koncentracije flutikazonpropionata i polisorbata 80 na površinsku napetost i reološka svojstva *in situ* gelirajućih nanosuspenzija i formiranog gela nakon miješanja s umjetnim nosnim fluidom

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

U ovom radu za pripremu *in situ* gelirajućih nanosuspenzija korišteni su mikronizirani flutikazonpropionat (Carbosynth Ltd, UK), polisorbata 80 (Sigma-Aldrich, SAD), niskometoksilirani amidirani pektin CF 025 stupnja esterifikacije 23-28% i stupnja amidacije 22-25% (Herbstreith & Fox, Njemačka), natrijev hijaluronat molekulske mase 0,8 MDa (Contipro, Češka), D (-) manitol (BDH Prolabo, UK) i 1 M otopina NaOH (Kemig, Hrvatska). Umjetni nosni fluid (engl. *simulated nasal fluid*, SNF) pripremljen je otapanjem natrijevog klorida (Kemig, Hrvatska) pri koncentraciji od 150 mM, kalijevog klorida (Kemig, Hrvatska) pri koncentraciji od 40 mM te kalcijevog klorida dihidrata (Sigma-Aldrich, Njemačka) pri koncentraciji od 5,3 mM u pročišćenoj vodi.

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Priprema *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

Mikronizirani flutikazonpropionat rastrljan je s polisorbatom 80 uz intenzivno miješanje staklenim štapićem u omjerima 1:1, 1:1,33, 1:1,5, 1:2, 1,33:1, 1,5:1, i 2:1. Dodatkom 20 ml pročišćene vode i miješanjem na magnetskoj miješalici pripravljene su suspenzije pri rasponu koncentracija flutikazonpropionata i polisorbata 80 od 2,4 do 4,8 mg/ml. Zatim je u vijale za mljevenje izvagano po 0,5 g kuglica za mljevenje promjera 0,1, 0,2 i 0,4-0,6 mm. U svaku vijalu stavljeno je, uz ukupno 1,5 g kuglica za mljevenje, 5 magnetskih mješača dimenzija 10 × 6 mm i 2,5 g pripravljene suspenzije. Nanosuspenzije flutikazonpropionata pripravljene su miješanjem sadržaja vijala na magnetskom mješaču tijekom 24 sata.

Za pripravu *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata pripravljene su i koncentrirane otopine pektina (1,4 %; *m/m*) i natrijevog hijaluronata (0,5 %; *m/m*) otapanjem krutina u pročišćenoj vodi uz miješanje na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Otopina pektina prije upotrebe je profiltrirana. Koncentrirane otopine polimera pomiješane su u odgovarajućim omjerima te razrijeđene pročišćenom vodom kako bi se dobile otopine željenih koncentracija polimera. Tako priređenim otopinama polimera dodana je nanosuspenzija flutikazonpropionata u količini od 2,5 g uz miješanje na magnetskoj miješalici.

Sastav pripremljenih *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata prikazan je u Tablici 3. Za izotonizaciju uzoraka dodan je D (-) manitol pri koncentraciji od 4 % (*m/m*), a pH vrijednost podešena je na  $6,0 \pm 0,2$  pomoću otopine NaOH (1 M). Vrijednost pH praćena je pH metrom (Mettler Toledo GmbH, Švicarska) uz miješanje uzoraka na magnetskoj miješalici.

**Tablica 3.** Sastav pripremljenih *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

| Uzorak | Flutikazonpropionat<br>(%; <i>m/m</i> ) | Polisorbat 80<br>(%; <i>m/m</i> ) | Pektin<br>(%; <i>m/m</i> ) | Natrijev<br>hijaluronat<br>(%; <i>m/m</i> ) | Manitol<br>(%; <i>m/m</i> ) |
|--------|---|-----------------------------------|----------------------------|---|-----------------------------|
| 1      | 0,30                                    | 0,30                              | 0,90                       | 0,02  | 4,00                        |
| 2      | 0,30                                    | 0,45                              | 0,90                       | 0,02  | 4,00                        |
| 3      | 0,30                                    | 0,60                              | 0,90                       | 0,02  | 4,00                        |
| 4      | 0,45                                    | 0,30                              | 0,90                       | 0,02  | 4,00                        |
| 5      | 0,45                                    | 0,45                              | 0,90                       | 0,02  | 4,00                        |
| 6      | 0,45                                    | 0,60                              | 0,90                       | 0,02  | 4,00                        |
| 7      | 0,60                                    | 0,30                              | 0,90                       | 0,02  | 4,00                        |
| 8      | 0,60                                    | 0,45                              | 0,90                       | 0,02  | 4,00                        |
| 9      | 0,60                                    | 0,60                              | 0,90                       | 0,02  | 4,00                        |

### 3.2.2. Određivanje veličine i zeta potencijala čestica u *in situ* gelirajućim nanosuspenzijama flutikazonpropionata

Za mjerenje veličine čestica te zeta potencijala korišten je uređaj Zetasizer Ultra (Malvern Pananalytical, UK; Slika 6.) i pripadajući program za računalnu obradu podataka. Priprema uzoraka za mjerenje obuhvaćala je deseterostruko razrjeđivanje *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata otopinom polisorbata 80 iste koncentracije kao u mjerenoj nanosuspenziji.



**Slika 6.** Zetasizer Ultra (Malvern Pananalytical, UK; preuzeto s [www.malvernpanalytical.com/](http://www.malvernpanalytical.com/))

### 3.2.3. Mjerenje površinske napetosti

Površinska napetost mjerena je uređajem Krüss Processor Tensiometer K100 (Krüss GmbH, Hamburg, Njemačka; Slika 7.).



**Slika 7.** Krüss Processor Tensiometer K100 (Krüss GmbH, Hamburg, Njemačka; preuzeto s [www.kruss-scientific.com/](http://www.kruss-scientific.com/))

Za mjerenje površinske napetosti 50 ml *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata termostatirano je pri 25 °C tijekom 24 sata. Uređaj je kalibriran pročišćenom vodom. Posudice u kojim se vrši mjerenje površinske napetosti prvo su oprane u kromsumpornoj kiselini, a zatim prokuhane 15 minuta u pročišćenju vodi te do kraja osušene. Posudica za mjerenje (tip SV20 Glass Vessel 121, 5 ml, 70 mm) ima promjer od 66,5 mm i volumen od 121,6 ml te visinu 35,0 mm.



Prije samog mjerenja, svaki je uzorak ostavljen u mirovanju 30 minuta u uređaju. Mjerenja se vrše pomoću metalnog prstena (Krüss Standard Ring, polumjera 9,545 mm i promjera žice 0,37 mm) koji se prije mjerenja svakog uzorka čisti uranjanjem u pročišćenu vodu i žarenjem redukcijским plamenom. Određivanje površinske napetosti za svaki uzorak provedeno je u triplikatu.

### 3.2.4. Reološka mjerenja

Reološka su ispitivanja provedena pomoću reometra MCR 102 (Anton Paar, GmbH, Austrija; Slika 8.) koji je spojen s računalom na kojem su podaci obrađeni i analizirani u programu RheoCompass. Sva reološka mjerenja provedena su u duplikatu.



**Slika 8.** MCR 102 reometar (Anton Paar, GmbH, Austrija; preuzeto s [www.anton-paar.com/](http://www.anton-paar.com/))

#### 3.2.4.1. Određivanje viskoznosti pri mirovanju

Viskoznost pri mirovanju (engl. *Zero-shear viscosity*) *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikozonpropionata mjerena je rotacijskim testom puzanja (engl. *Creep test*) koji prikazuje ovisnost smične deformacije o vremenu. Korišteno je mjerno tijelo CP50-1 (engl. *cone plate*, promjera 50 mm i nagiba 1°) pri fiksnoj udaljenosti (0,102 mm) od donje ploče. Nakon nanošenja uzorka na donju ploču reometra, uzorak je ekvilibriran 3 minute. Viskoznost pri mirovanju određivana je tijekom 5 minuta pri temperaturi od 25 °C. Pri ovom testu je korišteno konstantno smično naprezanje od 0,1 Pa. Za izračun viskoznosti pri mirovanju korišten je softver RheoCompass.

#### **3.2.4.2. Test promjene amplitude**

Test promjene amplitude (engl. *Amplitude sweep test*) je oscilacijski test ovisnosti modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) ispitivanog sustava o smičnoj deformaciji (amplitudi) ( $\gamma$ ). Test je proveden pri temperaturi od 34 °C, kutnoj frekvenciji od 6,28 rad/s i rasponu amplitude od 0,1 do 100 %. Korišteno je mjerno tijelo PP50 (engl. *parallel plate*, promjera 50 mm) pri udaljenosti između ploča od 0,500 mm. Mjereni uzorak pripremljen je miješanjem *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata i simuliranog nosnog fluida (SNF) u omjeru 1:1. Mjerenje je izvršeno nakon jedne minute miješanja sustava na magnetskoj miješalici.

