

Razvoj oftalmičkih sekundarnih kationskih nanoemulzija za uklapanje slabo topljivih glukokortikoida

Pavić, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:764089>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-31**



Repository / Repozitorij:

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



Klara Pavić

**Razvoj oftalmičkih sekundarnih kationskih
nanoemulzija za uklapanje slabo topljivih
glukokortikoida**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na predmetu Biofarmacija s farmakokinetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Jasmine Lovrić. Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2019-04- 2174.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasmini Lovrić na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici te stručnom vodstvu, prenesenom znanju i savjetovanju prilikom izrade i pisanja ovog Diplomskog rada.

Hvala asistentu Josipu Ljubici, mag. pharm., na pruženoj pomoći i pristupačnosti tijekom eksperimentalnog rada koji je izrađen u sklopu njegovog doktorskog istraživanja.

*Hvala mojoj obitelji na neizmjerljivoj podršci i strpljenju tijekom cijelog studija.
Hvala i svim mojim prijateljima na bezuvjetnoj potpori i pomoći na putu do ostvarenja cilja.*

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Nanoemulzije	1
1.2	Pomoćne tvari u izradi nanoemulzija	3
1.2.1	Uljna faza.....	3
1.2.2	Površinski aktivne tvari	4
1.2.3	Nositelji pozitivnog naboja.....	5
1.3	Metode izrade nanoemulzija	6
1.3.1	Visokoenergetske metode.....	7
1.3.2	Niskoenergetske metode.....	9
1.4	Stabilnost nanoemulzija.....	10
1.5	Karakterizacija nanoemulzija.....	11
1.5.1	Veličina i raspodjela veličina kapljica disperzne faze.....	11
1.5.2	Zeta-potencijal	12
1.6	Bolest suhog oka	13
1.7	Prednosti nanoemulzija u liječenju bolesti suhog oka.....	15
2	OBRAZLOŽENJE TEME.....	19
3	MATERIJALI I METODE.....	21
3.1	MATERIJALI	21
3.2	METODE.....	21
3.2.1	Izrada nanoemulzija	21
3.2.2	Određivanje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti	25
3.2.3	Određivanje zeta-potencijala	25
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1	Izrada nanoemulzija stabiliziranih neionskim površinski aktivnim tvarima	27
4.1.1	Veličina kapljica i indeks polidisperznosti	28
4.1.2	Zeta-potencijal	29

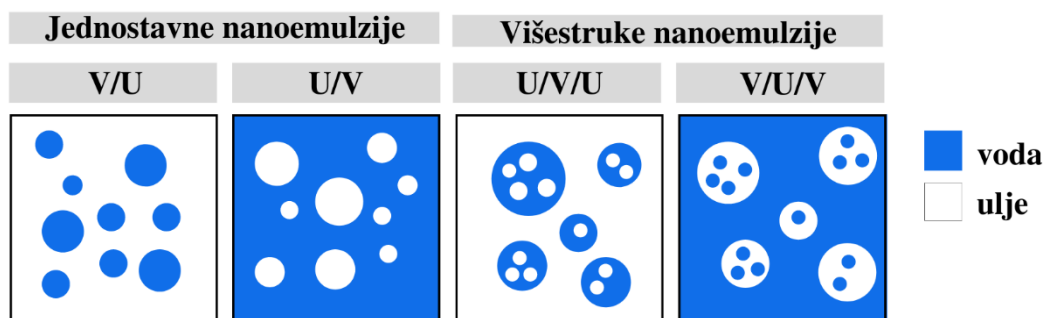
4.1.3	Stabilnost nanoemulzija stabiliziranih neionskim površinski aktivnim tvarima	30
4.2	Izrada nanoemulzija stabiliziranih anionskim površinski aktivnim tvarima	30
4.2.1	Veličina kapljica i indeks polidisperznosti	32
4.2.2	Zeta-potencijal	35
4.2.3	Stabilnost nanoemulzija	36
4.3	Izrada nanoemulzija stabiliziranih kitozanom niske molekulske mase	37
4.3.1	Veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal	37
5	ZAKLJUČCI	39
6	LITERATURA	40
7	SAŽETAK/SUMMARY	43

1 UVOD

1.1 NANOEMULZIJE

Nanoemulzije su koloidne disperzije dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, a stabilizirane su odgovarajućim površinski aktivnim tvarima (Singh i sur., 2017). Veličina kapljice disperzne faze se kreće od 50 do 200 nm te su takvi sustavi transparentni, a sustavi do 500 nm su transludentni. Karakteristična svojstva kao što su mala veličina kapljica, velika kinetička stabilnost (Rai i sur., 2018), mogućnost uklapanja djelatnih tvari u unutrašnjosti ili na samom rubu kapljica uljne faze te poboljšana bioraspoloživost djelatnih tvari u očnoj vodici čini nanoemulzije izuzetno prikladnim terapijskim nanosustavom za oftalmičku primjenu (Jurišić Dukovski, 2021). Mala veličina kapljica osigurava veliku ukupnu površinu za oslobađanje djelatne tvari koja time postaje dostupna za apsorpciju u suznom filmu, što posljedično povećava brzinu apsorpcije djelatne tvari u tkiva oka (Lallemant i sur., 2012). Usto, manje kapljice osiguravaju transparentniji izgled nanoemulzije, čime se smanjuje замуćenje vida nakon primjene (Singh i sur., 2017).

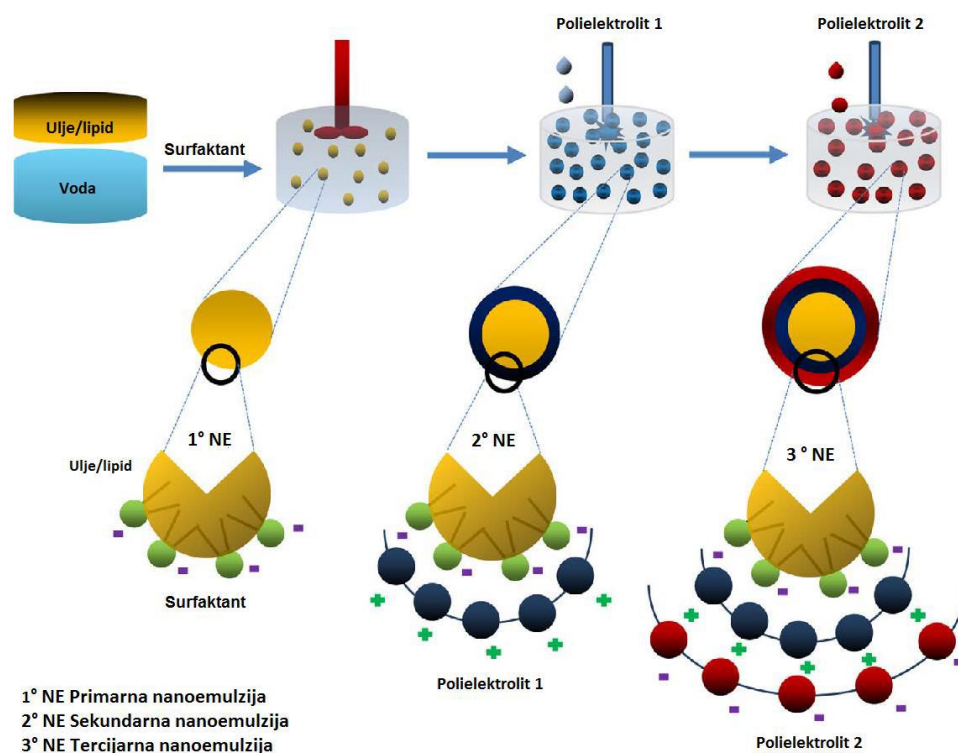
Tipična nanoemulzija sadrži ulje, vodu i površinski aktivne tvari (Gupta i sur., 2016). Dodatak površinski aktivnih tvari presudan je za stvaranje malih kapljica jer smanjuje međupovršinsku napetost između faza tj. između uljne i vodene faze emulzije. Ukoliko se smanji međupovršinska napetost, samim time se smanjuje i količina energija koja je potrebna za usitnjavanje kapi. Slika 1 prikazuje podjelu na tri tipa nanoemulzija: ulje u vodi (U/V) – uljna faza je raspršena u vodenoj fazi; voda u ulju (V/U) – vodena faza je raspršena u uljnoj fazi i višestruke emulzije (U/V/U ili V/U/V) gdje su mikro domene uljne i vodene faze međusobno raspršene unutar sustava.



Slika 1. Tipovi nanoemulzija.

Od navedenih, u razvoju oftalmičkih lijekova, najviše se istražuju nanoemulzije U/V tipa zbog mogućnosti miješanja sa suznim filmom nakon primjene. Oslobođena se uljna faza stapa s lipidnim slojem suznog filma, pri čemu neoslobođena frakcija djelatne tvari prisutna u uljnoj fazi služi kao depo. Oslobođene molekule površinski aktivnih tvari ulaze u interakciju s lipidnim slojem suznog filma i mucinima, čime se poboljšava močenje površine oka (Jurišić Dukovski, 2021).

Interakcija nanoemulzije s površinom oka ovisi i o naboju na površini kapljica te s obzirom na to razlikujemo neionske, anionske i kationske nanoemulzije. Postoji i nekoliko modifikacija: primarne, sekundarne i tercijarne nanoemulzije (slika 2). U primarnoj nanoemulziji, uljna faza dispergirana je u vodenoj fazi pomoću (ionske) površinski aktivne tvari, dok se u sekundarnoj nanoemulziji oko kapljica nalazi suprotno nabijeni polielektrolit. Tercijarna nanoemulzija je zapravo sekundarna nanoemulzija obložena suprotno nabijenim polielektrolitom ili polimerom (Rai i sur., 2018).



Slika 2. Shematski prikaz primarne, sekundarne i tercijarne nanoemulzije (preuzeto i prilagođeno prema Rai i sur., (2018) uz dopuštenje izdavača).

1.2 POMOĆNE TVARI U IZRADI NANOEMULZIJA

Odabir prikladnih pomoćnih tvari za izradu nanoemulzija je od velike važnosti s obzirom da pomoćne tvari ne smiju iritirati oko, ali u isto vrijeme moraju osigurati dobru topljivost djelatne tvari i odgovarajuću stabilnost formulacije kako bi nastale nanoemulzije željenih svojstava.

1.2.1 Uljna faza

U razvoju oftalmičkih nanoemulzija koriste se visokopročišćena ulja koja omogućuju podnošljivost pri primjeni na oko (Gan i sur., 2013). Lipidi ili ulja koji se koriste u izradi oftalmičkih nanoemulzija su navedeni u tablici 1. Općenito, 3-10% (*m/m*) lipida ili ulja dovoljno je za pripremu oftalmičkih nanoemulzija. Odabir vrste i udjela uljne faze uvelike ovisi o topljivosti djelatne tvari u odabranom ulju. Stoga je topljivost lijeka u lipidnoj ili uljnoj fazi jedno od važnih mjerila za odabir ulja ili lipida. Također, na svojstva nanoemulzija, u smislu razvoja i stabilnosti, uvelike utječu fizičko-kemijska svojstva odabranog ulja, tj. površinska napetost, viskoznost, gustoća i indeks loma. Ulja niske površinske napetosti i viskoznosti poznata su kao idealni kandidati za izradu nanoemulzija (Singh i sur., 2020).

Tablica 1. Sastavnice nanoemulzija (preuzeto i prilagođeno prema Singh i sur., (2020) uz dopuštenje izdavača).

Komponenta	Primjer	Svrha
Ulje/Lipid	ricinusovo ulje, Lipoid [®] S75, Lipoid [®] E80, trigliceridi srednje duljine lanca, lecitin iz žumanjka jajeta, Estasan [®] (kaprilni kaprinski triglicerid), vitamin E, etiloleat, Eutanol G, Lipoid [®] S100, Capmul [®] MCM, oleinska kiselina, triacetin, Miglyol [®] 812, izopropil miristat, Capryol [®] 90, ulje kikirikija, Dermol [®] M5, Epikuron [®] 200, sojino ulje, Lipoid [®] E-80, 1,2-di-(9Z-oktadecenoil)-3-trimetilamonijpropan (DOTAP), Phospholipon [®] 90H, Labrasol [®]	Povećanje topljivosti lipofilnog lijeka i uklapanje lijeka.

Površinski aktivna tvar	Pluronic [®] F68, poloksamer 188, Tween [®] 80, Tween [®] 40, Tween [®] 20, poloksamer 407, Span [®] 20, tiloksapol, Miranol [®] C2M, Soluphor P, Brij [®] 35	Smanjenje međupovršinske napetosti između dvije faze.
Kosurfaktanti	propilen glikol, polietilen glikol 400, glicerol, Transcutol [®] P (dietilen glikol monoetil eter), Cremophor [®] RH40, Cremophor [®] EL	Smanjenje koncentracije površinski aktivnih tvari.
Kationski agensi / konzervansi	Cetilpiridinijev klorid, benzalkonijev klorid, benzetonij klorid, cetrimid, cetalkonijev klorid, stearylamin, oleilamin, poli(etilenimin), poli(L-lizin), 1,2-di-(9Z-oktadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamin (DOPE), 1,2-di-(9Z-oktadecenoil)-3-trimetilamonijpropan (DOTAP)	Površinski naboj na kapljicama NE ovisi o ovim agensima; neki djeluju kao i konzervansi.
Tvari za izotonizaciju	manitol, sorbitol, glicerol, dekstroza, propilen glikol	Za postizanje odgovarajuće osmolalnosti.

1.2.2 Površinski aktivne tvari

Površinski aktivne tvari (PAT, surfaktanti) su organske molekule sa svojstvom površinske aktivnosti, koje, otopljene u tekućini, a osobito u vodi, smanjuju površinsku ili međupovršinsku napetost, prvenstveno adsorpcijom na međupovršini tekućina/plin ili na drugim međupovršinama. Adsorpcijom na površini uljna faza/vodena faza omogućuju nastanak nanoemulzije. Spadaju u amfipatske molekule zbog njihove specifične građe koja se sastoji od polarne (hidrofilne) glave, što u većini slučajeva osigurava topljivost u vodi, i nepolarnog (lipofilnog) repa, koji ima malu sklonost prema vodi. Zahvaljujući tome, omogućena je adsorpcija na međupovršini faza i time smanjenje međupovršinske napetosti između faza (Singh i sur., 2017).

