Ispitivanje stabilnosti kationskih nanoemulzija metodama ubrzanog starenja

Bručić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:479368

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ivona Bručić

Ispitivanje stabilnosti kationskih nanoemulzija metodama ubrzanog starenja

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr.sc. Jasmini Lovrić na uloženom vremenu i trudu pri izradi ovog diplomskog rada te Biseri Jurišić Dukovski, mag. pharm. na uloženom vremenu i suradnji pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem Danki Bračko, mag. pharm. na omogućavanju izrade nanoemulzija u farmaceutskoj tvrtki PLIVA d.o.o. te Željku Vincelju, tech. pharm, na pomoći i izdvojenom vremenu.

Najviše zahvaljujem svojoj obitelji na podršci tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD…….1

1.1. PROBLEMI TOPIKALNE OFTALMIČKE PRIMJENE LIJEKOVA……1

1.2.POTENCIJAL LIPIDNIH SUSTAVA U OFTALMIČKOJ PRIMJENI……...…2

1.3. NANOEMULZIJE……...…2

1.4. NANOEMULZIJE U OFTALMIČKOJ PRIMJENI……...…..3

1.5. METODE IZRADE NANOEMULZIJA……..……4

1.5.1. VISOKOENERGETSKE METODE…….5

1.5.2. NISKOENERGETSKE METODE……6

1.6. STABILNOST NANOEMULZIJA……..……9

2. OBRAZLOŽENJE TEME…….13

3. MATERIJALI I METODE……14

3.1. MATERIJALI…….14

3.2. METODE……...……15

3.2.1. IZRADA NANOEMULZIJA…….……15

3.2.2. MJERENJE VELIČINE KAPLJICA I INDEKSA POLIDISPERZNOSTI……..…....16

3.2.3. MJERENJE ZETA POTENCIJALA……...……18

3.2.4. STABILNOST U STVARNOM VREMENU……..……19

3.2.5. METODE UBRZANOG STARENJA…….……....19

3.2.4.1. VIŠESTRUKI CIKLUSI ZAGRIJAVANJA I HLAĐENJA....19

3.2.4.2. VIŠESTRUKI CIKLUSI ZAMRZAVANJA I ODMRZAVANJA……19

3.2.4.3. CENTRIFUGIRANJE……..……19

3.2.6. ISPITIVANJE STABILNOSTI NANOEMUZIJE NAKON RAZRIJEĐENJA UMJETNOM SUZNOM TEKUĆINOM…….……20

4. REZULTATI I RASPRAVA…….21

4.1. IZRADA NANOEMULZIJA…….21

4.2.ODREĐIVANJE STABILNOSTI U STVARNOM VREMENU……...23

4.3. METODE UBRZANOG STARENJA……25

4.3.1. CIKLUSI ZAGRIJAVANJA I HLAĐENJA……...……25

4.3.2. CIKLUSI ZAMRZAVANJA I ODMRZAVANJA……..27

4.3.3. CENTRIFUGIRANJE…….……30

4.4.ISPITIVANJE STABILNOSTI NANOEMUZIJE U UMJETNOJ SUZNOJ TEKUĆINI……32

5. ZAKLJUČAK……...……34

6. LITERATURA……..35

7. SAŽETAK / SUMMARY……...……..37

TEMELJNA DOKUMETACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

1.UVOD

1.1. PROBLEMI TOPIKALNE OFTALMIČKE PRIMJENE

Zbog jednostavnosti i neinvazivnosti, topikalna primjena glavni je put primjene oftalmičkih lijekova. Međutim, apsorpcija i posljedično bioraspoloživost topikalnih oftalmičkih lijekova je ograničena zbog barijera prednjeg dijela oka kao što su nazolakrimalna drenaža, refleks treptanja i suzenja, čvrste barijere rožnice te proteini i metabolički enzimi suzne tekućine (Pepić, 2004). Brzinu i obim apsorpcije primijenjenog lijeka određuju i njegova osnovna svojstva kao što su stupanj ionizacije lijeka u pH području suzne tekućine, hidrofilnost ili lipofilnost lijeka predočena koeficijentom raspodjele, veličina molekule lijeka te oblik u koji je lijek uklopljen. Za većinu terapijski značajnih oftalmičkih lijekova (male lipofilne molekule) apsorpcija preko rožnice glavni je put apsorpcije, dok su tkivne barijere spojnice i bjeloočnice značajnije za apsorpciju velikih hidrofilnih molekula (proteinski i peptidni lijekovi te nukleinske kiseline). Nakon prolaska barijere rožnice, čimbenici koji određuju farmakokinetičku sudbinu lijeka su vezanje lijeka za proteine očne vodice ili tkiva, volumen prostora u koji se lijek raspodjeljuje, uspostavljanje ravnoteže između očne vodice i tkiva te mogućnost metaboličke razgradnje lijeka. Zbog ograničene bioraspoloživosti, a kako bi se postigao željeni terapijski učinak, bolesnici moraju učestalo primjenjivati oftalmički lijek. Topikalni oftalmički farmaceutski oblici lijeka uključuju vodene/uljne otopine, vodene/uljne suspenzije, emulzije, masti i gelove. Međutim, ti konvencionalni oblici imaju određene nedostatke kao što su kratko zadržavanje na površini oka (vodene otopine), mehanički nadražaj površine oka (suspenzije), ometanje procesa vida odnosno njegovo zamućenje (uljne otopine/suspenzije, emulzije, masti) te neujednačenost doziranja (masti, gelovi). S ciljem povećanja bioraspoloživosti oftalmičkih lijekova, smanjenja nuspojava zbog neproduktivne apsorpcije u sistemsku cirkulaciju te smanjene učestalosti doziranja istražuju se i razvijaju inovativni farmaceutski oblici topikalnih oftalmičkih lijekova.

1.2. POTENCIJAL LIPIDNIH TERAPIJSKIH NANOSUSTAVA U OFTALMIČKOJ PRIMJENI

Jedan od pristupa za poboljšanje bioraspoloživosti oftalmičkih lijekova uključuje uklapanje lijeka u lipidne terapijske nanosustave koji mogu osigurati produljeno zadržavanje na površini oka, kontrolirano oslobađanje te poboljšanu transkornealnu (preko rožnice) ili transkonjunktivalnu (preko spojnice) apsorpciju lijeka (Gan i sur., 2013).

Lipidni terapijski nanosustavi uključuju vezikularne sustave kao što su liposomi i niosomi, nanostrukturirane čestice tekućih kristala (kubosomi), lipidne nanočestice prve (čvrste lipidne nanočestice) i druge generacije (nanostrukturirani lipidni nosači) te nanoemulzije (Gan i sur., 2013).

1.3.NANOEMULZIJE

Nanoemulzije su disperzni sustavi dviju tekućina koje se međsobno ne miješaju, uljne i vodene faze, a prosječnog promjera kapljica unutarnje faze manjeg od 500 nm (Benoit i sur., 2008). Uljnu fazu mogu činiti različite hidrofobne komponente, trigliceridi, esencijalna ulja, vitamini topljivi u ulju, dok se vodena faza može sadržavati soli, proteine, ugljikohidrate, pufere i konzervanse otopljene u vodi. Nanoemulzije ne nastaju spontano (Komaiko i McClements, 2015), a njihov nastanak i stabilnost osiguravaju površinski aktivne tvari odnosno surfaktanti. Surfaktanti su površinski aktivne amfifline molekule koje se adsorbiraju na granici između unutarnje i vanjske faze te smanjuju međufaznu površinsku napetost i sprječavaju agregaciju kapljica (Singh i sur., 2017). Nakon adsorpcije trebaju pružiti dovoljne sile odbijanja da spriječe agregaciju kapljica, a što se može postići steričkim i/ili elektrostatskim odbijanjem (Singh i sur., 2017). Ionski surfaktanti pružaju elektrostatsku stabilizaciju, a neionski steričku (Silva i sur., 2015).

S obzirom na vanjsku i unutarnju fazu, u komercijalnoj upotrebi najčešće se koriste ulje u vodi (U/V), a manje voda u ulju (V/U) tip nanoemulzije.

Fizičko-kemijske i funkcionalne karakteristike nanoemulzija ovise o svojstvima kapljica unutarnje faze kao što su sastav, veličina i zeta potencijal. Sastav uljne faze U/V nanoemulzija ovisi o topljivosti djelatne tvari. Mala veličina kapljica nanoemulzije podrazumijeva da će

vrijeme difuzije lijeka iz unutarnje faze biti relativno kratko. Posljedično, nanoemulzije se ponekad fiksiraju u strukturiranom nosaču ili se kapljice oblažu polimerima kako bi se usporilo oslobađanje lijeka. Zeta potencijal ovisi o korištenom surfaktantu, djelatnoj tvari adsorbiranoj na međupovršini te ionskoj jakosti vodene faze. Surfaktanti su organske molekule koje sadrže barem jednu polarnu (hidrofilnu) i nepolarnu (hidrofobnu) skupinu u svojoj strukturi. Njihov odabir temelji se na njihovoj topljivosti u uljnoj i vodenoj fazi, vrsti nanoemulzije koja je potrebna, potrebnoj HLB (engl. *hydrophilic-lipophilic balance*) vrijednosti i sl. Neionski surfaktanti (npr. Tween) s HLB vrijednosti većom od 8 korišteni su za razvoj U/V nanoemulzije, a mineralna ulja s HLB vrijednosti manjom od 8 za razvoj tipa V/U nanoemulzija (Rai i sur., 2018). Vrlo često koristi se kombinacija različitih surfaktanata.

Odabir surfaktanta ne samo da utječe na veličinu i stabilnost kapljica unutarnje faze, već određuje i sigurnost primjene nanoemulzija (Singh i sur., 2017). Neionski surfaktanti su manje toksični i iritirajući od ionskih surfaktanata, naročito kationskih.

Kosurfaktanti se upotrebljavaju za stabiliziranje surfaktanata jačajući film na granici faza. Uz surfaktante kao prave emulgatore, mogu se još koristiti pseudo emulgatori (hidrofilni koloidi, polisaharidi) ili netopljivi emulgatori (koloidne gline i metalni hidroksidi).

Reološka svojstva nanoemulzija također su važan parametar. Viskoznost nanoemulzija povećava se povećanjem koncentracije kapljica, dok u višim koncentracijama poprimaju viskoelastična svojstva. Stabilizatori se dodaju u vanjsku fazu kako bi promijenili reološka svojstva (uguščivači, sredstva za geliranje), a po sastavu mogu biti polisaharidi topljivi u vodi i proteini. Optička svojstva ovise o raspršenju i apsorpciji svjetla. Nanoemulzije su zbog male veličine kapljica unutranje faze optički transparentnije od emulzija.

1.4. METODE IZRADE NANOEMULZIJA

Nastajanje nanoemulzija je termodinamički nestabilan proces zbog povećanja međupovršinske energije koja nastaje razbijanjem velikih kapljica u manje. Lipofilni lijek dispergira se izravno u uljnoj fazi, dok se hidrofilni lijekovi dispergiraju u vodenoj fazi. Metode priprave nanoemulzija dijele se na visokoenergetske metode i niskoenergetske metode, s obzirom na

količinu energije koja se mora izvana uvesti u sustav (Rai i sur., 2018). Odabir pojedine metode ovisi o kemijsko-fizičkim svojstvima lijeka, prirodi sirovina (posebno ulja i surfaktanta) i željenim fizičko-kemijskim i funkcionalnim karakteristikama gotovog proizvoda (Gupta i sur., 2016).