#### **3.2.4.3. Test promjene frekvencije**

Test promjene frekvencije (engl. *Frequency sweep test*) je oscilacijski test ovisnosti modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) o kutnoj frekvenciji ( $\omega$ ). Test je proveden pri temperaturi od 34 °C i pri smičnoj deformaciji od 0,1 % (iz linearnog viskoelastičnog područja). Raspon kutnih frekvencija bio je od 1 – 100 rad/s. Korišteno je mjerno tijelo PP50 (engl. *parallel plate*, promjera 50 mm) pri udaljenosti između ploča od 0,500 mm. Mjereni uzorak pripremljen je na isti način kao i za test promjene amplitude (dio 3.2.4.2.). Nakon nanošenja uzorka na donju mjernu ploču reometra, uzorak je ekvilibriran 10 minuta.

#### **3.2.4.4. Vrijeme geliranja**

Vrijeme geliranja (engl. *Gelation time test*) je oscilacijski test pomoću kojeg se određuje vrijeme potrebno da pripremljeni sustav prijeđe iz sol u gel stanje. On prikazuje ovisnost modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) o vremenu. Korišteno je mjerno tijelo PP50 (engl. *parallel plate*, promjera 50 mm) i test je rađen pri 34 °C tijekom 5 minuta. Udaljenost donje ploče od mjernog tijela bila je 0,500 mm, kutna frekvencija iznosila je 6,28 rad/s, a smična deformacija je iznosila 0,1 % (iz linearnog viskoelastičnog područja). Priprema uzorka sastojala se od jednogminutnog miješanja *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata i SNF-a u omjeru 1:1 na magnetskoj miješalici, nakon čega je uzorak nanesen na donju mjernu ploču reometra.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Priprema *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

Obzirom da je djelatna tvar u ovom ekperimentalnom radu flutikazonpropionat ( $C_{25}H_{31}F_3O_5S$ ), čija je topljivost u vodi vrlo niska i iznosi 0,0114 mg/ml, oblikovana je kao nanosuspenzija. Za suspendiranje djelatne tvari korišten je polisorbit 80 ([www.go.drugbank.com/](http://www.go.drugbank.com/)). On je neionski surfaktant, čija HLB vrijednost (engl. *hydrophil-lipophil balance*) iznosi 15 te se koristi kao solubilizator i emulgator u sustavima ulje/voda. HLB vrijednost inače poprima vrijednosti od 0 do 20 i izražava hidrofilnost, odnosno lipofilnost površinski aktivne tvari te što je vrijednost viša, tvar je hidrofilnija i preferira vodeni medij (Ćurt, 2019). Bitan korak ovog rada je vlažno mljevenje kojim se čestice djelatne tvari usitnjavaju do nanometarskog reda veličine, što ima za cilj povećati raspoloživost lijeka na mjestu učinka (Rabinow, 2004).

Za pripravu *in situ* gelirajuće nanosuspenzije korištene su polimerne otopine pektina i natrijevog hijaluronata. Pektin je strukturni polisaharid u biljaka koji se sastoji od lanaca D-galakturonske kiseline povezane  $\alpha(1, 4)$  glikozidnom vezom čije slobodne karboksilne skupine mogu biti acetilirane ili amidirane (Mrak, 2018). U ovom radu korišten je niskometoksilirani amidirani pektin CF 025 stupnja esterifikacije 23-28% i stupnja amidacije 22-25% čije će negativno nabijene karboksilne skupine galakturonske kiseline gelirati s ionima kalcija iz nosne tekućine (Ćurt, 2019).

Hijaluronska kiselina dio je izvanstaničnog matriksa u tkivima i pomaže u cijeljenju rana, oblaže sluznice te pridonosi staničnoj pokretljivosti. U kombinaciji s nazalnim kortikosteroidom i sistemskim antihistaminikom pridonosi smanjenju broja neutrofila, čime se reduciraju simptomi alergijskog i nealergijskog rinitisa (Cantone i Iengo, 2016). Hidroksilne skupine hijaluronske kiseline pomoću vodikovih veza stvaraju film koji uzrokuje dulje zadržavanje tvari i vode na mjestu primjene zbog čega se smatra i prirodnim humektansom bez izazivanja neželjenih reakcija. Prednost *in situ* gelirajuće nanosuspenzije je što se kao tekućina dobro raspršuje pri primjeni, a nakon doticaja s nosnom sluznicom gelira, opire se mukocilijarnom čišćenju i produljeno oslobađa lijek, osiguravajući minimalnu sistemska izloženost (Ćurt, 2019; Nižić i sur., 2019).

Formulacije koje se primjenjuju nazalno trebaju biti izotonizirane, tj. potrebno im je prilagoditi osmolalnost, što je ovdje postignuto uporabom manitola (4,0 %, *m/m*).

## 4.2. Veličina čestica *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropiona

Srednji promjer i raspodjela veličina nanočestica flutikazonpropionata u *in situ* gelirajućim nanosuspenzijama pripravljenim 24-satnim vlažnim mljevenjem na magnetskoj miješalici prikazani su u Tablici 4. Srednji promjer čestica bio je u rasponu od  $129,1 \pm 1,8$  nm do  $162,7 \pm 3,7$  nm, a indeks polidisperznosti iznosio je od  $0,213 \pm 0,015$  do  $0,297 \pm 0,040$ .

**Tablica 4.** Srednji promjer i indeks polidisperznosti nanočestica flutikazonpropionata u *in situ* gelirajućim nanosuspenzijama

| Uzorak | Flutikazonpropionat<br>(%; m/m) | Polisorbat 80<br>(%; m/m) | Pektin<br>(%; m/m) | Natrijev<br>hijaluronat<br>(%; m/m) | Srednji<br>promjer<br>čestica<br>(nm) | PI          |
|--------|---------------------------------|---------------------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------|
| 1      | 0,30                            | 0,30                      | 0,90               | 0,02                                | 139,6±2,3                             | 0,234±0,004 |
| 2      | 0,30                            | 0,45                      | 0,90               | 0,02                                | 148,5±1,4                             | 0,243±0,019 |
| 3      | 0,30                            | 0,60                      | 0,90               | 0,02                                | 162,7±3,7                             | 0,297±0,040 |
| 4      | 0,45                            | 0,30                      | 0,90               | 0,02                                | 129,1±1,8                             | 0,238±0,035 |
| 5      | 0,45                            | 0,45                      | 0,90               | 0,02                                | 135,3±0,9                             | 0,247±0,021 |
| 6      | 0,45                            | 0,60                      | 0,90               | 0,02                                | 149,5±1,6                             | 0,240±0,007 |
| 7      | 0,60                            | 0,30                      | 0,90               | 0,02                                | 135,5±0,5                             | 0,263±0,015 |
| 8      | 0,60                            | 0,45                      | 0,90               | 0,02                                | 135,7±0,9                             | 0,213±0,015 |
| 9      | 0,60                            | 0,60                      | 0,90               | 0,02                                | 137,6±0,3                             | 0,239±0,021 |

Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=3); PI = indeks polidisperznosti

Prosječna veličina čestica u izrađenim nanosuspenzijama je manja od 200 nm, čime se značajno ubrzava otapanje lijeka što može rezultirati poboljšanjem terapijskog učinka (Wang i sur. 2016), otvarajući mogućnost prilagodbe doze u formulaciji.

Indeks polidisperznosti ne prelazi vrijednost od 0,3, što znači da nema mnogo nanočestica u uzorku koje odskakuju od izmjerene srednje vrijednosti veličine čestica. Isto tako, Chavhan i sur. 2011. navode kako se tako okarakteriziran sustav može smatrati fizički stabilnim.

Temeljem prikazanih vrijednosti veličine i raspodjele veličine nanočestica flutikazonpropionata u *in situ* gelirajućim nanosuspenzijama može se zaključiti da je proces vlažnog mljevenja uspješno proveden.