Parametar koji opisuje polarnost površinski aktivne tvari je hidrofilni/lipofilni balans (engl. *Hydrophile-Lipophile Balance*, HLB) odnosno vrijednost koja označava odnos između hidrofilnih i lipofilnih dijelova unutar same molekule. HLB vrijednosti odgovaraju stupnju topljivosti određene površinski aktivne tvari u vodi ili ulju pa tako niža HLB vrijednost ukazuje na bolju topljivost u ulju, dok veće HLB vrijednosti ukazuju na bolju topljivost u vodi. Površinski aktivne tvari s niskim HLB vrijednostima (3-8) prikladniji su za V/U tip emulzija, a više vrijednosti HLB (10-18) su bolje za emulzije U/V tipa (Singh i sur., 2020). U tablici 1 su prikazane određene prikladne površinske aktivne tvari koje se koriste prilikom izrade nanoemulzija namijenjenih oftalmičkoj primjeni. Hidrofilni dio sadržava skupine koje mogu disocirati, polarne skupine ili nepolarne skupine sa elektronegativnim atomima (npr. dušikov atom u aminima ili kisikov atom u eterima). Ovisno o prisutnosti hidrofilnih skupina u molekuli, površinski aktivne tvari se kategoriziraju u anionske, kationske, neionske i amfoterne. Iako su neionske površinski aktivne tvari u prednosti zbog toga što ne uzrokuju iritacije, neosjetljive su na promjene ionske jakosti i pH sustava te ipak značajnu ulogu u izradi oftalmičkih nanoemulzija imaju upravo kationske površinski aktivne tvari (Qadir i sur., 2015).

1.2.3 Nositelji pozitivnog naboja

Priprava kationskih nanoemulzija za oftalmičku primjenu zahtijeva korištenje nositelja pozitivnog naboja, kao što su kationske površinski aktivne tvari, kationski lipidi ili polimeri (Lallemand i sur., 2012). Iako je cetalkonijev klorid jedini nositelj pozitivnog naboja u oftalmičkim nanoemulzijama koje su komercijalno dostupne, u literaturi se mogu pronaći i neki drugi kao npr. stearylamin, oleilamin, 1,2-di-(9Z-oktadecenoil)-3-trimetilamonijpropan (DOTAP) koji spadaju u skupinu kationskih lipida i kitozan, korišten za potrebe istraživanja ovog rada, kao prirodan polimer. Tablica 1 sažeto prikazuje najznačajnije kationske agense korištene za izradu kationskih nanoemulzija.

Kitozan je polisaharid koji se sastoji od monosaharida glukozamina i N-acetilglukozamina, a dobiva se deacetilacijom hitina. Mukoadhezivna svojstva se pripisuju pozitivnom naboju kitozana, no osim toga procesu mukoadhezije pridonose i vodikove veze te hidrofobne interakcije (Jurišić Dukovski, 2021). Zahvaljujući elektrostatskom odbijanju kitozan sprječava koalescenciju te ujedno na površini kapljica stvara nepropustan film koji sprječava rast kapljica mehanizmom Ostwaldovog zrenja i time pridonosi stabilnosti nanoemulzija (Chiappisi i Gradzielski, 2015). Kitozan se smješta na površini negativno

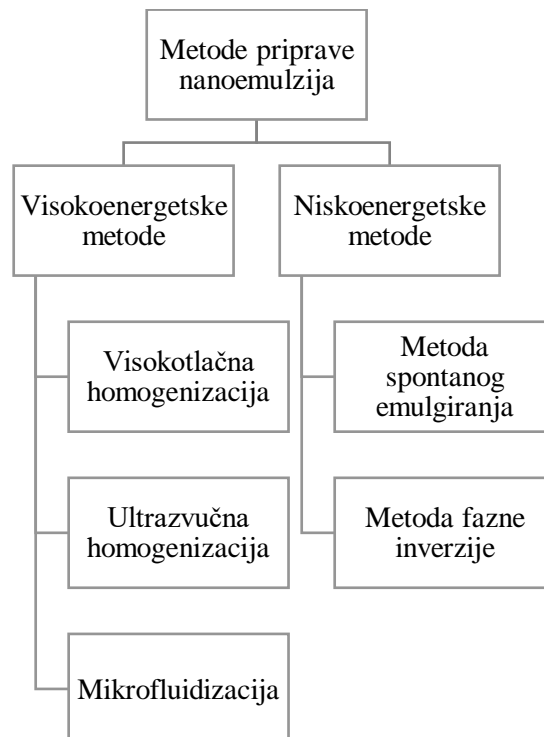
nabijenih uljnih kapljica koje tada poprimaju pozitivan naboj te nastaje sekundarna kationska nanoemulzija (Rai i sur., 2018).

1.3 METODE IZRADE NANOEMULZIJA

Način izrade je iznimno važan za stabilnost nanoemulzija, a dobivanje željene veličine kapljica disperzne faze uvelike ovisi o opremi, uvjetima izrade (npr. temperatura i vrijeme) te ujedno o svojstvima i sastavu uzorka. Kako bi došlo do nastanka nanoemulzija potrebno je sustavu dovesti energiju. Ovisno o izvoru energije razlikujemo visokoenergetske i niskoenergetske metode (Gupta i sur., 2016).

Visokoenergetske metode zahtijevaju energiju iz nekog vanjskog izvora tj. mehaničkih uređaja poput mikrofluidizatora, visokotlačnog homogenizatora ili ultrasonikatora jer oni mogu generirati snažnu silu koja je potrebna za stvaranje vrlo sitnih kapljica.

Niskoenergetske metode stvaraju manje kapljice uslijed promjena u sastavu ili temperaturi tj. iskorištavaju energiju koja potječe od kemijskog potencijala pohranjenog u sustavu, a uključuju spontanu emulgaciju i metodu fazne inverzije (Gupta i sur., 2016).

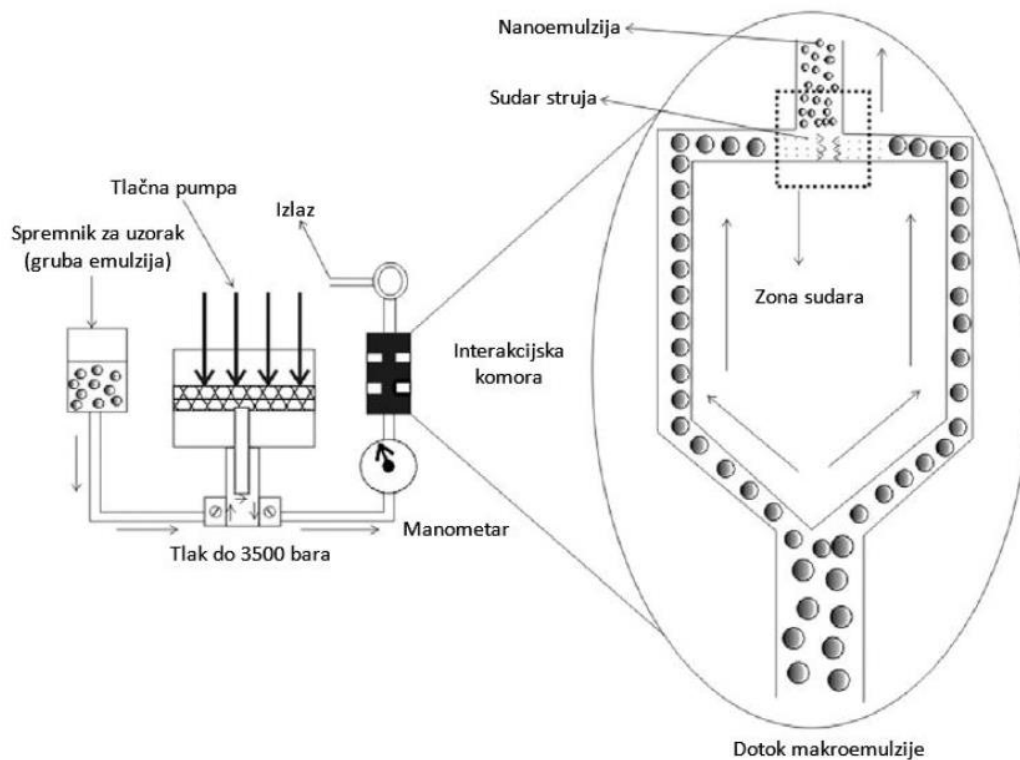


Slika 3. Shematski prikaz metoda pripreme nanoemulzija.

1.3.1 Visokoenergetske metode

Visokoenergetske metode ovise o mehaničkim uređajima koji su u mogućnosti proizvesti snažne sile za smanjenje veličine čestica. Najčešće korišteni uređaji su visokotlačni homogenizatori, ultrasonikatori i mikrofluidizatori. Prednost leži u činjenici da gotovo svako ulje može biti podvrgnuto nanoemulzifikaciji dok je nedostatak visoka cijena uređaja te nemogućnost uklapanja termolabilnih djelatnih tvari zbog zagrijavanja sustava tijekom izrade. Kod korištenja visokoenergetskih metoda prvi korak je izrada grube emulzije uz pomoć visokoturažne mješalice. Takvu emulziju potom obrađujemo visokoenergetskim uređajima.

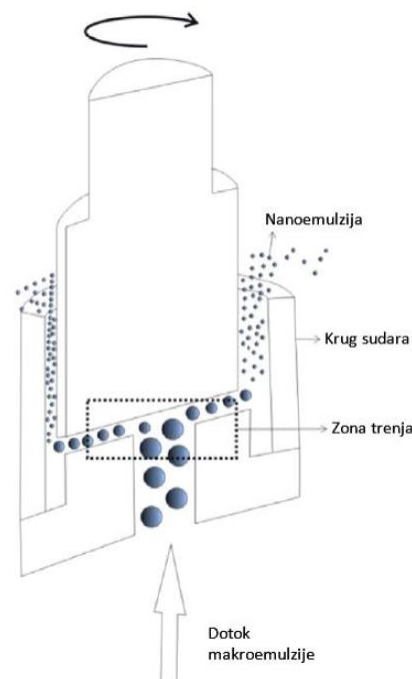
Mikrofluidizator se sastoji od interakcijske komore u kojoj se nalazi sustav mikrokanala kroz koje se propušta gruba emulzija pod visokim tlakom te zbog sudara struja formulacije usmjerenih jedne prema drugoj, dolazi do smanjenja veličine kapljica (Singh i sur., 2017).



Slika 4. Princip rada mikrofluidizatora (preuzeto i prilagođeno prema Singh i sur., (2017) uz dopuštenje izdavača).

Prvi korak je ulijevanje grube emulzije u ulazni spremnik. Tijekom usisavanja, pumpa mikrofluidizatora vuče uzorak iz ulaznog spremnika u tlačnu komoru kroz jednosmjerni (nepovratni) ventil. Zatim slijedi period snažnog potiska za vrijeme kojeg je uzorak izložen konstantnoj razini tlaka. Stlačeni uzorak ulazi u interakcijsku komoru gdje prolazi vrlo uskim mikrokanalima stalnih dimenzija pri čemu dolazi do ubrzanja protoka uzorka do brzine vrlo visokih vrijednosti. Nakon izlaska iz interakcijske komore uzorak se dalje procesira i prolazi kroz pomoćne module za obradu. Uzorak izlazi kroz izmjenjivač i potom recirkulira natrag u spremnik dok se ne postigne zadovoljavajuća veličina kapljica i polidisperznost, ponekad i do 100 ciklusa, ili se sakuplja završni uzorak (Mahdi Jafari i sur., 2006).

Visokotlačni homogenizatori rade na principu koloidnog mlina gdje gruba emulzija prolazi kroz uzak otvor između statora i rotora pri čemu dolazi do smanjenja kapljica pod utjecajem sile smicanja. Kao i kod mikrofluidizatora, proces se ponavlja do zadovoljavajuće veličine kapljica (Gupta i sur., 2016). Međutim, visokotlačna homogenizacija jest energetski vrlo zahtjevan proces, a mljevenje može biti vrlo dugotrajno te uvijek postoji opasnost od kontaminacije uzorka. Isto tako, iako visokotlačni homogenizatori ne proizvode pretjeranu količinu topline, osobito temperaturno osjetljivi uzorci bi mogli zahtijevati dodatne metode hlađenja čime bi se produžilo vrijeme obrade i troškovi.

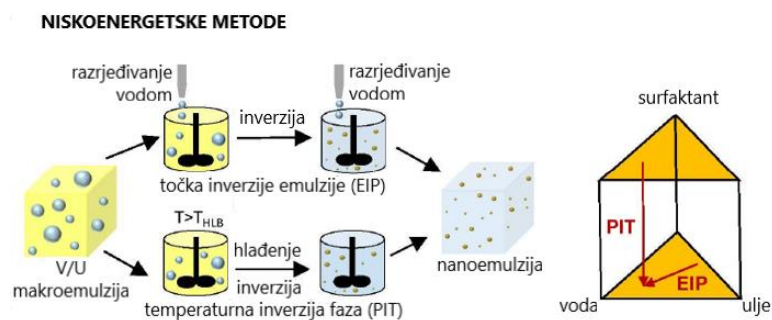


Slika 5. Princip rada visokotlačnog homogenizatora (preuzeto i prilagođeno prema Singh i sur., (2017) uz dopuštenje izdavača).

Ultrasonikator se sastoji od piezoelektrične sonde čiji se rad temelji na stvaranju visokoenergetskih valova frekvencija iznad 20 kHz. Ultrazvučni valovi potom stvaraju kavitacijske mjehuriće koji rastu te implozijom uzrokuju smanjenje veličine kapljica unutarnje faze. U usporedbi s drugim visokoenergetskim metodama, ultrazvučna homogenizacija zahtijeva najmanje energije, ali nedostatak je što njenom primjenom može doći do kontaminacije uzorka usred uranjanja sonde (Singh i sur., 2017).

1.3.2 Niskoenergetske metode

Glavna prednost ovakvih metoda je to što ne zahtijevaju skupe uređaje, tj. koristi se puno jednostavnija oprema uz značajno manji utrošak energije što omogućuje uklapanje termolabilnih tvari zbog niže radne temperature. Niskoenergetske metode iskorištavaju unutarnja fizičko-kemijska svojstva komponenata kako bi generirale emulzije odgovarajućih veličina kapljica (Gupta i sur., 2016). Temelj ovih metoda je mijenjanje temperature i sastava kojima posljedično utječemo na HLB vrijednost sustava. Nedostatak je uski spektar površinski aktivnih tvari i ulja koji se mogu upotrebljavati u izradi. Razlikujemo dvije metode: metoda spontanog emulgiranja i metoda fazne inverzije.



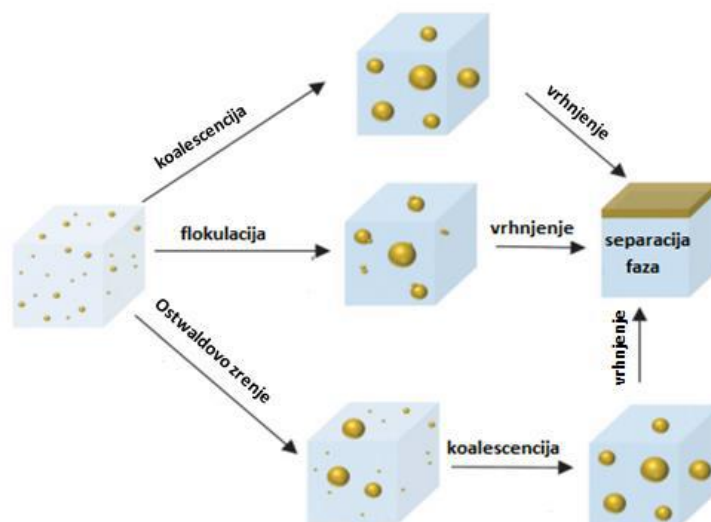
Slika 6. Shematski prikaz izrade nanoemulzija niskoenerskim metodama (preuzeto i prilagođeno iz (Gupta i sur., 2016)).

