

Veronika Ria Tus

**Razvoj *in situ* gelirajuće nanosuspenzije
melatonina za nazalnu primjenu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

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

Prvenstveno zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Hafner na pruženoj prilici, strpljenju, velikoj pomoći i prenesenom znanju u izradi ovog diplomskog rada.

Veliko hvala dr. sc. Lauri Nižić Nodilo na uloženom vremenu, trudu i stručnim savjetima, kolegi Tinu Rogini na ugodnom druženju i pomoći, kao i djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na poticajnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem i svim svojim dragim ljudima na pruženoj ljubavi, podršci, pomoći i nenormalnim količinama čokolade. Na kraju, posebnu zahvalu upućujem jednoj posebnoj osobi.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Nazalna primjena melatonina	1
1.2. Inovativni farmaceutski oblici melatonina za nazalnu primjenu.....	2
1.3. Nanosuspenzije	5
1.3.1. Prednosti i nedostaci nanosuspenzija.....	5
1.3.2. Vlažno mljevenje kao metoda izrade nanosuspenzija	7
1.3.3. Ispitivanje fizičke stabilnosti nanosuspenzija	9
1.3.4. Primjena nanosuspenzija u biomedicini.....	10
1.3.5. Nanosuspenzije za nazalnu primjenu.....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Materijali	16
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Izrada nanosuspenzija melatonina	16
3.2.2. Određivanje veličine čestica i stabilnosti nanosuspenzija melatonina.....	18
3.2.3. Priprema <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija melatonina	18
3.2.4. Reološka karakterizacija <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija melatonina	19
3.2.4.1. Test promjene amplitude.....	19
3.2.4.2. Test vremena geliranja	19
3.2.4.3. Određivanje krivulje viskoznosti	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. Priprema nanosuspenzija melatonina	21
4.2. Veličina i indeks polidisperznosti nanočestica melatonina u pripremljenim nanosuspenzijama	21
4.3. Stabilnost nanosuspenzija melatonina.....	24
4.4. Priprema <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija melatonina	26
4.5. Reološka svojstva <i>in situ</i> gelirajućih nanosuspenzija melatonina.....	27
4.5.1. Linearno viskoelastično područje.....	27
4.5.2. Vrijeme geliranja.....	28
4.5.3. Krivulja viskoznosti.....	29
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA	32
7. SAŽETAK/SUMMARY	40
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Nazalna primjena melatonina

Melatonin je neurohormon indolamidne strukture ključan u regulaciji cirkadijanog ritma (Jayachandra Babu i sur., 2011; Lalanne i sur., 2021). U tijelu se sintetizira u tri koraka iz esencijalne aminokiseline triptofana pretežito u epifizi, ali i u retini te probavnom sustavu (Lalanne i sur., 2021). Izlučivanje melatonina iz epifize suprimirano je svjetlošću pa se tako vršna koncentracija melatonina u plazmi postiže između 2 i 4 sata ujutro (Jayachandra Babu i sur., 2011; Lalanne i sur., 2021). Kada se ciklus izloženosti svjetlu i tami promijeni, primjerice nakon leta kroz više vremenskih zona, hipotalamus postupno prilagođava izlučivanje melatonina novim uvjetima (Zhdanova, 2014). Melatonin svoj učinak ostvaruje vezanjem na receptore ili izravnom reakcijom s reaktivnim kisikovim i dušikovim spojevima (Lalanne i sur., 2021). Membranski ML1 i ML2 receptori pripadaju skupini receptora povezanih s G-proteinima koji sudjeluju u regulaciji ciklusa spavanja i budnosti te u regulaciji koštane mase (Lalanne i sur., 2021). Citosolni MT3 receptori imaju važnu ulogu u procesu detoksifikacije, dok su retinoidni Z receptori nuklearni receptori koji sudjeluju u modulaciji imunskog odgovora (Lalanne i sur., 2021).

Najučestalija primjena melatonina je u svrhu liječenja nesanice i problema sa spavanjem (Lalanne i sur., 2021). Koristi se kod problema s usnivanjem i održavanjem sna, rada u smjenama, jet laga, migrena, u osoba s poremećenim cirkadijanim sustavom i slijepih osoba (Jayachandra Babu i sur., 2011; Zhdanova, 2014). Melatonin ne narušava arhitekturu sna niti inhibira REM (engl. *rapid eye movement*) fazu sna kao klasični hipnotici (Zhdanova, 2014). Primjena melatonina također se intenzivno istražuje u liječenju neurodegenerativnih bolesti kao što je Alzheimerova bolest zbog antioksidativnih i neuroprotektivnih učinaka melatonina (Jayachandra Babu i sur., 2011).

Razgradnja u probavnom sustavu i metabolizam prvog prolaska kroz jetru, kratko vrijeme polueliminacije i značajna intervarijabilnost samo su neki od razloga nepredvidljive apsorpcije i male bioraspodivnosti oralno primijenjenog melatonina (Al-Omary, 2013; Jayachandra Babu i sur., 2011; Lalanne i sur., 2021). Melatonin otežano prolazi krvno-moždanu barijeru što ograničava učinkovitost sistemski primijenjenog melatonina u mozgu (Jayachandra Babu i sur., 2011).