1.4.1. VISOKOENERGETSKE METODE

Visokoenergetske metode su danas najčešće korištene metode za pripravu nanoemulzija. Ove metode obuhvaćaju mehaničke uređaje koji stvarajući jake sile smicanja i vrtložni protok smanjuju veličinu kapljica do nanometarskih dimenzija (Singh i sur., 2017). Za pripravu nanoemulzija visokoenergetskim metodama, prvo treba napraviti primarnu, grubu emulziju koja se kasnije obradi na visokoenergetskom uređaju. Najkorištenije visokoenergetske metode danas su visokotlačna homogenizacija, mikrofluidizacija i sonikacija. Visokotlačna homogenizacija prikladna je za industrijsku pripravu nanoemulzija zbog lakoće rada i ponovljivosti (Silva i sur., 2015). Visokotlačni homogenizator obrađuje uzorake pod visokim tlakom i funkcionira na principu mlinova s pomičnim klipom. Zbog sudara čestica sa čvrstom površinom dolazi do smicanja i vrtložnog protoka te usitnjavanja kapljica.

Mikrofluidizacija je visokoenergetska metoda koja, koristeći visoki tlak, usmjerava emulziju kroz mikrokanale (Jafari i sur., 2006). Energija nastala sudaranjem kapljica raspršuje se u obliku topline i zahtijeva hlađenje (Singh i sur., 2017). Ultrasonikatori koriste ultrazvučnu sondu kako bi razbili makroemulziju na manje čestice. Istraživanje procesnih parametara pokazalo je da se kapljice smanjuju s povećanjem vremena soniciranja i ulazne snage (Singh i sur., 2017). U usporedbi s drugim metodama visoke energije ultrasonikacija zahtijeva manju potrošnju energije. Nedostatak te metode je moguća kontaminacija emulzije uzrokovana uranjanjem sonde.

Nedostaci ovih metoda su visoka cijena uređaja i povećanje temperature tijekom samog procesa što isključuje upotrebu mnogih termolabilnih lijekova.

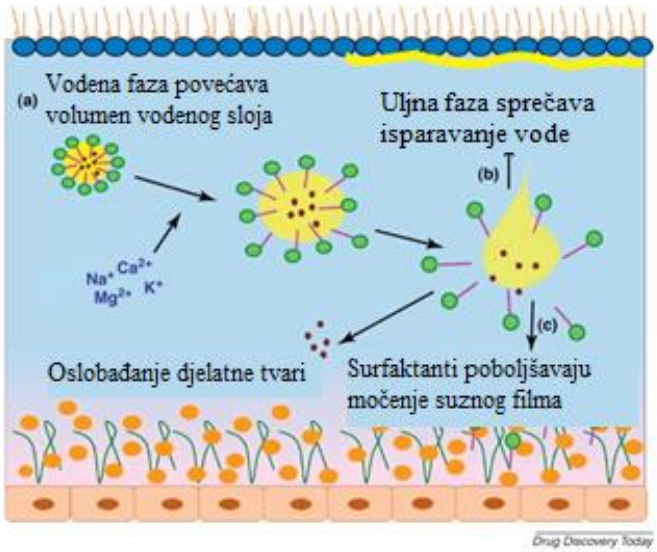
1.4.2. NISKOENERGETSKE METODE

Niskoenergetske metode oslanjaju se na spontano nastajanje malih kapljica u određenim smjesama ulja, vode i surfaktanta kada se mijenja sastav sustava ili okolišni uvjeti, na primjer temperatura (Komaiko i McClements, 2015). Najčešće korištene niskoenergetske metode su spontano emulgiranje i metoda fazne inverzije. Za razliku od visokoenergetskih metoda, niskoenergetske metode ne zahtijevaju skupe uređaje, već se temelje na intrizičnim fizičko-kemijskim svojstvima surfaktanata, kosurfaktanata, ulja i vodene faze. Prednost ovih metoda je niska cijena i jednostavnost. Nanoemulzije pripravljene niskoenergetskim metodama zahtijevaju velike količine surfaktanta za stabilizaciju kapljica što može ograničavati sigurnost primjene pripravljenih nanoemulzija (Singh i sur., 2017).

1.5. NANOEMULZIJE U OFTALMIČKOJ PRIMJENI

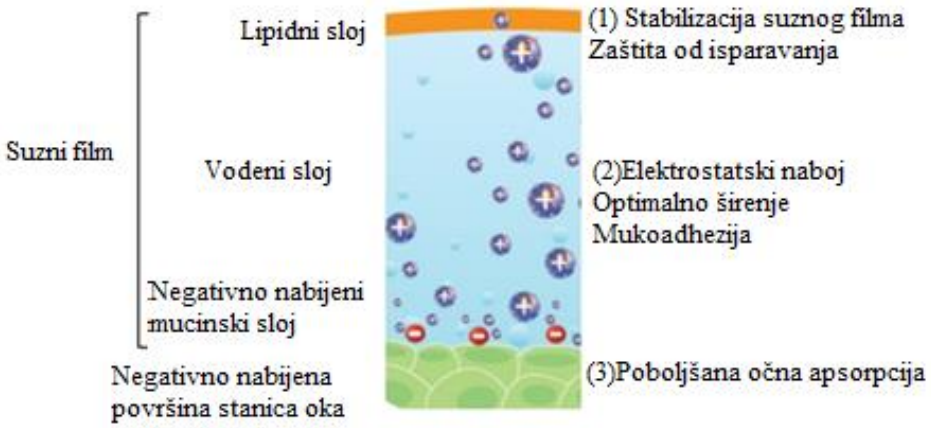
Potencijal U/V nanoemulzija u oftalmičkoj primjeni temelji se na sličnosti nanoemulzija sa suznim filmom. Suzni film je proizvod suznih žlijezda i žljezdanih stanica oka, a prekriva površinu rožnice i spojnice. Suzni film ključan je za normalnu funkciju površine oka, uključujući njezinu vlažnost, transparentnost, optičku kvalitetu i vanjsku zaštitu. Suzni film trilaminarne je strukture: sastoji se od gornjeg lipidnog, srednjeg vodenog te donjeg mucinskog sloja neposredno uz površinu oka.

Nakon primjene U/V nanoemulzija na površinu oka, pretpostavlja se da dolazi do raspada uljnih kapljica, pri čemu uljna faza ulazi u interakciju s lipidnim slojem suznog filma te tako sprječava isparavanje suza i djeluje kao depo lijeka (slika 1) (Gan i sur., 2013). Vodena faza nanoemulzije povećava volumen vodenog sloja suznog filma i vlaži površinu oka, dok surfaktanti poboljšavaju svojstva močenja suznog filma te uklapanjem u mucinski sloj povećavaju njegovu debljinu. Zbog tih svojstava, smatra se da U/V nanoemulzije imaju značajan potencijal u liječenju bolesti suhog oka.



Slika 1. Interakcije između U/V nanoemulzija i suznog filma. (a) Nakon primjene, vodena faza nanoemulzije vlaži površinu oka. (b) Kapljice ulja se raspadaju i oslobađa se uklopljena djelatna tvar. Uljna faza se zatim spaja s lipidnim slojem suznog filma i povećava ga, smanjujući gubitak vodene faze uzrokovan isparavanjem. (c) Surfaktanti poboljšavaju močenje suznog filma (preuzeto i prilagođeno iz Gan i sur., 2013).

Kako je većina oftalmičkih lijekova slabo topljiva u vodi, uklapanjem u uljnu fazu U/V nanoemulzija povećava se njihova topljivost. Stoga nanoemulzije predstavljaju jedan od značajnih farmaceutskih oblika za topikalne oftalmičke lijekove. S ciljem produljenja zadržavanja nanoemulzija na površini oka, površina kapljica modificira se dodatkom kationskih surfaktanata ili polimera. Time površina kapljica unutarnje faze postaje pozitivno nabijena. Površinu oka čine epitelne stanice rožnice i spojnice koje oblaže negativno nabijeni mucinski sloj, stoga prilikom primjene pozitivno nabijenih kapljica dolazi do elektrostatske interakcije (Tamilavan i Benita, 2004). Osim produljenog zadržavanja na površini oka, pozitivni površinski naboj kapljica smanjuje kut močenja između nanoemulzije i površine oka čime se postižu poboljšana svojstva širenja formulacije (Lallemand i sur., 2012).



Slika 2. Kationska nanoemulzija u interakciji s negativno nabijenim rožnicama. Učinci kationske nanoemulzije su (1) stabilizacija suznog filma, (2) elektrostatička interakcija pozitivno nabijenih kapljica uljne faze i negativno nabijene površine rožnice i spojnice te (3) poboljšana apsorpcija lijeka preko epitelne barijere rožnice (preuzeto i prilagođeno iz Lallemand i sur., 2012).

Značajna prednost U/V nanoemulzija je i poboljšanje apsorpcije lijekova. Mala veličina kapljica i manja međufazna površinska napetost poboljšavaju interakciju s membranom epitelnih stanica, dovode do solubilizacije lipidne barijere ili fuzije s lipidnim dvoslojem što rezultira boljom apsorpcijom i bioraspoloživošću uklopljenog lijeka.

Nadalje, nanoemulzije su relativno otporne na uobičajene destabilizacijske mehanizme emulzija što produljuje rok valjanosti takvih oblika. Također, u usporedbi s emulzijama, obično su veće transparentnosti što smanjuje njihovu interferenciju s proceom vida.

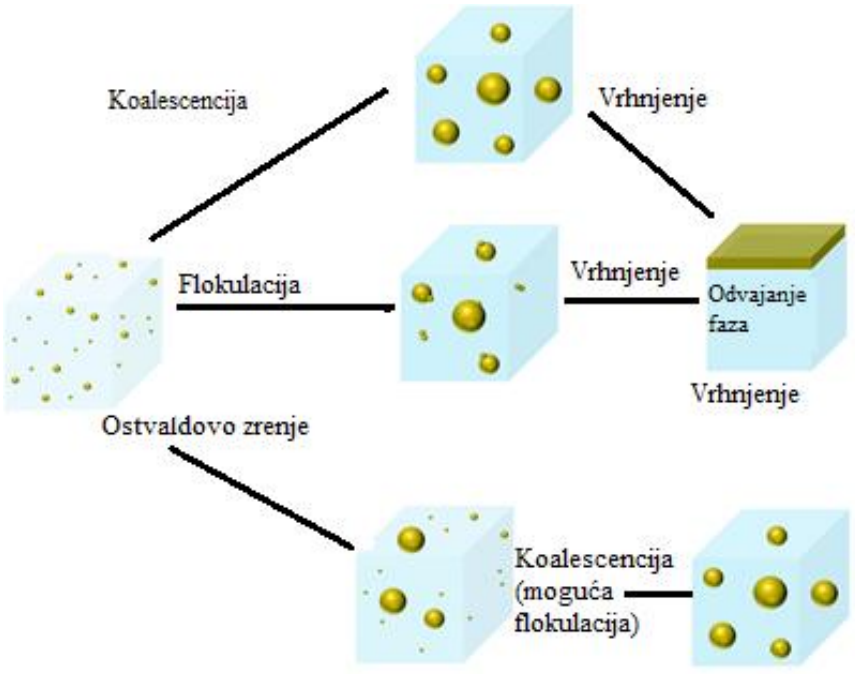
Prva oftalmička nanoemulzija na tržištu bio je Restasis® (Allergan) bez konzervansa, anionska nanoemulzija ciklosporina A za liječenje sindroma suhog oka (Lallemand i sur., 2012). Za izradu nanoemulzije Ikervis® (Santen) korištena je tzv. Novasorb® tehnologija koja se temelji na spomenutoj elektrostatskoj interakciji između negativno nabijene površine oka i pozitivno nabijenih uljnih kapljica nanoemulzije, pri čemu je kao nositelj pozitivnog naboja korišten cetalkonij klorid (Lallemand i sur., 2012).