Metoda spontanog emulgiranja (engl. *Emulsion Inversion Point*, EIP) obuhvaća pripremu dviju faza, jednu vodenu i jednu uljnu (u uljnu je potrebno dodati i vodotopljivo organsko otapalo). Uljna faza se u tankom mlazu dodaje vodenoj fazi pri čemu dolazi do difuzije organskog otapala u vodenu fazu. Rezultat su sitne kapljice uljne faze prekrivene molekulama površinski aktivnih tvari. Također je moguće i dodavanje vodene faze u uljnu fazu. Ukoliko je potrebno izraditi vrlo male kapljice onda je važno dodati puno veći udio organskog otapala (Singh i sur., 2017).

Metoda fazne inverzije (engl. *Phase Inversion Temperature*, PIT) temelji se na surfaktantima osjetljivima na temperaturu koji imaju specifično svojstvo da mijenjaju topljivost u vodi odnosno ulju ovisno o temperaturi sustava. Nakon kritične PIT dolazi do inverzije faza te lipofilni surfaktant daje V/U emulziju. Naglim hlađenjem dobivamo U/V nanoemulziju s niskim indeksom polidisperznosti tj. uske raspodjele veličina kapljica. Isti postupak se može primijeniti i za pripravu V/U nanoemulzija. Uklapanje termolabilnih lijekova je ograničeno s obzirom da je ovakvim sustavima potrebno dovođenje topline (Izquierdo i sur., 2002).

1.4 STABILNOST NANOEMULZIJA

Stabilnost je sposobnost sustava da ne mijenja svoja svojstva tijekom vremena ili pod utjecajem neke vanjske sile. Nanoemulzije posjeduju visoku kinetičku stabilnost zahvaljujući maloj veličini kapljica i zbog toga prikazuju otpornost prema mehanizmima destabilizacije kao što su sedimentacija, vrhnjenje, flokulacija i koalescencija, prikazani na slici 7 (Gupta i sur., 2016). Kolizija kapljica dovodi do flokulacije, ukoliko se flokulirane kapljice sjedine uslijed pucanja filma na granici faza, doći će do koalescencije odnosno povećanja veličine kapljica što je ireverzibilan proces destabilizacije. Flokulacija i vrhnjenje su reverzibilni procesi jer se mijenja samo distribucija kapljica, a ne i njihova veličina i broj. Mala veličina kapljica pridonosi stabilnosti nanoemulzija jer su Brownovo gibanje i posljedično brzina difuzije veće od brzine sedimentacije ili vrhnjenja.



Slika 7. Mehanizmi destabilizacije nanoemulzija (preuzeto i prilagođeno iz (Gupta i sur., 2016)).

Ostwaldovo zrenje predstavlja glavni problem nanoemulzijskih sustava, dok flokulacija i koalescencija dobivaju na značaju tek nakon rasta primarnih kapljica. Karakteristika Ostwaldovog zrenja je rast većih kapljica emulzije na račun manjih zbog razlike u kemijskom potencijalu. Manje kapljice imaju veći potencijal od potencijala većih kapljica i zato dolazi do prijenosa mase što uzrokuje povećavanje većih kapljica, a smanjivanje manjih (Gupta i sur., 2016). Zato je prilikom karakterizacije nanoemulzija bitan parametar indeks polidisperznosti koji što je manji to znači da je uža raspodjela veličine kapljica i samim time imamo sustav koji je otporniji na Ostwaldovo zrenje (Klang i Valenta, 2011). Brzina Ostwaldova zrenja u U/V emulzijama izravno je proporcionalna topljivosti ulja u vodenoj fazi (Singh i sur., 2020). Ostwaldovo zrenje se može smanjiti dodavanjem u sustav male količine drugog ulja niske topljivosti u vodenoj fazi te će tako stvoriti kinetičku barijeru Ostwaldowom zrenju (Solans i sur., 2005).

1.5 KARAKTERIZACIJA NANOEMULZIJA

Uobičajeni vid karakterizacije obuhvaća vizualan izgled, transparentnost, termodinamičku stabilnost, veličinu i raspodjelu veličina kapljica disperzne faze, zeta-potencijal, indeks loma svjetlosti, površinsku napetost, reološka svojstva, pH i osmolalnost pri čemu će od svega navedenog biti pobliže objašnjena svojstva istraživana u ovom radu, a to su: veličina čestica, indeks polidisperznosti te zeta-potencijal.

1.5.1 Veličina i raspodjela veličina kapljica disperzne faze

Prosječna veličina kapljica disperzne faze nanoemulzije najčešće se određuje dinamičkim raspršivanjem svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS). Drugi naziv te tehnike je fotonska korelacijska spektroskopija (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS). Tehnika se temelji na Brownovom gibanju kapljica koje je definirano kao slučajno kretanje čestica uslijed sudaranja s molekulama otapala koje ih okružuju. Smanjenjem veličine čestica Brownovo gibanje je brže. Uzorak nanoemulzije obasjava se laserom, pri čemu se svjetlost raspršuje na kapljicama disperzne faze nanoemulzije. Kod kapljica koje se gibaju brže veće su fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti. Uređaj mjeri fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti te na temelju toga, pomoću Stokes-Einsteinove jednadžbe, izračunava veličinu kapljica (Qadir i sur., 2015).

Uz veličinu kapljica određuje se i indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI), a koji predstavlja omjer standardne devijacije i prosječne veličine čestica. Vrijednosti PDI manje od 0,1 ukazuje na monodisperzne, a blizu 1 na polidisperzne sustave (Singh i sur., 2020).

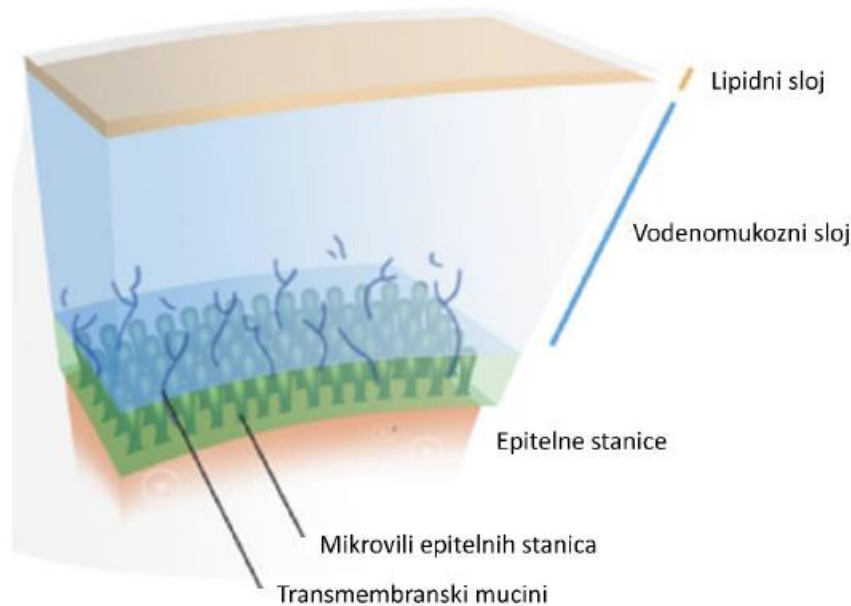
Na prosječnu veličinu kapljica disperzne faze značajan utjecaj imaju vrsta i udio ulja u nanoemulziji te vrsta površinski aktivne tvari (Tayel i sur., 2013). Nadalje, veličina kapljica disperzne faze i PDI vrijednosti nanoemulzija kontinuirano se smanjuju s povećanjem udjela površinski aktivne tvari (Zhang i sur., 2020). Smanjenje veličine kapljica posljedica je povećanja broja molekula površinski aktivne tvari na međupovršini dviju faza što smanjuje međupovršinsku napetost (Saber i sur., 2013).

1.5.2 Zeta-potencijal

Zeta-potencijal je potencijal smješten na plohi smicanja između električnog dvosloja kapljice i okolnog medija te ima važnu ulogu u formuliranju nanoemulzija za oftalmičku primjenu. Ne samo da omogućuje zadržavanje formulacije na mjestu primjene već o njemu ovisi i stabilnost nanoemulzija (Jurišić Dukovski, 2021). Nanoemulzije stabilizirane površinski aktivnim tvarima male molekulske mase zahtijevaju apsolutnu vrijednost zeta potencijala minimalno 30 mV za osiguravanje zadovoljavajuće elektrostatska stabilizacija sustava. Suprotno tome, nanoemulzije stabilizirane površinski aktivnim tvarima veće molekulske mase, koje sustavu pružaju dostatnu steričku stabilizaciju, apsolutna vrijednost zeta-potencijala može biti i manja (Rai i sur., 2018).

1.6 BOLEST SUHOG OKA

Stabilan preokularni suzni film znak je zdravlja oka jer štiti i vlaži rožnicu te tvori primarnu površinu koja lomi svjetlost koja ulazi u vidni sustav (Willcox i sur., 2017). Predložen je dvoslojni model suznog filma: (i) vodenomukozni sloj gela koji čini glavninu debljine suznog filma i u izravnom je kontaktu s epitelom rožnice, i (ii) vrlo tanki lipidni sloj koji prekriva vodenomukozni sloj i kod otvorenog oka u izravnom je kontaktu sa zrakom (slika 8).



Slika 8. Struktura suznog filma (<https://www.hydrelo.com/hydrelo-allergy>).

Međunarodna radna skupina za bolest suhog oka (engl. *International Dry Eye WorkShop*, DEWS) definirala je bolest suhog oka kao multifaktorijalnu bolest suza i površine oka koja rezultira simptomima neugode, poremećaja vida te nestabilnosti suznog filma, s mogućim oštećenjem površine (Craig i sur., 2017). Popraćena je povišenom osmolarnošću suznog filma te upalom površine oka (Willcox i sur., 2017).

Razlikujemo dva oblika bolesti suhog oka, a to su hiperevaporacijski oblik koji je karakteriziran poremećajem lučenja lipidnog dijela suznog filma te hiposekrecijski oblik definiran kao poremećaj lučenja vodenog dijela suznog filma.

Hiposekrecijski oblik (engl. *Aqueous-Deficient Dry Eye*, ADDE) je uzrokovan smanjenim lučenjem suza, a može se dalje podijeliti u dvije podskupine: Sjögrenov sindrom (SS) i stanja bez Sjögrenovog sindroma (ne-SS). Sjögrenov sindrom je autoimuna bolest u kojoj se aktivirani T limfociti infiltriraju u suzne žlijezde i žlijezde slinovnice uzrokujući disfunkciju. Klinički, pacijenti imaju simptome i suhog oka i suhih usta (kserostomija). Ne-SS suho oko može se podijeliti u četiri kategorije: primarni i sekundarni nedostaci suznih žlijezdi, opstrukcija kanala suznih žlijezdi i refleksna hiposekrecija.

Hiperevaporacijski oblik (engl. *Evaporative Dry Eye*, EDE) je karakteriziran patološki visokom razinom isparavanja suza i može biti uzrokovan unutarnjim uvjetima koji utječu na strukturu ili dinamiku očnih vjeđa, ili čimbenicima izloženosti vanjskim uvjetima (okoliš). Unutarnji uzroci obuhvaćaju bilo koja stanja koja ugrožavaju namještanje očnih vjeđa ili smanjuju brzinu treptanja što dovodi do brzog isparavanja, npr. gledanje televizije, čitanje, rad na računaru. Nasuprot tome, okolišni čimbenici djeluju izravno na vanjsku površinu: centralno grijanje, suha klima, onečišćenje zraka, vjetar, nošenje kontaktnih leća.

Bolest suhog oka (engl. *Dry eye disease*, DED) pogađa milijune ljudi širom svijeta sa značajnim utjecajem na kvalitetu života. Negativan utjecaj na funkciju vida pacijenata otežava obavljanje dnevnih vizualnih zadataka što rezultira psihološkim komorbiditetima, osjetljivošću rožnice na infekcije te, u najgorem slučaju, mogućim trajnim gubitkom vida. U Europi je zabilježena prevalencija DED-a od 11,0% u Španjolskoj do 29,6% u Francuskoj. Općenito je češći u azijata nego u bijelaca što objašnjava prevalenciju od 52,4% u Kini. Iako je DED karakterističan za starije populacije (prevalencija raste linearno s dobi), u zadnje vrijeme je sve češća pojava DED-a kod mlađih pacijenata zbog velikog porasta uporabe digitalnih uređaja. Osim navedenog, DED mogu uzrokovati različiti lijekovi, kirurški postupci ili pak korištenje kontaktnih leća. Stoga je potreba za razvojem novih, učinkovitih lijekova za liječenje DED-a veća nego ikad.

1.7 PREDNOSTI NANOEMULZIJA U LIJEČENJU BOLESTI SUHOG OKA

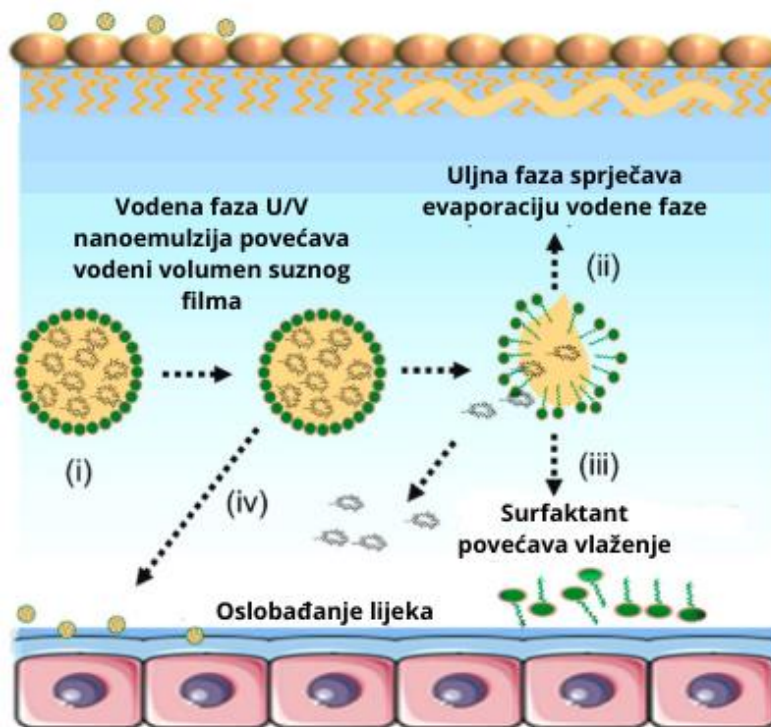
Trenutno su glavne terapijske mogućnosti u liječenju suhog oka su nadomještanje suznog filma, stimulacija stvaranja suza i topikalni protuupalni lijekovi. Nadomještanje suznog filma postiže se primjenom umjetnih suza u obliku kapi za oko. Najzastupljenija je sastavnica u takvim kapima za oko voda s različitim sredstvima za povećanje viskoznosti koja imaju ulogu lubrikacije i produljenja zadržavanja proizvoda na površini oka. U novije se vrijeme u topikalne oftalmičke lubrikante uklapaju različiti lipidi (npr. mineralna ulja i fosfolipidi) s ciljem obnove lipidnog sloja suznog filma.