### 4.3. Zeta potencijal nanočestica flutikazonpropionata u *in situ* gelirajućim nanosuspencijama

Zeta potencijal nanočestica flutikazonpropionata u *in situ* gelirajućim nanosuspencijama bio je u rasponu od  $-83,9 \pm 2,4$  mV do  $-75,3 \pm 2,6$  mV (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Zeta potencijal nanočestica flutikazonpropionata u *in situ* gelirajućim nanosuspencijama

| Uzorak | Flutikazonpropionat<br>(%; m/m) | Polisorbat 80<br>(%; m/m ) | Pektin<br>(%; m/m) | Natrijev<br>hijaluronat<br>(%; m/m) | Zeta potencijal<br>(mV) |
|--------|---------------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| 1      | 0,30                            | 0,30                       | 0,90               | 0,02                                | $-78,0 \pm 2,0$         |
| 2      | 0,30                            | 0,45                       | 0,90               | 0,02                                | $-83,6 \pm 1,9$         |
| 3      | 0,30                            | 0,60                       | 0,90               | 0,02                                | $-83,9 \pm 2,4$         |
| 4      | 0,45                            | 0,30                       | 0,90               | 0,02                                | $-82,9 \pm 1,4$         |
| 5      | 0,45                            | 0,45                       | 0,90               | 0,02                                | $-76,9 \pm 1,2$         |
| 6      | 0,45                            | 0,60                       | 0,90               | 0,02                                | $-81,5 \pm 0,5$         |
| 7      | 0,60                            | 0,30                       | 0,90               | 0,02                                | $-75,5 \pm 1,5$         |
| 8      | 0,60                            | 0,45                       | 0,90               | 0,02                                | $-75,3 \pm 2,6$         |
| 9      | 0,60                            | 0,60                       | 0,90               | 0,02                                | $-82,4 \pm 1,6$         |

Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=3).

Zeta potencijal od  $\pm 60$  mV svrstava nanosuspencije u grupu vrlo stabilnih (Turkalj, 2018). Za razvijeni sustav u ovom radu izmjerene su još veće apsolutne vrijednosti zeta potencijala što nanosuspencije flutikazonpropionata svrstava u istu kategoriju i ne dovodi se njihova stabilnost tijekom skladištenja u pitanje.

### 4.4. Površinska napetost *in situ* gelirajućih nanosuspencija flutikazonpropionata

Površinska napetost *in situ* gelirajućih nanosuspencija flutikazonpropionata kretala se u rasponu od  $35,09 \pm 0,17$  do  $37,51 \pm 0,19$  mN/m, kao što je prikazano u Tablici 6.

**Tablica 6.** Površinska napetost *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

| Uzorak | Flutikazonpropionat<br>(%; m/m) | Polisorbat 80<br>(%; m/m ) | Pektin<br>(%; m/m) | Natrijev<br>hijaluronat<br>(%; m/m) | Površinska<br>napetost<br>(mN/m) |
|--------|---------------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1      | 0,30                            | 0,30                       | 0,90               | 0,02                                | 35,89±0,19                       |
| 2      | 0,30                            | 0,45                       | 0,90               | 0,02                                | 35,66±0,14                       |
| 3      | 0,30                            | 0,60                       | 0,90               | 0,02                                | 37,28±0,15                       |
| 4      | 0,45                            | 0,30                       | 0,90               | 0,02                                | 36,09±0,26                       |
| 5      | 0,45                            | 0,45                       | 0,90               | 0,02                                | 35,86±0,09                       |
| 6      | 0,45                            | 0,60                       | 0,90               | 0,02                                | 36,20±0,06                       |
| 7      | 0,60                            | 0,30                       | 0,90               | 0,02                                | 36,30±0,13                       |
| 8      | 0,60                            | 0,45                       | 0,90               | 0,02                                | 35,09±0,17                       |
| 9      | 0,60                            | 0,60                       | 0,90               | 0,02                                | 37,51±0,19                       |

Prikazane su srednje vrijednosti ± SD (n=3).

Raspon koncentracija flutikazonpropionata i polisorbata 80 je relativno uzak te nije uočen jasan utjecaj koncentracija tvari na površinsku napetost.

Površinska napetost pripremljenih nanosuspenzija manja je od 44 mN/m, što odgovara vrijednostima sprejeva za nos prema Shrestha i sur. iz 2020. Prisustvo površinski aktivne tvari u ispitivanim koncentracijama rezultiralo je dobrim močenjem čestica lijeka te se iz tog razloga može očekivati nizak stupanj agregacije nanočestica flutikazonpropionata (Li i sur., 2018).

#### **4.5. Reološka svojstva *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata**

Kako bi se pripremljeni nanosustavi reološki okarakterizirali, rađen je rotacijski test kojim se razmatra utjecaj vanjske sile na strukturu sustava (određivanje viskoznosti pri mirovanju) te oscilacijski testovi koji ne narušavaju strukturu sustava, a ispituju njegova svojstva: test vremena geliranja, test promjene frekvencije i test promjene amplitude (Mezger, 2014).

Generalno, *in situ* gelirajući sustavi se ubrajaju u ne-Newtonove tekućine i njihova se svojstva izražavaju kroz modul pohrane ( $G'$ ) i modul gubitka ( $G''$ ), gdje bi potonji nakon primjene trebao biti manji (Cai i sur., 2011).

#### 4.5.1. Viskoznost pri mirovanju

Viskoznost pri mirovanju *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata određivana je rotacijskim testom puzanja pri konstantnom smičnom naprežanju od 0,1 Pa i konstantnoj temperaturi. Izmjerene vrijednosti prikazane su u Tablici 7., a kreću od  $8,24 \pm 0,14$  do  $10,08 \pm 1,21$  mPa s.

**Tablica 7.** Viskoznost pri mirovanju *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata

| Uzorak | Flutikazonpropionat<br>(%; m/m) | Polisorbat 80<br>(%; m/m) | Pektin<br>(%; m/m) | Natrijev<br>hijaluronat<br>(%; m/m) | Viskoznost pri<br>mirovanju<br>(mPa s) |
|--------|---------------------------------|---------------------------|--------------------|-------------------------------------|--|
| 1      | 0,30                            | 0,30                      | 0,90               | 0,02                                | 9,62±0,26                              |
| 2      | 0,30                            | 0,45                      | 0,90               | 0,02                                | 10,01±0,17                             |
| 3      | 0,30                            | 0,60                      | 0,90               | 0,02                                | 9,77±0,05                              |
| 4      | 0,45                            | 0,30                      | 0,90               | 0,02                                | 9,25±0,09                              |
| 5      | 0,45                            | 0,45                      | 0,90               | 0,02                                | 10,08±1,21                             |
| 6      | 0,45                            | 0,60                      | 0,90               | 0,02                                | 9,17±0,44                              |
| 7      | 0,60                            | 0,30                      | 0,90               | 0,02                                | 8,24±0,14                              |
| 8      | 0,60                            | 0,45                      | 0,90               | 0,02                                | 9,48±0,22                              |
| 9      | 0,60                            | 0,60                      | 0,90               | 0,02                                | 10,07±0,17                             |

Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SD (n=2).

Viskoznost pri mirovanju svojstvo je sustava koje se koristi u procjeni stabilnosti tijekom vremena primjenom Stokesovog zakona koji izravno dovodi u vezu viskoznost, veličinu čestica i brzinu taloženja čestica. Što je sustav manje viskozan i suspendirane čestice u njemu veće, taloženje uzrokovano silom gravitacije će biti brže, što smanjuje dugoročnu stabilnost i efikasnost ispitivanog pripravka (Ćurt, 2019; Nižić i sur., 2019).

Pri najvećem udjelu flutikazonpropionata, viskoznost pri mirovanju raste s povećanjem koncentracije polisorbata 80 u nanosuspenziji, što može pridonijeti održavanju stabilnog nanosustava nakon pripreme tijekom vremena i efikasnosti pripremljene formulacije u liječenju bolesti. Valja uzeti u obzir i promjenu viskoznosti prilikom primjene nanosuspenzije u nos, zahvaljujući smičnom naprežanju pri raspršivanju te povećanju temperature nakon primjene.