1.6. STABILNOST NANOEMULZIJA

Stabilnost se definira kao stupanj u kojem, tijekom čuvanja i uporabe, lijek zadržava ista svojstva koja je imao u vrijeme priprave te ukazuje na otpornost prema različitim kemijskim, fizičkim i mikrobiološkim agensima koji bi mogli uzrokovati promjenu njegovih svojstava tijekom transporta, čuvanja i uporabe.

Stabilna emulzija može se definirati kao sustav u kojem kapljice zadržavaju početna fizičko-kemijska svojstva što omogućuje da ostaju ravnomjerno dispergirane u vanjskoj fazi. Emulzije su termodinamički nestabilni sustavi zbog nepovoljnih interakcija koje se javljaju na međupovršini ulje-voda zbog hidrofobnog efekta i termodinamičke pokretačke sile koja smanjuje dodirno područje na granici ulje-voda (Tadros i sur., 2004). Za nastanak emulzija potrebno je u sustav dovesti energiju izvana, zbog čega će se sustav naći u stanju povišene slobodne površinske energije (Eccleston, 2013) koje karakterizira visoka površinska napetost na granici faza. Sustav se stoga nastoji vratiti u stanje minimalne slobodne površinske energije.

Nestabilnost je kod emulzija najčešće posredovana agregacijom kapljica, što uzrokuje rast veličine kapljica. Procesi nestabilnosti emulzija su koalescencija, flokulacija, Ostwaldovo zrenje te vrhnjenje (slika 3). Tim procesima zajedničko je povećanje kapljica unutarnje faze, što dovodi do smanjenja dodirne površine među fazama i slobodne površinske energije te u konačnici do razdvajanja faza.



Slika 3. Mehanizami nestabilnosti emulzija (preuzeto i prilagođeno iz Gupta i sur., 2016).

Koalescencija i flokulacija su vrste agregacije kapljica koje se javljaju zbog koloidnih interakcija između istih. Flokulacija je reverzibilna agregacija kapljica, dok je koalescencija ireverzibilna. Do flokulacije dolazi ako su međumolekularne odbojne sile dovoljno jake da zadrže agregate odvojenima na maloj ravnotežnoj udaljenosti, dok kod koalescencije privlačne sile nadvladaju odbojne sile između kapljica (Rai i sur., 2018). Agregacija kapljica može se inhibirati prevladavanjem odbojnih sila (elektrostatske i steričke sile) nad privlačnim silama (Van der Waalsove i hidrofobne sile) što se postiže odabirom prikladnog emulgatora i/ili pseudoemulgatora i sastava vodene faze. Koalescencija nadalje uzrokuje sedimentaciju (taloženje) ili vrhnjenje (izdvajanje unutarnje faze na površinu). Sedimentacija i vrhnjenje posljedica su gravitacijske ili centrifugalne sile te nepodudaranja u gustoći faza nanoemulzije. Ostwaldovim zrenjem veće kapljice privlače manje kapljice zbog veće potencijalne energije. Ostwaldovo zrenje objašnjeno je Kelvinovim efektom iz kojeg proizlazi da se molekule na površini manjih čestica lakše odvajaju zbog slabijih kohezijskih sila. Kako bi došli u stanje ravnoteže, male kapljice difundiraju kroz vanjsku fazu i spajaju se s većim kapljicama, čime dolazi do njihvog porasta (Singh i sur., 2017). Uslijed ovakvog sporog i postupnog povećanja

veličine kapljica može doći do odvajanja faza nanoemulzija. To se može spriječiti dodatkom uljne faze koja ima nisku topljivost u vodi (Singh i sur., 2017).

Kinetička stabilnost emulzije definirana je zadržavanjem početnih svojstva kapljica unutarnje faze i njihova jednolika dispergiranost u vanjskoj fazi kroz dulje vrijeme (Eccleston, 2013; Komaiko i McClements, 2015). Kinetička stabilnost ili nestabilnost emulzija ovisi o različitim faktorima poput prirode međupovršinskog filma (najbolja je kombinacija surfaktanata topljivih u vodi i u ulju zbog gustog pakiranja molekula u međupovršinskom filmu), električkostatske i steričke barijere (električni naboj na kapljicama sprječava koalescenciju), viskoznosti vanjske faze (veća viskoznost pridonosi većoj gustoći i stabilnosti nanoemulzije), raspodjela veličina kapljica (uža raspodjela veličina kapljica sprječava Ostwaldovo zrenje) i temperature (povišenjem temperature mijenja se slobodna energija površine kapljevina, povećava se brzina koalescencije te se smanjuje stabilnost).

Nanoemulzije su relativno otporne na uobičajene destabilizacijske mehanizme emulzija. Veličina kapljica u nanometarskom području smanjuje utjecaj gravitacije na stabilnost nanoemulzija odnosno Brownovo gibanje malih kapljica može biti dostatno za prevladavanje utjecaja sile gravitacije (Tadros i sur., 2004). Time se isključuje pojava vrhnjenja ili sedimentacije tijekom skladištenja. Zbog male veličine kapljica smanjena je i mogućnost flokulacije. Koalescencija je umanjena jer su male kapljice manje deformabilne, a debljina filma surfaktanta na površini kapljica je značajna u odnosu na njihovu veličinu što sprječava disrupciju filma. Glavni mehanizam nestabilnosti nanoemulzija ostaje Ostwaldovo zrenje. Stabilnost nanoemulzija može se kontrolirati pažljivim odabirom njihovog sastava i strukture.

Uz standarne testove stabilnosti i ubrzane testove stabilnosti propisane od strane *International Council for Harmonisation* (ICH), nanoemulzije se podvrgavaju specifičnim termodinamičkim testovima stabilnosti kako bi se osigurao integritet kapljica uslijed promjena temperature (Singh i sur., 2017). Ovi testovi uključuju uzastopno zagrijavanje na 45°C i hlađenje nanoemulzija na 4°C u višestrukim ciklusima. Nanoemulzije mogu biti podvrgnute i višestrukim ciklusima smrzavanja i odmrzavanja. Kinetičke nestabilnosti kao što je vrhnjenje, taloženje ili bilo koji drugi oblik razdvajanja faza isključuju se centrifugiranjem na 3000-4000 okretaja u minuti (Singh i sur., 2017). Dugoročno razmatranje stabilnosti uključuje ispitvanje stabilnosti pri skladištenju gdje se nanoemulzije čuvaju pri sobnoj temperaturi ili u hladnjaku tijekom

razdoblja od 3 do 6 mjeseci i periodično se procjenjuju izgled nanoemulzije, veličina kapljica, indeks polidisperznosti, zeta potencijal ili sadržaj lijeka. Promjene navedenih parametara ne znače nužno nestabilnost nanoemulzija ako su unutar dozvoljenog raspona, međutim bitno je izvijestiti o značajnim razlikama ako su prisutne i koristiti te spoznaje pri postavljanju uvjeta skladištenja ili, ako je potrebno, preoblikovati formulaciju s ciljem povećanja stabilnosti (Singh i sur., 2017).

Nanoemulzije s malom veličinom kapljica i uskom raspodjelom veličina kapljica (indeksom polidisperznosti) zadržavaju visoku razinu stabilnosti. Veći stupanj naboja površine kapljica, zbog prisutnosti jakih intermolekularnih odbojnih sila, dovodi do povećane stabilnosti (Rai i sur., 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Jedan od pristupa za poboljšanje bioraspoloživosti slabo topljivih lijekova u oku uključuje uklapanje lijeka u kationske U/V nanoemulzije. Prednosti koje osigurava topikalna primjena kationskih U/V nanoemulzija s uklopljenim lijekom uključuje (i) poboljšano širenje pripravka na površini oka, (ii) produljeno zadržavanje na površini oka, (iii) kontrolirano oslobađanje te (iv) poboljšanu transkornealnu apsorpciju lijeka. Nadalje, smatra se da bi nanoemulzije mogle pozitivno utjecati na stabilnost suznog filma te time predstavljati važan iskorak u liječenju bolesti suhog oka.

Ključan parametar u procesu razvoja konačnog oblika lijeka je njegova stabilnost. Nanoemulzije su termodinamički nestabilni sustavi, ali njihova stabilnost može se kontrolirati pažljivim odabirom sirovina pri njihovoj izradi.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati stabilnost kationskih U/V nanoemulzija čiju uljnu fazu čini Mygliol 812, surfaktanti koji osiguravaju stabilnost sustava su lecitin S45 i Cremophor EL, a kao nositelj pozitivog naboja kationski polimer kitozan. Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije.

Specifični ciljevi diplomskog rada su:

- prirediti kationske nanoemulzije metodom mikrofluidizacije;
- ispitati stabilnost nanoemulzija nakon skladištenja 30 dana pri sobnoj temperaturi i pri 4°C;
- ispitati stabilnost nanoemulzija metodama ubrzanog starenja;
- ispitati stabilnost nanoemulzija nakon razrjeđenja umjetnom suznom tekućinom.

Kao parametri stabilnosti, razmatrani su veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal nanoemulzija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Uljna faza pripravljenih nanoemulzija sastoji se od Miglyol-a 812 (Kemig, Hrvatska) i lecitina S45 (Lipoid, Njemačka) 0,05% kao surfaktanta. Miglyol 812 je polusintetsko ulje, smjesa zasićenih triglicerida srednje dužine lanaca. Lecitin je kompleksna smjesa fosfolipida čiji je glavni sastojak fosfatidilkolin. Glavni prirodni izvori lecitina su soja i žumanjak jajeta. Lecitin S45 koji je korišten u sklopu ovog diplomskog rada dobiven je iz soje te sadrži 45 % fosfatidilkolina, dok ostatak čine masne kiseline koje su odgovorne za njegov negativni naboj. Vodenu fazu čine pročišćena voda, Cremophor EL 0,25% (Badische Anilin & Soda-Fabrik, Njemačka) kao neionski surfaktant i glicerol 2,5% (T.T.T. d.o.o., Hrvatska) kao sredstvo za izotonizaciju. Cremophor EL je neionski surfaktant koji se sintetizira polietoksiliranjem ricinusovog ulja s etilenoksidom, a glavna sastavnica mu je glicerol polietilenglikol ricinoleat. U formulacije s kitozanom dodano je i 0,3% kitozana niske molekulske mase (engl. *Low molecular weight,* LMW) (Sigma - Aldrich, SAD) koji služi kao nositelj pozitivnog naboja. Kitozan je kationski biopolimer, tj. heterogeni polisaharid koji se sastoji od acetilglukozamina i glukozamina, a dobiva se alkalnom deacetilacijom hitina, glavnog sastojka staničnih stijenki gljiva i egzoskeleta člankonožaca. U svrhu razrjeđivanja formulacija prije mjerenja veličine kapljica i njihovog zeta potencijala korišteni su filtrirana pročišćena voda i filtrirana otopina natrijevog klorida (10mM). Navedene tvari filtrirane su kroz membranski mikrobakteriološki filter (0,45µm, TPP-Techno plastic products, Švicarska). Za izradu simulirane suzne tekućine korišteni su kalijev klorid (Kemig, Hrvatska), natrijev klorid (Kemig, Hrvatska), natrijev hidrogenkarbonat (Kemig, Hrvatska), kalcijev klorid dihidrat (Sigma-Aldrich, SAD) i pročišćena voda te HCl (1M) za podešavanje pH.

3.2. METODE

3.2.1. IZRADA NANOEMULZIJA

Izrađene su dvije formualcije U/V nanoemulzija, kationska nanoemulzija te kontrolna nanoemulzija bez dodatka kitozana. Nanoemulzije su izrađene u triplikatu. Točan sastav formulacija nanoemulzija prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav formulacija nanoemulzija.

