

# Predformulacijska ispitivanja u razvoju nanoemulzija s uklopljenim ibuprofenom

---

Grošić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:391965>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Petra Grošić**

**Predformulacijska ispitivanja u razvoju  
nanoemulzija s uklopljenim ibuprofenom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2022.

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

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

*Hvala asistentu Josipu Ljubici, mag. pharm. i dr. sc. Biseri Jurišić Dukovski na strpljenju, savjetima i pomoći pri izradi eksperimentalog dijela rada.*

*Veliko hvala mojim roditeljima na neizmjerne podršci, razumijevanju i ohrabivanju tijekom cijelog studija. Hvala što ste uvijek tu za mene i podupirete moje snove.*

*Hvala mojim dragim prijateljicama i kolegicama koje su uvijek bile strpljive i pune razumijevanja i što su mi uljepšale studentske dane.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Bolest suhog oka.....	1
1.1.1. Mehanizam bolesti .....	2
1.1.2. Klasifikacija bolesti .....	3
1.1.3. Liječenje bolesti suhog oka.....	4
1.2. Nanoemulzije.....	6
1.3. Pomoćne tvari u izradi nanoemulzija .....	7
1.3.1. Uljna faza .....	7
1.3.1.1. Ricinusovo ulje.....	8
1.3.1.2. Miglyol® 812 .....	8
1.3.1.3. Sojino ulje .....	9
1.3.1.4. Sezamovo ulje .....	9
1.3.2. Površinski aktivne tvari.....	9
1.3.3. Ostale pomoćne tvari .....	10
1.4. Metode izrade nanoemulzija.....	11
1.4.1. Visokoenergetske metode .....	12
1.5. Karakterizacija nanoemulzija .....	14
1.5.1. Veličina kapljica i indeks polidisperznosti .....	15
1.5.2. Zeta-potencijal .....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. Materijali .....	17
3.2. Metode .....	17
3.2.1. Ispitivanje topljivosti ibuprofena u uljima .....	17
3.2.2. Određivanje sadržaja ibuprofena .....	17
3.2.3. Priprava nanoemulzija.....	20
3.2.4. Mjerenje veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	23
4.1. Ispitivanje topljivosti djelatne tvari ibuprofena u uljima s potencijalom za izradu oftalmičkih nanoemulzija .....	24
4.2. Priprava i karakterizacija preliminarne oftalmičke nanoemulzije ricinusova ulja s uklopljenim ibuprofenom .....	25

5. ZAKLJUČCI.....	30
6. LITERATURA.....	31
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	35

# 1. UVOD

## 1.1. Bolest suhog oka

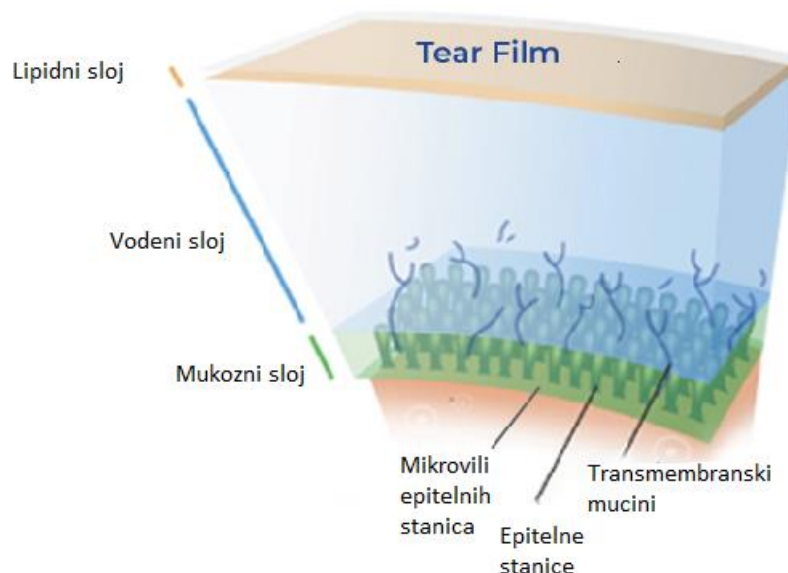
Bolest suhog oka (engl. *Dry eye disease*, DED) prepoznata je kao rastući javnozdravstveni problem i jedan od najčešćih razloga za traženje oftalmološke intervencije (Kaštelan i sur., 2013). Korišteni su različiti nazivi za opisivanje bolesti suhog oka uključujući sindrom suhog oka (engl. *Dry eye syndrome*, DES) te lat. *keratoconjunctivitis sicca* (KCS) i lat. *keratitis sicca*.

U epidemiološkim studijama provedenim na globalnoj razini, prevalencija bolesti suhog oka (DED) kreće se od 5% do 50%. Na temelju podataka iz Nacionalnog istraživanja zdravlja i dobrobiti (*National Health and Wellness Survey*), 6,8% odrasle populacije Sjedinjenih Američkih Država (otprilike 16,4 milijuna ljudi) ima dijagnozu DED. Prevalencija raste s dobi, 2,7% dijagnosticiranog DED u populaciji od 18 do 34 godine, dok je čak 18,6% dijagnosticirano u osoba starijih od 75 godina. Također je uočena veća prevalencija u žena nego muškaraca (8,8% naspram 4,5%) ([www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)). Rizik je značajno povećan kod žena u postmenopauzi koje primaju hormonsku nadomjesnu terapiju. Ostali rizični čimbenici uključuju dugotrajan rad na digitalnim uređajima, boravak u klimatiziranim prostorima niske relativne vlažnosti zraka te nošenje kontaktnih leća (Jurišić Dukovski, 2021).

Bolest suhog oka definira se kao multifaktorijalna bolest suza i površine oka koju obilježavaju simptomi poput nelagode, poremećaji vida te nestabilnost suznog filma što potencijalno može dovesti do oštećenja površine oka. Prati ju hiperosmolarnost suznog filma te subakutne upale površine oka (Messmer, 2015). Uz navedene simptome, mogu biti prisutni i drugi nespecifični simptomi poput crvenila, peckanje, suzenje, svrbež, osjećaj suhoće i pijeska ili stranog tijela u oku te prolazno zamućenje vida. Postoje slučajevi kada pacijent osjeća sve ili samo neke od simptoma bolesti suhog oka, dok klinički znakovi nisu prisutni, no moguća je i obrnuta situacija (Jurišić Dukovski, 2021). Blagi, ali i teži oblik bolesti povezani su s boli, ograničavanjem svakodnevnih aktivnosti, smanjenjem kvalitete života i često depresijom (Zemanová, 2021).

### 1.1.1. Mehanizam bolesti

Površina oka (rožnica, spojnice, pomoćne suzne žlijezde), Meibomova žlijezda (specifična lojna žlijezda na rubu vjeđa koja proizvodi vanjski lipidni sloj suznog filma), glavna suzna žlijezda te inervacija između njih čini funkcionalnu cjelinu. Bilo koja ili sve ove strukture mogu biti zahvaćene kod bolesti suhog oka. Nedavne studije su pokazale da je suho oko upalna bolest koja ima mnogo zajedničkih karakteristika s autoimunim bolestima. Pretpostavlja se da je stres površine oka (okolišni čimbenici, infekcija, endogeni stres, antigeni, genetski čimbenici) pokretač patoloških procesa u oku (Messmer, 2015).



Slika 1. Struktura suznog filma (preuzeto s <https://www.hydrelo.com/hydrelo-allergy>).

U središtu patogeneze bolesti suhog oka je hiperosmolarnost suznog filma koja oštećuje površinu oka neposrednim, ali i posrednim mehanizmima preko kaskade upalnih reakcija (Jurišić Dukovski, 2021). Proupalni citokini, kemokini te matriksne metaloproteinaze dovode do ekspanzije autoreaktivnih T- limfocita koji onda infiltriraju očnu površinu i suznu žlijezdu (Messmer, 2015). Dolazi do smanjenja ekspresije transmembranskih mucina i apoptoze epitelnih stanica rožnice i spojnice te vrčastih stanica spojnice. Manjak vrčastih stanica očituje se smanjenom koncentracijom mucina u suznom filmu što u konačnici značajno narušava

stabilnost suznog filma i moćenje površine oka te je uzrok preuranjenog pucanja suznog film. Gubitak mucina uzrokuje i pojačano trenje između vjeđa i površine oka za vrijeme treptanja. Pojačano trenje može dodatno mehanički oštetiti određena područja na površini oka (Jurišić Dukovski, 2021). Rezultat je začaran krug oštećenja površine oka i upale.

### **1.1.2. Klasifikacija bolesti**

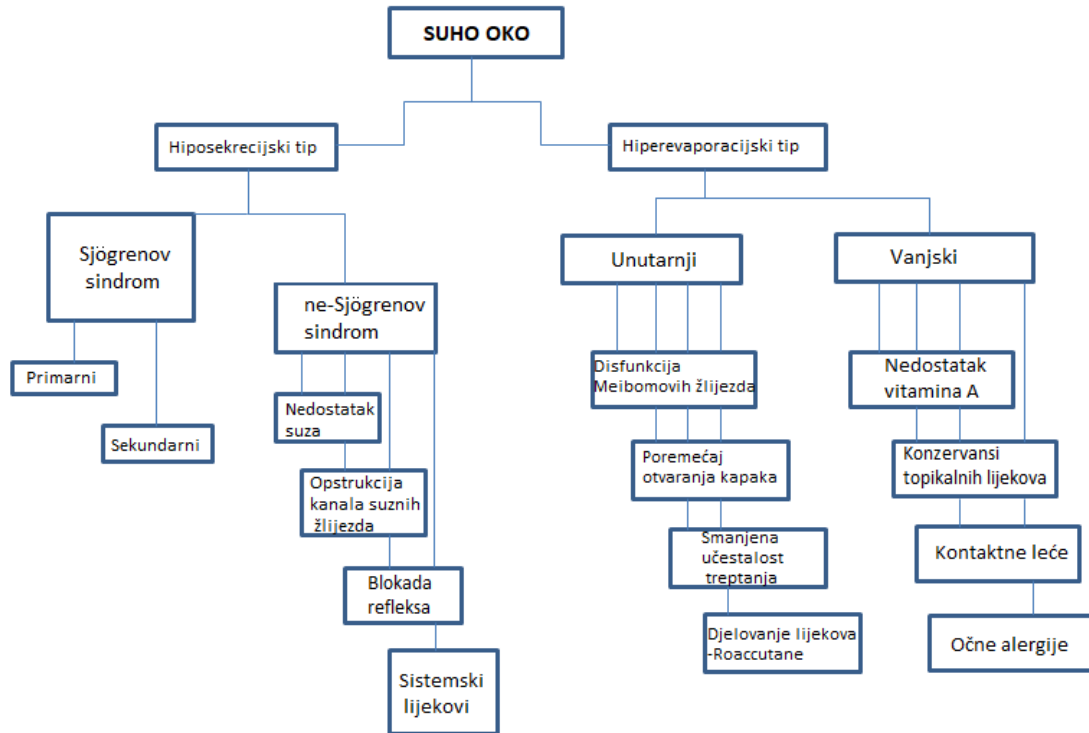
Prema Međunarodnoj radnoj skupini za bolest suhog oka (engl. *International Dry Eye WorkShop*, DEWS), razlikujemo 2 oblika bolesti suhog oka: hiposekrecijski oblik (engl. *Aqueous-Deficient Dry Eye*, ADDE) i hiperevaporacijski oblik (engl. *Evaporative Dry Eye*, EDE).

Kod hiposekrecijskog oblika, hiperosmolarnost suza nastaje uslijed smanjenja lakrimalne sekrecije, a u uvjetima normalnog isparavanja suza. Kod hiperevaporacijskog oblika, funkcija suzne žlijezde je očuvana, međutim dolazi do prekomjernog isparavanja suza zbog poremećenog lučenja lipidnog dijela suznog filma.