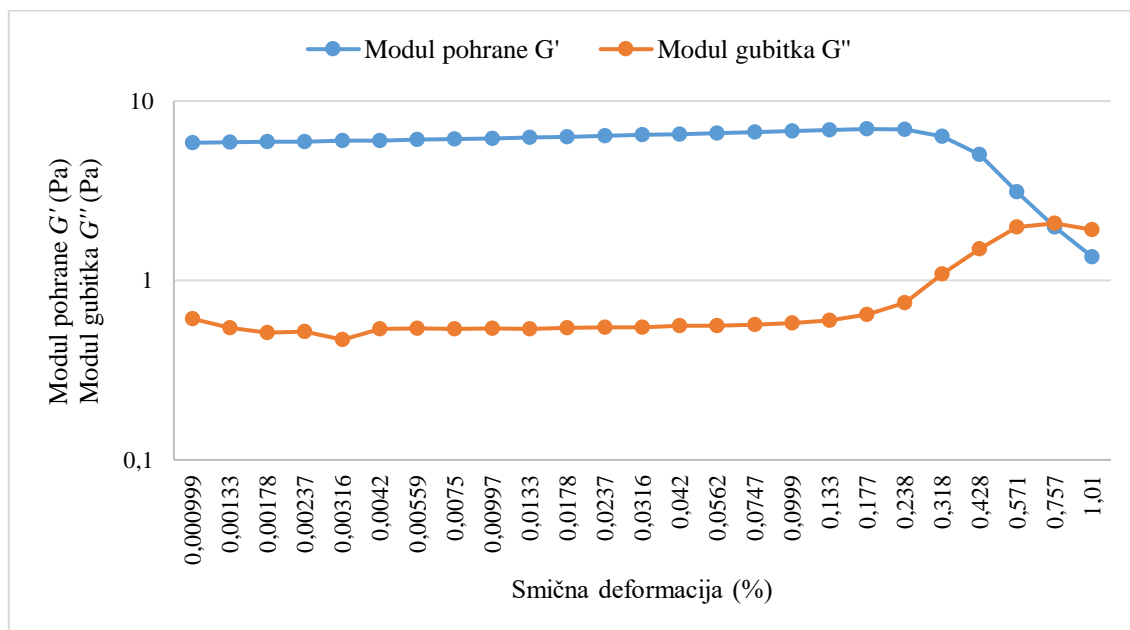
Naime, lijek se skladišti pri sniženoj ili sobnoj temperaturi, a temperatura nosne sluznice iznosi oko 34 °C (Agrawal i sur., 2020). Pretjerano velika viskoznost sustava rezultira nezadovoljavajućim stupnjem raspršenja prilikom primjene lijeka u nos (Singh i sur., 2012).

#### 4.5.2. Test promjene amplitude

Test promjene amplitude izvodi se kako bi se promotrila ovisnost modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) o amplitudi, tj. smičnoj deformaciji ( $\gamma$ ) koja se mijenja pri konstantnoj vrijednosti kutne frekvencije ( $\omega$ ) od 6,28 rad/s.

Test promjene amplitude proveden je za gelirane nanosuspencije flutikazonpropionata koje su pripravljene miješanjem *in situ* gelirajućih nanosuspencija sa SNF-om u volumnom omjeru 1:1. Za provođenje testa odabrane su nanosuspencije s najmanjom i najvećom koncentracijom flutikazonpropionata i polisorbata 80 kako bi se odabrala vrijednost smične deformacije koja je prikladna za provođenje daljnjih reoloških testova nanosuspencija nakon geliranja, odnosno pri kojoj je očuvana struktura gela ispitivanog sustava. Ovisnost modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) o smičnoj deformaciji ( $\gamma$ ) za *in situ* gelirajuću nanosuspenciju koncentracije flutikazonpropionata i polisorbata 80 od 0,3 % ( $m/m$ ), nakon miješanja s SNF-om u volumnom omjeru 1:1, prikazana je na Slici 9.

Slični profili ovisnosti modula pohrane i gubitka o smičnoj deformaciji dobiveni su i za *in situ* gelirajuću nanosuspenciju s najvećom koncentracijom fluzikazonpropionata i polisorbata 80 (0,6 %,  $m/m$ ). Temeljem dobivenih rezultata, smična deformacija ( $\gamma$ ) od 0,1 % odabrana je za provođenje testa promjene frekvencije pri daljnjoj karakterizaciji geliranih nanosuspencija flutikazonpropionata.



**Slika 9.** Ovisnost modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) o smičnoj deformaciji ( $\gamma$ ) za *in situ* gelirajuću nanosuspenciju koncentracije flutikazonpropionata i polisorbata 80 od 0,3 %



(*m/m*), pektina 0,9 % (*m/m*) i natrijevog hijaluronata 0,02 % (*m/m*), nakon miješanja s SNF-om u volumnom omjeru 1:1. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 34 °C.

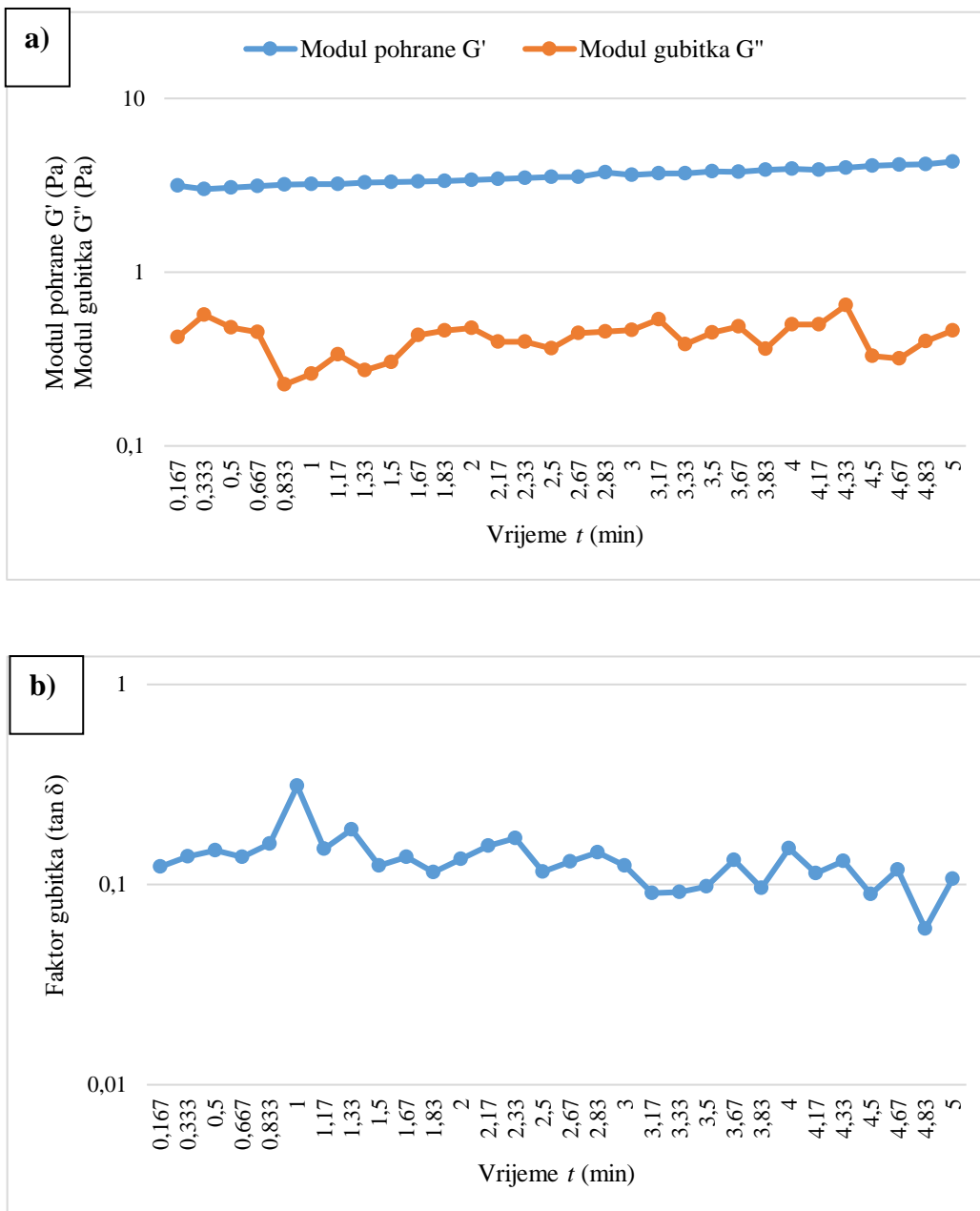
#### 4.5.3. Vrijeme geliranja

Vrijeme geliranja je oscilacijski test u kojem se promatraju modul pohrane ( $G'$ ) i modul gubitka ( $G''$ ) u ovisnosti o vremenu ( $t$ ) pri konstantnoj smičnoj deformaciji i kutnoj frekvenciji. *In situ* gelirajuća nanosuspenzija flutikazonpropionata miješa se sa SNF-om u omjeru 1:1 prije mjerenja i ispitivanje se provodi pri temperaturi od 34 °C kako bi se simulirali *in vivo* uvjeti na sluznici nosa. Ioni kalcija iz simuliranog nosnog fluida ključni su u procesu umrežavanja polimernih lanaca pektina (Ćurt, 2019).