Naziv formulacije	Maseni udio sastavnica (%)				
	Mygliol	Lecitin	Cremophor	Glicerol	Kitozan
1-3	2,5	0,05	0,25	2,5	-
K1-K3	2,5	0,05	0,25	2,5	0,3

Nanoemulzije su izrađene tako da su odvojeno pripremljene uljna i vodena faza. Uljna je faza izrađena otapanjem lecitina S45 u Miglyol-u 812 na sobnoj temperaturi, uz miješanje na magnetskom mješaču. Vodena je faza izrađena otapanjem Cremophora EL u pročišćenoj vodi, nakon čega je dodan glicerol uz miješanje na magnetskom mješaču. Kod nanoemulzija s kitozanom u vodenu je fazu dodan i kitozan, u obliku 1%-tne vodene otopine u 0,05%-tnoj octenoj kiselini. Octena kiselina osigurava kiseli medij koji je nužan za otapanje kitozana. Nakon otapanja kitozana neotopljena onečišćenja odstranjena su filtriranjem kroz filter papir. Nakon odvojene pripreme faza uljna je faza dodana u vodenu, uz miješenje na magnetskom mješaču (450 okretaja u minuti) te su nakon kraćeg miješanja emulzije obrađene na Ultra-turrax-u (ULTRA-TURRAX®, IKA®-Werke GmbH & Co., Staufen, Njemačka) 5 minuta brzinom od 6000 okretaja u minuti. Time su dobivene grube emulzije prikladne za obradu na mikrofluidizatoru (Model M-110EH-30 Microfluidizer, Microfluidics, Newton MA, SAD). Grube su emulzije obrađene na mikrofluidizatoru u 5 ciklusa pri tlaku od 1000 bara.

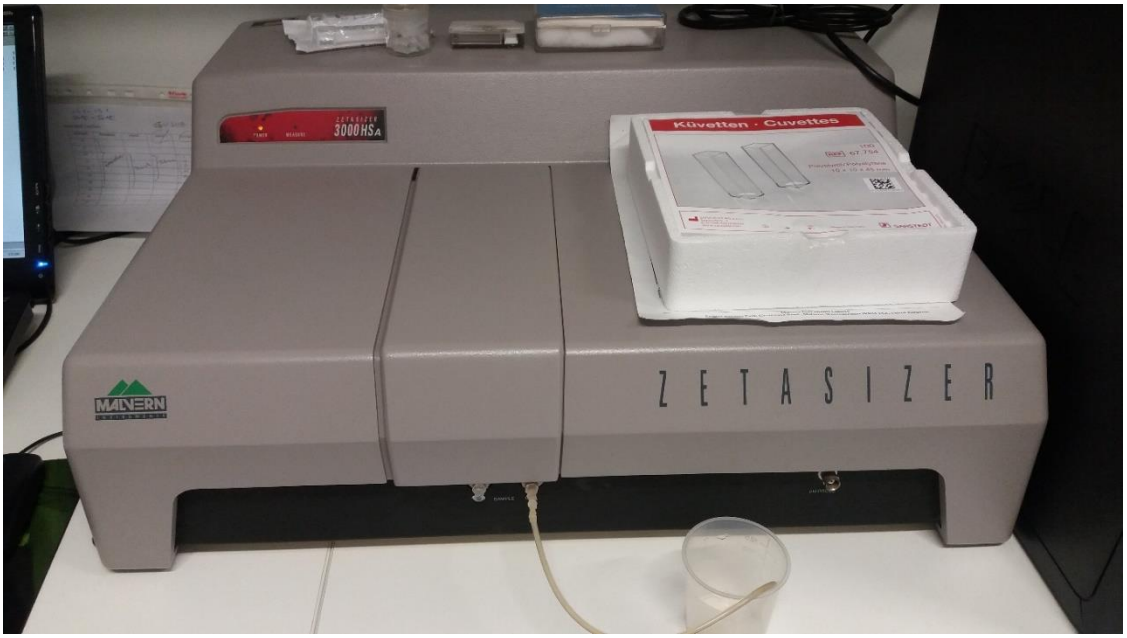


Slika 4. Mikrofluidizator (Model M-110EH-30 Microfluidizer, Microfluidics, Newton MA, SAD), PLIVA Hrvatska d.o.o..

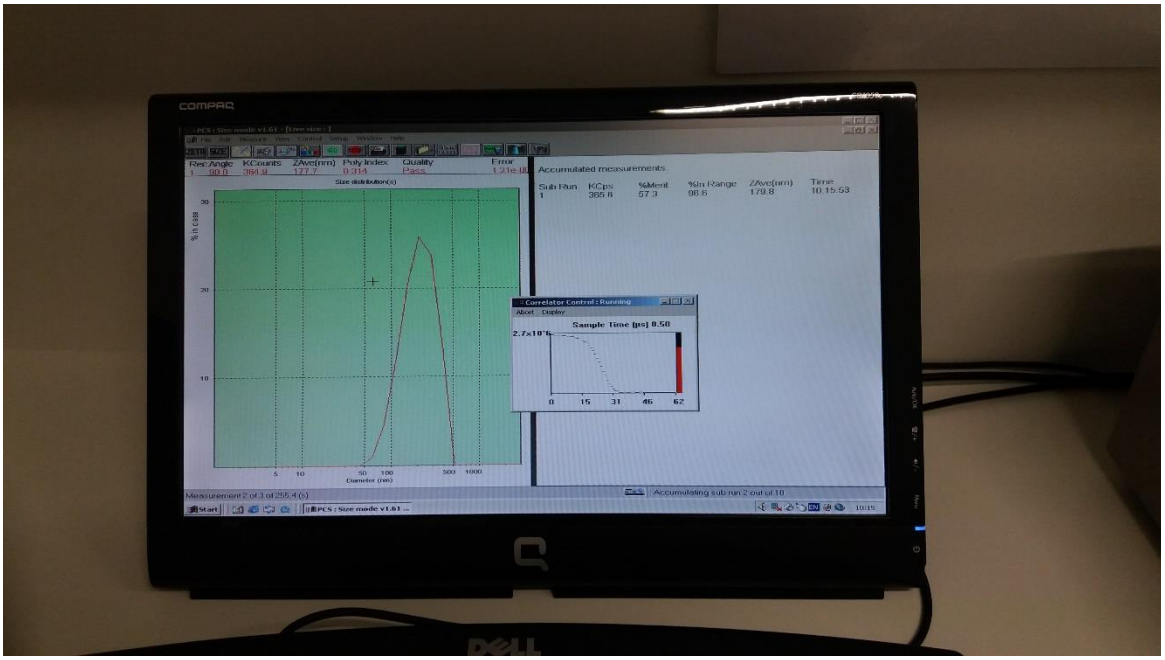
3.2.2. MJERENJE VELIČINE KAPLJICA I INDEKSA POLIDISPERZNOSTI

Veličina kapljica unutarnje faze (engl. *Z-average*) i raspodjela veličine kapljica – indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity indeks*) izmjereni su fotonskom korelacijskom spektroskopijom na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK) pri temperaturi od 25 °C u jednokratnim polistirenskim kivetama. Metoda mjerenja veličine kapljica temelji se na mjerenju promjene intenziteta raspršene svjetlosti kao funkcije vremena

te se na temelju Stokes-Einsteinove relacije softverski izračunava promjer kapljica unutarnje faze. Kao izvor svjetlosti uređaj koristi monokromatski koherentni helij-neon laser, a detekcija se vrši pod kutem od 90˚C. Rezultati se prikazuju kao prosječna veličina kapljica i indeks polidisperznosti. Indeks polidisperznosti je mjera za raspodjelu veličina čestica i ukazuje na homogenost disperzije pri čemu vrijednost od 0 označava monodisperznost, a vrijednost oko 1 označava nehomogeni sustav. Mjerenja su provođena pri 25 °C, a uzorci su prije mjerenja razrijeđeni pročišćenom vodom prethodno filtriranom kroz membranski mikrobakteriološki fiilter veličine pora 0,45µm (Spritzen- /Syringe-Filter 0,45µm, TPP, Švicarska).



Slika 5. Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK).



Slika 6. Mjerenje veličine kapljica unutarnje faze i indeksa polidisperznosti.

3.2.3. MJERENJE ZETA POTENCIJALA

Zeta potencijal nanoemulzija izmjeren je na uređaju Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Mjerenje se temelji na elektroforetskoj pokretljivosti izračunatoj iz frekvencija koje proizlaze iz detektiranih fotona svjetlosti te se primjenom Smoluchowskijeve aproksimacije prevodi u zeta potencijal.

$$U_E = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta}$$

U formuli U_E je elektroforetska pokretljivost, ε dielektrična konstanta vanjske faze, ζ zeta potencijal, a η viskoznost vanjske faze. Uzorak je prije mjerenja razrijeđen profiltriranom otopinom natrijevog klorida (10 mM) do primjerene koncentracije. Mjerenje se provodi pri 25 °C.

3.2.4. STABILNOST U STVARNOM VREMENU

Pripravljene nanoemulzije su skladištene tijekom 30 dana pri sobnoj temperaturi i 4°C nakon čega im je određena veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica na uređaju Zetasizer 3000HS.

3.2.5. METODE UBRZANOG STARENJA

Stabilnost nanoemulzija određena je sljedećim metodama ubrzanog starenja odnosno provedeni su sljedeći stres testovi: višestruki ciklusi zagrijavanja i hlađenja nanoemulzija, višestruki ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja nanoemulzija te test centrifugiranja nakon kojih je izmjerena veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica nanoemulzije. Prije mjerenja nanoemulzije su vizualno pregledane zbog mogućeg odvajanja faza.

3.2.5.1. VIŠESTRUKI CIKLUSI ZAGRIJAVNJA I HLAĐENJA

Uzastopno zagrijavanje na 45°C i hlađenje nanoemulzija na 4°C provedno je u 6 ciklusa. Uzorci su skladišteni po 48 sati pri svakoj temperaturi nakon čega su provedena mjerenja veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala kapljica.

3.2.5.2. VIŠESTRUKI CIKLUSI ZAMRZAVANJA I ODMRZAVANJA

Provedena su 3 ciklusa zamrzavanja nanoemulzija pri -20°C i odmrzavanja pri 25°C. Uzorak je skladišten po 48 sati pri svakoj navedenoj temperaturi nakon čega su provedena mjerenja veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala kapljica.

3.2.5.3. CENTRIFUGIRANJE

Uzorci su centrifugirani 30 min pri 9000xg nakon čega je izmjerena veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica.

3.2.6. ISPITIVANJE STABILNOSTI NANOEMUZIJE NAKON RAZRIJEĐENJA UMJETNOM SUZNOM TEKUĆINOM

Suzna tekućina je pripremljena otapanjem KCl (1,4 mg/mL), NaCl (6,8 mg/mL), $NaHCO_3$ (2,2 mg/mL) i $CaCl_2x2H_2O$ (0,08 mg/mL) u 500 ml destilirane vode (Krtalić i sur., 2018). pH otopine podešen je na 7,4 pomoću 1M HCl.

Uzorci nanoemulzija razrijeđeni su umjetnom suznom tekućinom u omjeru 40:7. Razrijeđeni uzorci miješani su 5 i 15 minuta na magnetskom mješaču pri 150 okretaja u minuti (*engl. Revolutions per minute, rpm*). Uzorcima je izmjerena veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. IZRADA NANOEMULZIJA

Pripravljena je kationska nanoemulzija za oftalmičku primjenu s Mygliolom 812 kao uljnom fazom u koncentraciji od 2,5% (*m*/*m*), Cremophorom EL (0,25%, *m*/*m*) i lecitinom S45 (0,05%, *m*/*m*) kao neionskim i ionskim surfaktantom, glicerolom (2,5%, *m*/*m*) kao sredstvom za izotonizaciju te kitozanom niske molekulske mase (0,3%, *m*/*m*) kao nositeljem pozitivnog naboja. Cremophor EL dodan je u svrhu emulgiranja i steričkog stabiliziranja kapljica uljne faze. Lecitin S45 korišten je s ciljem dobivanja negativnog površinskog naboja na kapljicama uljne faze. Taj površinski naboj potječe od negativno nabijenih slobodnih masnih kiselina te fosfatidne kiseline (Klang i Valenta, 2011). Negativni naboj dispergiranih kapljica ulja posredovan lecitinom S45 omogućuje njihovo oblaganje pozitivno nabijenim kitozanom (Li i sur., 2016). Kao kontrolna nanoemulzija, pripravljena je nanoemulzija bez dodatka kitozana u vanjsku fazu.