Hiposekrecijski oblik dijelimo u dvije grupe: Sjögrenov sindrom (SS) i stanja bez Sjögrenovog sindroma (ne-SS). Sjögrenov sindrom je kronična upalna autoimuna bolest karakterizirana limfocitnom infiltracijom egzokrinih žlijezda (kao što su slinovnice i suzne žlijezde) što dovodi do kliničke slike suhih usta i očiju (Bjordan i sur., 2020.). Stanja bez Sjögrenovog sindroma uključuju kongenitalne i stečene oblike DED-a bez sistemskih autoimunih obilježja Sjögrenovog sindroma poput starenjem uzrokovanog hiposekrecijskog oblika suhog oka, kongenitalne alakrime te obiteljske disautonomije (Bron i sur., 2017.).

Hiperevaporacijski oblik najčešće je posljedica nedostatka lipida uslijed disfunkcije Meibomovih žlijezda, ali nastaje i uslijed poremećaja otvaranja kapaka, smanjene učestalosti treptanja, te primjene određenih lijekova. Ostali čimbenici koji povećavaju isparavanje suza su: nedostatak vitamina A, konzervansi topikalnih oftalmičkih lijekova poput benzalkonijevog klorida, nošenje kontaktnih leća te očne alergije (Kaštelan i sur., 2013).





Slika 2. Klasifikacija suhog oka prema Međunarodnoj radnoj skupini za bolest suhog oka 2007. (engl. *International Dry Eye WorkShop, DEWS*), (preuzeto i prilagođeno prema Tincani i sur., (2013) uz dopuštenje izdavača).

### 1.1.3. Liječenje bolesti suhog oka

Primarni cilj liječenja bolesti suhog oka uključuje ublažavanje simptoma, poboljšanje vida i kvalitete života te obnavljanje površine oka i suznog filma. Neke od mogućnosti liječenja su: promjena higijene i stila života, upotreba umjetnih suza, terapija protuupanim lijekovima, te kao zadnji korak kirurški postupci za povećanje zadržavanja suza. Liječenje treba prilagoditi odgovoru pojedinog pacijenta na samu terapiju te se treba održavati ravnoteža između učinkovitosti, sigurnosti i pogodnosti za pacijenta (Kaštelan i sur., 2013).

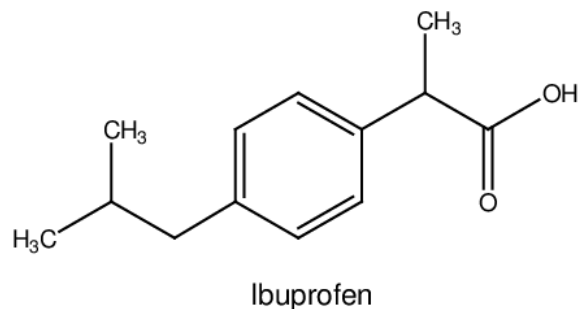
Od iznimne važnosti su nefarmakološke mjere. Bolesnike treba savjetovati da izbjegavaju dugotrajno izlaganje računalima, TV-u, boravak u prostorijama s zrakom niske relativne vlažnosti, boravak u zadimljenim prostorijama te na vjetru.

Umjetne suze temelj su terapije za sve oblike bolesti suhog oka. Iako se međusobno mogu razlikovati u osmolalnosti, viskoznosti i pH, većina ima sličnosti u svojim glavnim komponentama. Temeljna komponenta u umjetnim suzama je voda, a kako bi se poboljšalo podmazivanje i produžilo vrijeme zadržavanja na površini oka, često se dodaju različite tvari za povećanje viskoznosti (hijaluronska kiselina, karboksimetilceluloza, hidroksipropilmetilceluloza, poliakrilna kiselina i dr.) (Jones i sur., 2017).

Kod disfunkcije Meibomove žlijezde, preporučeno je primjenjivati umjetne suze koje sadrže lipide koji će poboljšati funkciju žlijezde i povećati stabilnost suznog filma (Messmer, 2015). Od lipida se koriste fosfolipidi, trigliceridi, zasićene i nezasićene masne kiseline, ricinusovo ulje, maslinovo ulje, sojino ulje, lecitin (Jones i sur., 2017).

U načelu, kod oštećenja površine oka treba izbjegavati pripravke koji sadrže benzalkonijev klorid kao konzervans (Messmer, 2015).

Kod srednjeg do teškog oblika bolesti potrebno je uvođenje farmakoterapije. Kako je u pozadini bolesti suhog oka upala, protuupalni lijekovi će biti terapija izbora za ove bolesti. Primjenjuju se nesteroidni protuupalni lijekovi, kortikosteroidi, ciklosporin A, takrolimus i pimekrolimus, tetraciklini i makrolidi (azitromicin).



Slika 3. Struktura ibuprofena ([www.researchgate.net](http://www.researchgate.net))

Ibuprofen je nesteroidni protuupalni lijek (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drug*, NSAID), čiji se mehanizam djelovanja temelji na neselektivnoj inhibiciji enzima ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2). Ciklooksigenaza je enzim koji sudjeluje u sintezi prostaglandina, prostaciklina i tromboksana iz arahidonske kiseline.

U patofiziologiji suhog oka značajni su upravo prostaglandini kao proupalni medijatori. Hiperosmolarnost suznog filma stimulira otpuštanje proupalnih citokina uključujući PGE2 (prostaglandin E2) iz oštećenog epitela rožnice. PGE2 osim što posreduje stvaranju upale, pridonosi i preosjetljivosti na bol modulirajući višestruka mjesta u nociceptivnim putevima (Lekhanont i sur., 2019). Lekhanont i sur. u svom istraživanju primjećuju pozitivnu korelaciju povišenih vrijednosti PGE2 u suzama kod oboljelih od bolesti suhog oka. Time se PGE2 stavlja kao potencijalna meta za liječenje ove bolesti.

Nanotehnologija nudi brojne mogućnosti za unaprjeđenje liječenja bolesti suhog oka. Nanosustavi omogućuju bolje uklapanje djelatnih tvari slabo topljivih u vodi te istovremenu zaštitu djelatnih tvari od enzimske razgradnje u suznom filmu. Također, nanosustavi omogućuju produljeno zadržavanje i bolju interakciju djelatne tvari s površinom oka te postizanje veće koncentracije djelatne tvari na ciljnom mjestu. Komercijalno dostupne inovativne nanoemulzije s ciklosporinom A za liječenje bolesti suhog oka su Restasis<sup>®</sup> (Allergan), Lacrinmune<sup>®</sup> (Bausch & Lomb) te Ikervis<sup>®</sup> (Santen) (Jurišić Dukovski, 2021).

## 1.2. Nanoemulzije

Nanoemulzije (NE) su disperzije dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, a stabilizirane su odgovarajućim površinski aktivnim tvarima. Termodinamički su nestabilni, ali kinetički stabilni sustavi. Veličina kapljica unutarnje faze kreće se od 20 do 500 nm (Singh i sur., 2020). Mala veličina kapljica osigurava veliku ukupnu površinu za oslobađanje djelatne tvari koja time postaje dostupna za apsorpciju (Jurišić Dukovski, 2021).

Klasifikacija NE temelji se na vrsti disperzne faze. Razlikujemo U/V tip NE u kojoj su uljne kapljice dispergirane u vodenoj kontinuiranoj fazi te V/U tip NE u kojoj su vodene kapljice dispergirane u uljnoj kontinuiranoj fazi, te mješoviti U/V/U ili V/U/V tip NE (Singh i sur., 2020).

U/V nanoemulzije (NE), ultrafine disperzije ulja u vodi stabilizirane amfifilnim površinski aktivnim tvarima, imaju veliki potencijal djelotvornog liječenja DED-a. Prema dosadašnjem shvaćanju, NE 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. Nadomještanje deficijentnog lipidnog sloja suznog filma (engl. *tear film*

*lipid layer*, TFLL) s odgovarajućim lipidima iz uljnih kapljica moguće uzrokuje stabilizaciju suznog filma. Nadalje, NE učinkovito dopremaju teško topljivu djelatnu tvar u rožnični segment. Takav učinak posljedica je uklapanja djelatne tvari u uljne kapljice koje imaju ulogu spremnika. Budući da većina protuupalnih djelatnih tvari (tj. glukokortikoidi, CsA, takrolimus, NSAID poput indometacina i ibuprofena) imaju ograničenu topljivost u vodi, njihovo uklapanje u NE može osigurati ublažavanje simptoma suhoga oka zbog stabilizacije suznog filma i protuupalnog učinka te tako prekinuti začarani krug DED-a.

### **1.3. Pomoćne tvari u izradi nanoemulzija**

Pri izradi nanoemulzija potrebno je obratiti pozornost na odabir prikladnih pomoćnih tvari. Poželjno bi bilo birati pomoćne tvari koje su odobrene za oftalmičku primjenu ili se nalaze na GRAS (engl. *Generally recognized as safe*) listi. Pomoćne tvari moraju biti netoksične i ne iritirati oko nakon primjene. Također moraju osigurati otapanje djelatne tvari te odgovarajuću stabilnost formulacije.

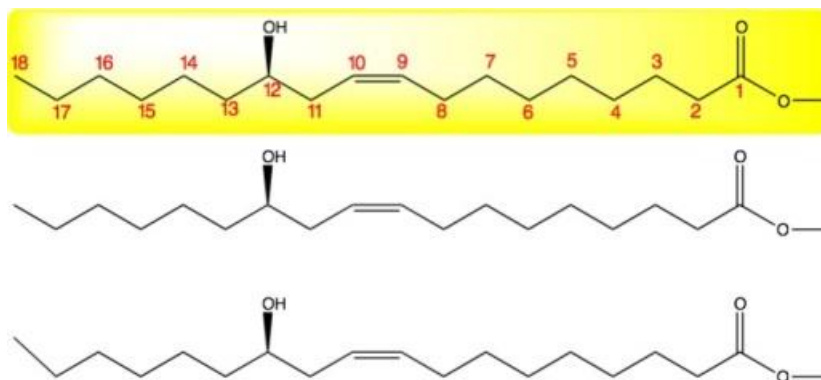
#### **1.3.1. Uljna faza**

Pri odabiru ulja ili lipida koji će se koristiti u izradi nanoemulzija, topljivost djelatne tvari u odabranoj uljnoj fazi je važno mjerilo koje treba uzeti u obzir. Druge relevantne karakteristike ulja/lipida su viskoznost, gustoća, indeks loma svjetlosti i površinska napetost. Za dobivanje nanoemulzija manjih veličina kapljica potrebno je odabrati ulje niske površinske napetosti i viskoznosti (Fernandes i sur., 2021). Općenito, 3-10% (*m/m*) lipida ili ulja dovoljno je za pripremu oftalmičkih nanoemulzija (Singh i sur., 2020). Kako bi se postigla dobra podnošljivost nanoemulzija nakon primjene u oko, u izradi nanoemulzija se koriste visokopročišćena ulja (Jurišić Dukovski, 2021). Obično se trigliceridi srednjeg i dugog lanca smatraju idealnom uljnom fazom u smislu poboljšane topljivosti i bioraspodivnosti lipofilnih lijekova (Singh i sur., 2020).

Ostala ulja i lipidi koja se spominju u literaturi, a potencijalno se mogu koristiti u izradi nanoemulzija za oftalmičku primjenu su: ricinusovo ulje, sojino ulje, ulje kikirikija, kokosovo ulje, ulje noćurka, maslinovo ulje, laneno ulje, mineralno ulje, ulje kukuruza, vitamin E, izopropilmiristat, oleinska kiselina, triacetin, etiloleat, lecitin iz žumanjka jajeta, Lipoid® S75, Lipoid® E80, Estasan® (kaprilni kaprinski triglicerid), Eutanol G, Lipoid® S100, Capmul®

MCM, Miglyol<sup>®</sup> 812, Capryol<sup>®</sup> 90, Dermal<sup>®</sup> M5, Epikuron<sup>®</sup> 200, Lipoid<sup>®</sup> E-80, 1,2-di-(9Z-oktadecenoil)-3-trimetilamonijpropan (DOTAP), Phospholipon<sup>®</sup> 90H, Labrasol<sup>®</sup> (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021; Singh i sur., 2020).