Kao trenutak u kojem sustav gelira uzima se ono vrijeme u kojem je modul pohrane jednak modulu gubitka ( $G'=G''$ ), a prikladnije bi bilo promotriti faktor gubitka ( $\tan \delta$ ) koji se definira kao omjer modula gubitka i modula pohrane te se kao vrijeme geliranja uzima trenutak kada on postane neovisan o kutnoj frekvenciji (Winter i Chambon, 1986).

Neovisno o sastavu *in situ* gelirajućih nanosuspenzija, svi su pripremljeni uzorci već pri početku mjerenja u  $t = 0$  pokazivali veći modul pohrane ( $G'$ ) od modula gubitka ( $G''$ ), što znači da je sustav gelirao trenutno, prije samog nanošenja uzorka na uređaj te taj trenutak u kojem bi moduli bili jednaki ( $G'=G''$ ) nije zabilježen (Slika 10.a).

Također, u  $t = 0$  vidljivo je kako je faktor gubitka manji od 1, što dokazuje da se sustav nalazi u stanju gela (Slika 10.b). Obzirom da su oponašani okolišni uvjeti sluznice nosa, takvi se rezultati očekuju i primjenom lijeka *in vivo*. Geliranje je iznimno važan proces koji se opire fiziološkom mukocilijarnom čišćenju koje bi u kratkom vremenu uklonilo lijek iz nosa, ali i smanjuje curenje formulacije u ždrijelo te pristizanje u probavni sustav. No, valja spomenuti i kako gel ne bi trebao biti prečvrst jer je tada moguća sporija difuzija lijeka pri oslobađanju iz formulacije. Također, ukoliko bi volumen gela nakon primjene postao veći nego što je volumen *in situ* gelirajućeg sustava pri primjeni, pacijent bi mogao osjećati nelagodu u nosu što bi smanjilo suradljivost (Brozović, 2019).

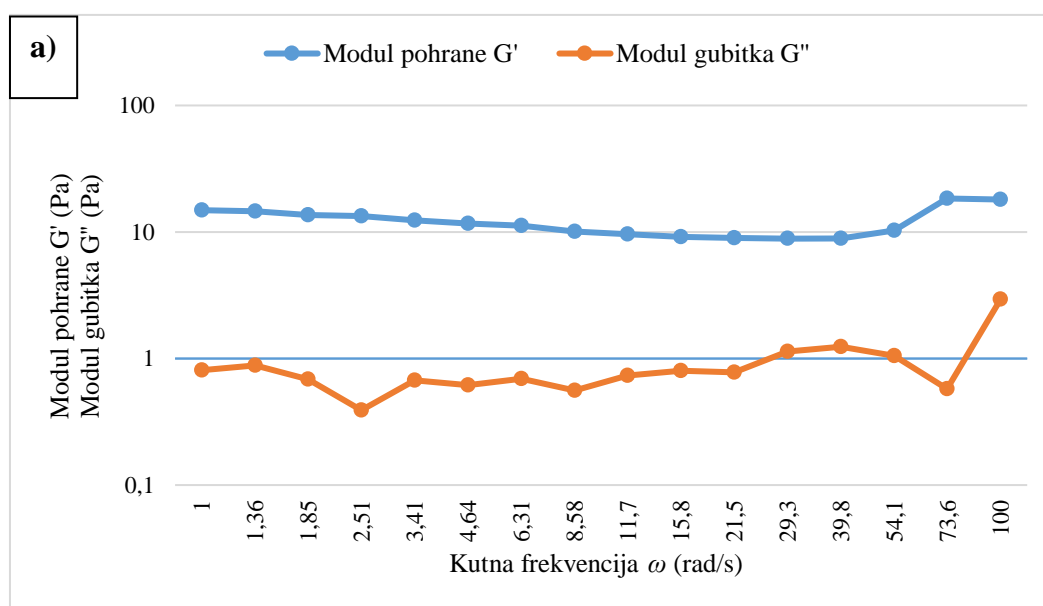


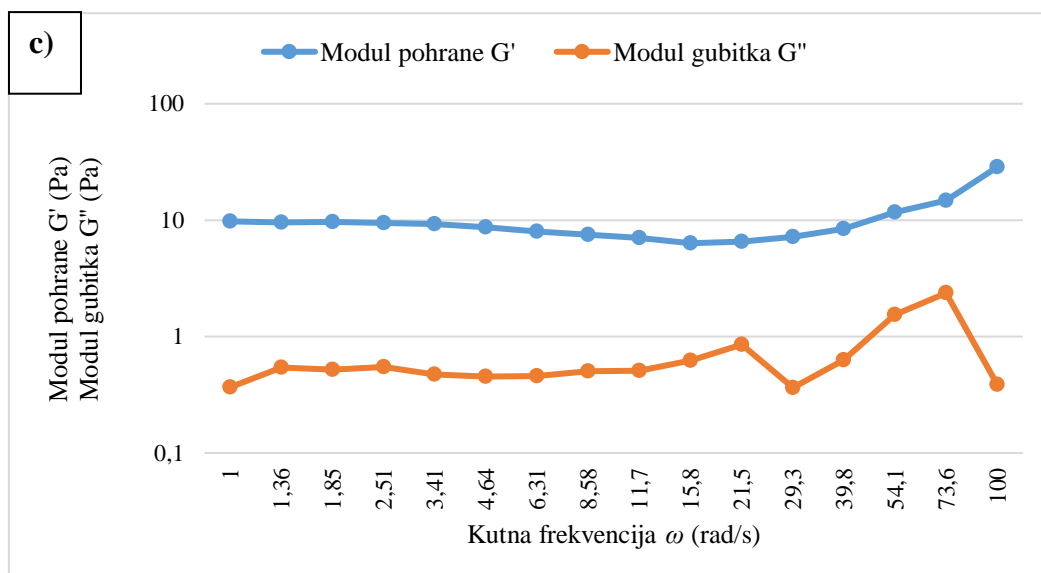
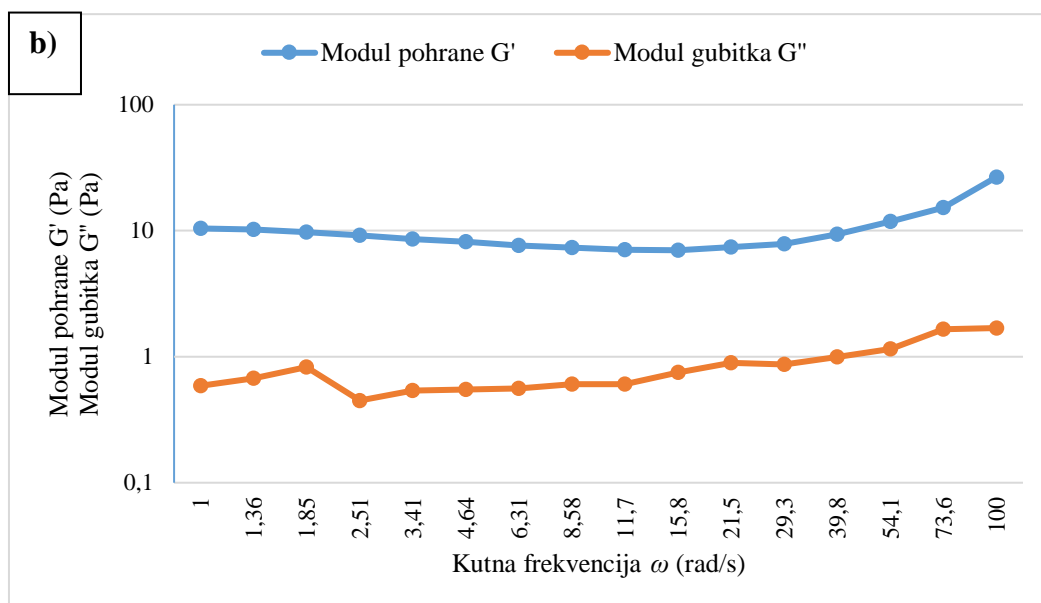
**Slika 10.** Graf ovisnosti: **a)** modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) te **b)** faktora gubitka ( $\tan \delta$ ) o vremenu ( $t$ ) za *in situ* gelirajuću nanosuspenciju koncentracije flutikazonpropionata od 0,45 % (m/m), polisorbata 80 od 0,3 % (m/m), pektina 0,9 % (m/m) i natrijevog hijaluronata 0,02 % (m/m), nakon miješanja s SNF-om u volumnom omjeru 1:1. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 34 °C. Ovaj je graf reprezentativan za svih 9 mjerenih formulacija u duplikatu.