Po pripravi nanoemulzija nije uočeno odvajanje faza te su izgledom stabilne. Pripravljene nanoemulzije karakterizira mliječno bijela boja s blago plavičastim odsjajem zbog Rayleighovog raspršenja, kao što je i karakteristično za nanoemulzije (Klang i Valenta, 2011). Veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencija kapljica unutarnje faze pripravljenih nanoemulzija prikazana su u tablici 2. Kationska i kontrolna nanomeulzije bez kitozana pripravljene su u triplikatu. Kontrolne nanoemulzije obilježene su brojevima 1-3, a kationske nanoemulzije K1-K3.

Tablica 2. Veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica nanoemulzija.

Uzorak	Veličina kapljica (nm)*	PDI	Zeta potencijal (mV)**
1	177,5±1,3	0,138±0,009	-22,2±0,3
2	179,1±0,7	0,112±0,025	-16,4±0,4
3	176,9±0,5	0,130±0,021	-16,0±0,6
K1	180,2±2,6	0,254±0,052	31,0±1,4
K2	177,0±1,0	0,259±0,000	29,9±1,1
K3	175,1±1,0	0,215±0,010	28,0±1,2

* Pri mjerenju veličine kapljica nanoemulzije su razrijeđene 1000x
** Pri mjerenju zeta potencijala kapljica nanoemulzije su razrijeđene 100x

Srednja veličina nanoemulzija bez kitozana iznosi 177,7±1,1 nm, a nanoemulzija s kitozanom 177,4±2,5 nm. Srednja vrijednost indeksa polidisperznosti kontrolnih nanoemulzija iznosi 0,127±0,013, a kationskih 0,243±0,024. Srednja vrijednost zeta potencijala kontrolnih nanoemulzija iznosi -18,2±3,4 mV, a kationskih 29,63±1,518 mV. Rezultati određivanja veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala odgovaraju zahtjevima za izradu nanoemulzija. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su uspješno pripremljene nanoemulzije prosječne veličine kapljica manje od 500 nm zadovoljavajućeg indeksa polidisperznosti. Veličina kapljica nije se značajno promijenila dodatkom kitozana u formulaciju, ali je porastao indeks polidisperznosti što je u skladu s očekivanjima za kationski polimer određenog raspona molekulskih masa (50-190 kDa). Vrijednosti zeta potencijala formulacija bez kitozana su negativnog naboja, dok nanoemulzije s kitozanom poprimaju pozitivne vrijednosti zeta potencijala. U načelu, sustavi sa zeta potencijalom od ± 30 mV pokazuju dobru stabilnost, dok je kod vrijednosti zeta potencijala od ± 60 mV njihova stabilnost odlična. Kratkotrajna stabilnost prisutna je ako je zeta potencijal oko ± 20 mV, a vrijednosti do ± 5 mV ukazuju na brzu agregaciju (García-Celma i sur., 2016). Zeta potencijal sustava stabiliziranih s polielektrolitima kao što je kitozan, može biti manji od ± 30 mV, a osiguravati dovoljnu stabilnost sustava (Rai i sur., 2018). S obzirom na zeta potencijal kapljica uljne faze, za očekivati je da će pripravljene kationske nanoemulzije biti zadovoljavajuće stabilnosti.

4.2. ODREĐIVANJE STABILNOSTI U STVARNOM VREMENU

U svrhu određivanja stabilnosti nanoemulzija u stvarnom vremenu, pripravljene nanoemulzije su čuvane 30 dana pri sobnoj temepraturi (25°C) i u hladnjaku (pri 4°C). Dobiveni rezultati prikazani su u sljedećim tablicama.

Tablica 3. Veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica nanoemulzija nakon skladištenja pri 4°C tijekom 30 dana.

Uzorak	Izgled	Veličina kapljica (nm)*	PDI	Zeta potencijal (mV)**
1	U REDU	202,5±4,5	0,050±0,041	-14,5±0,7
2	U REDU	197,7±5,0	0,028±0,029	-14,5±0,6
3	U REDU	194,9±3,6	0,047±0,017	-15,2±0,2
K1	U REDU	204,5±6,1	0,222±0,009	29,7±1,0
K2	U REDU	190,1±3,9	0,091±0,010	28,5±0,8
K3	U REDU	198,4±5,8	0,208±0,017	27,9±0,9

* Pri mjerenju veličine kapljica nanoemulzije su razrijeđene 1000x
** Pri mjerenju zeta potencijala kapljica nanoemulzije su razrijeđene 100x

Tablica 4. Veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica nanoemulzija nakon skladištenja pri 25°C tijekom 30 dana.

Uzorak	Izgled	Veličina kapljica (nm)*	PDI	Zeta potencijal (mV)**
1	U REDU	201,5±1,3	0,052±0,011	-13,5±0,9
2	U REDU	201,7±3,9	0,025±0,014	-13,6±1,2
3	U REDU	199,1±1,6	0,066±0,018	-14,2±0,6
K1	U REDU	267,9±7,2	0,226±0,015	33,0±0,5
K2	U REDU	332,9±8,5	0,138±0,017	35,0±0,6
K3	U REDU	347,6±5,0	0,134±0,008	34,4±0,6

* Pri mjerenju veličine kapljica nanoemulzije su razrijeđene 1000x
** Pri mjerenju zeta potencijala kapljica nanoemulzije su razrijeđene 100x

Nakon čuvanja pri 4°C srednja veličina kapljica kontrolne nanoemulzije iznosi 198,4±3,8 nm, a kationske nanoemulzije 197,7±7,2 nm, odnosno došlo je do povećanja veličine kapljica u odnosu na početne vrijednosti. Srednja veličina indeksa polidisperznosti za kontrolne nanoemuzije 0,042±0,012 te za kationske nanoemulzije 0,174±0,072 ukazuje na homogenost

nanoemulzija. Zeta potencijal kationskih nanoemulzija ostao je nepromijenjen, dok se kod kontrolnih nanoemulzija zamjećuje blagi pad (-14,7±0,4 mV) nakon čuvanja 30 dana pri 4°C. Ta razlika vjerojatno je posljedica reorganizacije slobodnih masnih kiselina iz uljne faze na površinu kapljica. Nakon čuvanja nanoemulzija 30 dana pri sobnoj temperaturi uočen je značajniji porast kapljica kationske nanoemulzije (265,4±42,4 nm) u usporedbi s početnim mjerenjima, međutim unatoč porastu veličine kapljica nije došlo do vrhnjenja ni razdvajanja faza nanoemulzija, što ukazuje na njihovu kinetičku stabilnost. Uočeno je smanjenje indeksa polidisperznosti nakon skladištenja 30 dana pri obje temperature. Mogući uzrok tome je Ostwaldovo zrenje zbog kojeg su kapljice postale nešto veće, ali i ujednačenije jer su veće kapljice narasle na račun manjih. Kod kationskih nanoemulzija zeta potencijal se povisio samo nakon skladištenja pri 25 °C (34,1±1,0 mV). Do promjene u zeta potencijalu vjerojatno je došlo zbog porasta u veličini kapljica (veće kapljice-više pozitivno nabijenih molekula kitozana na površini-veći zeta potencijal).

Tablice izmjerenih vrijednosti pokazuju zadovoljavajuće rezultate nanoemulzija nakon skladištenja 30 dana pri 4 i 25°C. Izgled formulacija ostao je nepromijenjen tijekom skladištenja.

4.3. METODE UBRZANOG STARENJA

Metode ubrzanog starenja su metode koje omogućuju prognoziranje stabilnosti, a značajne su jer je vrijeme ispitivanja skraćeno.

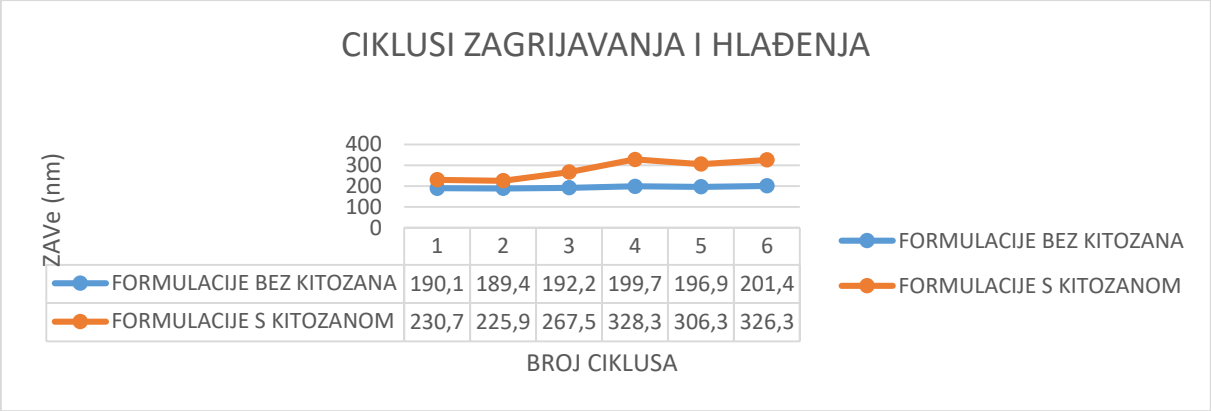
4.3.1. CIKLUSI ZAGRIJAVANJA I HLAĐENJA

Prva metoda ubrzanog starenja kojoj su podvrgnute nanoemulzije uključuje uzastopno zagrijavanje na 45°C i hlađenje nanoemulzija na 4°C. Provedeno je 6 ciklusa zagrijavanja i hlađenja, pri čemu su uzorci skladišteni po 48 sati pri svakoj temperaturi. Ključni parametri nanoemulzija nakon 6 ciklusa zagrijavanja i hlađenja prikazani su u tablici 5. 6 ciklusa kontrolnih nanoemulzija označeno je brojevima 1-6, dok je 6 ciklusa kationskih nanoemulzija označeno K1-K6.

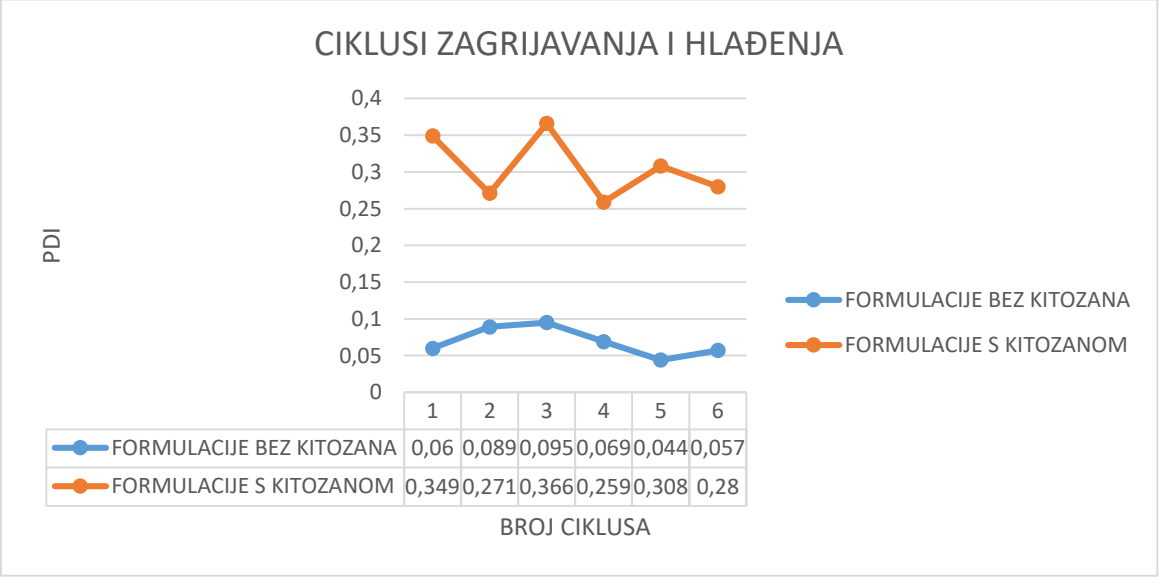
Tablica 5. Veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica nanoemulzija nakon ciklusa zagrijavanja i hlađenja pri temeraturi od 45 i 4°C.