### 1.3.1.1. Ricinusovo ulje



Slika 4. Kemijska struktura ricinolne kiseline, glavne sastavnice ricinusovog ulja (preuzeto iz Patel i sur., (2016) uz dopuštenje izdavača)

Ricinusovo ulje je biljno ulje dobiveno mehaničkim prešanjem sjemenki biljke *Ricinus communis* L. Boja mu varira od blijedožućkaste do čak gotovo bezbojne, te je blagog karakterističnog mirisa (Patel i sur., 2016). Sadrži 90% ricinolne, 4% linolne, 3% oleinske, 1% stearinske i manje od 1% linolenske masne kiseline (Patel i sur., 2016). Osim što u oftalmičkim nanoemulzijama služi za uklapanje slabo topljivih lijekova, ricinusovo ulje ima i snažna antimikrobna, protuupalna, antinociceptivna, analgetska, antioksidativna, zacjeljujuća i vazokonstriktorna svojstva te se smatra sigurnim i podnošljivim uljem za oftalmičku primjenu (Sandford i sur., 2021).

### 1.3.1.2. Miglyol<sup>®</sup> 812

Miglyol<sup>®</sup> 812 je trigliceridni ester kaprilne i kaprinske masne kiseline (najčešće izolirane iz kokosovog ili palminog ulja) i glicerola. Pripada skupini triglicerida srednje duljine lanca. Bistra je i gotovo bezbojna tekućina neutralnog mirisa (Sheskey i sur., 2017). Zbog svoje

niske viskoznosti, dobre kompatibilnosti s djelatnim i pomoćnim tvarima, fiziološke podnošljivosti te stabilnosti na oksidaciju pokazao se kao prihvatljiva uljna faza u izradi nanoemulzija za oftalmičku primjenu.

### **1.3.1.3. Sojino ulje**

Sojino ulje je izvor polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina, a dobiva se iz zrna soje. Glavne komponente ulja su linolna (48% - 58%), oleinska (17% - 30%), palmitinska (9% - 13%), linolenska (4% - 11%) i stearinska kiselina (2,5% - 5,0%) ([go.drugbank.com](http://go.drugbank.com)). Svojstva sojinog ulja čine ga dobrim izborom kao pomoćne tvari u izradi neiritirajućih, biokompatibilnih i financijski isplativih nanoemulzija. Ovo ulje korišteno je u izradi brojnih drugih formulacija, primjerice liposoma, mikrosfera, suhih emulzija, nanokapsula i samoemulgirajućih sustava (Fernandes i sur., 2021).

### **1.3.1.4. Sezamovo ulje**

Sezamovo ulje se dobiva iz sjemenki biljke *Sesamum indicum* L. Sadrži otprilike jednaku količinu mononezasićenih masti (40% oleinske kiseline) i polinezasićenih masti (42% linolne kiseline), a preostali dio ulja čine zasićene masti (~8% palmitinske i 4% stearinske kiseline). Jedinstvena prednost sezamovog ulja u usporedbi s drugim biljnim uljima je ta što zbog visokog sadržaja antioksidansa ima visoku oksidativnu stabilnost s gotovo 85%-tnim udjelom nezasićenih masnih kiselina (Eftimov i sur., 2022).

## **1.3.2. Površinski aktivne tvari**

Površinski aktivne tvari (PAT, surfaktanti) omogućuju stvaranje disperzije dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju smanjenjem površinske napetosti između faza te sprječavaju ponovnu agregaciju kapljica, što posljedično dovodi do povećanja stabilnosti stvorenih nanoemulzija (Fernandes i sur., 2021). PAT su amfipatske molekule građene od polarne (hidrofilne) glave i nepolarnog (hidrofobnog) repa. HLB (engl. *Hydrophilic/Lipophilic Balance*) vrijednost opisuje udio hidrofilnih i lipofilnih dijelova u strukturi PAT. Niža HLB vrijednost ukazuje na bolju topljivost PAT u ulju, dok viša HLB vrijednost ukazuje na to da je PAT topljivija u vodi.

U izradi oftalmičkih nanoemulzija preferira se primjena površinski aktivnih tvari HLB vrijednosti 8-16 jer takve PAT stvaraju U/V tip nanoemulzija i poboljšavaju permeaciju lijeka kroz rožnicu oka (Fernandes i sur., 2021).

PAT možemo podijeliti u 4 skupine s obzirom na prirodu hidrofilnih grupa: Zwitterionske, neionske, anionske i kationske. Neionske PAT smatraju se sigurnima i uzrokuju reverzibilne promjene u permeabilnosti površine oka (Singh i sur., 2020). Tween 80 (neionska PAT) se naširoko koristi u oftalmičkim farmaceutskim oblicima zbog svoje sigurnosti i nenadražujućeg učinka na oko, njegova HLB vrijednost iznosi 15 (Fernandes i sur., 2021). Istoj skupini pripadaju i sorbitanski esteri (Span), poloksameri (Pluronic F68, Pluronic L-62TM, Pluronic F127), polioksietilenski esteri (Emulphor), hidrogenirani derivati ricinusovog ulja (Kolliphor EL, Kolliphor RH40, Kolliphor RH60), tiloksapol, polioksietilenski ester 12-hidroksistearinske kiseline (Solutol HS 15), Vitamin E-TPGS i polietilen glikol sukcinat (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021).

Ponekad se PAT dodaju i kosurfaktanti. Kosurfaktanti su također amfipatske molekule, male veličine, koje djeluju sinergistički s PAT. Povećavaju fluidnost međupovršinskog filma kapljica i smanjuju koncentraciju PAT, izbjegavajući njihovu potencijalnu toksičnost (Fernandes i sur., 2021). Najčešće korišteni kosurfaktanti u oftalmičkim nanoemulzijama su kratkolančani i srednjelančani alkoholi poput etanola, benzil alkohola, glicerola, propilenglikola i polietilenglikola PEG 400 (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021).

### **1.3.3. Ostale pomoćne tvari**

Oftalmološke formulacije zahtijevaju dodatak drugih pomoćnih tvari koje im omogućuju primjenu na površinu oka, uključujući konzervanse, pufere, sredstva za izotonizaciju, modifikatore viskoznosti te humektanse (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021).

Sljedeći konzervansi se koriste u oftalmičkim nanoemulzijama: benzalkonijev klorid (0,01–0,1% m/V), cetrimid (0,01–0,1% m/V), klorokrezol, parabeni i alkoholi (npr. klorobutanol i fenoksi-2-etanol) (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021).

Pufere nije nužno koristiti jer se pH vrijednost suza nakon primjene nepuferiranih kapi za oko, čiji se pH razlikuje od pH suza, vrlo brzo vraća na fiziološke vrijednosti zahvaljujući puferskom kapacitetu suza (Jurišić Dukovski, 2021). Međutim, ukoliko je puferiranje neophodno, koriste se citratni, fosfatni ili boratni puferi (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021).

Osmolalnost oftalmičkih nanoemulzija prilagođava se dodatkom sredstva za izotonizaciju poput manitola (0,15-0,3% m/V), glicerola (2,5-5% m/V), sorbitola, propilenglikola i dekstroze (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021). Glicerol je sredstvo za izotonizaciju koje se naširoko koristi u nanoemulzijama jer osim što djeluje kao suotapalo u vodenoj fazi ima i svojstvo mijenjanja gustoće, viskoznosti i indeksa loma otopine. Njegov dodatak vodenoj fazi modificira topljivost PAT (bilo ionskih ili neionskih) i optimalnu zakrivljenost kapljica. Niska koncentracija glicerola u U/V nanoemulzijama povećava stabilnost iste (Fernandes i sur., 2021).

Viskoznost oftalmičkih nanoemulzija može se povećati dodavanjem prirodnih i sintetskih polimera koji imaju dobra svojstva upijanja vode i stvaraju viskoelastične gelove. Kao rezultat toga, može se postići produljeno vrijeme kontakta lijeka s rožnicom oka, što u konačnici dovodi do povećanja bioraspoloživosti lijeka. U tu svrhu se koriste polisaharidni polimeri kao što su metilceluloza, hidroksietilceluloza, hidroksipropilceluloza, hidroksipropilmetilceluloza, gelan guma, ksantan guma, hijaluronska kiselina te sintetski polimeri kao što su poli(vinil alkohol), polivinilpirolidon i karbomer (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021).

#### **1.4. Metode izrade nanoemulzija**

Nanoemulzije se mogu pripremiti korištenjem visokoenergetskih i niskoenergetskih metoda. Kod visokoenergetskih metoda, mehanički uređaji isporučuju velike razorne sile potrebne za stvaranje vrlo sitnih kapljica (Çinar, 2017). Visoki unos energije u ovim metodama može izazvati lokalno povećanje temperature unutar formulacija što ih čini neprikladnim metodama za homogenizaciju termolabilnih spojeva. Nadalje, velika potrošnja energije i specijalizirana oprema povećavaju trošak proizvodnje nanoemulzija. Visokoenergetske metode omogućuju kontroliranje veličine kapljica putem različitih tehnoloških procesa poput uvjeta homogenizacije (npr. vrijeme, temperatura), kao i svojstva i sastava početne formulacije (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021). S druge strane, kod niskoenergetskih metoda nema potrebe za vanjskom silom. Energetski su učinkovite jer koriste unutarnju kemijsku energiju sustava i zahtijevaju samo lagano miješanje u pripravi nanoemulzija (Kumar i sur., 2019).

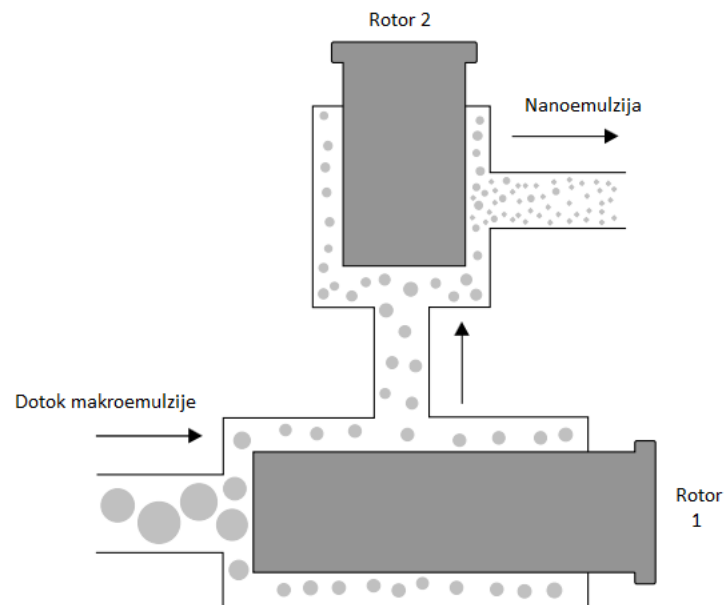
Visokoenergetske metode obuhvaćaju visokotlačnu homogenizaciju, mikrofluidizaciju i ultrazvučnu homogenizaciju, a niskoenergetske metode obuhvaćaju metodu fazne inverzije



(uslijed promjene sastava formulacije ili temperature) i metodu spontanog emulgiranja (Singh i sur., 2020).