Većina protuupalnih djelatnih tvari (glukokortikoidi, ibuprofen, takrolimus) je slabo topljiva u vodi što otežava njihovo oblikovanje u konvencionalni farmaceutski oblik kapi za oko. Uklapanje slabo topljivih djelatnih tvari u U/V nanoemulzije koje zbog svoje strukture i sastava mogu imati i učinak nadomještanja i stabilizacije suznog filma, predstavlja značajan iskorak u liječenju bolesti suhog oka (Sahoo i sur., 2008). Poseban potencijal imaju kationske nanoemulzije, zbog dobrih svojstava širenja po površini oka pri primjeni te produljenom zadržavanju na površini oka.



Slika 9. Prikaz širenja oftalmičkih nanoemulzija na površini oka (preuzeto i prilagođeno prema Singh i sur., (2020) uz dopuštenje izdavača).

Pojednostavljeni prikaz širenja po površini oka nanoemulzija nakon njihove primjene u oko prikazan je na slici 9. Povoljna svojstva širenja po površini oko te svojstvo produljenog zadržavanja, kationskim nanoemulzijama osigurava elektrostatska interakcija s negativno nabijenim mucinima prisutnim u vodenomukoznom sloju. Ta pojava naziva se mukoadhezija, a podijeljena je u dvije faze (Singh i Rana, 2012). U prvoj fazi uspostavlja se kontakt između mukoadhezivne formulacije i površine oka, pri čemu ključnu ulogu igraju sposobnost širenja formulacije po površini oka i međupovršinske sile. Druga faza mukoadhezije je faza integracije, kod koje dolazi do stvaranja fizičkih petlji i sekundarnih kemijskih veza između mukoadhezivnog materijala i mucina (Jurišić Dukovski, 2021). Prema dosadašnjem shvaćanju, nanoemulzije se destabiliziraju pri miješanju sa suznim filmom; uljne kapljice se udružuju i stapaju s lipidnim slojem suznog filma, dok se površinski aktivne tvari vežu za vodenomukozni sloj (slika 10).



Slika 10. Interakcije između suznog filma i U/V nanoemulzija (preuzeto i prilagođeno prema Singh i sur., (2020) uz dopuštenje izdavača).

Tijekom protekla dva desetljeća, nanoemulzije su detaljno ispitane u smislu strategije poboljšanja biorasploživosti ciklosporina A u oku nakon topikalne oftalmičke primjene što je rezultiralo odobrenjem tri lijeka, prikazana u tablici 2, za liječenje bolesti suhog oka.

Prva oftalmološka nanoemulzija na tržištu bila je Restasis® (Allergan) indicirano dva puta dnevno za liječenje bolesti suhog oka, odobrena 2002. od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA). Restasis® je anionska U/V nanoemulzija s uklopljenim ciklosporinom A bez konzervansa i ricinusovim uljem emulgiranim i stabiliziranim pomoću polisorbata 80 i kopolimera karbomera.

Lacrinmune® ima sličan sastav kao Restasis® samo što još u svojoj formulaciji sadržava natrijev hijaluronat koji djeluje tako da povećava viskoznost pripravka i na taj način produljuje vrijeme zadržavanja lijeka na površini oka.

Godine 2015. lansiran je Ikervis® (Santen), kationska nanoemulzija triglicerida srednje duljine lanca emulgiranih i stabiliziranih pomoću tiloksapola, poloksamera 188 i cetalkonijevog klorida, koji se primjenjuje jednom dnevno (Bazán Henostroza i sur., 2020). Odobren je od strane Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA), a temelji se na Novasorb® tehnologiji. Tehnologija podrazumijeva upotrebu amonijev cetalkonijev klorida, alkilnog derivat benzalkonijevog klorida, koji nema ulogu konzervansa već osigurava pozitivan naboj na površini uljnih kapljica nanoemulzije.

Tablica 2. Nanoemulzije odobrene za liječenje bolesti suhog oka.

Skupina	Naziv lijeka	Djelatna tvar	Farmaceutski oblik	Nositelj odobrenja
Imunomodulatori	Restasis®	ciklosporin A (0,05 %)	kapi za oko/nanoemulzija	Allergan
	Lacrinmune®	ciklosporin A (0,05 %)	kapi za oko/nanoemulzija	Bausch & Lomb
	Ikervis®	ciklosporin A (0,1 %)	kapi za oko/nanoemulzija	Santen

Navedeni lijekovi, u farmaceutskom obliku kapi za oko, kao djelatnu tvar sadrže ciklosporin A, a odobreni su za liječenje umjerenih do teških oblika bolesti suhog oka. Nastup djelovanja kod topikalne oftalmičke primjene ciklosporina A značajno je odgođen, čak i do 3 mjeseca od početka liječenja, što može negativno utjecati na adherenciju pacijenata, stoga se u nekim slučajevima preporučuje početna kombinirana terapija ciklosporinom A i topikalnim glukokortikoidima, s ciljem ubrzanja nastupa protuupalnog učinka i olakšanja simptoma (Jurišić Dukovski, 2021).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Bolest suhog oka je bolest koja ozbiljno narušava kvalitetu života oboljelih, a ukoliko se ne liječi može dovesti i do sljepoće. U današnje vrijeme bolest zahvaća velik dio svjetskog stanovništva te sve veći udio mlađe populacije, zbog velikog porasta uporabe digitalnih uređaja. Odobreni lijekovi s ciklosporin A koriste se u liječenje umjerenih i težih oblika bolesti, ali uz odgođeni nastup djelovanja do tri mjeseca od početka terapije. Iz sveg navedenog razvidna je potreba razvoja lijekova za liječenje blagog do umjerenog oblika bolesti uz brže postizanje učinka.

Topikalni glukokortikoid loteprednol etabonat ima veliki potencijal učinkovitog liječenja i ublažavanja simptoma blažeg odnosno umjerenog oblika bolesti suhog oka. Lijek Eysuvis (0,25 % loteprednol etabonata) odobren je 2020. godine od strane FDA u farmaceutskom obliku kapi za oko, suspenzija. Loteprednol etabonat je slabo topljiv u vodi i njegova kristalna priroda predstavlja izazov u razvoju inovativnog farmaceutskog oblika za topikalnu oftalmičku primjenu.

Cilj diplomskog rada je razvoj sekundarne kationske U/V nanoemulzije prikladne za uklapanje djelatne tvari loteprednol etabonata. Kao uljna faza odabran je Capryol[®] 90, propilenglikol monokaprilat, u kojem prema dostupnim podacima loteprednol etabonat ima zadovoljavajuću topljivost. Kao nosač pozitivnog naboja odabran je kitozan niskomolekulske mase, a kao anionska površinski aktivna tvar, nositelj naboja primarne nanoemulzije, odabran je lecitin. Kako bi se postigla zadovoljavajuća stabilnost nanoemulzija s lecitinom potrebno je u formulaciju dodati i neionske površinski aktivne tvari, a u ovom radu odabrani su u tu svrhu polisorbit 80, tiloksapol i makrogol 15 hidrosistearat (Kolliphor[®] HS 15). Kao metoda pripreme odabrana je visokoenergetska metoda mikrofluidizacije. Pripravljen je niz formulacija s različitim udjelima površinski aktivnih tvari te kitozana, a pripravljenim nanoemulzijama određena je veličina kapljica, indeks polidisperznosti te zeta-potencijal.

Specifični ciljevi diplomskog rada bili su:

- Pripraviti U/V nanoemulzije visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije;
- Ispitati utjecaj vrste i udjela odabranih neionskih površinski aktivnih tvari na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal pripravljenih nanoemulzija;
- Ispitati utjecaj različitih vrsta lecitina na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal pripravljenih nanoemulzija;

- Ispitati utjecaj niskomolekulskog kitozana na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal pripremljenih nanoemulzija;
- Ispitati stabilnost pripremljenih nanoemulzija s obzirom na različite udjele sastavnica.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

Za pripravu U/V nanoemulzija korišten je propilenglikol monokaprilat (Capryol 90[®], Gattefosse, Francuska), polisorbat 80 (Tween[®] 80) (Kemig, Zagreb, Hrvatska), tiloksapol (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka); makrogol 15 hidrosistearat (Kolliphor[®] HS 15, BASF, Ludwigshafen, Njemačka), lecitini (Lipoid[®] S45, Lipoid[®] S75, Lipoid[®] S100, Ludwigshafen, Njemačka), kitozan male molekulske mase (50-190 kDa, stupanj deacetilacije 75-85 %, viskoznost vodene otopine (1 %) u octenoj kiselini (1 %) 20-300 mPas, Sigma-Aldrich) te ultra čista voda kao vanjska faza.

3.2 METODE

3.2.1 Izrada nanoemulzija

Razvoj formulacije nanoemulzije proveden je u tri faze. U prvoj fazi proveden je probir neionskih površinskih aktivnih tvari. Pripravljeno je 15 formulacija U/V nanoemulzija s tri različite neionske površinski aktivne tvari (polisorbat 80, tiloksapol i makrogol 15 hidrosistearat) u 5 različitih udjela kako bi se odredilo koja površinski aktivna tvar i u kojem udjelu daje nanoemulziju optimalnih svojstava i stabilnosti. Određena količina površinski aktivne tvari odvaže se u staklenu čašu te se potom doda odgovarajuća odvaga ultračiste vode. Smjesa se prekrije parafilmom kako bi se spriječila kontaminacija česticama prašine te se potom stavi na magnetsku miješalicu zajedno sa malim magnetnim mješačem pri sobnoj temperaturi. Nakon potpunog otapanja površinski aktivne tvari, otopini se dodaje prethodno odvagana količina Capryola[®] 90, ponovno se vraća na magnetsku miješalicu te miješa pri sobnoj temperaturi i brzini miješanja od 500 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm) tijekom 15 minuta. Postupak je ponovljen za svaku površinski aktivnu tvar pet puta pri čemu je udio površinski aktivne tvari iznosio 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1% i 2,5% (*m/m*), a udio Capryola[®] 90 5% (*m/m*). Nakon tog slijedi homogenizacija na visokoturažnoj miješalici Ultra-Turrax (IKA[®]-Werke GmbH & Co, Njemačka) brzinom od 5000 rpm tijekom 5 minuta. Dobivena gruba emulzija je dalje obrađena propuštanjem kroz mikrofluidizator (Model LM20 Microfluidizer[®], Microfluidics, Newton MA, SAD) pod tlakom od 1000 bara i deset ciklusa. Pripravljene nanoemulzije pohranjene su u staklene spremnike te su čuvane u hladnjaku pri +4°C. Sastav formulacija je detaljno prikazan u tablici 3.

Tablica 3. Sastav izrađenih nanoemulzija u prvoj fazi razvoja formulacije.

Formulacija	Sastavnice (% <i>m/m</i>)			
	Capryol® 90	polisorbat 80	tiloksapol	makrogol 15 hidroksistearat
polisorbat 80 1 – 5	5	0,10	-	-
		0,25	-	-
		0,50	-	-
		1,00	-	-
		2,50	-	-
tiloksapol 1 – 5	5	-	0,10	-
		-	0,25	-
		-	0,50	-
		-	1,00	-
		-	2,50	-
makrogol 15 hidroksistearat 1 – 5	5	-	-	0,10
		-	-	0,25
		-	-	0,50
		-	-	1,00
		-	-	2,50

Nakon određivanja veličine čestica, indeksa polidisperznosti, zeta-potencijala i stabilnosti prikazanih nanoemulzija u tablici 3, tri nanoemulzije najboljih svojstava su izabrane za sljedeću fazu razvoja koja je obuhvaćala dodavanje lecitina kao nositelja negativnog naboja. Prije početka druge faze, proveden je probir tipova lecitina kako bi se odlučilo koji je od početna tri najkompatibilniji i najbolje odgovara našim zahtjevima za stvaranjem nanoemulzija odgovarajuće veličine čestica, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala. Pripravljene formulacije su prikazane u tablici 4.

Tablica 4. Sastav nanoemulzija prilikom probira vrste lecitina.

Formulacija	Sastav formulacije (% <i>m/m</i>)				
	Capryol [®] 90	makrogol 15 hidroksistearat	Lipoid [®] S45	Lipoid [®] S75	Lipoid [®] S100
makrogol 15 hidroksistearat - 1	5	0,1	-	-	-
makrogol 15 hidroksistearat - 2			0,25	-	-
makrogol 15 hidroksistearat - 3			-	0,25	-
makrogol 15 hidroksistearat - 4			-	-	0,25

Nakon izvršenog probira lecitina, zaključeno je da je Lipoid[®] S75 najprikladniji oblik lecitina te se s njime dalje išlo u izradu nanoemulzija. Prvi korak druge faze razvoja je odvaga lecitina Lipoid[®] S75 i Capryola[®] 90 koji se pomiješaju i stave na magnetsku miješalicu pri 450 rpm do sljedećeg dana tj. dok ne dobijemo potpuno homogenu smjesu. U ultračistu vodu doda se određena količina neionske površinski aktivne tvari i miješa na magnetnoj miješalici do otapanja. Vodena faza se dodaje u uljnu fazu te se obradi koristeći Ultra-Turrax brzinom od 5000 rpm u trajanju od 5 minuta. Tako dobivene grube emulzije se obrađuju mikrofluidizatorom u deset ciklusa pri tlaku od 1000 bara.

Tablica 5. Sastav izrađenih nanoemulzija u drugoj fazi razvoja formulacije.

Formulacija	Sastavnice (% <i>m/m</i>)			
	Capryol [®] 90	polisorbat 80	makrogol 15 hidroksistearat	Lipoid [®] S75
polisorbat 80 1 – 3	5	0,50	-	0,10
				0,25
				0,50
makrogol 15 hidroksistearat 1 – 3	5	-	0,10	0,10
				0,25
				0,50
makrogol 15 hidroksistearat 1 – 3	5	-	0,25	0,10
				0,25
				0,50

Dobivenim nanoemulzijama sastava prikazanog u tablici 5 se ponovno određuje veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal. Nanoemulzija s udjelom makrogol 15 hidroksistearata od 0,25% (*m/m*) i udjelom Lipoida® S75 od 0,1% (*m/m*) je nanoemulzija najboljih svojstava te je iz tog razloga izabrana za treću fazu razvoja koja je uključivala dodatak niskomolekulskog kitozana kao nositelja pozitivnog naboja.