Uzorak	Veličina kapljica (nm)*	PDI	Zeta potencijal (mV)**
1	190,1±0,8	0,060±0,020	-4,6±3,0
2	189,4±3,7	0,089±0,017	-9,5±3,4
3	192,2±0,8	0,095±0,016	-13,2±0,4
4	199,7±2,3	0,069±0,002	-16,7±0,8
5	196,9±0,9	0,044±0,01	-15,1±0,2
6	201,4±2,3	0,057±0,018	-15,7±0,3
K1	230,7±33,4	0,349±0,118	36,6±1,1
K2	225,9±28,6	0,271±0,224	35,7±1,7
K3	267,5±11,3	0,366±0,042	5,7±1,0
K4	328,3±15,4	0,259±0,022	39,4±1,9
K5	306,3±13,0	0,308±0,004	34,6±4,3
K6	326,3±13,0	0,280±0,053	37,8±1,2

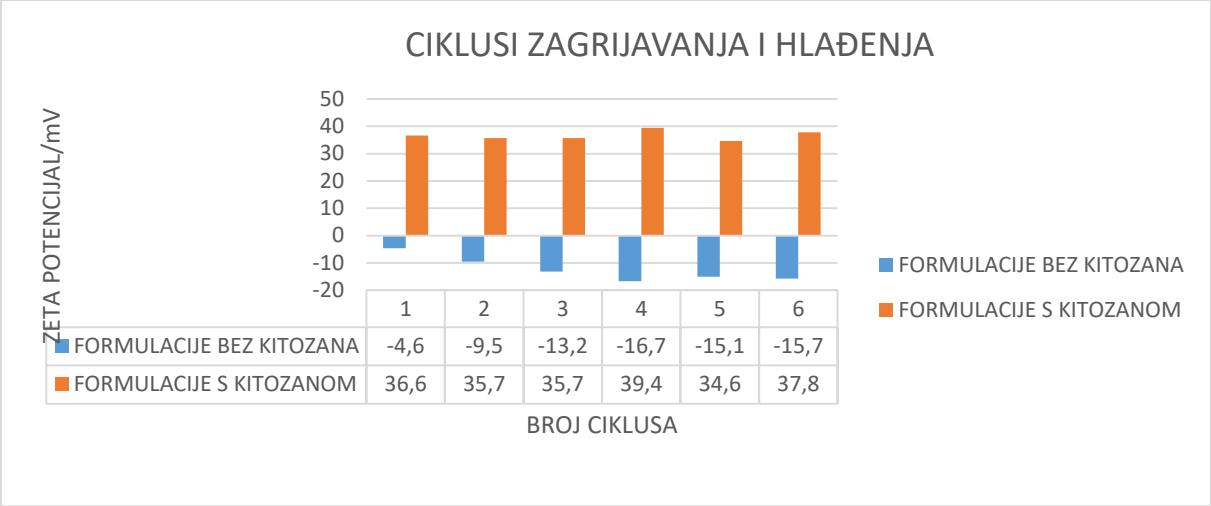
* Pri mjerenju veličine kapljica nanoemulzije su razrijeđene 1000x
** Pri mjerenju zeta potencijala kapljica nanoemulzije su razrijeđene 100x



Slika 7. Promjene veličine kapljica nanoemulzije ovisno o broju ciklusa zagrijavanja i hlađenja pri 45 i 4°C.



Slika 8. Promjene indeksa polidisperznosti kapljica nanoemulzije ovisno o broju ciklusa zagrijavanja i hlađenja pri 45 i 4°C.



Slika 9. Promjene zeta potencijala kapljica nanomeulzije ovisno o broju ciklusa zagrijavanja i hlađenja pri 45 i 4°C.

Iz priloženih podataka vidljivo je da su izrađene nanoemulzije stabilne nakon provedenog testa ubrzanog starenja, tj. 6 ciklusa zagrijavanja i hlađenja pri temperaturama 45°C i 4°C. Nanoemulzije s kitozanom pokazuju veći rast kapljica unutarnje faze i polidisperznosti nego kontrolne nanoemulzije bez kitozana, međutim izmjerene vrijednosti obiju formulacija i dalje u rasponu dozvoljenih veličina kapljica i indeksa polidisperznosti nanoemulzija. Nakon ovog ispitivanja došlo je do porasta zeta potencijala kationskih nanoemulzija s obzirom na početne vrijednosti što ukazuje da su vrijednosti zeta potencijala dovoljno visoke za stabilnu nanoemulziju (Rai i sur., 2017)

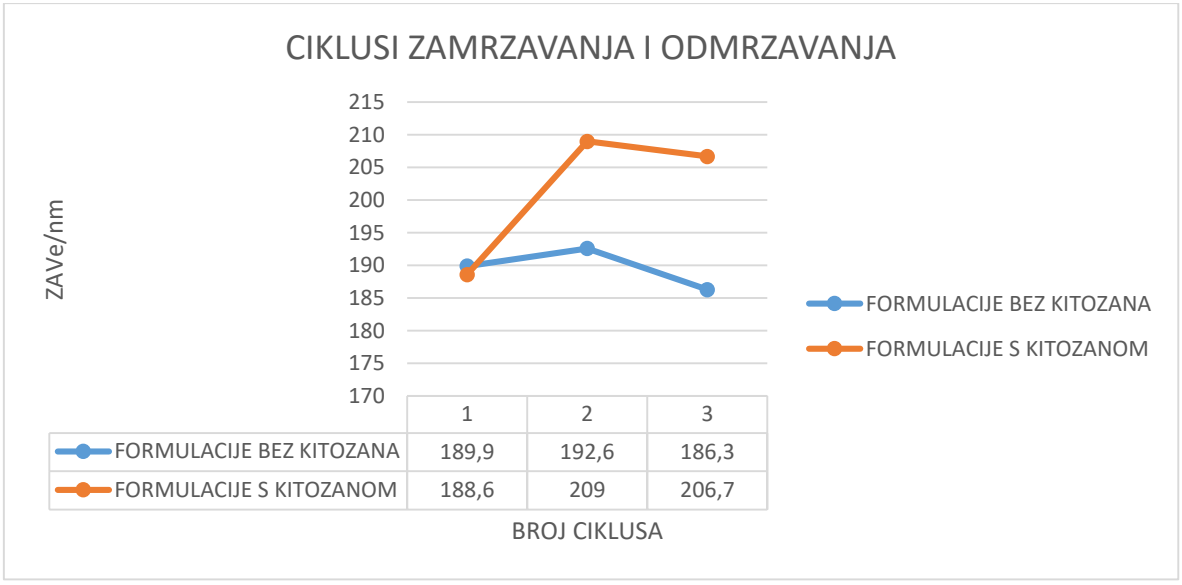
4.3.2. CIKLUSI ZAMRZAVANJA I ODMRZAVANJA

Druga metoda ubrzanog starenja kojoj su podvrgnute nanoemulzije uključuje uzastopno zamrzavanje pri -20°C i odmrzavanja nanoemulzija pri 25°C. Provedeno je 3 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, pri čemu su uzorci čuvani po 48 sati pri svakoj temperaturi. Ključni parametri nanoemulzija nakon 3 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja prikazani su u tablici 6. Ciklusi nanoemulzija bez kitozana prikazani su brojevima 1-3, a ciklusi kationskih nanoemulzija označeni su K1-K3.

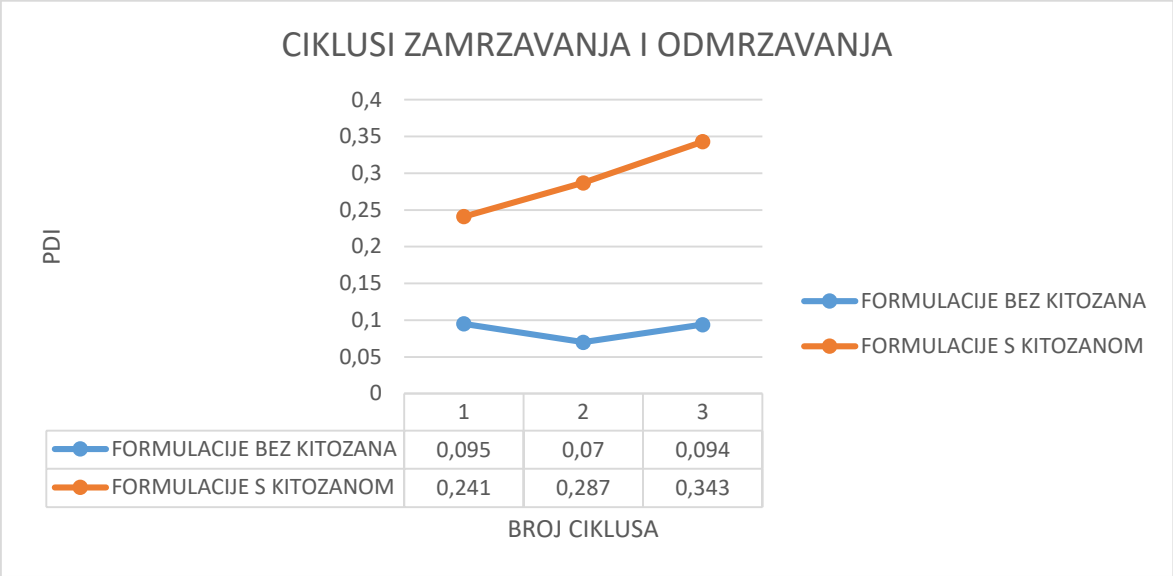
Tablica 6. Veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica nanoemulzija nakon 3 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja pri -20 i 25°C.