#### 1.4.1. Visokoenergetske metode

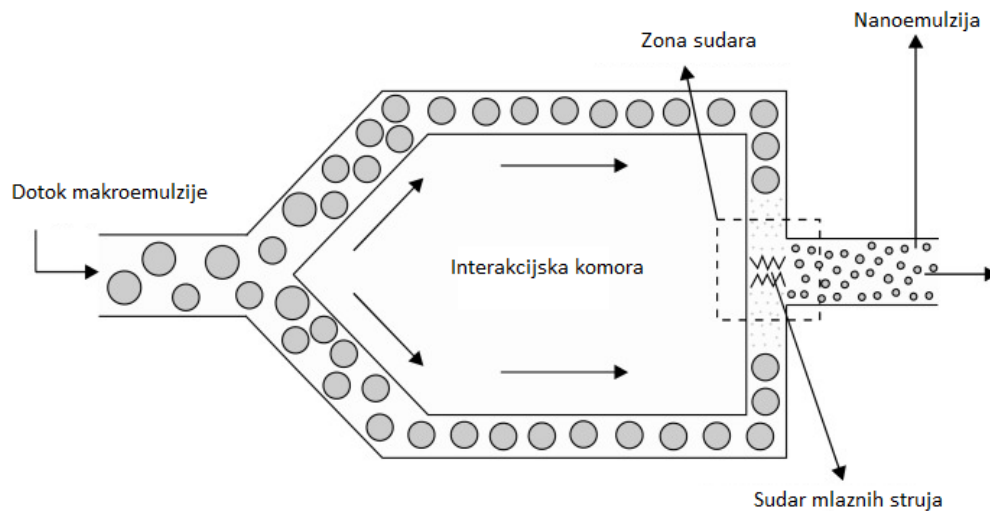
##### Visokotlačni homogenizator



Slika 5. Princip rada dvofaznog visokotlačnog homogenizatora (preuzeto i prilagođeno prema Kumar i sur., (2019) uz dopuštenje izdavača).

Visokotlačni homogenizatori su uređaji koji rade na principu koloidnog mlina. U tim se uređajima gruba emulzija propušta kroz uzak otvor ( $< 10 \mu\text{m}$ ) između nepomičnog statora i rotora koji se okreće velikom brzinom, pod visokim tlakom, što rezultira homogenom nanoemulzijom s promjerom čestica disperzne faze od oko 100 nm (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021; Jurišić Dukovski, 2021). Formulacija se obično propušta više puta kroz homogenizator, a konačna veličina kapljica ovisi o broju ciklusa homogenizacije i sastavu formulacije. Najvažnije prednosti visokotlačne homogenizacije u proizvodnji nanoemulzija su visoka učinkovitost, skalabilnost te ponovljivost procesa (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021).

## Mikrofluidizator

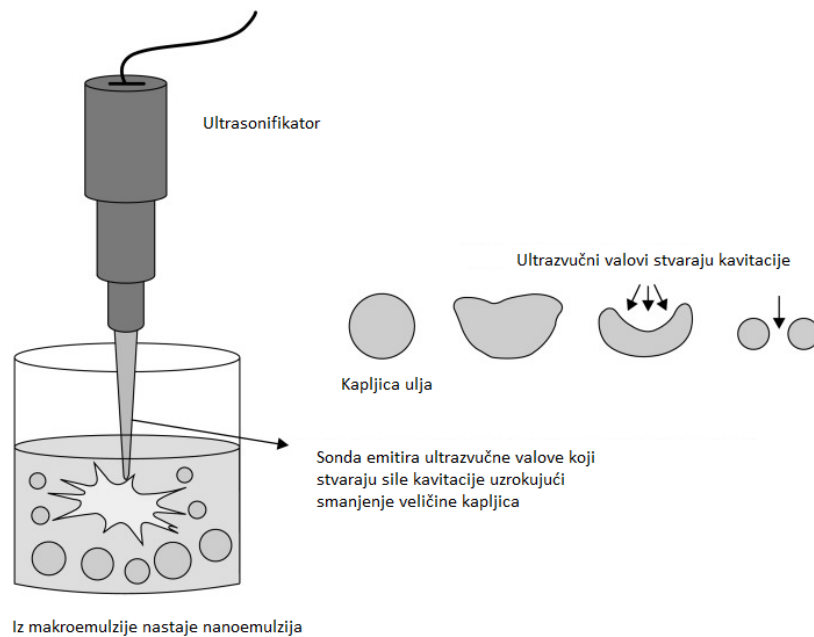


Slika 6. Princip rada mikrofluidizatora (preuzeto i prilagođeno prema Kumar i sur., (2019) uz dopuštenje izdavača).

U mikrofluidizatoru se gruba emulzija propušta kroz mikrokanale pod visokim tlakom koji vode do interakcijske komore. U interakcijskoj komori dvije struje uzorka udaraju jedna o drugu velikom brzinom. Ovaj sudar stvara sile smicanja i kavitacije pri čemu se stvaraju stabilne nanoemulzije (Kumar i sur., 2019). Unutar mikrofluidizatora formulacije se mogu propuštati mnogo puta dok se ne postigne željena veličina kapljica (Fernandes i sur., 2021). Veličina kapljica dobivena ovom metodom ovisi o primijenjenom tlaku, broju prolaza kroz interakcijsku komoru te sastavu formulacije (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021).

## Ultrasonifikator

Ultrasonifikacija je metoda pripreme nanoemulzija korištenjem sonde koja emitira ultrazvučne valove. Ultrazvučni valovi stvaraju sile kavitacije koje razbijaju makroemulziju u nanoemulziju. Mijenjanjem unosa ultrazvučne energije i vremena, možemo postići željenu veličinu kapljica i stabilnost nanoemulzije. Metodom ultrasonifikacije moguće je proizvesti nanoemulzije u odsutnosti površinski aktivnih tvari (Kumar i sur., 2019).



Slika 7. Princip rada ultrasonifikatora (preuzeto i prilagođeno prema Kumar i sur., (2019) uz dopuštenje izdavača).

### 1.5. Karakterizacija nanoemulzija

Karakterizacija nanoemulzija je ključna za pronalaženje optimalne formulacije i praćenje svojstava formulacije tijekom vremena skladištenja (Fernandes i sur., 2021). Razvijeno je nekoliko metoda karakterizacije u svrhu procjene svojstava i kvalitete oftalmičkih nanoemulzija. Ove metode omogućuju ispitivanje *fizičko-kemijskih svojstava* formulacije (npr. vizualni izgled, transparentnost, veličinu i raspodjelu veličina kapljica, zeta-potencijal, indeks loma svjetlosti, pH, osmolalnost, površinsku napetost, viskoznost), *farmaceutskih svojstava* (npr. određivanje sadržaja djelatne tvari i in vitro oslobađanje iz nanoemulzije, procjena sterilnosti i stabilnosti nakon skladištenja, ispitivanje interakcije djelatne tvari sa sastavnicama formulacije) te *biofarmaceutskih svojstava* (ispitivanje mukoadhezivnosti, citotoksičnosti, iritacije, transkornealne permeacije, antifungalne aktivnosti i dr.). Kako su nanoemulzije složeni višekomponentni sustavi, potrebno je kombinirati komplementarne metode karakterizacije kako bi razumjeli svojstva, ali i učinkovitost i sigurnost primjene (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021). Fizičko-kemijska svojstva nanoemulzije mogu značajno utjecati na stabilnost formulacije, brzinu oslobađanja djelatne tvari te njezinu posljedičnu apsorpciju i raspodjelu u tkiva oka, kao i na ugodnost primjene (Jurišić Dukovski, 2021).

### 1.5.1. Veličina kapljica i indeks polidisperznosti

Veličina kapljica disperzne faze u rasponu od 20 do 500 nm značajno povećava stabilnost nanoemulzije i kontakt djelatne tvari s površinom oka, što u konačnici dovodi do poboljšane apsorpcije lijeka nakon primjene. Dinamičko raspršivanje svjetlosti (engl. *Dynamic light scattering*, DLS) je najčešće korištena tehnika za određivanje veličine kapljica disperzne faze te indeksa polidisperznosti nanoemulzijskih sustava (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021). U DLS metodi laserska zraka se raspršuje na kapljicama unutarnje faze nanoemulzije, a na temelju promjene intenziteta raspršene svjetlosti određuju se prosječna veličina i raspodjela veličina kapljica. U ovoj metodi se prati varijabilnost intenziteta raspršene laserske svjetlosti uslijed Brownovog gibanja kapljica, male kapljice se gibaju brže od većih. Uređaj mjeri fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti te na temelju toga, pomoću Stokes-Einsteinove jednadžbe, računa veličinu kapljica (Jurišić Dukovski, 2021). Mjerenja se mogu provesti u nerazrijeđenim uzorcima nanoemulzija ili pak uzorcima koji su razrijeđeni s vanjskom fazom. Razrjeđivanje uzoraka je često potrebno pri analizi formulacija koje sadrže pomoćne tvari koje povećavaju viskoznost sustava, jer one mogu ometati procjenu veličine kapljica.

Uz veličinu kapljica navodi se i indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI) kao mjera rasapa veličina kapljica nanoemulzije oko prosječne vrijednosti. PDI se kreće od 0, za potpuno ujednačene, monodisperzne nanoemulzije, do 1, za polidisperzne nanoemulzije čije su kapljice unutarnje faze prisutne u vrlo različitim veličinama. S obzirom na to da nije moguće postići potpunu ujednačenost veličina kapljica, nanoemulzije se smatraju monodisperznima kada je njihov PDI manji od 0,2 (Jurišić Dukovski, 2021).

### 1.5.2. Zeta-potencijal

Zeta-potencijal je neizravna mjera električnog naboja na površini kapljica, te se može koristiti za procjenu fizičke stabilnosti nanoemulzija. Računa se iz elektroforetske pokretljivosti kapljica u električnom polju pomoću Henry-jeve jednadžbe. Visoke vrijednosti zeta-potencijala sugeriraju na odbojne sile između kapljica koje su odgovorne za stabilizaciju sustava. U slučaju oftalmičkih nanoemulzija, zeta potencijal oko +20 mV opisan je kao dovoljan za postizanje optimalnog elektrostatskog kontakta između nanoemulzija i površine oka. Zeta-potencijal nanoemulzija od +20 do +40 mV dovoljan je za produljeno vrijeme zadržavanja na rožnici. Naboj na površini kapljice osigurava bioadheziju na površini oka te elektrostatsko odbijanje između kapljica nanoemulzije (Fernandes i sur., 2021).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Bolest suhog oka je prepoznata kao rastući javnozdravstveni problem koji se sve češće javlja kod mlađe populacije zbog sve veće uporabe digitalnih uređaja. Simptomi poput crvenila, peckanja, suzenja, svrbeži, osjećaja suhoće i pijeska ili stranog tijela u oku mogu značajno narušavati kvalitetu života oboljelih te čak dovesti do oštećenja površine oka i sljepoće.

Trenutno su glavne terapijske mogućnosti nadomještanje suznog filma, stimulacija stvaranja suza i topikalni protuupalni lijekovi. Djelatne tvari s učinkom smanjenja upale površine oka uključuju glukokortikoide, ne-glukokortikoidne imunomodulatore (ciklosporin A i takrolimus), nesteroidne protuupalne lijekove (NSAID) i antibiotike.

Ciklosporin A se koristi u liječenju težih oblika bolesti suhog oka, međutim, potrebno ga je koristiti dulje vrijeme, a početak djelovanja mu je odgođen. Kratkotrajna premedikacija NSAID može osigurati brže otklanjanje znakova i simptoma u teškim oblicima bolesti. NSAID imaju potencijal učinkovitog liječenja blagog do umjerenog oblika bolesti suhog oka, a razvoj formulacije s produljenim zadržavanjem na površini oka i produljenim oslobađanjem djelatne tvari omogućio bi smanjenje potrebne doze NSAID-a pri čemu bi se osigurao bolji omjer koristi i rizika budućih oftalmičkih lijekova.

Uklapanje lipofilnih NSAID (poput ibuprofena) u funkcionalne nanoemulzije s potencijalom za nadoknadu i stabilizaciju narušenog suznog filma moglo bi predstavljati iskorak u liječenju bolesti suhog oka.

Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti uljnu fazu koja će omogućiti optimalno uklapanje ibuprofena u nanoemulziju U/V tipa te postaviti temelj razvoju oftalmičke formulacije s uklopljenim ibuprofenom. Pri odabiru uljne faze napravljen je probir sljedećih ulja: Miglyol<sup>®</sup> 812, ricinusovo ulje, sojino ulje i sezamovo ulje. Kao površinski aktivna tvar je izabran Tween<sup>®</sup> 80, a kao sredstvo za izotonizaciju glicerol. Pripravljene su formulacije s različitim udjelom uljne faze te s uklopljenim ibuprofenom. Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije.