Kao što je već navedeno, treća faza razvoja nanoemulzija je obuhvaćala dodavanje kitozana na način da su krajnje koncentracije otopina 0,01%, 0,025% i 0,05% (*m/m*). Točan sastav je prikazan u tablici 6. Niskomolekulski kitozan (engl. *low molecular weight*, LMW) je dobro topljiv u vodi pri pH nižem od 6. Iz tog razloga ne možemo dodati direktno u vodenu fazu nego je prvo potrebno napraviti 1%-tnu otopinu kitozana u 1%-tnoj octenoj kiselini. Potom je pripravljena otopina kitozana 1% (*m/m*) dodana u vodenu fazu (otopinu makrogol 15 hidroksistearata u pročišćenoj vodi) na samom početku pripreve, prije dodatka uljne faze i obrade na visokoturažnoj miješalici (5000 rpm, 5 minuta) te mikrofluidizatoru (1000 bara, 10 ciklusa) (Jurišić Dukovski, 2021). Sve izrađene nanoemulzije čuvane su u hladnjaku pri +4 °C.

Tablica 6. Sastav izrađenih nanoemulzija u trećoj fazi razvoja formulacije.

Formulacija	Sastavnice (% <i>m/m</i>)			
	Capryol® 90	makrogol 15 hidroksistearat	Lipoid® S75	Kitozan LMW
makrogol 15 hidroksistearat 1 – 3	5	0,25	0,10	0,010
				0,025
				0,050

3.2.2 Određivanje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti

Prosječna veličina kapljica i indeks polidisperznosti (engl. *Polydispersity index*, PDI) određeni su tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti korištenjem uređaja Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Malvern, UK) u jednokratnim polistirenskim kivetama pri temperaturi od 25 °C. Kut detekcije kod mjerenja veličine kapljica i PDI iznosio je 174,7°. U nanoemulzijama, kapljice ulja se konstantno gibaju tzv. Brownovim gibanjem koje uređaj detektira kao fluktuaciju intenziteta svjetlosti raspršene na kapljicama pod određenim kutom. Uređaj analizira ovisnost između kuta raspršenja svjetlosti i veličine kapljica (manja kapljica znači veći kut pod kojim se svjetlost raspršuje) te daje raspodjelu veličina kapljica u nanoemulziji. Svaki uzorak prolazi kroz tri ciklusa po 10 mjerenja iz kojih se ispisuje rezultat prikazan kao aritmetička sredina veličine kapljica (engl. *Z-Average*) i indeksa polidisperznosti. Prije samog mjerenja sve nanoemulzije su prvotno razrijeđene ultračistom vodom 500 puta (Jurišić Dukovski, 2021).

3.2.3 Određivanje zeta-potencijala

Zeta-potencijal određen je pri 25 °C korištenjem uređaja Zetasizer Ultra. Vrijednost zeta-potencijala dobije se mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica. Nanoemulzije su prije mjerenja razrijeđene 100 puta 10 mM vodenom otopinom NaCl jer bi razrjeđivanje uzorka čistom destiliranom vodom rezultiralo nedosljednom provodljivošću. Elektroliti poput natrijevog klorida i kalijevog klorida u destiliranoj vodi često koriste kako bi se osigurala stalna provodljivost ispod 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Singh i sur., 2020). Za mjerenje zeta-potencijala korištene su jednokratne kivete DTS1070 (Malvern Instruments).

Zeta-potencijal se ne mjeri izravno, već se računa iz elektroforetske pokretljivosti kapljica pomoću Henry-jeve jednadžbe. Elektroforetsko raspršivanje svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS) najčešće je korištena tehnika za određivanje zeta-potencijala. Primjenom električnog polja na uzorak, nabijene kapljice potaknute privlačnim elektrostatskim silama počnu se gibati prema elektrodi suprotnog naboja, obasjavaju se laserom te dolazi do raspršivanja svjetlosti. Elektroforetska pokretljivost kapljica određuje se na temelju razlike u frekvenciji između raspršene svjetlosti i originalne laserske zrake. Iz spektra frekvencije koji proizlazi iz detektiranih fotona svjetlosti, izračunava se elektroforetska pokretljivost.

4 REZULTATI I RASPRAVA

Nanoemulzije su pripravljene s propilenglikol monokaprilatom pod nazivom Capryol[®] 90 kao uljnom fazom te trima neionskim površinski aktivnim tvarima pri čemu je udio Capryola[®] 90 iznosio 5%, a udjeli površinski aktivnih tvari su se mijenjali. Capryol[®] 90 odabran je zbog dobre topljivosti loteprednol etabonata (Patel i sur., 2016). Kao neionske površinski aktivne tvari korišteni su polisorbat 80, tiloksapol i makrogol 15 hidroksistearat, odabrani na temelju njihove prikladnosti za oftalmičku primjenu (FDA *Drug Databases, Inactive Ingredients in Approved Drug Products*).

Polisorbat 80 je izveden iz polietoksiliranog sorbitana i oleinske kiseline. Brojčana oznaka nakon polisorbata odnosi se na lipofilnu skupinu tj. oleinsku kiselinu, a hidrofilne skupine su polimeri etilen oksida (<https://www.ebi.ac.uk>). Polisorbat 80 je blago viskozna tekućina svijetlo žute do jantarne boje. Dobro je topljiv u vodi, biljnim i životinjskim uljima, a loše topljiv u etanolu i drugim organskim spojevima. HLB vrijednost iznosi 15 te je po tome prikladan za izradu U/V tipa nanoemulzija.

Tiloksapol je uobičajena površinski aktivna pomoćna tvar za oftalmološku primjenu, a po sastavu je neionski tekući polimer tipa alkil aril polieter alkohola. Tiloksapol je viskozna tekućina blijedo žute do jantarne boje, HLB vrijednosti 12,9 te se u potpunosti miješa s vodom.

Makrogol 15 hidroksistearat (Kolliphor[®] HS 15) se sastoji se od poliglikolmono- i di-estera 12-hidroksistearinske kiseline (lipofilni dio) i od oko 30% slobodnog polietilen glikola (hidrofilni dio). Žućkasto bijela je pasta na sobnoj temperaturi koja postaje tekuća pri otprilike 30 °C. Otapa se u vodi, etanolu i 2-propanolu (<https://pharma.basf.com>). Njegova topljivost u vodi opada s porastom temperature. Netopljiv je u tekućem parafinu. HLB vrijednost iznosi između 14 i 16 te je prikladan za izradu U/V tipa nanoemulzija (Liu i sur., 2016).

Nakon određivanja najprikladnije neionske površinski aktivne tvari u odgovarajućem udjelu, u sljedećoj fazi razvoja nanoemulzije, korišten je lecitin. Lecitin se također koristi kao površinski aktivna tvar. Najčešće se lecitin izolira iz dva izvora, iz sjemena soje ili iz žumanjka jajeta. Lecitin izoliran iz soje je puno stabilniji zbog manjeg udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina. Također, ne podliježe kontaminaciji proteinima i/ili patogenim kontaminacijama koje su slučaj kod lecitina dobivenog iz žumanjka, te koji iz tog razloga zahtijeva dodatnu provjeru (Thuy i sur., 2019). Lecitin karakterizira netoksičnost te mogućnost uklapanja lipofilnih lijekova i njihovo produljeno oslobađanje (Klang i Valenta, 2011). Smjesa

je fosfolipida, sadrži i fosfatidilkolin, lizofosfatidilkolin i fosfatidiletanolamin, fosfolipide fiziološki prisutni u suznom filmu. Lecitin je stoga iznimno prikladnim za oftalmičku primjenu i ima veliki potencijal u liječenju bolesti suhog oka (Jurišić Dukovski, 2021). Ovisno o svom sastavu, lecitin može osigurati negativan površinski naboj na kapljicama uljne faze, a što omogućuje oblaganje takovih kapljica ulja pozitivno nabijenim kitozonom.

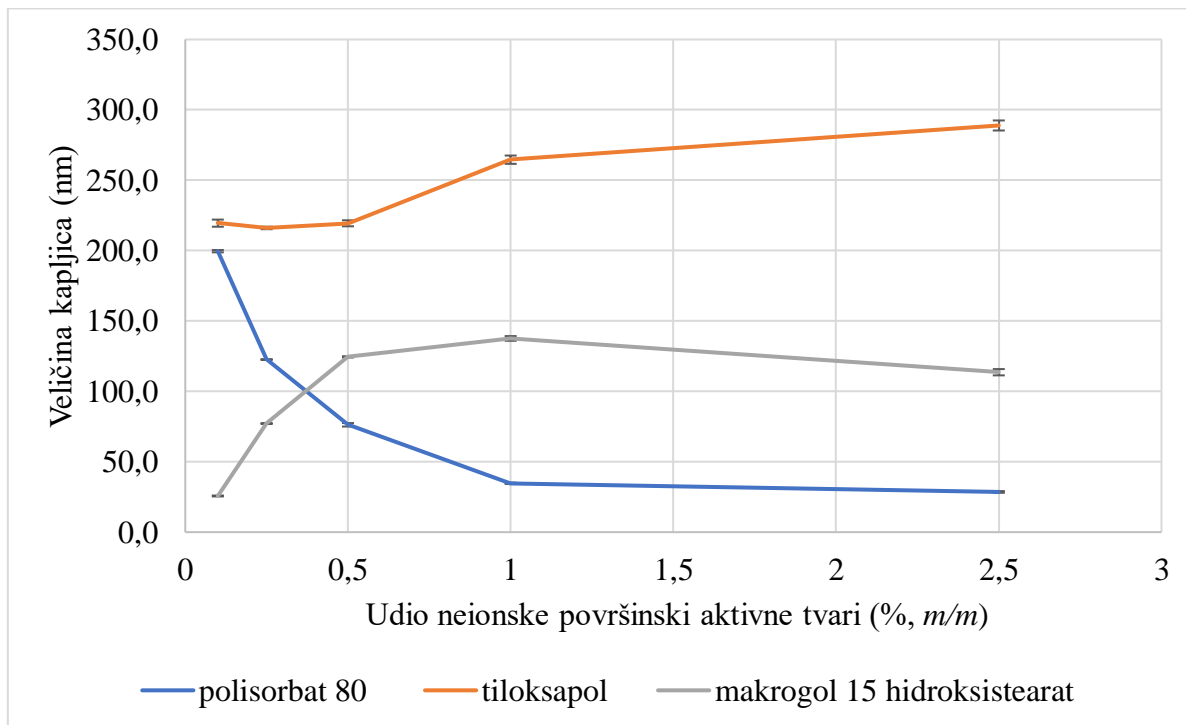
U trećoj fazi razvoja oftalmičke nanoemulzije korišten je kationski polisaharid kitozan. Karakteristike kitozana kao što su molekularna težina i stupanj deacetilacije bitno utječu na njegovu topljivost, viskoznost, površinsku aktivnost i kapacitet vezanja (Chiappisi i Gradzielski, 2015). Kitozan je nositelj pozitivnog naboja te u interakciji sa negativno nabijenim mucinima na površini oka rezultira produljenim zadržavanjem lijeka. Uklapanje pozitivno nabijenog kitozana zahtijeva dovoljno negativno nabijenu površinu kapljice što se može postići upotrebom anionske površinski aktivne tvari kao što je već spomenuti lecitin (Jurišić Dukovski, 2021).

4.1 IZRADA NANOEMULZIJA STABILIZIRANIH NEIONSКИM POVRŠINSKI AKTIVNIM TVARIMA

Prva faza razvoja kationske nanoemulzije započeta je probirom neionski površinski aktivnih tvari. U tu svrhu pripravljeno je 15 nanoemulzija postupkom mikrofluidizacije. Pet uzoraka nanoemulzija za svaku neionsku površinsku aktivnu tvar (polisorbat 80, tiloksapol i makrogol 15 hidrosistearat) pri čemu je udio površinski aktivne tvari iznosio 0,10%, 0,25%, 0,50%, 1,00% i 2,50% (*m/m*). Prvotno su uljna i vodena faza pomiješane korištenjem magnetske miješalice, a zatim je smjesa obrađena korištenjem visokoturažne miješalice. Uzorci su tad poprimili mliječno bijelu boju te su potom obrađeni korištenjem mikrofluidizatora kako bismo dobili homogene nanoemulzije kojima je određena veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal.

4.1.1 Veličina kapljica i indeks polidisperznosti

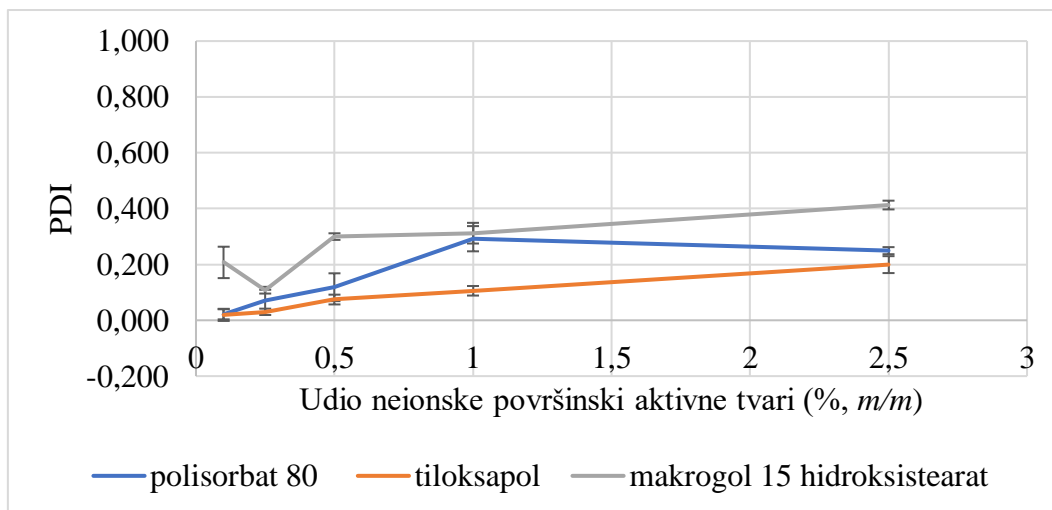
Svih 15 priređenih nanoemulzija karakterizira veličina kapljica manja od 300 nm, vidljivo na slici 11.



Slika 11. Ovisnost veličine kapljica nanoemulzija o udjelu neionske površinski aktivne tvari (% m/m). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=3).

Iz grafičkog prikaza na slici 11 razvidan je očekivani trend opadanja veličine kapljica s porastom udjela površinski aktivne tvari samo u slučaju polisorbata 80. U slučaju makrogol 15 hidroksistearata razvidan je suprotan trend tj. dolazi do povećanja veličina kapljica s povećanjem udjela površinski aktivne tvari. Veličina kapljica nanoemulzije sa tiloksapolom je iznad 200 nm bez obzira na udio površinski aktivne tvari te tiloksapol nije dalje razmatran u razvoju nanoemulzija.