Uzorak	Veličina kapljica (nm)*	PDI	Zeta potencijal (mV)**
1	189,9±1,8	0,095±0,008	-11,6±0,9
2	192,6±2,6	0,07±0,017	-10,7±1,5
3	186,3±3,5	0,094±0,013	-15,9±0,4
K1	188,6±7,4	0,241±0,0212	29,3±1,1
K2	209,0±15,4	0,287±0,078	30,6±0,3
K3	206,7±22,2	0,343±0,087	32,1±1,3

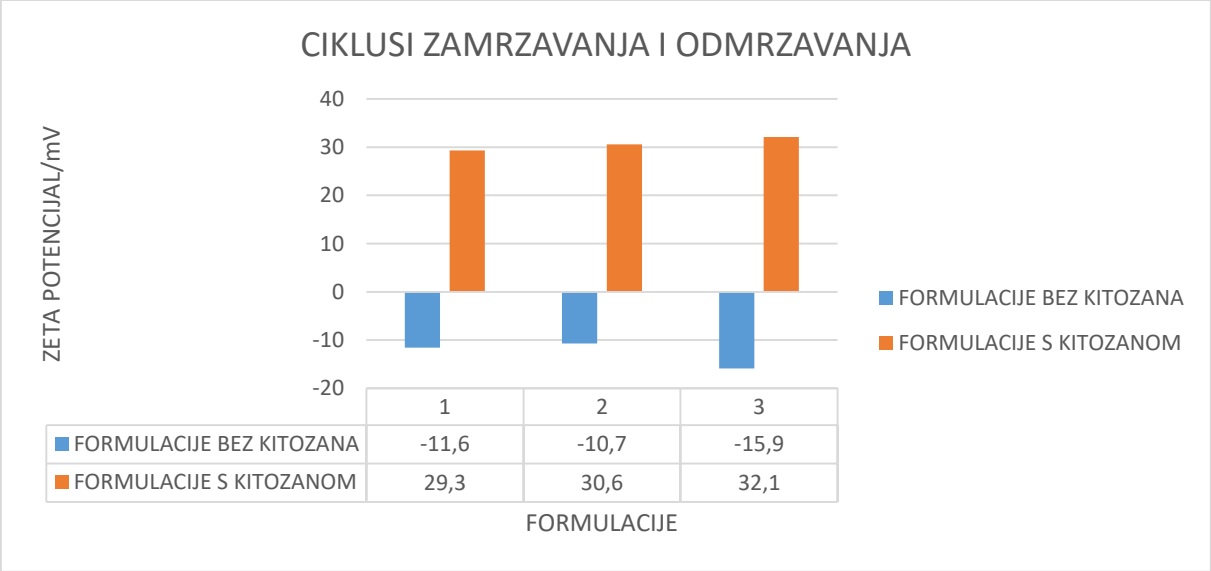
* Pri mjerenju veličine kapljica, nanoemulzije su razrijeđene 1000x
** Pri mjerenju zeta potencijala kapljica, nanoemulzije su razrijeđene 100x



Slika 10. Promjene veličine kapljica nanoemulzije ovisno o broju ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja pri -20 i 25°C.



Slika 11. Promjene indeksa polidisperznosti kapljica nanoemulzije ovisno o broju ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja pri -20 i 25°C.



Slika 12. Promjene zeta potencijala kapljica nanoemulzije ovisno o broju ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja pri -20 i 25°C.

Uspoređujući prikazane rezultate s početnim vrijednostima može se uočiti da je porasla veličina kapljica i nanoemulzija bez kitozana i kationskih nanoemulzija, s time da su vrijednosti kationskih nanoemuzija malo više (209±0,2 nm), međutim obje formulacije zadovoljavaju vrijednosti veličina kapljica za nanoemulzijske sustave. Nadalje, indeks polidisperznosti kationskih nanoemulzija viši je od 0,2 što ukazuje na široki raspon veličina kapljica, odnosno nedovoljno visoku homogenost te moguću nestabilnost. Nisu uočene značajnije promjene u vrijednostima zeta potencijala kationskih nanoemulzija.

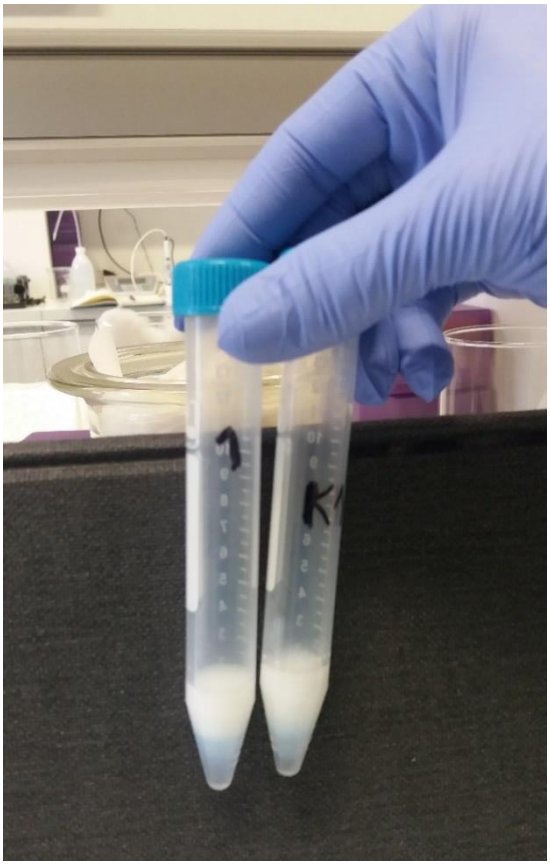
4.3.3. CENTRIFUGIRANJE

Treća metoda ubrzanog starenja kojoj su podvrgnute nanoemulzije uključuje centrifugiranje pri 9000 x g u trajanju od 30 min. Ključni parametri nanoemulzija nakon centrifugiranja prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica nanoemulzija nakon centrifugiranja pri 9000 x g u trajanju od 30 minuta.

Uzorak	Izgled	Veličina kapljica (nm)*	PDI	Zeta potencijal (mV)**
1	VRHNJENJE	185,6±0,8	0,101±0,008	-9,9±0,6
2	VRHNJENJE	185,0±0,2	0,092±0,010	-11,0±0,7
3	VRHNJENJE	186,1±0,9	0,091±0,007	-13,0±0,7
K1	VRHNJENJE	184,8±0,4	0,192±0,006	29,7±1,6
K2	VRHNJENJE	179,4±0,9	0,195±0,015	29,8±1,0
K3	VRHNJENJE	177,1±1,5	0,172±0,009	29,0±0,8

* Pri mjerenju veličine kapljica, nanoemulzije su razrijeđene 1000x
** Pri mjerenju zeta potencijala kapljica, nanoemulzije su razrijeđene 100x



Slika 13. Izgled nanoemulzija bez kitozana (1) i s kitozanom (K1) nakon centrifugiranja. Na slici je vidljivo odvajanje faza.

Kao što je vidljivo na slici 13, došlo je do vrhnjenja nakon centrifugiranja pri 9000 x g u trajanju od 30 minuta. Međutim, nakon kratkog i snažnog protresivanja došlo je do redispergiranja nanoemulzija. Veličina kapljica unutarnje faze nakon redispergiranja podjednaka je u svim uzorcima (185,6±0,6 nm i 180,4±3,9 nm), nema značajnih odstupanja od početnih vrijednosti. Indeksi polidisperznosti manji su od 0,2, što upućuje na uzak raspon veličine kapljica i stabilnost formulacija. Vrijednost zeta potencija kationskih nanoemulzija je 29,5±0,4 mV što znači da su nanoemulzije stabilne nakon centrifugiranja usprkos razdvajanju faza.

4.4. ISPITIVANJE STABILNOSTI NANOEMUZIJE U UMJETNOJ SUZNOJ TEKUĆINI

Kako bi se ispitala stabilnost nanoemulzija u biorelevantnim uvjetima, nanoemulzije su razrijeđene s umjetnom suznom tekućinom u omjeru 40:7 (Wei i sur., 2002; Krtalić i sur., 2018). Omjer proizlazi iz volumena jedne kapi pripravaka (40 µL) te volumena suznog filma na površini oka (7 µL). Nanoemulzije su pomiješane s umjetnom suznom tekućinom na magnetskom miješaču tijekom 5 minuta i 15 minuta, a dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 8 i 9.

Tablica 8. Veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica nanoemulzija nakon miješanja izrađenih nanoemulzija i umjetne suzne tekućine u omjeru 40:7 pri 150 okretaja u minuti u trajanju od 5 minuta.

Uzorak	**Veličina kapljica (nm)***	**PDI**	**Zeta potencijal (mV)****
1	190,9±1,6	0,067±0,030	-10,3±4,0
2	192,1±3,1	0,083±0,031	-16,6±1,4
3	188,4±0,5	0,038±0,051	-18,6±1,6
K1	189,2±2,4	0,181±0,025	30,6±1,3
K2	198,5±2,9	0,183±0,032	27,4±1,5
K3	184,5±1,5	0,156±0,010	26,8±1,6

* Pri mjerenju veličine kapljica, nanoemulzije su razrijeđene 500x
** Pri mjerenju zeta potencijala kapljica, nanoemulzije su razrijeđene 100x

Tablica 9. Veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal kapljica nanoemulzija nakon miješanja izrađenih nanoemulzija i umjetne suzne tekućine u omjeru 40:7 pri 150 okretaja u minuti u trajanju od 15 minuta.

Uzorak	Veličina kapljica (nm)*	PDI	Zeta potencijal (mV)**
1	189,8±2,4	0,077±0,006	-19,3±0,6
2	190,0±3,2	0,075±0,004	-16,6±1,6
3	188,1±2,4	0,095±0,012	-19,1±2,6
K1	197,4±2,6	0,204±0,012	30,5±1,7
K2	185,2±3,8	0,164±0,032	28,3±1,3
K3	190,2±2,0	0,181±0,021	28,7±1,2

* Pri mjerenju veličine kapljica, nanoemulzije su razrijeđene 500x
** Pri mjerenju zeta potencijala kapljica, nanoemulzije su razrijeđene 100x

Veličina kapljica obiju formulacija nakon miješanja sa umjetnom suznom tekućinom je podjednaka i nešto veća u odnosu na početne nerazrijeđene formulacije (177,7±1,1 nm i 177,4±2,6 nm). Indeksi polidisperznosti su manji od 0,2 (osim K1, tablica 9 koji je nezamjetno veći) i upućuju na uski raspon veličina kapljica. Nema značajnije promjene u zeta potencijalu kationskih nanoemulzija nakon razrijeđenja. Nema značajnih razlika s obzirom na vrijeme miješanja formulacija i umjetne suzne tekućine.

5. ZAKLJUČAK

- Pripravljena je kationska nanoemulzija za oftalmičku primjenu s Mygliolom 812 kao uljnom fazom u koncentraciji od 2,5% (*m*/*m*), Cremophorom EL (0,25%, *m*/*m*) i lecitinom S45 (0,05%, *m*/*m*) kao neionskim i ionskim surfaktantom, kitozanom niske molekulske mase (0,3%, *m*/*m*) kao nositeljem pozitivnog naboja te glicerolom (2,5%, *m*/*m*) kao sredstvom za izotonizaciju.
- Veličina kapljica i indeks polidisperznosti pripravljene kationske nanoemulzije unutar je dozovoljenog raspona s obzirom na stabilnost sustava.
- Određivanje stabilnosti nanoemulzije u stvarnom vremenu pri 4 i 25°C ukazuju na potrebu čuvanja nanoemulzije pri nižim temepraturama.
- Nakon provedenih testova ubrzanog starenja, došlo je do porasta veličine kapljica i indeksa polidisperznosti kationskih nanoemulzija, koje prati i blagi porast zeta potencijala, ali nije došlo do vrhnjenja niti do odvajanja faza, što ukazuje na dobru kinetičku stabilnost formulacija.
- Nakon provedenih testova ubrzanog starenja, uočen je blagi porast veličine kapljica unutarnje faze, međutim ispitivana kationska nanoemulzija zadovoljava vrijednosti za nanoemulzijske sustave. Došlo je do određenog porasta indeksa polidisperznosti kationske nanoemulzije (> 0,2) što ukazuje na moguću nestabilnost. Nije došlo do značajnijih promjena zeta potencijala kationske nanoemulzije.
- Centrifugiranjem kationske nanoemuzije došlo je do vrhnjena, međutim protresivanjem dolazi do redispergiranja, a dobivenu nanomeulziju karakterizira zadovoljavajuća veličina kapljica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal što ukazuje na stabilnost ispitivanog sustava.
- Miješanjem nanoemulzija sa suznom tekućinom u omjeru 40:7 nije došlo do značajne promjene veličine kapljica. Indeks poidisperznosti je manji od 0,2 što znači da je nanoemulzija uskog raspona veličine kapljica. Također, nema značajnije promjene u zeta potencijalu kationske nanoemulzije nakon razrijeđenja.