Specifični ciljevi diplomskog rada bili su:

- Ispitati topljivost ibuprofena u različitim uljima;
- Pripraviti U/V nanoemulzije visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije;
- Odrediti fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija uključujući veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal.

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

#### **3.1. Materijali**

U ispitivanju topljivosti ibuprofena u različitim uljima korištena su sljedeća ulja: Miglyol<sup>®</sup> 812 i ricinusovo ulje (Kemig, Zagreb, Hrvatska), sojino ulje (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) te sezamovo ulje (Croda International Plc, Snaith, Ujedinjeno Kraljevstvo). Izopropanol (Kemig) je korišten kao otapalo i sredstvo za razjeđivanje prilikom ispitivanja topljivosti ibuprofena u uljima. U izradi U/V nanoemulzija korišteni su ricinusovo ulje, ibuprofen kojeg je donirala PLIVA Hrvatska d.o.o.(Zagreb, Hrvatska), polisorbit 80 (Tween<sup>®</sup> 80) (Kemig, Zagreb, Hrvatska), glicerol kao sredstvo za izotonizaciju nanoemulzija (T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska) te pročišćena voda.

#### **3.2. Metode**

##### **3.2.1. Ispitivanje topljivosti ibuprofena u uljima**

Topljivost ibuprofena ispitana je pri sobnoj temperaturi u sljedećim uljima: Miglyolu<sup>®</sup> 812, ricinusovom ulju, sojinom ulju i sezamovom ulju. Na 5 g svakog pojedinog ulja je dodan ibuprofen u količini koja prelazi njegovu topljivost. Nastala suspenzija je zatim ostavljena na magnetskoj mješalici tijekom 48 sati, nakon čega je centrifugirana 30 min pri  $1520 \times g$ . Uzeto je 100 mg supernatanta te razrijeđeno izopropanolom  $10\,000 \times$ . Izmjerene su apsorbancije pomoću UV-Vis spektrofotometra pri valnoj duljini 225 nm. Kao slijepa proba je korištena smjesa izopropanola i pojedinog ulja, čija je apsorbancija također izmjerena. Izračunat je sadržaj ibuprofena (izražen kao topljivost, mg ibuprofen/g ulja) korištenjem baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o koncentraciji ibuprofena, opisanog u poglavlju 3.2.2.

##### **3.2.2. Određivanje sadržaja ibuprofena**

Iz literature je poznato da je prosječna topljivost ibuprofena u različitim uljima iznosi oko 100 mg/g ulja (Zhao i sur., 2015). Stoga će nakon razrjeđivanja (10 000 puta) koncentracija ibuprofena u otopini iznositi 10  $\mu\text{g/mL}$ .

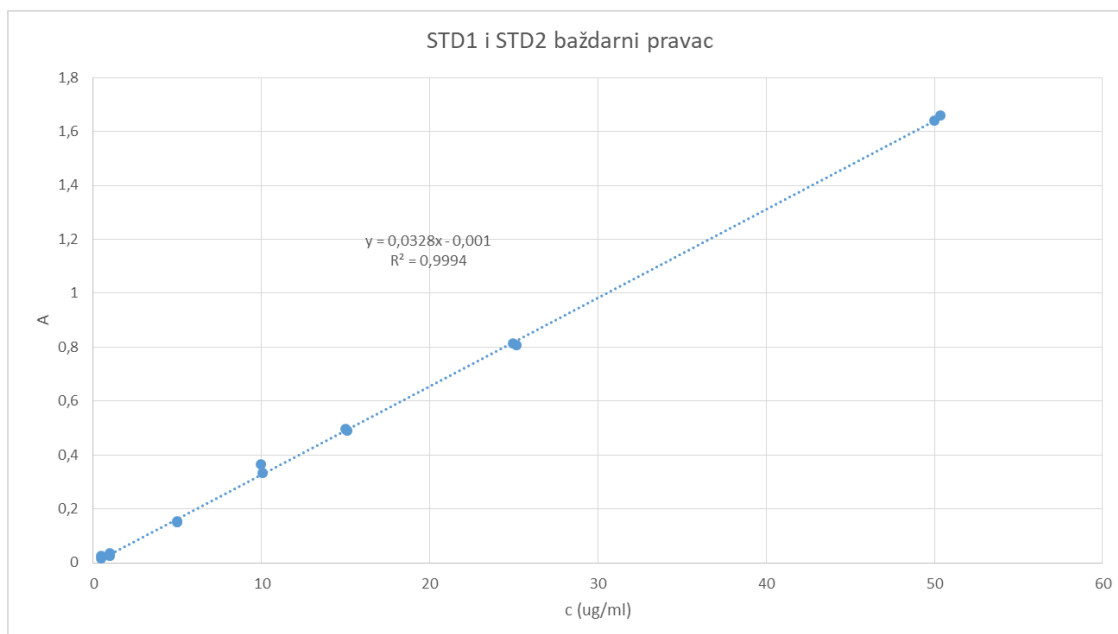
Napravljene su 2 temeljne standardne otopine ibuprofena različitih koncentracija, na način da se određena količina ibuprofena otopila u izopropanolu. Koncentracija jedne otopine ibuprofena je iznosila 1,008 mg/mL, a druge 1 mg/mL. Iz otopine ibuprofena koncentracije 1,008 mg/mL pripravljeno je 7 radnih otopina različitih koncentracija (0,504; 1,008; 5,04; 10,08; 15,12; 25,2; 50,4  $\mu$ g/mL), na način da su određeni volumeni temeljne otopine ibuprofena uzeti i razrijeđeni izopropanolom do 10 mL. Na isti način je pripređeno i 7 radnih otopina iz temeljne otopine ibuprofena koncentracije 1 mg/mL, a čije su koncentracije iznosile 0,5; 1; 5; 10; 15; 25; 50  $\mu$ g/mL. Izopropanol je korišten kao slijepa proba, jer se ibuprofen otapa u istome. Pomoću UV-Vis spektrofotometra Cary 50 Probe (Varian Analytical Instruments, SAD) izmjerena je apsorbancija radnih otopina pri valnoj duljini 225 nm. Izmjerena je i apsorbancija čistog izopropanola. Izmjerene apsorbancije pripadajućih radnih otopina i njihove koncentracije su prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Koncentracije radnih otopina i njihove izmjerene apsorbancije.

Naziv temeljne otopine ibuprofena	Koncentracija radne otopine ( $\mu\text{g/mL}$ )	Apsorbancija radne otopine (A)	Apsorbancija izopropanola ( $A_i$ )	Apsorbancija ibuprofena (A- $A_i$ )
<b>STD1</b>	0,504	0,324	0,300	0,024
	1,008	0,325		0,025
	5,04	0,449		0,149
	10,08	0,633		0,333
	15,12	0,788		0,489
	25,2	1,106		0,806
	50,4	1,958		1,658
<b>STD2</b>	0,5	0,314		0,015
	1	0,334		0,034
	5	0,452		0,152
	10	0,663		0,364
	15	0,797		0,497
	25	1,113		0,813
	50	1,938		1,638

Vrijednosti koncentracija svih radnih otopina te njihovih pripadajućih izmjerenih apsorbancija (A- $A_i$ ) su uvrštene u baždarni dijagram pomoću programa Microsoft Excel te je dobiven baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji ibuprofena prikazan na Slici 8.





Slika 8. Baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji ibuprofena

### 3.2.3. Priprava nanoemulzija

Za izradu U/V nanoemulzija korišteno je ricinusovo ulje kao uljna faza jer je ustanovljeno da je topljivost ibuprofena u istom najveća. Vodenu fazu su sačinjavali pročišćena voda, polisorb 80 (Tween<sup>®</sup> 80) kao neionska površinski aktivna tvar, te glicerol kao sredstvo za izotonizaciju nanoemulzija. Pripravljene su nanoemulzije s uklopljenim ibuprofenom i bez uklopljenog ibuprofena. Sastav izrađenih nanoemulzija prikazan je u Tablici 2. Masa pojedine formulacije iznosila je 50 g.

Tablica 2. Sastav izrađenih nanoemulzija

Naziv formulacije	Sastavnice (% , m/m)				
	Ricinusovo ulje	Ibuprofen	Tween® 80	Glicerol	Pročišćena voda
R2	2	-	1	2,5	ad 100
R5	5	-	2,5	2,5	ad 100
IR2	2	0,2	1	2,5	ad 100
IR5	5	0,2	2,5	2,5	ad 100

Uljna i vodena faza se pripreme odvojeno. Uljna faza formulacija koje sadrže ibuprofen priprema se tako da se odvaže određena količina ibuprofena i ricinusovog ulja (prema Tablici 1) te miješa na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi sve do potpunog otapanja ibuprofena. Za pripremu vodene faze odvažu se određene količine Tweena® 80, glicerola te pročišćene vode (prema Tablici 1) te se miješa na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi sve do potpunog otapanja Tweena® 80 i glicerola. Gruba emulzija je dobivena dodavanjem uljne faze (ricinusovo ulje ili ibuprofen otopljen u ricinusovom ulju) u vodenu fazu te obradom na visokoturažnoj mješalici Ultra-Turrax (IKA® -Werke GmbH & Co, Njemačka) brzinom od 15000 rpm tijekom 5 minuta. S ciljem dobivanja nanoemulzija, priređena gruba emulzija je propuštena kroz mikrofluidizator (Model LM20 Microfluidizer®, Microfluidics, Newton MA, SAD) 10 puta pri tlaku od 1000 bara.

### 3.2.4. Mjerenje veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala

Mjerenje veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala pripremljenih nanoemulzija provedeno je korištenjem uređaja Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Malvern, UK). Uzorci nanoemulzija su prije mjerenja razrijeđeni 100 puta s 2,5% (m/m) vodenom otopinom glicerola (vanjska vodena faza nanoemulzija). Mjerenje se provodi u jednokratnim kivetama DTS1070 (Malvern Instruments) pri temperaturi od 25 °C.

Uređaj radi na principu dinamičkog raspršivanja svjetlosti (engl. *Dynamic light scattering*, DLS). Kut detekcije kod mjerenja veličine kapljica i PDI iznosio je 174,7°.

Drugi princip rada Zetasizer Ultra uređaja je mjerenje elektroforetske pokretljivosti čestica iz čije se vrijednosti pomoću Henry-jeve jednadžbe može izračunati zeta-potencijal. Elektroforetska pokretljivost kapljica određuje se na temelju razlike u frekvenciji između raspršene svjetlosti i originalne laserske zrake (Jurišić Dukovski, 2021).

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Djelatne tvari koje su u središtu istraživanja za razvoj novih lijekova za liječenje bolesti suhog oka, a čiji mehanizam djelovanja podrazumijeva smanjenje upale površine oka uključuju glukokortikoide, ne-glukokortikoidne imunomodulatore (tj. ciklosporin A (CsA) i takrolimus), nesteroidne protuupalne lijekove (NSAID) i antibiotike. Većinom je riječ o slabotopljivim djelatnim tvarima u vodi te dobrim kandidatima za uklapanje u U/V nanoemulzije. Ciklosporin A (CsA) je peptid izoliran iz gljivica koji ima protuupalna i imunosupresivna svojstva. Lipofilan je lijek stoga se može uspješno uklapati u uljnu fazu U/V nanoemulzija. Upravo je uklapanje CsA u oftalmičke nanoemulzije omogućilo liječenje težih oblika bolesti suhog oka. 2002. godine Agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila prvu oftalmičku nanoemulziju za liječenje bolesti suhog oka Restasis<sup>®</sup> (Allergan) koja sadrži 0,05 % ciklosporina A. Sličnog sastava je i Lacrinmune<sup>®</sup> (Bausch & Lomb, odobren u Argentini), dok Ikervis<sup>®</sup> (Santen) sadrži 0,1% CsA (Nagai i Otake, 2022; Mohamed i sur., 2022). CsA je prikladan za dugotrajnu upotrebu, koja je nužna zbog kronične naravi bolesti, bez opasnosti od izazivanja ozbiljnijih nuspojava. Ipak, 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 ili NSAID, s ciljem ubrzanja nastupa protuupalnog učinka i olakšanja simptoma (Jurišić Dukovski, 2021). NSAID imaju potencijal učinkovitog liječenja blagog do umjerenog oblika bolesti suhog oka, a razvoj formulacije s produljenim zadržavanjem na površini oka i produljenim oslobađanjem djelatne tvari omogućio bi smanjenje potrebne doze NSAID-a pri čemu bi se osigurao bolji omjer koristi i rizika budućih oftalmičkih lijekova.