#### 4.5.4. Test promjene frekvencije

Test promjene frekvencije je reološko ispitivanje koje uzima u obzir jednake parametre kao i test promjene amplitude, međutim daje ovisnost modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) o kutnoj frekvenciji ( $\omega$ ) pri konstantnoj vrijednosti smične deformacije ( $\gamma$ ; 0,1 %). Izvodi se kako bi se procijenila čvrstoća i stabilnost pripravljene formulacije. Prije mjerenja, *in situ* gelirajuća nanosuspenzija flutikazonpropionata miješa se sa SNF-om koji sadrži ione prisutne u nosnom fluidu u biorelevantnoj koncentraciji, kako bi se što vjernije simulirali uvjeti na nosnoj sluznici pri primjeni lijeka.

Na Slici 11. prikazana je ovisnost modula pohrane i gubitka o kutnoj frekvenciji za gelirane nanosuspenzije flutikazonpropionata koje su međusobno jednake prema koncentraciji pektina i natrijevog hijaluronata, a različite prema koncentracijama flutikazonpropionata i polisorbata 80. U svim ispitivanim uzorcima modul pohrane ( $G'$ ) bio je veći od modula gubitka ( $G''$ ) što upućuje na zaključak da su nanosuspenzije gelirale uslijed miješanja s SNF-om te da je u sustavu dominantna elastična komponenta koja može poslužiti kao mjera stabilnosti sustava. U ispitivanom rasponu kutnih frekvencija odnos  $G'$  i  $G''$  ostao je nepromijenjen iz čega se može zaključiti da je formirani gel stabilan. Gelirana struktura ima potencijal osiguravanja produljenog zadržavanja na mjestu primjene i produljenog oslobađanja lijeka (Nižić i sur., 2019).





**Slika 11.** Graf ovisnosti modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) o kutnoj frekvenciji ( $\omega$ ) za *in situ* gelirajuće nanosuspenzije pripravljene pri koncentracijama: **a)** 0,3 % (*m/m*) flutikazonpropionata i 0,6 % (*m/m*) polisorbata 80; **b)** 0,45 % (*m/m*) flutikazonpropionata i 0,45 % (*m/m*) polisorbata 80; **c)** 0,6 % (*m/m*) flutikazonpropionata i 0,45 % (*m/m*) polisorbata 80, nakon miješanja s SNF-om u volumnom omjeru 1:1. Koncentracija pektina u svim *in situ* gelirajućim suspenzijama iznosi 0,9 % (*m/m*), a natrijevog hijaluronata 0,02 % (*m/m*). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 34 °C. Ovi su grafovi reprezentativni za svih 9 mjerenih formulacija u duplikatu.

## 5. ZAKLJUČCI

- *In situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata (0,3 % - 0,6 %, *m/m*) s polisorbatom 80 (0,3 % - 0,6 %, *m/m*) kao suspendirajućom tvari u otopini pektina (0,9 %, *m/m*) i natrijevog hijaluronata (0,02 %, *m/m*), uz manitol kao sredstvo za izotonizaciju (4,0 %, *m/m*), uspješno su pripravljene.
- Srednja veličina čestica lijeka u nanosuspenzijama kretala se između  $129,1 \pm 1,8$  nm do  $162,7 \pm 3,7$  nm. Indeks polidisperznosti iznosio je od  $0,213 \pm 0,015$  do  $0,297 \pm 0,040$ .
- Zeta potencijal nanočestica u nanosuspenzijama iznosio je od  $-83,9 \pm 2,4$  mV do  $-75,3 \pm 2,6$  mV što pripravljene nanosuspenzije svrstava u stabilne sustave u kojima se ne očekuje agregacija čestica.
- Površinska napetost *in situ* gelirajućih nanosustava kretala se između  $35,09 \pm 0,17$  mN/m i  $37,51 \pm 0,19$  mN/m što potvrđuje prikladnost formulacije za primjenu raspršivanjem i dobar stupanj močenja čestica.
- Viskoznost pri mirovanju nanosuspenzija kretala se od  $8,24 \pm 0,14$  mPa s do  $10,08 \pm 1,21$  mPa s. Pri najvećem udjelu flutikazonpropionata, viskoznost pri mirovanju rasla je s povećanjem koncentracije polisorbata 80 u nanosuspenziji.
- Sve pripravljene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata gelirale su odmah nakon miješanja s umjetnim nosnim fluidom.
- Pripravljene gelove dostatne su stabilnosti: oscilacijskim testom utvrđeno je da je modul pohrane ( $G'$ ) bio veći od modula gubitka ( $G''$ ) pri promjeni kutne frekvencije od 1 do 100 rad/s.

## 6. LITERATURA

Ali H.S.M, York P, Blagden N. Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 375, 107–113

Agrawal M, Saraf Sh, Saraf Sw, Dubey S. K, Puri A, Gupta U, Kesharwani P, Ravischandiran V, Kumar P, Naidu V. G. M, Murty U. S, Ajazuddin, Amit A. Stimuli-responsive *in situ* gelling system for nose-to-brain drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2020, 327, 235–265

Alshweiat A, Csóka I, Tömösi F, Janáky T, Kovács A, Gáspár R, Sztojkov-Ivanov A, Ducza E, Márki A, Szabó-Révész P, Ambrus R. Nasal delivery of nanosuspension-based mucoadhesive formulation with improved bioavailability of loratadine: Preparation, characterization, and *in vivo evaluation*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 579, 119166

Bhavna, Md S, Ali M, Ali R, Bhatnagar A, Baboota S, Ali J. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: In vitro and in vivo safety evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 67, 418-425

Bitter C, Suter-Zimmermann K, Surbera C. Nasal Drug Delivery in Humans. *Current Problems in Dermatology*. Basel, Kaarger. 2011, 40, 20-35

Brozović M, 2019, Reološka karakterizacija nazalnih *in situ* gelova s flutikazonpropionatom, Diplomski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Cai Z, Song X, Sun F, Yang Z, Hou S, Liu Z. Formulation and Evaluation of In Situ Gelling Systems for Intranasal Administration of Gastrodin, *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12(4), 1102-1109

Cantone E, Iengo M. Effect of sodium hyaluronate added to topical corticosteroids in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *American Journal of Rhinology & Allergy*, 2016, 30, 5, 340-343

Chavhan S.S, Petkar K. C, Sawant K.K. Nanosuspensions in Drug Delivery: Recent Advances, Patent Scenarios, and Commercialization Aspects. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2011, 28(5), 447–488

Ćurt E, 2019, Razvoj *in situ* gelirajuće suspenzije flutikazonpropionata za nazalnu primjenu, Diplomski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Dinamičko raspršenje svjetlosti, 2021, <https://wiki.anton-paar.com/no-en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/##data-imagegroup-39782>, pristupljeno 25.02.2021.

Flixonase, 2019, <https://www.halmed.hr>, pristupljeno 20.02.2021.

Flutikazonpropionat, 2004, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444036>, pristupljeno 25.02.2021.

Flutikazonpropionat, 2021, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00588>, pristupljeno 29.03.2021.

Goel S, Sachdeva M, Agarwal V. Nanosuspension Technology: Recent Patents on Drug Delivery and their Characterizations. Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, 2019, 13, 91-104

Harding S.M. The human pharmacology of fluticasone propionate. Respiratory Medicine, 1990, 84/1, 25-29

Hauer I.M, Deblais A, Beattie J.K, Kellay H, Bonn D. The Dynamic Surface Tension of Water, The Journal of Physical Chemistry Letters, ACS Publications, 2017

Hao J, Zhao J, Zhang S, Tong T, Zhuang Q, Jin K, Chen W, Tang H. Fabrication of an ionic-sensitive *in situ* gel loaded with resveratrol nanosuspensions intended for direct nose-to-brain delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 147, 376–386

Herak J. Osnove kemijske fizike. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2001

Jacob S, Nair A. B, Shah J, Emerging role of nanosuspensions in drug delivery systems, Biomaterials Research, 2020

Jullaphant T, Nakpeng T, Srichana T. Montelukast nasal spray: Formulation development and *in vitro* evaluation. Pharmaceutical Development and Technology, 2018, DOI: 10.1080/10837450.2018.1514523

Krüss Processor Tensiometer K100, 2021, <https://www.kruss-scientific.com/en/products-services/products/k100>, pristupljeno 10.02.2021.