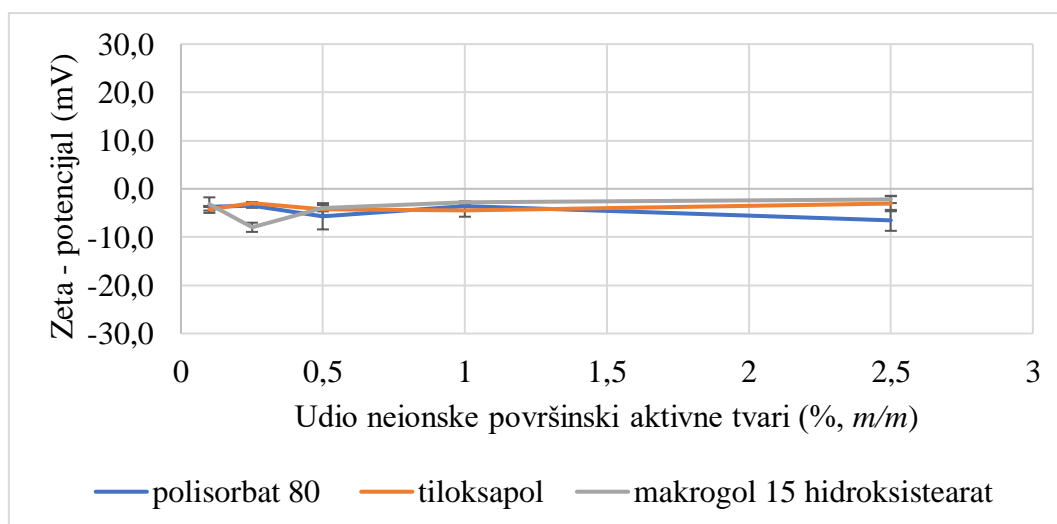
Ovisnost indeksa polidisperznosti o udjelu neionske površinski aktivne tvari prikazana je slikom 12. Razvidno je da se indeks polidisperznosti ne mijenja povećanjem udjela neionske površinski aktivne tvari. Određene formulacije prikazuju vrijednosti indeksa polidisperznosti 0,3 ili više što se smatra previsokim te upućuju na nehomogenost formulacije i nezadovoljavajuću stabilnost. Zadovoljavajuća stabilnost nanoemulzija očekuje se za nanoemulzije s indeksom polidisperznosti manjim od 0,2.



Slika 12. Ovisnost indeksa polidisperznosti (PDI) nanoemulzija o udjelu površinski aktivne tvari (% m/m). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=3).

4.1.2 Zeta-potencijal

Rezultati određivanja zeta-potencijala nanoemulzija pripremljenih korištenjem neionski površinski aktivnih tvari prikazani su slikom 13. S obzirom da je riječ o neionskim površinski aktivnim tvarima očekuju se vrlo male vrijednosti zeta-potencijala, obično blago negativni zeta-potencijal što se objašnjava prisustvom slobodnih masnih kiselina u uljnoj fazi, a koje su nositelji negativnog naboja. Sve vrijednosti su veće od -10 mV tj. relativno su blizu nuli što ukazuje na slabi negativni naboj na površini kapljica. Iz grafičkog prikaza na slici 13 razvidno je da se zeta-potencijal ne mijenja značajno s porastom udjela neionske površinski aktivne tvari.



Slika 13. Ovisnost zeta-potencijala o vrsti i udjelu neionske površinski aktivne tvari (% m/m). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=3).

4.1.3 Stabilnost nanoemulzija stabiliziranih neionskim površinski aktivnim tvarima

30 dana nakon izrade, ispitan je izgled te fizičko-kemijska svojstva pripremljenih nanoemulzija. Uočeno je razdvajanje faza kod određenih nanoemulzija. Te nanoemulzije odbačene su prilikom odabira formulacije za sljedeću fazu razvoja.

Od navedenih 15 početnih nanoemulzija odabrane su one tri koje imaju optimalna svojstva za uklapanje lecitina i daljnji razvoj formulacije s obzirom na stabilnost, veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal. Na temelju dobivenih rezultata odabrane su sljedeće tri nanoemulzije: polisorbitat 80 0,5% (*m/m*), makrogol 15 hidrosistearat 0,1% i 0,25% (*m/m*).

Tablica 7. Usporedni prikaz rezultata odabranih nanoemulzija za sljedeću fazu razvoja sekundarne kationske nanoemulzije. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$).

Naziv formulacije	Veličina kapljica (nm)	Indeks polidisperznosti (PDI)	Zeta-potencijal (mV)
polisorbitat 80 0,5%	76,3 \pm 1,2	0,118 \pm 0,050	-5,7 \pm 2,7
makrogol 15 hidrosistearat 0,1%	25,7 \pm 0,3	0,207 \pm 0,056	-3,1 \pm 1,4
makrogol 15 hidrosistearat 0,25%	77,2 \pm 0,2	0,108 \pm 0,012	-8,0 \pm 1,0

4.2 IZRADA NANOEMULZIJA STABILIZIRANIH ANIONSKIM POVRŠINSKI AKTIVNIM TVARIMA

Prije nego što je započeta druga faza razvoja formulacije, trebalo odrediti najprikladniji lecitin za izradu nanoemulzija. Korištene su tri vrste lecitina koje se razlikuju u sadržaju lipida koji pridonosi negativnom naboju lecitina: Lipoid[®] S45 (bezmasni sojin lecitin sa 45% fosfatidilkolina), Lipoid[®] S75 (bezmasni sojin lecitin sa 70% fosfatidilkolina) i Lipoid[®] S100 (fosfatidilkolin iz sojinog lecitina bez masti) (Hafner i sur., 2009). Udio od 0,25% (*m/m*) je korišten arbitrarno kako bi bio isti za sve formulacije te kako bi rezultati bili usporedivi.

Pripremljene su 4 nanoemulzije, kontrolna nanoemulzija s makrogol 15 hidroksistearatom u udjelu od 0,1% (*m/m*), a bez lecitina, te tri nanoemulzije s tri različite vrsta lecitina. Određena je veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal pripremljenih nanoemulzija. Kao što je i očekivano Lipoid® S100, lecitin s najmanjim udjelom fosfatidilkolina, pokazuje najmanji utjecaj na zeta-potencijal (tablica 8). Hafner i sur. (2009) proveli su ispitivanja sa sva tri Lipoida te su dobili rezultate koji su u skladu s onima koji se mogu naći i u ovom radu. S obzirom da je potreban negativan naboj na kapljicama disperzne faze kako bi se ostvarila elektrostatska interakcija s pozitivno nabijenim kitozanom, Lipoid® S100 se odbacuje kao pomoćna tvar za daljnje formulacije, a Lipoid® S45 i S75 dolaze u obzir te su potrebna daljnja ispitivanja kako bi se odlučilo koji je od preostala dva prikladniji.

Tablica 8. Utjecaj lecitina na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti (PDI) i zeta-potencijal pripremljenih nanoemulzija. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

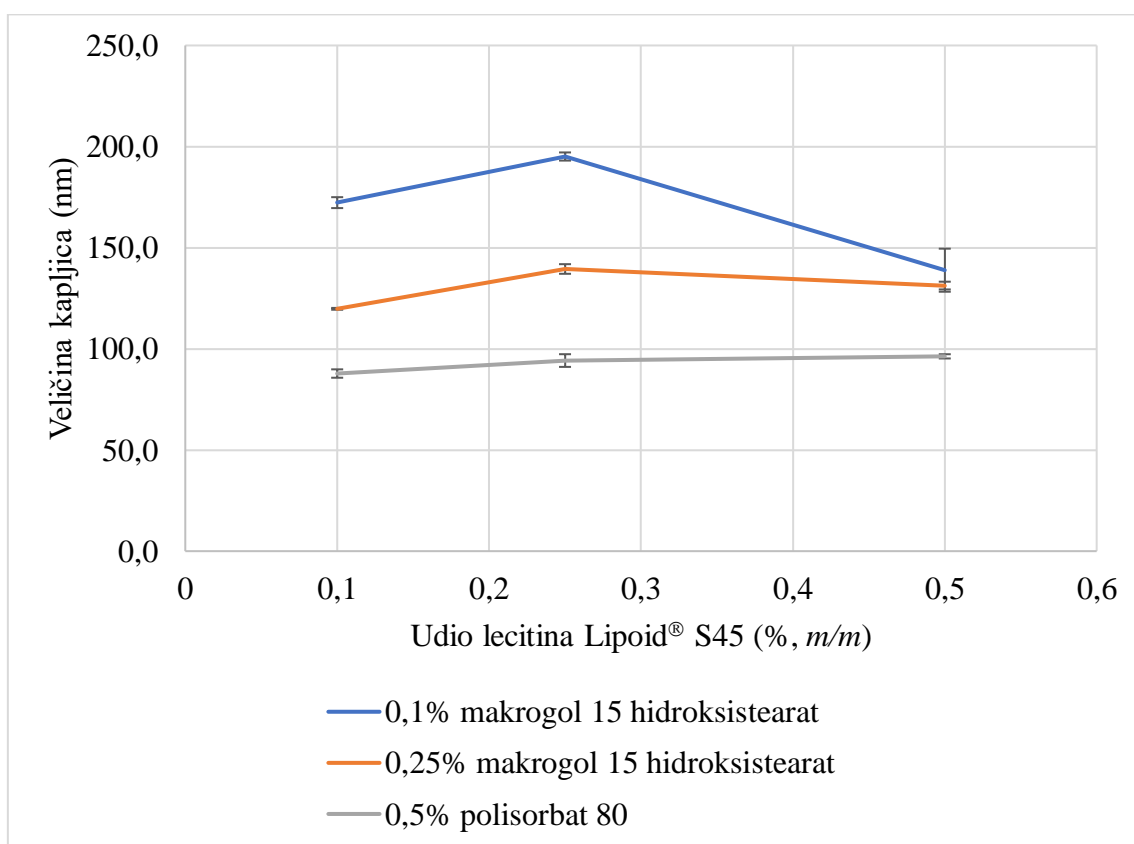
Naziv formulacije	Veličina kapljica (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)
HS15 1	129,3±1,3	0,280±0,024	-3,3±1,4
HS15 1-S45	158,1±10,8	0,458±0,070	-25,8±2,0
HS15 1-S75	86,4±0,5	0,161±0,031	-14,2±0,8
HS15 1 -S100	145,1±1,7	0,033±0,030	-4,3±0,3

Sljedeći korak je bio ispitivanje utjecaja Lipoid® S45 i S75 pri udjelima 0,1%, 0,25% i 0,5% (*m/m*) na fizičko-kemijska svojstva formulacija odabranih u prvoj fazi razvoja kationske nanoemulzije (0,5% (*m/m*) polisorbitat 80, 0,1% i 0,25% (*m/m*) makrogol 15 hidroksistearat). Ukupno je izrađeno 18 nanoemulzija, 9 u koje je dodan Lipoid® S45 i 9 u koje je dodan Lipoid® S75.

4.2.1 Veličina kapljica i indeks polidisperznosti

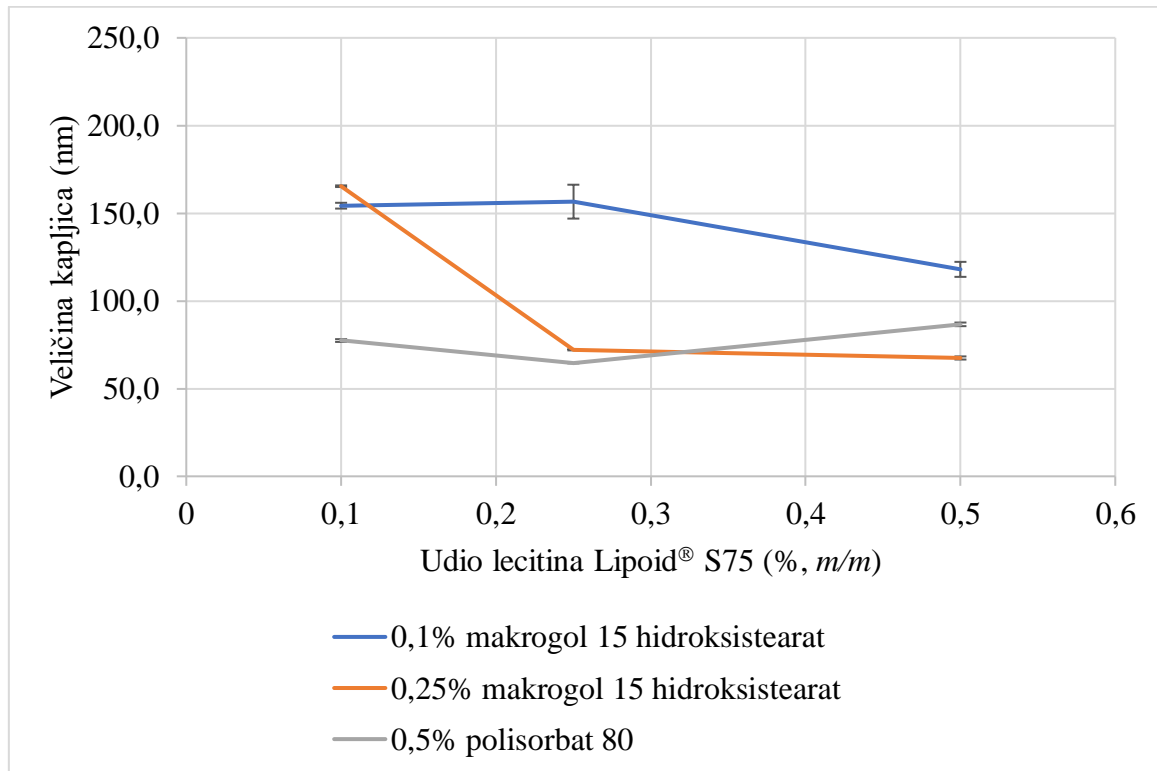
S obzirom da je veličina kapljica pripremljenih nanoemulzija manja od 200 nm, može se zaključiti da su nanoemulzije uspješno pripremljene.

Nanoemulzije pripremljene s lecitinom Lipoid® S45 ne karakterizira značajnija promjena veličina kapljica u ovisnosti o udjelu lecitina (slika 14). Razvidan je utjecaj vrste neionski površinske aktivne tvari na veličinu kapljica. Nanoemulzije najmanje veličine kapljica dobivene su pri korištenju polisorbata 80 u udjelu od 0,5% (*m/m*) i lecitina Lipoid® S45.