Ibuprofen je nesteroidni protuupalni lijek, slaba kiselina, međutim ima relativno visoku lipofilnost stoga je slabo topljiv u vodenom mediju, a dobro topljiv u organskim otapalima i lipidima (Janus i sur., 2020). Lipofilna svojstva ibuprofena omogućuju mu uklapanje u uljnu fazu oftalmičkih nanoemulzija koje služe kao tehnološka platforma za uklapanje slabo topljivih djelatnih tvari. Primjenom u oko, oslobođena frakcija ibuprofena je dostupna za apsorpciju i učinak, a neoslobođena frakcija prisutna u uljnoj fazi služi kao depo i na taj način osigurava produljeno vrijeme zadržavanja ibuprofena na površini oka. U oftalmičkim formulacijama udio ibuprofena iznosi 0,1-0,2 % (Jurišić Dukovski, 2021).

Jurišić Dukovski i sur., (2020) u svom istraživanju su uspješno uklopili ibuprofen u sekundarnu kationsku nanoemulziju. Formulacija je bila sastavljena od 0,2 % (*m/m*) ibuprofena, 0,05 % (*m/m*) kitozana, 2,5 % (*m/m*) Miglyola<sup>®</sup> 812, 0,05 % (*m/m*) lecitina, 0,25 % (*m/m*) Kolliphora<sup>®</sup> EL, 2,5 % (*m/m*) glicerola i pročišćene vode do 100 % (*m/m*). Fizičko-kemijska karakterizacija ukazala je na sličnost pripravljene formulacije s komercijalno dostupnim nanoemulzijama pripremljenim Novasorb<sup>®</sup> tehnologijom te potencijal primjene iste u liječenju blažih do umjerenih oblika bolesti suhog oka.

Ulje Miglyol<sup>®</sup> 812 je u navedenom istraživanju odabran kao ulja faza zbog zadovoljavajuće topljivosti ibuprofena, ali i topljivosti lecitina, pomoćne tvari koja sadrži fosfolipide fiziološki prisutne u suznom filmu (Jurišić Dukovski i sur., 2020). Cilj ovog diplomskog rada je provesti ispitivanje topljivosti ibuprofena u drugim uljima koja su odobrena ili velikog potencijala za oftalmičku primjenu. Stoga su u ispitivanju uz Miglyol<sup>®</sup> 812 kao kontrolnu uljnu fazu korišteno ricinusovo ulje, odobreno od strane FDA-a za oftalmičku primjenu (FDA Drug Databases, Inactive Ingredients in Approved Drug Products), sojino ulje koje se koristi kao uljna faza u umjetnim suzama Emustil<sup>®</sup> (Allergan, 7% *m/m*) u liječenju bolesti suhog oka povezanog s disfunkcijom Meibomove žlijezde te sezamovo ulje, visokopročišćeno biljno ulje jedinstvene kombinacije visoke oksidacijske stabilnosti, sadržaja antioksidansa i obiljem dugih polinezasićenih acilnih lanaca te velikog potencijala za liječenje bolesti suhog oka.

#### **4.1. Ispitivanje topljivosti djelatne tvari ibuprofena u uljima s potencijalom za izradu oftalmičkih nanoemulzija**

Ispitivanje topljivosti jedno je od ključnih ispitivanja u predformulacijskih istraživanjima. Termodinamička topljivost je topljivost tvari u stanju dinamičke ravnoteže između otopljene tvari i netopljene tvari u suvišku. Određuje se dodatkom krutine u suvišku u odgovarajuće otapalo. To može biti voda, različiti puferi, organska otapala, različita ulja, otopine PAT, prototipovi formulacija ili biorelevantni mediji (umjetne tjelesne tekućine). Ispitivanje se provodi u termostatoranoj komori pri određenoj brzini miješanja/mučkanja. Trajanje ispitivanja je 24, 48 ili više sati. Pri završetku ispitivanja, filtrira se nastala otopina i u filtratu određuje se koncentracija djelatne tvari.

Cilj ovih ispitivanja je odabrati pomoćne tvari i/ili prototip formulacije kako bi se postigla odgovarajuća topljivost djelatne tvari odnosno osigurala dobra bioraspoloživost te posljedično učinak lijeka. Udio uljne faze u nanoemulzijama kreće se od 3 do 10 % (*m/m*) (Singh i sur., 2020). Topljivost djelatne tvari u uljnoj fazi ključna je za odabir vrste i udjela uljne faze.

Kako udio uljne faze ne bi prešao zadano ograničenje, topljivost djelatne tvari u odabranoj uljnoj fazi mora biti dovoljna, s obzirom na ciljni udio djelatne tvari u formulaciji.

Rezultati ispitivanja topljivosti ibuprofena u četiri odabrana ulja prikazani su tablicom 3, a prikazani su kao topljivost ibuprofena u miligramima po gramu ulja. Ricinusovo ulje karakterizira najveća topljivost ibuprofena, značajno veća od topljivosti ibuprofena u preostala tri ulja.

Tablica 3. Topljivost ibuprofena u uljima pogodnim za oftalmičku primjenu. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 2$ ).

Ulje	Topljivost (mg ibuprofena/g ulja)
Miglyol <sup>®</sup> 812	89,29 $\pm$ 1,78
Sezamovo ulje	44,33 $\pm$ 1,63
Sojino ulje	50,58 $\pm$ 5,97
Ricinusovo ulje	144,69 $\pm$ 4,37

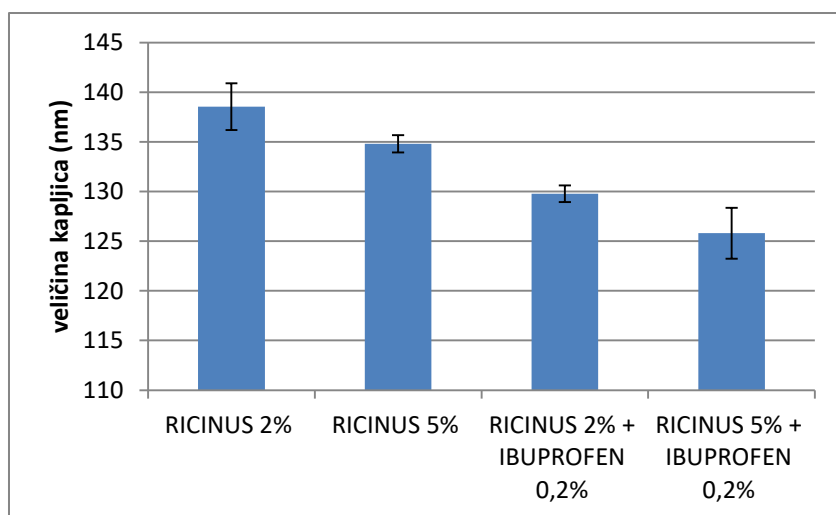
#### 4.2. Priprava i karakterizacija preliminarne oftalmičke nanoemulzije ricinusova ulja s uklopljenim ibuprofenom

S obzirom na izvrsnu topljivost ibuprofena u ricinusovom ulje te činjenicu da je ricinusovo ulje odobreno za oftalmičku primjenu i koristi se kao ulja faza u lijekovima Restasis<sup>®</sup> i Ikervis<sup>®</sup>, u sljedećoj fazi izrade diplomskog rada ispitana je mogućnost izrade nanoemulzija s uklopljenim ibuprofenom. U izradi oftalmičkih nanoemulzija preferira se primjena površinski aktivnih tvari HLB vrijednosti 8-16 jer takve PAT stvaraju U/V tip nanoemulzija i poboljšavaju permeaciju lijeka kroz rožnicu oka (Fernandes i sur., 2021). Tween<sup>®</sup> 80 (neionska PAT) se naširoko koristi u formulacijama za oko zbog svoje sigurnosti i nenadražujućeg učinka na oko, njegova HLB vrijednost iznosi 15 stoga je izabran kao PAT u izradi ovih nanoemulzija. Tween<sup>®</sup> 80 korišten je kao PAT i u lijeku Restasis<sup>®</sup>. Kao sredstvo za izotonizaciju korišten je glicerol.

Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije korištenjem jedinstvenog uređaja na tržištu pogodnog za laboratorijsku pripravu nanoemulzija, Model LM20 Microfluidizer<sup>®</sup> proizvođača Microfluidics. Zbog specifične tehničke izvedbe mikrofluidizatora, smično naprezanje koje se generira u interakcijskoj komori je značajno više u odnosu na druge tipove visokotlačnih homogenizatora, zbog čega ovaj tip uređaja omogućuje značajno veći stupanj usitnjena uzorka u odnosu na druge.

Cilj je bio pripremiti preliminarnu nanoemulziju s minimalnim udjelom uljne faze, a koja će sadržavati odgovarajuću količinu otopljenog ibuprofena. Kao ciljna vrijednost udjela uljne faze postavljena je vrijednost od 2 i 5% (*m/m*). Nanoemulzije s udjelom ricinusovog ulja od 2 % (*m/m*) sadržavale su 1% (*m/m*) Tweena<sup>®</sup> 80 (formulacije R2 i IR2), a nanoemulzije s 5 % (*m/m*) udjelom ricinusovog ulja, 2,5 % (*m/m*) Tweena<sup>®</sup> 80 (formulacije R5 i IR5). Što znači da je maseni odnos ricinusovog ulja i Tweena<sup>®</sup> 80 u svim formulacijama bio jednak (2:1). Sve nanoemulzije s uklopljenim ibuprofenom sadržavale su jednak udio ibuprofena (0,2 %, *m/m*). Iz literature je poznato da postoji utjecaj koncentracije PAT i udjela uljne faze na konačnu veličinu kapljica nanoemulzija. Đorđević i sur., (2013) u svom istraživanju primjećuju da s povećanjem udjela uljne faze i koncentracije površinski aktivne tvari dolazi do smanjenja veličine kapljica kod gotovo svih ispitivanih nanoemulzija. Međutim, pokazano je da ako se maseni odnos površinski aktivne tvari i uljne faze drži konstantnim, tj. ako se sa povećanjem udjela uljne faze povećava i koncentracija površinski aktivne tvari, u sustavu dolazi do smanjenja međupovršinske napetosti i nastanka manjih kapljica. Isti trend opadanja veličine kapljica vidljiv je i na Slici 9. Nanoemulzije s 5% (*m/m*) ricinusovog ulja i 2,5 % Tweena<sup>®</sup> 80 imaju manju veličinu kapljica od nanoemulzija s 2% (*m/m*) ricinusovog ulja i 1% (*m/m*) Tweena<sup>®</sup> 80.

Prosječna veličina kapljica svih izrađenih nanoemulzija se nalazila unutar nanometarskog područja, a iznosila je od 125,8 nm do 138,5 nm.