Leone F, Cavalli R. Drug nanosuspensions: a ZIP tool between traditional and innovative pharmaceutical formulations. Informa healthcare, Expert Opin. Drug Deliv, 2015, 12(10)

Li M, Alvarez P, Orbe P, Bilgili E. Multi-faceted Characterization of Wet-milled Griseofulvin Nanosuspensions for Elucidation of Aggregation State and Stabilization Mechanisms. American Association of Pharmaceutical Scientists, PharmSciTech, 2018

Lovrić J, Hafner A, Radiković M, Juretić M, Dürrigl M, Perina Lakoš G, Pepić I. Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva, Farmaceutski glasnik, 2015, 71, 7-8

Martin E, Verhoef J.C, Schipper N.G, Merkus F.W. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998, 29, 13–38

Medrol, 2021, <https://www.halmed.hr>, pristupljeno 20.02.2021.

Mezger T. G., The Rheology Handbook, For users of rotational and oscillatory rheometers, Hanover, Vincentz Network, 2014, str. 426

Mrak L, 2018, Pektinske mikrosfere kao nosači lipidno-alginatnih nanočestica s deksametazonom za nazalnu primjenu, Diplomski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Negrini R, Aleandri S, Kuentz M. Study of rheology and polymer adsorption onto drug nanoparticles in pharmaceutical suspensions produced by nano milling. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, DOI: 10.1016/j.xphs.2017.07.006.

Nižić L, Ugrina I, Špoljarić D, Saršon V, Kučuk M.S, Pepić I, Hafner A. Innovative sprayable *in situ* gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition. International Journal of Pharmaceutics, 2019, 563, 445–456.

Pailla S.R, Talluri S, Rangaraj N, Ramavath R, Challa V.S, Doijad N, Sampathi S. Intranasal Zotepine Nanosuspension: intended for improved brain distribution in rats. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019, DOI: 10.1007/s40199-019-00281-4

Parker S.P. Dictionary of Scientific and Technical Terms, McGraw-Hill, 6th Edition, 2003



Picout D.R, Ross-Murphy S.B. Rheology of Biopolymer Solutions and Gels. TheScientificWorldJOURNAL, 2003, 3, 105–121

Polisorbat 80, 2021,

[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/59924?lang=en&region=HR&gclid=Cj0KCQiAvvKBBhCXARIsACTePW-tHnvppaBjLo0D\\_5j27I-irT1PGPEqgpOOX4-P-TWjPBq9U9EANzMaArA7EALw\\_wcB](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/59924?lang=en&region=HR&gclid=Cj0KCQiAvvKBBhCXARIsACTePW-tHnvppaBjLo0D_5j27I-irT1PGPEqgpOOX4-P-TWjPBq9U9EANzMaArA7EALw_wcB), pristupljeno 01.03.2021.

Rabinow B. E. Nanosuspensions in drug delivery, Nature Reviews, Drug Discovery, 2004, 3, 785-796

Reometar MCR 102, 2021, <https://www.anton-paar.com/corp-en/products/details/rheometer-mcr-102-302-502> , pristupljeno 10.02.2021.

Saindane N.S, Pagar K.P, Vavia P.R. Nanosuspension Based In Situ Gelling Nasal Spray of Carvedilol: Development, In Vitro and In Vivo Characterization, American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech, 2013, 14, 189-199

Shrestha K, Van Strien J, Singh B, Inthavong K. Primary break-up and atomization characteristics of a nasal spray. PLoS ONE, 2020, 15(8): e0236063. DOI: 10.1371/journal.pone.0236063

Singh R. M. P, Kumar A, Pathak K. Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery. Informa healthcare, Expert Opin. Drug Deliv., 2012, DOI: 10.1517/17425247.2013.746659

Tao-Tao F, Zhao-Qing C, Yun Z, Wei-Ya C, Chun-Yu L, Ying Z, Fei-Fei Y, Yong-Hong L. Fluticasone propionate nanosuspensions for sustained nebulization delivery: An in vitro and in vivo evaluation. International Journal of Pharmaceutics, 2019, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118839

Turkalj J, 2018, Načini priprave i metode karakterizacije nanokristala djelatne tvari, Specijalistički rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Valečić D, 2017, Terapijske mogućnosti liječenja astme s osvrtom na liječenje u dječjoj populaciji, Diplomski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Wang L, Du J, Zhou Y, Wang Y. Safety of nanosuspension in drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2016, DOI: 10.1016/j.nano.2016.08.007

Wang X, Liu G, Ma J, Guo S, Gao L, Jia Y, Li X, Zhang Q. In Situ Gel-Forming System: An Attractive Alternative for Nasal Drug Delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2013, 30(5), 411–434

Wang Y, Zhang L, Wang O, Zhang D. Stability issue of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2013, DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.08.006

Willenbacher N, Georgieva K. Rheology of disperse systems. Buch Wiley, 2013

Winter H.H, Chambon F. Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point. *J Rheol*, 1986, 30, 367–382

Yang J. Z, Young A. L, Chiang P, Thurston A, Pretzer D. K. Fluticasone and Budesonide Nanosuspensions for Pulmonary Delivery: Preparation, Characterization and Pharmacokinetic Studies, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 97, 11, 4869-4878

Zeta potencijal čestica, 2021, <https://analytik.co.uk/zeta-potential-what-is-it-and-how-can-it-be-characterised/>, pristupljeno 25.02.2021.

Zetasizer Ultra, 2021, <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-advance-range/zetasizer-ultra>, pristupljeno 10.02.2021.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Nazalna primjena kortikosteroida omogućuje liječenje oboljenja nosne sluznice uz primjenu manjih doza lijeka, bez značajne sistemske izloženosti i uz smanjen rizik od sistemskih nuspojava. Veliki potencijal u nazalnoj primjeni imaju *in situ* gelirajuće otopine/nanosuspenzije koje se kao tekuće formulacije lako primjenjuju raspršivanjem u nosnu šupljinu, a u dodiru s nosnom sluznicom geliraju te tako osiguravaju dulje zadržavanje na mjestu primjene i produljeno oslobađanje lijeka.

Cilj ovog rada bio je pripremiti *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata različitog masenog omjera sa surfaktantom polisorbatom 80 i stalnim polimernim sastavom te ispitati utjecaj omjera lijeka i surfaktanta u *in situ* gelirajućim nanosuspenzijama flutikazonpropionata na uspješnost mljevenja (veličinu nanočestica), zeta potencijal nanočestica, površinsku napetost *in situ* gelirajućeg sustava, viskoznost pri mirovanju, vrijeme geliranja i svojstva gela formiranog pri miješanju nanosuspenzije s umjetnim nosnim fluidom.

*In situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata (0,3 % - 0,6 %, *m/m*) s polisorbatom 80 (0,3 % - 0,6 %, *m/m*) u otopini pektina (0,9 %, *m/m*) i natrijevog hijaluronata (0,02 %, *m/m*), uz manitol kao sredstvo za izotonizaciju (4,0 %, *m/m*), uspješno su pripravljene. Srednja veličina čestica lijeka u nanosuspenzijama kretala se između  $129,1 \pm 1,8$  nm do  $162,7 \pm 3,7$  nm. Indeks polidisperznosti iznosio je od  $0,213 \pm 0,015$  do  $0,297 \pm 0,040$ . Zeta potencijal nanočestica u nanosuspenzijama iznosio je od  $-83,9 \pm 2,4$  mV do  $-75,3 \pm 2,6$  mV što pripravljene nanosuspenzije svrstava u stabilne sustave u kojima se ne očekuje agregacija čestica. Površinska napetost *in situ* gelirajućih nanosustava kretala se između  $35,09 \pm 0,17$  mN/m i  $37,51 \pm 0,19$  mN/m što potvrđuje prikladnost formulacije za primjenu raspršivanjem i dobar stupanj močenja čestica. Viskoznost pri mirovanju nanosuspenzija kretala se od  $8,24 \pm 0,14$  mPa s do  $10,08 \pm 1,21$  mPa s. Pri najvećem udjelu flutikazonpropionata, viskoznost pri mirovanju rasla je s povećanjem koncentracije polisorbata 80 u nanosuspenziji. Sve pripravljene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata gelirale su odmah nakon miješanja s umjetnim nosnim fluidom. Pripravljene gelove dostatne su stabilnosti: oscilacijskim testom utvrđeno je da je modul pohrane ( $G'$ ) bio veći od modula gubitka ( $G''$ ) pri promjeni kutne frekvencije od 1 do 100 rad/s. Ostvareni rezultati mogu poslužiti kao polazišna točka u razvoju *in situ* gelirajućih nanosuspenzija kortikosteroida.

Nasal drug administration of corticosteroids allows treatment of diseases of nasal mucosa applying lower drug doses in comparison to systemic corticosteroid administration, reducing systemic drug exposure and risk of systemic side effects. *In situ* gelling nanosuspensions became subject of interest as they present liquid formulations which are easily delivered to the nasal mucosa, where they form a gel that ensures longer retention at the nasal mucosa and sustained release of the drug.