6. LITERATURA

Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. J Controlled Release, 2008, 128, 111-199.

Eccleston GM. Emulsions and Creams. U: Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. Aulton M, Taylor KMG, urednici, London, Elseiver, 2013, str. 436-464.

Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, Liu j, Gan Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. Drug Discov Today, 2013, 18, 290-297.

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

Gupta A, Burak H, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: formation, properties and applications. Soft Matter, 2016, 12, 2826-2841.

Jafari SM, He Y, Bhandari B. Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization - A Comparison. Int J Food Prop, 2006, 9, 475–485.

Klang V, Valenta C. Lecithin-based nanoemulsions. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2011, 21, 55-76.

Komaiko J, McClements DJ. Low-energy formulation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: factors influencing particle size. J Food Eng, 2015, 146, 122-128.

Krtalić I, Radošević S, Hafner A, Grassi M, Nenadić M, Cetina-Čizmek B, Filipović-Grčić J, Pepić I, Lovrić J. D-Optimal Design in the Development of Rheologically Improved In Situ Forming Ophthalmic Gel. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 1-10.

Lallemand F, Daull P, Benita S, Buggage R, Garrigue JS, Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb, Journal of Drug Delivery, 2012, 1-16

Li J, Hwang I-C, Chen X, Park HJ. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. Food Hydrocolloids, 2016, 60, 138-147.

McClements DJ, Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. Soft Matter, 2012, 8, 1719-1729.

Pepić I, Problemi lokalne primjene pripravaka za oči, Farmaceutski Glasnik 60, 7–8, 2004, 311-329.

Rai VK, Mishra N, Singh Yadav K, Yadav NP, Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications, Journal of Controlled Release 270, 2018, 203-225.

Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M, Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2007, 66, 227–243.

Silva HD, Cerqueira MA, Vicente AA. Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. J Food Eng, 2015, 167, 89–98.

Singh Y., Meher JG , Raval K, Ali Khan F, Chaurasia M, Jain NK, Chourasia MK. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery, Journal of Controlled Release 252, 2017, 28–49.

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

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

Wei G, Xu H, Ding PT, Li SM, Zheng JM, Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. J Control Release, 2002, 83, 65-74.

7.SAŽETAK/ SUMMARY

Apsorpcija i posljedično bioraspoloživost topikalnih oftalmičkih lijekova je ograničena zbog barijera prednjeg dijela oka kao što su nazolakrimalna drenaža, refleks treptanja i suzenja, čvrste barijere rožnice te proteini i metabolički enzimi suzne tekućine. S ciljem povećanja bioraspoloživosti oftalmičkih lijekova, smanjenja nuspojava zbog neproduktivne apsorpcije u sistemsku cirkulaciju te smanjene učestalosti doziranja istražuju se i razvijaju inovativni farmaceutski oblici topikalnih oftalmičkih lijekova. Potencijal U/V nanoemulzija u oftalmičkoj primjeni temelji se na sličnosti nanoemulzija sa suznim filmom. Kako je većina oftalmičkih lijekova slabo topljiva u vodi, uklapanjem u uljnu fazu U/V nanoemulzija povećava se njihova topljivost. S ciljem produljenja zadržavanja nanoemulzija na površini oka, površina kapljica modificira se dodatkom kationskih surfaktanata ili polimera. Time površina kapljica unutarnje faze postaje pozitivno nabijena. Ključan parametar u procesu razvoja konačnog oblika lijeka je njegova stabilnost. Cilj ovog diplomskog rada je ispitati stabilnost kationskih U/V nanoemulzija čiju uljnu fazu čini Mygliol 812, surfaktanti koji osiguravaju stabilnost sustava su lecitin S45 i Cremophor EL, a pseudoemulgator kationski polimer kitozan. Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije. Ispitativana je stabilnost nanoemulzija nakon skladištenja 30 dana pri sobnoj temperaturi i pri 4°C, metodama ubrzanog starenja i nakon razrjeđenja umjetnom suznom tekućinom. Kao parametri stabilnosti, razmatrani su veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal nanoemulzija. Određivanje stabilnosti nanoemulzija u stvarnom vremenu pri 4 i 25°C ukazuju na potrebu čuvanja nanoemulzija pri nižim temepraturama. Nakon provedenih testova ubrzanog starenja, došlo do porasta veličine kapljica i indeksa polidisperznosti kationskih nanoemulija, koje prati i blagi porast zeta potencijala, ali nije došlo do vrhnjenja niti do odvajanja faza, što ukazuje na dobru kinetičku stabilnost formulacija. Miješanjem nanoemulzija sa suznom tekućinom u omjeru 40:7 nije došlo do značajne promjene veličine kapljica, indeksa polidisperznosti ni zeta potencijala kationske nanoemulzije.

The absorption and consequently the bioavailability of topical ophthalmic drugs is limited by the anterior eye segment barriers such as nasolacrimal drainage, reflex blinking, tight corneal barriers and proteins and metabolic enzymes of tear fluid. In order to increase the bioavailability of ophthalmic drugs, reduce the side effects due to unproductive absorption into systemic circulation and reduced dosage frequency, innovative pharmaceutical forms of topical ophthalmic drugs are being investigated and developed. The potential of O/W nanoemulsion in ophthalmic drug delivery is based on the similarities of the nanoemulsion with the tear film. Since most of the ophthalmic drugs are poorly soluble in water, their encapsulation into the O/W nanoemulsion oil phase increases drug solubility. With the aim of prolonging the nanoemulsion retention on the surface of the eye, the droplet surface is modified by addition of cationic surfactants or polymers, which makes the droplets positively charged. The key parameter in the process of developing a final dosage form is its stability. The aim of this thesis is to examine the stability of the cationic O/W nanoemulsion whose oil phase makes the Mygliol 812, surfactants lecithin S45 and Cremophor EL, and pseudo-emulsifier cationic polymer chitosan. Nanoemulsions were prepared by a high-energy microfluidization method. The stability of nanoemulsion was tested after storage for 30 days at room temperature and at 4 ° C, accelerated stability testing methods and after dilution with simulated tear fluid. As stability parameters, the size of the droplet, the polydispersity index and the zeta potential of the nanoemulsion were considered. Determination of the stability of the nanoemulsion in real time at 4 and 25°C indicates the need to store the nanoemulsion at lower temperatures. After accelerated aging tests were performed, the droplet size and polydispersity index of cationic nanoemulsion increased, followed by a mild increase in potency, but there was no creaming or phase separation, indicating good kinetic stability of the formulationsMixing the nanoemulsion with the simulated tear fluid at a ratio of 40: 7 did not induced any significant changes to the droplet size, polydispersity index nor zeta potential.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Ispitivanje stabilnosti kationskih nanoemulzija metodama ubrzanog starenja

Ivona Bručić

SAŽETAK

Apsorpcija i posljedično bioraspoloživost topikalnih oftalmičkih lijekova je ograničena zbog barijera prednjeg dijela oka kao što su nazolakrimalna drenaža, refleks treptanja i suzenja, čvrste barijere rožnice te proteini i metabolički enzimi suzne tekućine. S ciljem povećanja bioraspoloživosti oftalmičkih lijekova, smanjenja nuspojava zbog neproduktivne apsorpcije u sistemsku cirkulaciju te smanjene učestalosti doziranja istražuju se i razvijaju inovativni farmaceutski oblici topikalnih oftalmičkih lijekova. Potencijal U/V nanoemulzija u oftalmičkoj primjeni temelji se na sličnosti nanoemulzija sa suznim filmom. Kako je većina oftalmičkih lijekova slabo topljiva u vodi, uklapanjem u uljnu fazu U/V nanoemulzija povećava se njihova topljivost. S ciljem produljenja zadržavanja nanoemulzija na površini oka, površina kapljica modificira se dodatkom kationskih surfaktanata ili polimera. Time površina kapljica unutarnje faze postaje pozitivno nabijena. Ključan parametar u procesu razvoja konačnog oblika lijeka je njegova stabilnost. Cilj ovog diplomskog rada je ispitati stabilnost kationskih U/V nanoemulzija čiju uljnu fazu čini Mygliol 812, surfaktanti koji osiguravaju stabilnost sustava su lecitin S45 i Cremophor EL, a pseudoemulgator kationski polimer kitozan. Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije. Ispitativana je stabilnost nanoemulzija nakon skladištenja 30 dana pri sobnoj temperaturi i pri 4°C, metodama ubrzanog starenja i nakon razrjeđenja umjetnom suznom tekućinom. Kao parametri stabilnosti, razmatrani su veličina kapljica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal nanoemulzija. Određivanje stabilnosti nanoemulzija u stvarnom vremenu pri 4 i 25°C ukazuju na potrebu čuvanja nanoemulzija pri nižim temepraturama. Nakon provedenih testova ubrzanog starenja, došlo do porasta veličine kapljica i indeksa polidisperznosti kationskih nanoemulija, koje prati i blagi porast zeta potencijala, ali nije došlo do vrhnjenja niti do odvajanja faza, što ukazuje na dobru kinetičku stabilnost formulacija. Miješanjem nanoemulzija sa suznom tekućinom u omjeru 40:7 nije došlo do značajne promjene veličine kapljica, indeksa polidisperznosti ni zeta potencijala kationske nanoemulzije.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 13 grafičkih prikaza, 9 tablica i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Stabilnost, kationske nanoemulzije, kitozan, oftalmička primjena, testovi ubrzanog starenja

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia
ili druga adresa

Diploma thesis

Accelerated stability testing of cationic nanoemulsions

Ivona Bručić

SUMMARY

The absorption and consequently the bioavailability of topical ophthalmic drugs is limited by the anterior eye segment barriers such as nasolacrimal drainage, reflex blinking, tight corneal barriers and proteins and metabolic enzymes of tear fluid. In order to increase the bioavailability of ophthalmic drugs, reduce the side effects due to unproductive absorption into systemic circulation and reduced dosage frequency, innovative pharmaceutical forms of topical ophthalmic drugs are being investigated and developed. The potential of O/W nanoemulsion in ophthalmic drug delivery is based on the similarities of the nanoemulsion with the tear film. Since most of the ophthalmic drugs are poorly soluble in water, their encapsulation into the O/W nanoemulsion oil phase increases drug solubility. With the aim of prolonging the nanoemulsion retention on the surface of the eye, the droplet surface is modified by addition of cationic surfactants or polymers, which makes the droplets positively charged. The key parameter in the process of developing a final dosage form is its stability. The aim of this thesis is to examine the stability of the cationic O/W nanoemulsion whose oil phase makes the Mygliol 812, surfactants lecithin S45 and Cremophor EL, and pseudo-emulsifier cationic polymer chitosan. Nanoemulsions were prepared by a high-energy microfluidization method. The stability of nanoemulsion was tested after storage for 30 days at room temperature and at 4 ° C, accelerated stability testing methods and after dilution with simulated tear fluid. As stability parameters, the size of the droplet, the polydispersity index and the zeta potential of the nanoemulsion were considered. Determination of the stability of the nanoemulsion in real time at 4 and 25°C indicates the need to store the nanoemulsion at lower temperatures. After accelerated aging tests were performed, the droplet size and polydispersity index of cationic nanoemulsion increased, followed by a mild increase in potency, but there was no creaming or phase separation, indicating good kinetic stability of the formulationsMixing the nanoemulsion with the simulated tear fluid at a ratio of 40: 7 did not induced any significant changes to the droplet size, polydispersity index nor zeta potential.

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

Thesis includes: 38 pages, 13 figures, 9 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Stability, cationic nanoemulsion, chitosan, ophthalmic use, accelerated aging tests

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

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

The thesis was accepted: July, 2018.