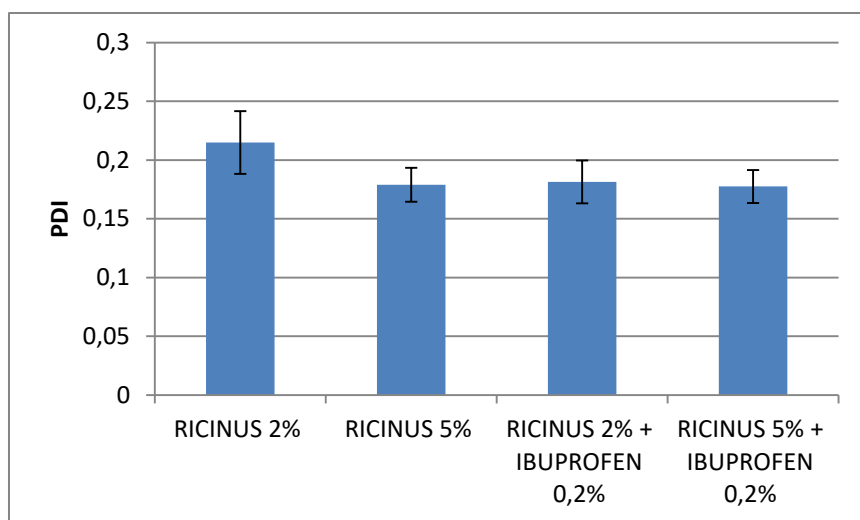


Slika 9. Usporedba veličine kapljica (izražene u nm) nanoemulzija različitog sastava (sastav nanoemulzija je prikazan u Tablici 2). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 2$ ).

Također je uočeno da nanoemulzije s uklopljenim ibuprofenom imaju manju veličinu kapljica od nanoemulzija bez uklopljenog ibuprofena (slika 9). Navedeno zapažanje je vjerojatno posljedica interakcije lijeka s različitim fazama nanoemulzije pri čemu je došlo do promjene fizičko-kemijskih svojstava formulacije. Uzrok pada veličine kapljica nanoemulzija nakon uklapanja ibuprofena može biti povezana sa amfifilnim svojstvima lijeka, gdje terminalna karboksilna skupina ibuprofena može stupiti u interakciju s Tweenom<sup>®</sup> 80, rezultirajući smanjenje međupovršinske napetosti, što onda dovodi do smanjenja veličine kapljica (Salim i sur., 2018).

Indeks polidisperznosti (engl. *Polydispersity index*, PDI) je mjera rasapa veličina kapljica nanoemulzije oko prosječne vrijednosti. PDI ukazuje na kvalitetu i homogenost nanoemulzije. Nanoemulzije s indeksom polidisperznosti manjim od 0,2 smatraju se monodisperznim. Slikom 10 prikazano je da se PDI ne mijenja značajno s promjenom udjela uljne faze i površinski aktivne tvari te uklapanjem ibuprofena. Sve formulacije imaju PDI manji od 0,2 osim formulacije s 2% (*m/m*) ricinusovog ulja, bez uklopljenog ibuprofena, čiji je PDI blago (zanemarivo) povišen i iznosi 0,21.





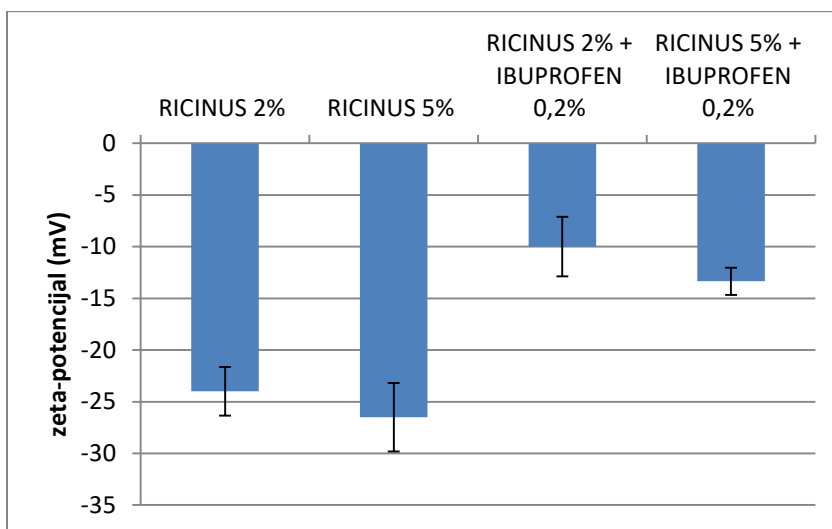
Slika 10. Usporedba indeksa polidisperznosti nanoemulzija različitog sastava (sastav nanoemulzija je prikazan u Tablici 2). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 2$ ).

U ovom istraživanju pri mjerenjima veličine i raspodjele veličina kapljica unutarnje faze, nanoemulzije su bile razrijeđene  $100 \times$  vanjskom fazom (2,5% otopinom glicerola). Razrjeđivanju se pristupa kako bi se osigurala pouzdana i točna mjerenja. Naime, studija Petrochenka i sur., (2018) je pokazala da razrjeđivanje NE s uklopljenim CsA ultračistom vodom ne dovodi do promjena u veličini kapljica NE kada su one mjerene tehnikama poput laserske difrakcije, analize praćenja nanočestica, kriogene transmisivne elektronske mikroskopije i dvodimenzionalne difuzijske spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije. Međutim, mjerenje veličine kapljica DLS tehnikom pokazalo je porast veličine kapljica kod koncentriranijih uzoraka NE u odnosu na razrijeđene. Porast se pripisuje interferenciji pomoćnih tvari (karbomer kopolimer tipa A, Carbopol<sup>®</sup> polimer 1342 i hidroksipropilmetilceluloza K15M te tri vrste polimera za povećanje viskoznosti) s kapljicama NE. Autori smatraju kako se navedeno može prevladati mjerenjem NE u razrijeđenim uvjetima ili korištenjem tehnike manje osjetljive na te smetnje. Svaki uzorak ima svoj idealan raspon koncentracije za optimalna mjerenja. Kad god je to moguće, koncentraciju uzorka treba odabrati tako da uzorak ima blago mliječni izgled. Za čestice u rasponu veličine od 100 nm do 1  $\mu$ m preporučeno je maksimalni maseni udio od 1%.

Rezultati određivanja zeta-potencijal kapljica unutarnje faze preliminarnih nanomeulzija prikazani su slikom 11. Iako je u izradi nanoemulzija korištena neionska PAT Tween<sup>®</sup> 80,

naboj na površini kapljica nanoemulzija nije neutralan već blago negativan. Smatra se da taj blago negativni naboj potječe od slobodnih masnih kiselina uljne faze (ricinusovog ulja) i njihove orijentacije prema površini kapljica ili od hidroksidnih iona iz vanjske vodene faze adsorbiranih na površini kapljica (Jurišić Dukovski, 2021). Na slici 11 razvidno je da nanoemulzije s većim udjelom ricinusovog ulja u formulaciji (5% *m/m*) imaju negativnije vrijednosti zeta-potencijala u odnosu na formulacije s 2% (*m/m*) udjelom ricinusovog ulja, vjerojatno zbog prisutnosti veće količine slobodnih masnih kiselina uljne faze. Također je vidljiva veća razlika u vrijednosti zeta-potencijala nanoemulzija bez ibuprofena i s uklopljenim ibuprofenom. Uklapanje ibuprofena u nanoemulzije uzrokovalo je porast vrijednosti zeta-potencijala prema nuli.

Iz sveg navedenog, može se zaključiti da pripravljene preliminarne nanoemulzije karakterizira odgovarajuća uklopljenost ibuprofena, veličina kapljica i raspodjela veličina te zeta-potencijal. Pripravljene preliminarne nanoemulzije predstavljaju dobar temelj za daljnji razvoj oftalmičke nanoemulzije korištenjem pomoćnih tvari odobrenih za oftalmičku primjenu odnosno za daljnja formulacijska istraživanja.



Slika 11. Usporedba zeta-potencijala (izražen u mV) nanoemulzija različitog sastava (sastav nanoemulzija je prikazan u Tablici 2.). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 2$ ).

## 5. ZAKLJUČCI

- Protuupalna nesteroidna djelatna tvar ibuprofen ispituje se kao potencijalna djelatna tvar u liječenju blagog do umjereno teškog oblika bolesti suhog oka.
- U/V nanoemulzije predstavljaju farmaceutski oblik pogodan za uklapanje ibuprofena, a zbog nadoknade i stabilizacije suznog filma koje osiguravaju pomoćne tvari nanoemulzija očekuje se razvoj vrlo učinkovitog lijeka.
- U ovom diplomskog radu ispitana je topljivost ibuprofena u četiri ulja koja su odobrena ili imaju veliki potencijal za razvoj lijekova za liječenje bolesti suhog oka: ricinusovo ulje, sezamovo ulje, sojino ulje te Miglyol<sup>®</sup> 812.
- Ricinusovo ulje karakterizira najveća topljivost ibuprofena ( $144,69 \pm 4,37$  mg ibuprofena/g ulja), značajno veća od topljivosti ibuprofena u preostala tri ulja.
- S obzirom na izvrsnu topljivost ibuprofena u ricinusovom ulje te činjenicu da je ricinusovo ulje odobreno za oftalmičku primjenu i koristi se kao ulja faza u lijekovima Restasis<sup>®</sup> i Ikervis<sup>®</sup>, u sljedećoj fazi izrade diplomskog rada ispitana je mogućnost izrade nanoemulzija s uklopljenim ibuprofenom.
- Kao ciljna vrijednost udjela uljne faze postavljena je vrijednost od 2 i 5% (*m/m*). Nanoemulzije s udjelom ricinusovog ulja od 2 % (*m/m*) sadržavale su 1% (*m/m*) Tweena<sup>®</sup> 80 (formulacije R2 i IR2), a nanoemulzije s 5 % (*m/m*) udjelom ricinusovog ulja, 2,5 % (*m/m*) Tweena<sup>®</sup> 80 (formulacije R5 i IR5). Maseni odnos ricinusovog ulja i Tweena<sup>®</sup> 80 u svim formulacijama bio jednak (2:1).
- Prosječna veličina kapljica svih izrađenih nanoemulzija bila je manja od 150 nm, a indeks polidisperznosti oko 0,2.
- Uočeno je da nanoemulzije s uklopljenim ibuprofenom imaju manju veličinu kapljica od nanoemulzija bez uklopljenog ibuprofena, što je vjerojatno posljedica interakcije terminalne karboksilne skupine ibuprofena s Tweenom<sup>®</sup> 80, a što rezultira smanjenjem međupovršinske napetosti i nastankom manjih kapljica.
- Blago negativni zeta-potencijal kapljica unutarnje faze potječe od slobodnih masnih kiselina ricinusovog ulja. Uklapanje ibuprofena u nanoemulzije uzrokovalo je porast vrijednosti zeta-potencijala prema nuli.
- Pripravljene preliminarne nanoemulzije predstavljaju dobar temelj za daljnji razvoj oftalmičke nanoemulzije s uklopljenim ibuprofenom za liječenje bolesti suhog oka.

## 6. LITERATURA

Bjordan O, Norheim KB, Rødahl E, Jonsson R, Omdal R. Primary Sjögren's syndrome and the eye. *Surv Ophthalmol*, 2020, 65, 119–32.

Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S, et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf*, 2017, 15, 438-510.

Chemical structure of Ibuprofen, [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net), pristupljeno 28.10.2022.

Çinar, K. A Review on Nanoemulsions: Preparation Methods and Stability. *Trak Univ J Eng Sci*, 2017, 18, 73–83.

Dry eye disease, 2022., [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com), pristupljeno 20.10.2022.

Đorđević SM, Cekić ND, Isailović TM, Milić JR, Vuleta GM, Lazić ML, Savić SD. Nanoemulzije dobijene variranjem tipa emulgatora i udela masne faze: Uticaj formulacije i procesnih parametara na karakteristike i fizičku stabilnost. *Hem Ind*, 2013, 67, 795–809.

Eftimov P, Yokoi N, Georgiev GA. Surface Chemistry Study of the Interactions of Sesame Oil with Meibomian Films. *Molecules*, 2022, 27, 464.

Fernandes AR, Sanchez-Lopez E, Santos TD, Garcia ML, Silva AM, Souto EB. Development and characterization of nanoemulsions for ophthalmic applications: Role of cationic surfactants. *Materials*, 2021, 14, 7541.

Gawin-Mikołajewicz A, Nartowski KP, Dyba AJ, Gołkowska AM, Malec K, Karolewicz B. Ophthalmic Nanoemulsions: From Composition to Technological Processes and Quality Control. *Mol Pharm*, 2021, 18, 3719-3740.