The aim of this study was to prepare *in situ* gelling nanosuspensions of fluticasone propionate with different drug to surfactant polysorbate 80 weight ratio, and constant polymeric composition. The idea was to investigate the influence of drug to surfactant ratio on milling efficacy, zeta potential, surface tension, zero-shear viscosity, gelation time and properties of gel formed after mixing of nanosuspension with simulated nasal fluid.

*In situ* gelling nanosuspensions of fluticasone propionate (0.3 % - 0.6 %, *m/m*) in pectin (0.9 %, *m/m*) and sodium hyaluronate (0.02 %, *m/m*) solution, with mannitol as isotonicizing agent (4.0 %, *m/m*), were successfully prepared. The mean particle size of the drug in nanosuspensions was between  $129.1 \pm 1.8$  nm do  $162.7 \pm 3.7$  nm. The polydispersity index ranged from  $0.213 \pm 0.015$  do  $0.297 \pm 0.040$ . Zeta potential values of nanoparticles in nanosuspensions ranged from  $-83.9 \pm 2.4$  do  $-75.3 \pm 2.6$  mV, which classifies prepared nanosuspensions into the stable system in which particle aggregation can not be expected. Values of the surface tension of *in situ* gelling nanosystems ranged between  $35.09 \pm 0.17$  mN/m and  $37.51 \pm 0.19$  mN/m, which confirms the suitability of the formulation for spray application as well as satisfying level of wetting the nanoparticles. The zero-shear viscosity of nanosuspensions ranged from  $8.24 \pm 0.14$  mPa s to  $10.08 \pm 1.21$  mPa s. At the highest concentration of fluticasone propionate, increase in polysorbate 80 concentration resulted in proportional increase in zero-shear viscosity. All prepared *in situ* gelling nanosuspensions gelled immediately after mixing with simulated nasal fluid. The prepared gels showed sufficient stability since oscillation test determined that the storage modulus ( $G'$ ) was greater than the loss modulus ( $G''$ ) when angular frequency was changed from 1 to 100 rad/s. The results of this thesis can be applied to further studies in the field of development of *in situ* gelling nanosuspensions of corticosteroids.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Fizičko-kemijska karakterizacija *in situ* gelirajućih nanosuspenzija flutikazonpropionata za nazalnu primjenu

David Horvat

Nazalna primjena kortikosteroida omogućuje liječenje oboljenja nosne sluznice uz primjenu manjih doza lijeka, bez značajne sistemske izloženosti i uz smanjen rizik od sistemskih nuspojava. Veliki potencijal u nazalnoj primjeni imaju *in situ* gelirajuće otopine/nanosuspenzije koje se kao tekuće formulacije lako primjenjuju raspršivanjem u nosnu šupljinu, a u dodiru s nosnom sluznicom geliraju te tako osiguravaju dulje zadržavanje na mjestu primjene i produljeno oslobađanje lijeka. Cilj ovog rada bio je pripremiti *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata različitog masenog omjera sa surfaktantom polisorbitom 80 i stalnim polimernim sastavom te ispitati utjecaj omjera lijeka i surfaktanta u *in situ* gelirajućim nanosuspenzijama flutikazonpropionata na uspješnost mljevenja (veličinu nanočestica), zeta potencijal nanočestica, površinsku napetost *in situ* gelirajućeg sustava, viskoznost pri mirovanju, vrijeme geliranja i svojstva gela formiranog pri miješanju nanosuspenzije s umjetnim nosnim fluidom. *In situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata (0,3 % - 0,6 %, m/m) s polisorbitom 80 (0,3 % - 0,6 %, m/m) u otopini pektina (0,9 %, m/m) i natrijevog hijaluronata (0,02 %, m/m), uz manitol kao sredstvo za izotonizaciju (4,0 %, m/m), uspješno su pripravljene. Srednja veličina čestica lijeka u nanosuspenzijama kretala se između  $129,1 \pm 1,8$  nm do  $162,7 \pm 3,7$  nm. Indeks polidisperznosti iznosio je od  $0,213 \pm 0,015$  do  $0,297 \pm 0,040$ . Zeta potencijal nanočestica u nanosuspenzijama iznosio je od  $-83,9 \pm 2,4$  mV do  $-75,3 \pm 2,6$  mV što pripravljene nanosuspenzije svrstava u stabilne sustave u kojima se ne očekuje agregacija čestica. Površinska napetost *in situ* gelirajućih nanosustava kretala se između  $35,09 \pm 0,17$  mN/m i  $37,51 \pm 0,19$  mN/m što potvrđuje prikladnost formulacije za primjenu raspršivanjem i dobar stupanj močenja čestica. Viskoznost pri mirovanju nanosuspenzija kretala se od  $8,24 \pm 0,14$  mPa s do  $10,08 \pm 1,21$  mPa s. Pri najvećem udjelu flutikazonpropionata, viskoznost pri mirovanju rasla je s povećanjem koncentracije polisorbata 80 u nanosuspenziji. Sve pripravljene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije flutikazonpropionata gelirale su odmah nakon miješanja s umjetnim nosnim fluidom. Pripravljene gelove dostatne su stabilnosti: oscilacijskim testom utvrđeno je da je modul pohrane ( $G'$ ) bio veći od modula gubitka ( $G''$ ) pri promjeni kutne frekvencije od 1 do 100 rad/s. Ostvareni rezultati mogu poslužiti kao polazišna točka u razvoju *in situ* gelirajućih nanosuspenzija kortikosteroida.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 11 grafičkih prikaza, 7 tablica i 50 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *in situ* gelirajuća nanosuspenzija, flutikazonpropionat, nazalna primjena lijekova, reologija, pektin, hijaluronska kiselina

Mentor: **Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocejenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj, 2021.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Physicochemical characterization of fluticasone propionate *in situ* gelling nanosuspension for nasal delivery

David Horvat

Nasal drug administration of corticosteroids allows treatment of diseases of nasal mucosa applying lower drug doses in comparison to systemic corticosteroid administration, reducing systemic drug exposure and risk of systemic side effects. *In situ* gelling nanosuspensions became subject of interest as they present liquid formulations which are easily delivered to the nasal mucosa, where they form a gel that ensures longer retention at the nasal mucosa and sustained release of the drug. The aim of this study was to prepare *in situ* gelling nanosuspensions of fluticasone propionate with different drug to surfactant polysorbate 80 weight ratio, and constant polymeric composition. The idea was to investigate the influence of drug to surfactant ratio on milling efficacy, zeta potential, surface tension, zero-shear viscosity, gelation time and properties of gel formed after mixing of nanosuspension with simulated nasal fluid. *In situ* gelling nanosuspensions of fluticasone propionate (0.3 % - 0.6 %, w/w) in pectin (0.9 %, w/w) and sodium hyaluronate (0.02 %, w/w) solution, with mannitol as isotonicizing agent (4.0 %, w/w), were successfully prepared. The mean particle size of the drug in nanosuspensions was between  $129.1 \pm 1.8$  nm do  $162.7 \pm 3.7$  nm. The polydispersity index ranged from  $0.213 \pm 0.015$  do  $0.297 \pm 0.040$ . Zeta potential values of nanoparticles in nanosuspensions ranged from  $-83.9 \pm 2.4$  mV do  $-75.3 \pm 2.6$  mV, which classifies prepared nanosuspensions into the stable system in which particle aggregation can not be expected. Values of the surface tension of *in situ* gelling nanosystems ranged between  $35.09 \pm 0.17$  mN/m and  $37.51 \pm 0.19$  mN/m, which confirms the suitability of the formulation for spray application as well as satisfying level of wetting the nanoparticles. The zero-shear viscosity of nanosuspensions ranged from  $8.24 \pm 0.14$  mPa s to  $10.08 \pm 1.21$  mPa s. At the highest concentration of fluticasone propionate, increase in polysorbate 80 concentration resulted in proportional increase in zero-shear viscosity. All prepared *in situ* gelling nanosuspensions gelled immediately after mixing with simulated nasal fluid. The prepared gels showed sufficient stability since oscillation test determined that the storage modulus ( $G'$ ) was greater than the loss modulus ( $G''$ ) when angular frequency was changed from 1 to 100 rad/s. The results of this thesis can be applied to further studies in the field of development of *in situ* gelling nanosuspensions of corticosteroids.

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

Thesis includes: 40 pages, 11 figures, 7 tables and 50 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *in situ* gelling nanosuspension, fluticasone-propionate, nasal delivery of drugs, rheology, pectin, hyaluronic acid

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

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivan Pepić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2021