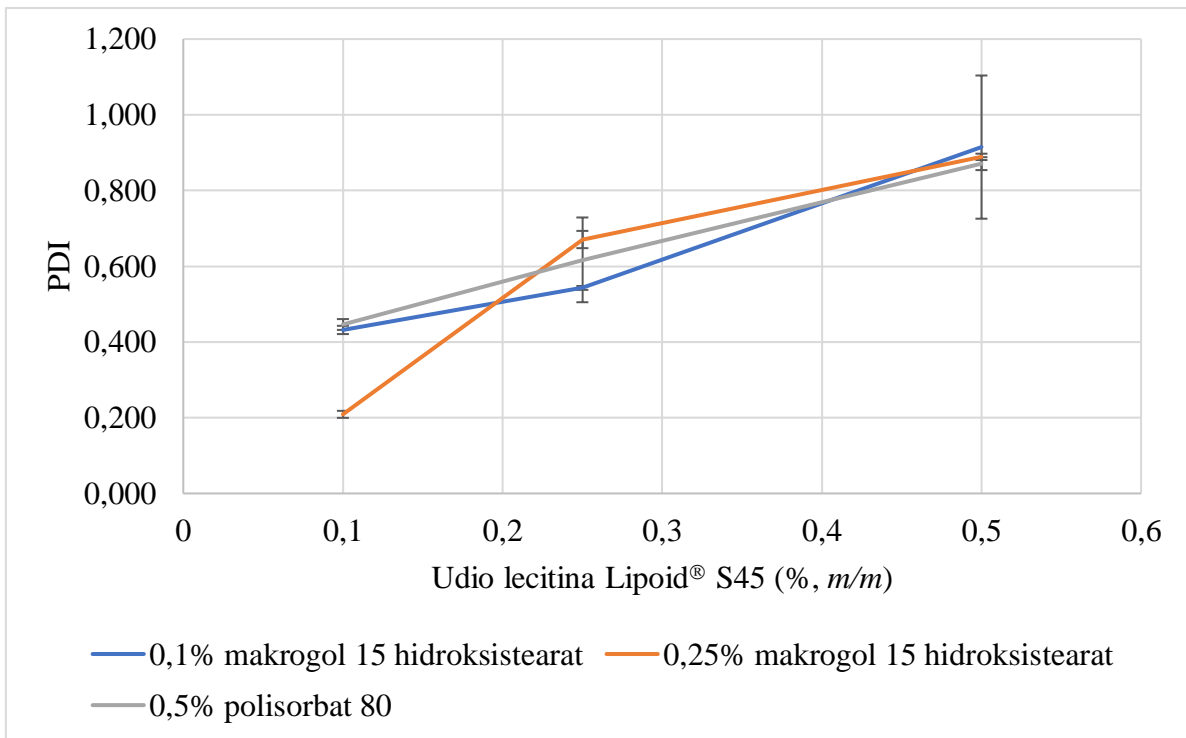
Slika 14. Ovisnost veličine kapljica nanoemulzija (Capryol® 90, makrogol 15 hidrosistearat ili polisorbat 80) o udjelu lecitina Lipoid® S45 (% , *m/m*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

Nanoemulzije sa lecitinom Lipoid® S75 ne prate isti trend koji je vidljiv kod nanoemulzija sa lecitinom Lipoid® S45. U pravilu, povećanjem koncentracije lecitina Lipoid® S75 dolazi do smanjenja veličine kapljica nanoemulzija što je vidljivo na slici 15.

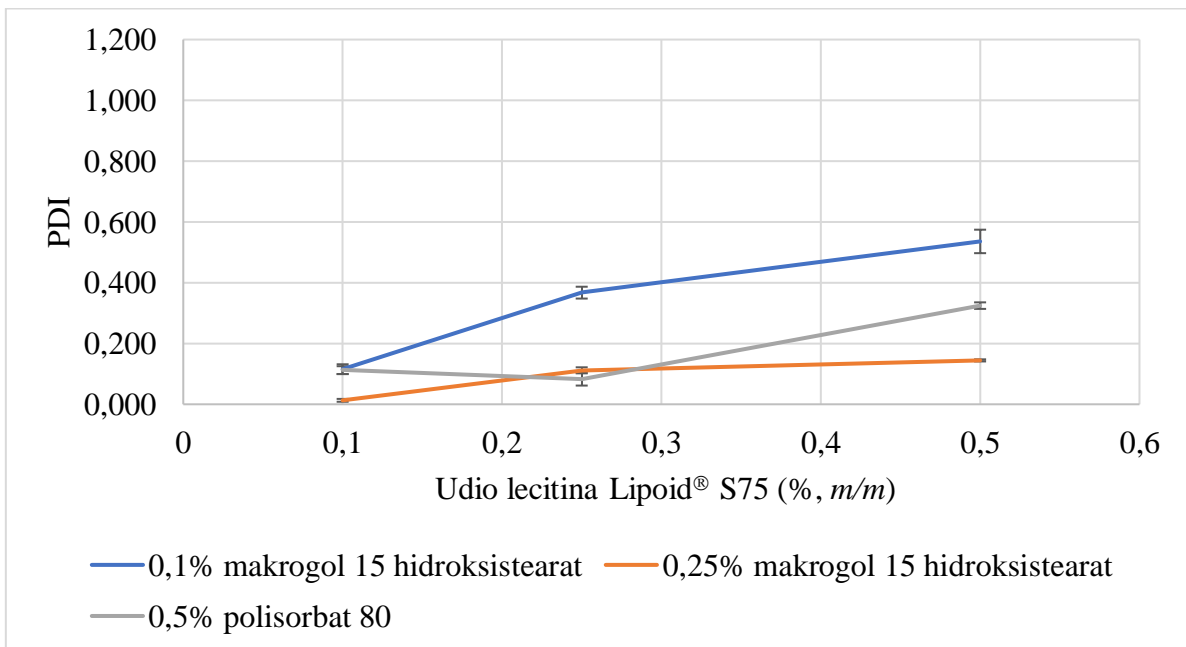


Slika 15. Ovisnost veličine kapljica nanoemulzija (Capryol® 90, makrogol 15 hidroksistearat ili polisorbat 80) o udjelu lecitina Lipoid® S75 (% , m/m). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

Slika 16 i 17 prikazuje ovisnost indeksa polidisperznosti o udjelu lecitina Lipoid® S45 i S75. Iz grafičkog prikaza na slici 16 razvidno je da su nanoemulzije pripravljene s lecitinom Lipoid® S45 polidisperzne, a što se zaključuje iz vrijednosti indeksa polidisperznosti većih od 0,2. Stoga se iz daljnjeg razvoja isključuje Lipoid® S45. Nanoemulzije s Lipoid® S75 karakterizira indeksa polidisperznosti od oko 0,1 što ukazuje na monodisperznost te se očekuje zadovoljavajuća stabilnost pripremljenih nanoemulzija.



Slika 16. Ovisnost indeksa polidisperznosti (PDI) pripravljenih nanoemulzija o udjelu lecitina Lipoid[®] S45 (% m/m). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

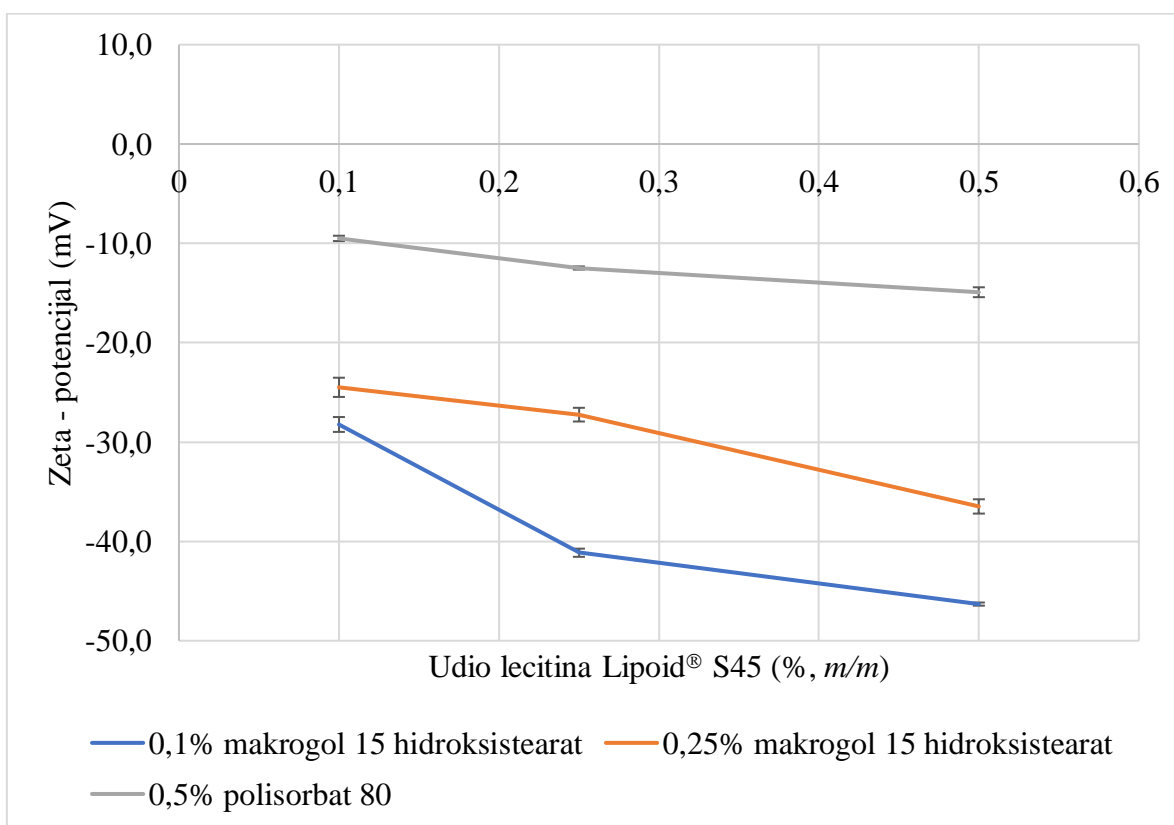


Slika 17. Ovisnost indeksa polidisperznosti (PDI) pripravljenih nanoemulzija o udjelu lecitina Lipoid[®] S75 (% m/m). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

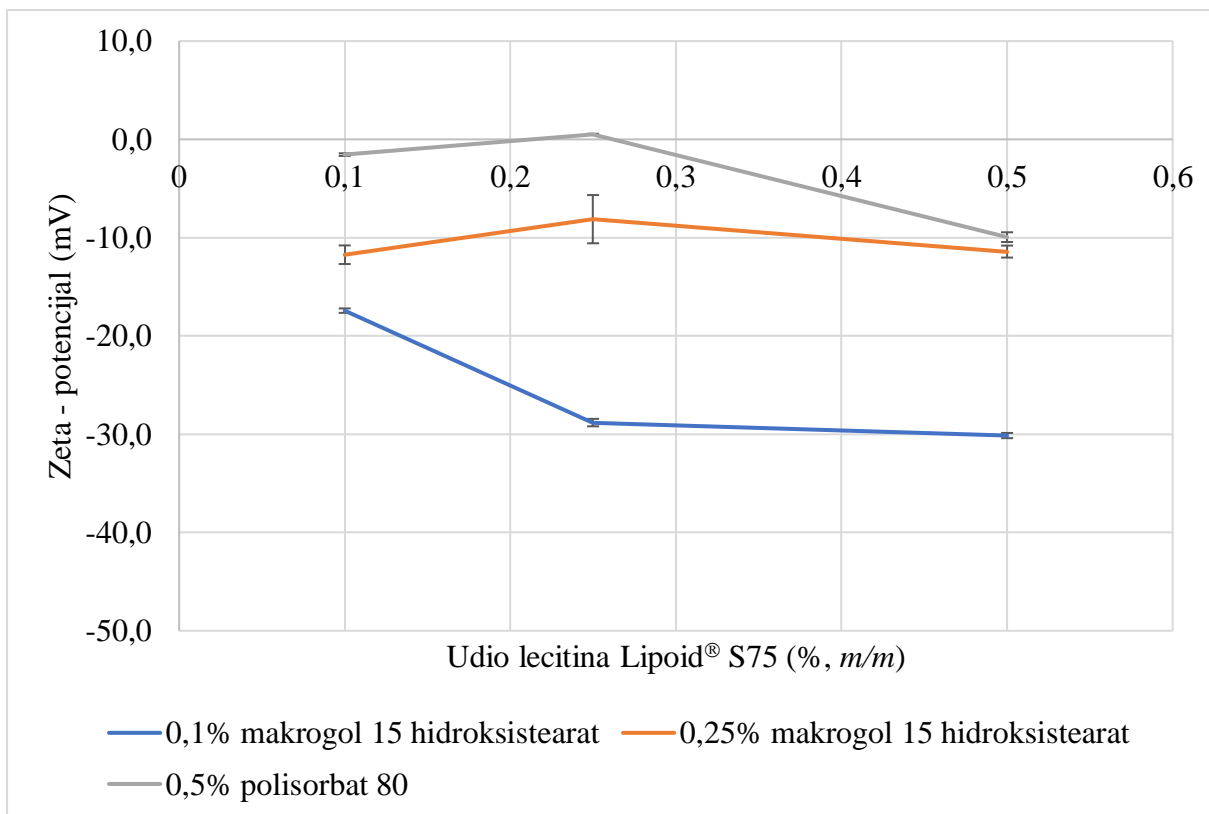
4.2.2 Zeta-potencijal

Odabir primarne anionske nanoemulzije za daljnja ispitivanja ne temelji se samo na maloj veličini kapljica i PDI, nego i na zeta-potencijalu, koji mora biti dovoljno negativan kako bi omogućio oblaganje uljnih kapljica pozitivno nabijenim molekulama kitozana i pripremu sekundarne kationske nanoemulzije (Jurišić Dukovski, 2021).

Povećanjem udjela oba lecitina dolazi do povećanja negativnih vrijednosti zeta-potencijala što je vidljivo na slikama 18 i 19. Odmah je moguće isključiti nanoemulzije s polisorbatom 80 zbog postizanja nedovoljno negativnog zeta-potencijala potrebnog za sljedeću fazu razvoja.



Slika 18. Ovisnost zeta-potencijala pripremljenih nanoemulzija u ovisnosti o udjelu lecitina Lipoid® S45 (% m/m). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=3).



Slika 19. Ovisnost zeta-potencijala pripremljenih nanoemulzija u ovisnosti o udjelu lecitina Lipoid® S75 (% , m/m). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

4.2.3 Stabilnost nanoemulzija

Vizualnim pregledom nije uočeno odvajanje faza niti 30 dana nakon izrade nanoemulzija. Od 18 nanoemulzija odabrana je ona s optimalnim udjelom lecitina za daljnji razvoj formulacije s obzirom na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti, zeta-potencijal i stabilnost.

U sljedećoj fazi razvoja kationske nanoemulzije koristit će se nanoemulzija s lecitinom Lipoid® S75 u udjelu od 0,1% (m/m) i makrogol 15 hidroksistearatom u udjelu od 0,25% (m/m), a koju karakterizira indeks polidisperznosti od 0,013 što ukazuje na monodisperznost te njenu visoku stabilnost.

4.3 IZRADA NANOEMULZIJA STABILIZIRANIH KITOZANOM NISKE MOLEKULSKE MASE

Nakon što je razvijena formulacija s optimalnim udjelom lecitina Lipoid® S75 od 0,1% (*m/m*) i makrogol 15 hidroksistearata od 0,25% (*m/m*) te sa zeta-potencijalom koji je dovoljno negativan, slijedi dodatak kitozana niske molekulske mase u svrhu postizanja pozitivnog površinskog naboja. Kitozan se odabranoj optimalnoj formulaciji dodaje kao 1%-tna otopina u 1%-tnoj otopini octene kiseline.