Hydrelo™ Allergy Lubricant Eye Drops infused by natural Ectoin® 2%, <https://www.hydrelo.com/hydrelo-allergy>, pristupljeno 21.11.2022.

Janus E, Ossowicz P, Klebeko P, Nowak A, Duchnik W, Kucharski Ł, Klimowicz A. Enhancement of ibuprofen solubility and skin permeation by conjugation with L-valine alkyl esters. *RSC Adv*, 2020, 10, 7570–7584.

Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, et al. TFOS DEWS II Management and Therapy Report. *Ocul Surf*, 2017, 15, 575–628.

Jurišić Dukovski B, Juretić M, Bračko D, Randjelović D, Savić S, Crespo Moral M, Diebold Y, Filipović-Grčić J, Pepić I, Lovrić J. Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: Development and optimization for dry eye disease treatment. *Int J Pharm*, 2020, 576, 118979.

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

Kaštelan S, Tomić M, Salopek-Rabatić J, Novak B. Diagnostic procedures and management of dry eye. *Biomed Res Int*, 2013, 309723.

Kumar M, Bishnoi RS, Shukla AK, Jain CP. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Prev Nutr Food Sci*, 2019, 24, 225-234.

Lekhanont K, Sathianvichitr K, Pisitpayat P, Anothaisintawee T, Soontrapa K, Udomsubpayakul U. Association between the levels of prostaglandin E2 in tears and severity of dry eye. *Int J Ophthalmol*, 2019, 12, 1127–1133.

Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int*, 2015, 112, 71–82.

Mohamed HB, Abd El-Hamid BN, Fathalla D, Fouad EA. Current trends in pharmaceutical treatment of dry eye disease: A review. *Eur J Pharm Sci*, 2022, 175, 106206.

Nagai N, Otake H. Novel drug delivery systems for the management of dry eye. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 191, 114582.

Patel VR, Dumancas GG, Kasi Viswanath LC, Maples R, Subong BJ. Castor Oil: Properties, Uses, and Optimization of Processing Parameters in Commercial Production. *Lipid Insights*, 2016, 9, 1-12.

Petrochenko PE, Pavurala N, Wu Y, Yee Wong S, Parhiz H, Chen K, Patil SM, Qu H, Buoniconti P, Muhammad A, Choi S, Kozak D, Ashraf M, Cruz CN, Zheng J, Xu X. Analytical considerations for measuring the globule size distribution of cyclosporine ophthalmic emulsions. *Int J Pharm*, 2018, 550, 229-239.

Salim N, García-Celma MJ, Escribano E, Nolla J, Llinàs M, Basri M, Solans C, Esquena J, Tadros TF. Formation of Nanoemulsion Containing Ibuprofen by PIC Method for Topical Delivery. *Mater Today Proc*, 2018, 5, S172–S179.

Sandford EC, Muntz A, Craig JP. Therapeutic potential of castor oil in managing blepharitis, meibomian gland dysfunction and dry eye. *Clin Exp Optom*, 2021,104, 315-322.

Sheskey PJ, Cook WG, Cable CG. Handbook of pharmaceutical excipients, 8th ed. Pharmaceutical press American pharmacists association, London Washington (D.C.), 2017, str. 590-593; 728-735.

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.

Soybean oil: Uses, Interactions, Mechanism of Action, 2022,  
<https://go.drugbank.com/drugs/DB09422>, pristupljeno 30.10.2022.

Tincani A, Andreoli L, Cavazzana I, Doria A, Favero M, Fenini MG, Franceschini F, Lojacono A, Nascimbeni G, Santoro A, Semeraro F, Toniati P, Shoenfeld Y. Novel aspects of Sjögren's syndrome in 2012. *BMC Med*, 2013, 11:93.

Zemanová M, DRY EYE DISEASE. A REVIEW. *Cesk Slov Oftalmol*, 2021, 77, 107–119.

Zhao T, Maniglio D, Chen J, Chen B, Motta A, Migliaresi C. Design and optimization of self-nanoemulsifying formulations for lipophilic drugs. *Nanotechnology*, 2015, 26, 125102.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Bolest suhog oka karakterizirana je hiperosmolarnošću suznog filma i subakutnom upalom. Trenutno su glavne terapijske mogućnosti nadomještanje suznog filma, stimulacija stvaranja suza i topikalni protuupalni lijekovi. Protuupalna nesteroidna djelatna tvar ibuprofen ima potencijal za liječenje blagog do umjereno teškog oblika bolesti suhog oka. U/V nanoemulzije predstavljaju farmaceutski oblik pogodan za uklapanje ibuprofena, a zbog nadoknade i stabilizacije suznog filma koje osiguravaju pomoćne tvari nanoemulzija moguć je razvoj vrlo učinkovitog lijeka.

Cilj ovog diplomskog rada bio je provesti ispitivanje topljivosti ibuprofena u uljima koja su odobrena ili velikog potencijala za oftalmičku primjenu te razviti preliminarne nanoemulzije U/V tipa s uklopljenim ibuprofenom. Topljivost ibuprofena ispitana je u četiri ulja: ricinusovo ulje, sezamovo ulje, sojino ulje te Miglyol<sup>®</sup> 812, od kojih ricinusovo ulje karakterizira najveća topljivost ibuprofena. U sljedećoj fazi izrade diplomskog rada ispitana je mogućnost izrade nanoemulzija s uklopljenim ibuprofenom. Uljnu fazu su činili ibuprofen i ricinusovo ulje, a vodenu fazu neionska površinski aktivna tvar Tween<sup>®</sup> 80, sredstvo za izotonizaciju glicerol te pročišćena voda. Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije, nakon čega su im određena fizičko-kemijska svojstva uključujući veličinu kapljica i raspodjelu veličina te zeta-potencijal.

Pripravljene preliminarne nanoemulzije karakterizira odgovarajuća uklopljenost ibuprofena, veličina kapljica i raspodjela veličina te zeta-potencijal, stoga predstavljaju dobar temelj za daljnji razvoj oftalmičke nanoemulzije s uklopljenim ibuprofenom za liječenje bolesti suhog oka.



Dry eye disease is characterized by hyperosmolarity of the tear film and subacute inflammation. Currently, the main therapeutic options are tear replacement, stimulation of tear production and topical anti-inflammatory drugs. The anti-inflammatory non-steroidal active ingredient ibuprofen has the potential to treat mild to moderate dry eye disease. U/V nanoemulsions represent a dosage form suitable for loading ibuprofen and due to compensation and stabilization of the tear film provided by excipients of the nanoemulsions, development of a very effective drug is possible.

The aim of this thesis was to test the solubility of ibuprofen in oils that are approved or have high potential for ophthalmic use and to develop preliminary o/w nanoemulsions loaded with ibuprofen. The solubility of ibuprofen was tested in four oils: castor oil, sesame oil, soybean oil and Miglyol<sup>®</sup> 812. Castor oil is characterized by the highest solubility of ibuprofen. In the next phase of this thesis, the possibility of preparing nanoemulsions loaded with ibuprofen was examined. The oil phase consisted of ibuprofen and castor oil, and the water phase consisted of the nonionic surfactant Tween<sup>®</sup> 80, an isotonicizing agent glycerol and purified water. Nanoemulsions were prepared using a high energy microfluidization method, after which their physicochemical properties were determined, including droplet size, size distribution and zeta potential.

The prepared preliminary nanoemulsions are characterized by appropriate incorporation of ibuprofen, droplet size, size distribution and zeta-potential, therefore they represent a good basis for further development of an ophthalmic nanoemulsion loaded with ibuprofen for the treatment of dry eye disease.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Predformulacijska ispitivanja u razvoju nanoemulzija s uklopljenim ibuprofenom

Petra Grošić

#### SAŽETAK

Bolest suhog oka karakterizirana je hiperosmolarnošću suznog filma i subakutnom upalom. Trenutno su glavne terapijske mogućnosti nadomještanje suznog filma, stimulacija stvaranja suza i topikalni protuupalni lijekovi. Protuupalna nesteroidna djelatna tvar ibuprofen ima potencijal za liječenje blagog do umjereno teškog oblika bolesti suhog oka. U/V nanoemulzije predstavljaju farmaceutski oblik pogodan za uklapanje ibuprofena, a zbog nadoknade i stabilizacije suznog filma koje osiguravaju pomoćne tvari nanoemulzija moguć je razvoj vrlo učinkovitog lijeka. Cilj ovog diplomskog rada bio je provesti ispitivanje topljivosti ibuprofena u uljima koja su odobrena ili velikog potencijala za oftalmičku primjenu te razviti preliminarne nanoemulzije U/V tipa s uklopljenim ibuprofenom. Topljivost ibuprofena ispitana je u četiri ulja: ricinusovo ulje, sezamovo ulje, sojino ulje te Miglyol<sup>®</sup> 812, od kojih ricinusovo ulje karakterizira najveća topljivost ibuprofena. U sljedećoj fazi izrade diplomskog rada ispitana je mogućnost izrade nanoemulzija s uklopljenim ibuprofenom. Uljnu fazu su činili ibuprofen i ricinusovo ulje, a vodenu fazu neionska površinski aktivna tvar Tween<sup>®</sup> 80, sredstvo za izotonizaciju glicerol te pročišćena voda. Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije, nakon čega su im određena fizičko-kemijska svojstva uključujući veličinu kapljica i raspodjelu veličina te zeta-potencijal. Pripravljene preliminarne nanoemulzije karakterizira odgovarajuća uklopljenost ibuprofena, veličina kapljica i raspodjela veličina te zeta-potencijal, stoga predstavljaju dobar temelj za daljnji razvoj oftalmičke nanoemulzije s uklopljenim ibuprofenom za liječenje bolesti suhog oka.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 11 grafičkih prikaza, 3 tablice i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanoemulzija, mikrofluidizacija, bolest suhog oka, ibuprofen, ricinusovo ulje, sojino ulje, sezamovo ulje, Miglyol<sup>®</sup> 812, Tween<sup>®</sup> 80, glicerol

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. Bisera Jurišić Dukovski**, asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Kristina Radić**, asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutics  
Ulica kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Preformulation studies in development of nanoemulsions loaded with ibuprofen

Petra Grošić

#### SUMMARY

Dry eye disease is characterized by hyperosmolarity of the tear film and subacute inflammation. Currently, the main therapeutic options are tear replacement, stimulation of tear production and topical anti-inflammatory drugs. The anti-inflammatory non-steroidal active ingredient ibuprofen has the potential to treat mild to moderate dry eye disease. U/V nanoemulsions represent a dosage form suitable for loading ibuprofen and due to compensation and stabilization of the tear film provided by excipients of the nanoemulsions, development of a very effective drug is possible. The aim of this thesis was to test the solubility of ibuprofen in oils that are approved or have high potential for ophthalmic use and to develop preliminary o/w nanoemulsions loaded with ibuprofen. The solubility of ibuprofen was tested in four oils: castor oil, sesame oil, soybean oil and Miglyol<sup>®</sup> 812. Castor oil is characterized by the highest solubility of ibuprofen. In the next phase of this thesis, the possibility of preparing nanoemulsions loaded with ibuprofen was examined. The oil phase consisted of ibuprofen and castor oil, and the water phase consisted of the nonionic surfactant Tween<sup>®</sup> 80, an isotonicizing agent glycerol and purified water. Nanoemulsions were prepared using a high energy microfluidization method, after which their physicochemical properties were determined, including droplet size, size distribution and zeta potential. The prepared preliminary nanoemulsions are characterized by appropriate incorporation of ibuprofen, droplet size, size distribution and zeta-potential, therefore they represent a good basis for further development of an ophthalmic nanoemulsion loaded with ibuprofen for the treatment of dry eye disease.

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

Thesis includes: 36 pages, 11 figures, 3 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nanoemulsion, microfluidization, dry eye disease, ibuprofen, castor oil, soybean oil, sesame oil, Miglyol<sup>®</sup> 812, Tween<sup>®</sup> 80, glycerol

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  
**Bisera Jurišić Dukovski, Ph.D.** *Research Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Kristina Radić, Ph.D.** *Research Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2022.