Priredene su 3 nanoemulzije s udjelom Capryola® 90 od 5% (*m/m*), makrogol 15 hidroksistearata od 0,25% (*m/m*) i lecitina Lipoid® S75 od 0,1% (*m/m*) koju smo pomiješali sa otopinom kitozana u tri različita udjela.

4.3.1 Veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal

Na dan izrade nanoemulzijama su izmjerene veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal. Iz priloženih rezultata mjerenja prikazanih u tablici 9 zaključuje se da su pripremljene nanoemulzije zadovoljavajućih svojstava.

Tablica 9. Fizičko-kemijska karakterizacija sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (*n*=3).

Kitozan (%, <i>m/m</i>)	Veličina kapljica (nm)	Indeks polidisperznosti (PDI)	Zeta-potencijal (mV)
0,000	119,8±0,4	0,209±0,009	-24,5±1,0
0,010	264,0±65,5	0,294±0,104	7,3±0,4
0,025	281,4±2,8	0,173±0,017	17,3±1,0
0,050	237,1±1,9	0,064±0,017	22,3±1,0

Dodatkom kitozana dolazi do povećanja veličine kapljica u usporedbi s kontrolnim nanoemulzijama bez kitozana (tablica 9). Međutim, nanoemulzije s najvećim udjelom kitozana imaju manju veličinu kapljica u odnosu na manje udjele kitozana.

Vrijednost indeksa polidisperznosti za nanoemulzije s 0,025% i 0,05% (*m/m*) kitozana manja je od 0,2 (tablica 9) što ukazuje na visoku homogenost tj. usku raspodjelu veličina čestica, a samim time i odgovarajuću stabilnost.

Porastom udjela kitozana očekivano raste i zeta-potencijal te pri najvećem udjelu kitozana doseže vrijednost od 22,3 mV (tablica 9). Obrat zeta-potencijala iz negativnog u pozitivni dokaz je elektrostatski posredovane interakcije negativno nabijenih kapljica disperzne faze i pozitivno nabijenih molekula kitozana te smještanja molekula kitozana na površinu kapljica.

Na temelju provedene fizičko-kemijske karakterizacije sekundarna kationska nanoemulzija s 0,05 % (*m/m*) kitozana, 5 % (*m/m*) Capryola® 90, 0,25% (*m/m*) makrogol 15 hidrosistearata i 0,1% (*m/m*) lecitina Lipoid® S75 ističe se kao vodeća formulacija s najvećim potencijalom za uklapanje loteprednol etabonata.

5 ZAKLJUČCI

- Sekundarne kationske nanoemulzije s kitozonom uspješno su pripravljene visokoenergetskom metodom na mikrofluidizatoru.
- Kao uljna faza korišten je Capryol® 90 u udjelu od 5% (*m/m*).
- Razvoj formulacije proveden je u tri faze.
- U prvoj fazi razvoja formulacije proveden je probir neionski površinski aktivnih tvari. Za drugu fazu razvoja odabrane su nanoemulzije s polisorbitom 80 u udjelu od 0,5% (*m/m*) te makrogol 15 hidroksistearatom u udjelima od 0,1 i 0,25% (*m/m*).
- U drugoj fazi razvoja formulacije proveden je probir vrste i udjela lecitina kao anionske površinski aktivne tvari. Za daljnji razvoj odabrana je nanoemulzija s 0,1% (*m/m*) lecitina Lipoid® S75 i 0,25% (*m/m*) makrogol 15 hidroksistearata.
- U trećoj fazi razvoja formulacije proveden je probir udjela kitozana niske molekulske mase kao nositelja pozitivnog naboja.
- Na temelju provedene fizičko-kemijske karakterizacije sekundarna kationska nanoemulzija s 0,05 % (*m/m*) kitozana, 5 % (*m/m*) Capryola® 90, 0,25% (*m/m*) makrogol 15 hidroksistearata i 0,1% (*m/m*) lecitina Lipoid® S75 ističe se kao vodeća formulacija s najvećim potencijalom za uklapanje loteprednol etabonata.

6 LITERATURA

BASF Pharma, 2021, <https://pharma.basf.com/products/kolliphor-hs-15>, pristupljeno 15.1.2022.

Bazán Henostroza MA, Curo Melo KJ, Nishitani Yukuyama M, Löbenberg R, Araci Bou-Chacra N. Cationic rifampicin nanoemulsion for the treatment of ocular tuberculosis. *Colloids Surf A Physicochem*, 2020, 597, 124755.

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI), 2018, <https://www.ebi.ac.uk/chebi>, pristupljeno 15.1.2022.

Chiappisi L, Gradzielski M. Historical Perspective Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: thermodynamics, structures, interfacial properties and applications. *Adv Colloid Interface Sci*, 2015.

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

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

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

Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J. Pharmaceutical Nanotechnology Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through CaCO-2 cell monolayers. *Int J Pharm*, 2009, 381, 205–213.

HydrelTM Allergy Lubricant Eye Drops infused by natural Ectoin[®] 2%. <https://www.hydrelo.com/hydrelo-allergy>, pristupljeno 24.1.2022.

Izquierdo P, Esquena J, Tadros TF, Dederen C, Garcia MJ, Azemar N, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. *Langmuir*, 2002, 18, 26–30.

Jurišić Dukovski B. Razvoj funkcionalnih kationskih nanoemulzija za liječenje bolesti suhog oka, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2021.

Klang V, Valenta C. Lecithin-based nanoemulsions. *J Drug Del Sci Tech*, 2011, 21, 55–76.

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

Liu L, Mao K, Wang W, Pan H, Wang F, Yang M, Liu H. Kolliphor® HS 15 Micelles for the Delivery of Coenzyme Q10: Preparation, Characterization, and Stability. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 17, 757–766.

Mahdi Jafari S, He Y, Bhandari B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. *Int J Food Prop*, 2006, 9, 475–485.

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

Qadir A, Hussain T, Alshammari TM, Shakeel F. Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. *J Mol Liq*, 2015, 214, 7-18.

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

Saberi AH, Fang Y, McClements DJ. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *J Colloid Interface Sci*, 2013, 391, 95–102.

Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov*, 2008, 13, 144-151.

Singh I, Rana V. Techniques for the Assessment of Mucoadhesion in Drug Delivery Systems: An Overview. *J Adhes Sci Technol*, 2012, 26, 2251–2267.

Singh M, Bharadwaj S, Lee KE, Kang SG. Therapeutic nanoemulsions in ophthalmic drug administration: Concept in formulations and characterization techniques for ocular drug delivery. *J Control Release*, 2020, 328, 895–916.

Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, Chourasia MK. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*, 2017, 252, 28–49.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2005, 10, 102-110.

Tayel SA, El-Nabarawi MA, Tadros MI, Abd-Elsalam WH. Promising ion-sensitive in situ ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: Design, in vitro characterization and in vivo estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits. *Int J Pharm*, 2013, 443, 293–305.

Thuy N, Le T, Cao V du, Nhu T, Nguyen Q, Thu T, Le H, Tran TT, Thanh T, Thi H. Molecular Sciences Soy Lecithin-Derived Liposomal Delivery Systems: Surface Modification and Current Applications, *Int J Mol Sci*, 2019, 20, 4706.

Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, Papas EB, Rolland JP, Schmidt TA, Stahl U, Suarez T, Subbaraman LN, Uçakhan O, Jones L. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf*, 2017, 15, 366–403.

Zhang J, Liu Z, Tao C, Lin X, Zhang M, Zeng L, Chen X, Song H. Cationic nanoemulsions with prolonged retention time as promising carriers for ophthalmic delivery of tacrolimus. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 144, 105229.

7 SAŽETAK/SUMMARY

Nanoemulzije se ističu kao inovativni farmaceutski oblik s velikim potencijalom u liječenju bolesti suhog oka. Prednosti nanoemulzija temelje se na njihovoj strukturi i sastavu koje imaju učinak nadomještanja i stabilizacije suznog filma te na mogućnosti uklapanja slabo topljivih gluokokortikoida kao što je loteprednol etabonat, djelatna tvar nedavno odobrena u liječenju blagih do umjerenog oblika bolesti suhog oka. Poseban potencijal imaju kationske nanoemulzije, zbog dobrih svojstava širenja po površini oka pri primjeni te produljenom zadržavanju na površini oka.

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti sekundarnu kationsku U/V nanoemulziju s kitozanom pogodnu za uklapanje loteprednol etabonata. Nanoemulzije U/V tipa izrađene su visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije. Kao ulja faza odabran je Capryol[®] 90 zbog dobre topljivosti loteprednol etabonata u toj uljnoj fazi. Razvoj nanoemulzije proveden je u tri faze, (i) probir vrste i udjela neionske površinski aktivne tvari, (ii) probir vrste i udjela anionske površinski aktivne tvari te (iii) probir udjela niskomolekulskog kitozana. U svim fazama razvoja provedena je fizičko-kemijska karakterizacija nanoemulzija u vidu određivanja veličine i raspodjele veličina kapljica disperzne faze te zeta-potencijala. Na temelju provedene fizičko-kemijske karakterizacije sekundarna kationska nanoemulzija s 0,05 % (*m/m*) kitozana, 5 % (*m/m*) Capryola[®] 90, 0,25% (*m/m*) makrogol 15 hidroksistearata i 0,1% (*m/m*) lecitina Lipoid[®] S75 ističe se kao vodeća formulacija s najvećim potencijalom za uklapanje loteprednol etabonata.

Nanoemulsions stand out as an innovative dosage form with great potential in the treatment of dry eye disease. The benefits of nanoemulsions are based on (i) their structure and composition, which have the effect of replacing and stabilizing the tear film; and (ii) the ability to incorporate poorly soluble glucocorticoids such as loteprednol etabonate, an active substance recently approved in the treatment of mild to moderate dry eye disease. Cationic nanoemulsions have a unique potential due to their good spreading properties on the eye surface and prolonged retention on the eye surface.

The aim of this thesis was to develop a secondary cationic O/W nanoemulsion with chitosan suitable for the incorporation of loteprednol etabonate. O/W type nanoemulsions are prepared by microfluidization. Capryol® 90 was chosen as the oil phase due to the good solubility of loteprednol etabonate in this oil phase. The development of the nanoemulsion was carried out in three phases, (i) screening of the type and content of nonionic surfactants, (ii) screening of the type and content of anionic surfactants, and (iii) screening of the content of low molecular weight chitosan. In all phases of development, physicochemical characterization of nanoemulsions was performed in the terms of determining the size and size distribution of droplets of the dispersed phase and zeta potential. Based on the performed physicochemical characterization, the secondary cationic nanoemulsion with 0.05% (w/w) chitosan, 5% (w/w) Capryola® 90, 0.25% (w/w) macrogol 15 hydroxystearate and 0.1% (w/w) Lecithin Lipoid® S75 stands out as the leading formulation with the greatest potential for incorporation of loteprednol etabonate.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Razvoj oftalmičkih sekundarnih kationskih nanoemulzija za uklapanje slabo topljivih glukokortikoida

Klara Pavić

SAŽETAK

Nanoemulzije se ističu kao inovativni farmaceutski oblik s velikim potencijalom u liječenju bolesti suhog oka. Prednosti nanoemulzija temelje se na njihovoj strukturi i sastavu koje imaju učinak nadomještanja i stabilizacije suznog filma te na mogućnosti uklapanja slabo topljivih glukokortikoida kao što je loteprednol etabonat, djelatna tvar nedavno odobrena u liječenju blagih do umjerenog oblika bolesti suhog oka. Poseban potencijal imaju kationske nanoemulzije, zbog dobrih svojstava širenja po površini oka pri primjeni te produljenom zadržavanju na površini oka. Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti sekundarnu kationsku U/V nanoemulziju s kitozonom pogodnu za uklapanje loteprednol etabonata. Nanoemulzije U/V tipa izrađene su visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije. Kao ulja faza odabran je Capryol® 90 zbog dobre topljivosti loteprednol etabonata u toj uljnoj fazi. Razvoj nanoemulzije proveden je u tri faze, (i) probir vrste i udjela neionske površinski aktivne tvari, (ii) probir vrste i udjela anionske površinski aktivne tvari te (iii) probir udjela niskomolekulskog kitozana. U svih fazama razvoja provedena je fizičko-kemijska karakterizacija nanoemulzija u vidu određivanja veličine i raspodjele veličina kapljica disperzne faze te zeta-potencijala. Na temelju provedene fizičko-kemijske karakterizacije sekundarna kationska nanoemulzija s 0,05 % (*m/m*) kitozana, 5 % (*m/m*) Capryola® 90, 0,25% (*m/m*) makrogol 15 hidroksistearata i 0,1% (*m/m*) lecitina Lipoid® S75 ističe se kao vodeća formulacija s najvećim potencijalom za uklapanje loteprednol etabonata.

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

Rad sadrži: 44 stranica, 19 grafičkih prikaza, 9 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kationska nanoemulzija, bolest suhog oka, kitozan, lecitin, polisorbit 80, makrogol 15 hidroksistearat, tiloksapol

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

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

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

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

Rad prihvaćen: veljača 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Development of ophthalmic secondary cationic nanoemulsions for incorporation of poorly soluble glucocorticoids

Klara Pavić

SUMMARY

Nanoemulsions stand out as an innovative dosage form with great potential in the treatment of dry eye disease. The benefits of nanoemulsions are based on (i) their structure and composition, which have the effect of replacing and stabilizing the tear film; and (ii) the ability to incorporate poorly soluble glucocorticoids such as loteprednol etabonate, an active substance recently approved in the treatment of mild to moderate dry eye disease. Cationic nanoemulsions have a unique potential due to their good spreading properties on the eye surface and prolonged retention on the eye surface. The aim of this thesis was to develop a secondary cationic O/W nanoemulsion with chitosan suitable for the incorporation of loteprednol etabonate. O/W type nanoemulsions are prepared by microfluidization. Capryol® 90 was chosen as the oil phase due to the good solubility of loteprednol etabonate in this oil phase. The development of the nanoemulsion was carried out in three phases, (i) screening of the type and content of nonionic surfactants, (ii) screening of the type and content of anionic surfactants, and (iii) screening of the content of low molecular weight chitosan. In all phases of development, physicochemical characterization of nanoemulsions was performed in the terms of determining the size and size distribution of droplets of the dispersed phase and zeta potential. Based on the performed physicochemical characterization, the secondary cationic nanoemulsion with 0.05% (w/w) chitosan, 5% (w/w) Capryola® 90, 0.25% (w/w) macrogol 15 hydroxystearate and 0.1% (w/w) Lecithin Lipoid® S75 stands out as the leading formulation with the greatest potential for incorporation of loteprednol etabonate.

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

Thesis includes: 44 pages, 19 figures, 9 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cationic nanoemulsion, dry eye disease, chitosan, lecithin, polysorbate 80, macrogol 15 hydroxystearate, tyloxapol

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

Reviewers: **Jasmina Lovrić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Hafner, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February 2022.