Kao rješenje nudi se nazalni put primjene zbog mogućnosti izravne dostave lijeka u mozak putem olfaktornog živca i ogranaka trigeminalnog živca (Hafner i sur., 2014; Jayachandra Babu i sur., 2011). Nazalnom primjenom lijekova sa sistemskim učinkom izbjegnut je opsežan metabolizam u jetri i probavnom sustavu te se postiže veća bioraspoloživost (Hafner i sur., 2014; Ozer, 2007). Ostale prednosti su jednostavnost primjene i prihvaćenost od strane bolesnika, brzi nastup djelovanja i mogućnost primjene manjih doza lijeka što uz lokaliziranu primjenu dovodi do manje nuspojava (Ozer, 2007; Türker i sur., 2004).

1.2. Inovativni farmaceutski oblici melatonina za nazalnu primjenu

U svrhu poboljšanja farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava melatonina istražuju se razni inovativni farmaceutski oblici za nazalnu primjenu čiji pregled je prikazan u Tablici 1. (Chuffa i sur., 2021). Intenzivno se ispituju nanosustavi zbog povećane topljivosti i nazalne permeabilnosti melatonina, mogućnosti njegovog kontroliranog oslobađanja te smanjene razgradnje u nosnoj sluznici (De Oliveira Junior i sur., 2019). Jedan od primjera su niosomi, vezikule nanometarske veličine, višeslojne strukture, načinjene od neionskih površinski aktivnih tvari. U odnosu na intravensku primjenu otopine melatonina, nazalna primjena melatonina uklopljenog u niosome rezultirala je bržim početkom djelovanja te produljenim oslobađanjem lijeka, bez pojave toksičnih učinaka (Priprem i sur., 2017). Istražuju se i mikrosustavi kao što su polimerne mikrosfere s melatoninom, napravljene od škroba ili mukoadhezivnih polimera hipromeloze i pektina (Mao i sur., 2004; Nižić i sur., 2020; Ozer, 2007). Takvi sustavi omogućuju prikladnu brzinu oslobađanja melatonina (Nižić i sur., 2020), veću bioraspoloživost naspram neprocesuiranog lijeka (Nižić i sur., 2020), kao i potencijal produljenog zadržavanja u nosnoj šupljini (Mao i sur., 2004). Odabir prikladnih polimera u pripravi takvih oblika omogućuje dulje zadržavanje na nosnoj sluznici unatoč fiziološkom procesu mukocilijarnog čišćenja (Türker i sur., 2004). Sustavi s ciklodekstrinima pak povećavaju topljivost melatonina te se spominju kao dobri promotori nazalne apsorpcije (Al-Omary, 2013).

Tablica 1. Pregled inovativnih farmaceutskih oblika melatonina za nazalnu primjenu

Farmaceutski oblik	Pomoćne tvari	<i>In vitro</i> ispitivanja	<i>In vivo/ ex vivo</i> ispitivanja	Literatura
Nanočestice	Captex® Span 80 Tween 80 Polikaprolakton	-veličina čestica: $166,7 \pm 6,3$ nm, zeta potencijal: $-34,0 \pm 5,2$ mV, nizak PDI, lijek je kompatibilan s pomoćnim tvarima -stabilnost: nisu opaženi sedimentacija, vrhjenje, koalescencija i segregacija -oslobađanje lijeka: u prvih 6 h 28,7 % lijeka, zatim postupno u 48 h 71,2 %	- Wistar štakori: i.n. aplikacija uz fluorescentno sredstvo IR780 - brz prijenos lijeka iz nosne šupljine u mozak, 9 × veći postotak dostavljenog lijeka u mozak naspram nenanoniziranog oblika lijeka i 18 × veći postotak naspram p.o. primjene nenanoniziranih čestica -humane glioblastoma stanice (U87M6): citotoksičnost formulacije, 2500 × snižen IC ₅₀ naspram nenanoniziranih čestica	(De Oliveira Junior i sur., 2019)
Nanokapsule	Labrafil Solutol HS15 Lecitin	-veličina čestica: 18,3 – 109,8 nm, zeta potencijal: $-8,73$ do $-0,60$ mV, nizak PDI, viskoznost: 1,00–1,74 cP -stabilnost: formulacija sastavljena od 10% Labrafila, 40% Solutola i 50 mg MT se pokazala najstabilnijom -oslobađanje lijeka: početno brzo oslobađanje lijeka uz kasnije produljeno oslobađanje -morfolgija: sferične strukture nanokapsula	-nazalna sluznica ovce: 10,35 × veća permeacija naspram kontrolne otopine MT -Wistar štakori: i.n. primjena formulacije rezultirala je većim oporavkom neurona u hipokampusu i antioksidativnim učinkom u odnosu na i.n. primjenu kontrolne otopine	(Bseiso i sur., 2022)
Nanoniosomi	Kolesterol Span 60 Natrijev deoksikolat	-veličina čestica: do 104,4 nm, zeta potencijal: $-49,6$ do $-54,4$ mV, PDI: do 0,8 -morfolgija: sferične vezikule	-humane neuroblastoma stanice IMR-32 (CCL-127™) i nazalne stanice karcinoma septuma RPMI 2650 (CCL-30™): primjenom niosoma s MT otprilike 3 × snižen IC ₅₀ naspram praznih niosoma -Wistar štakori: toksičnost nije opažena, indukcija sna je postignuta unutar 15 min, i.n. primjena je rezultirala brzom distribucijom niosoma MT u periferna tkiva, dulje $t_{1/2}$ i t_{max} te približno jednakom bioraspoloživošću kao i nakon i.v. primjene otopine MT	(Priprem i sur., 2017)

Mikrosfere	Škrob Span 80 Tereftaloil klorid	-veličina čestica: 30 – 60 nm -morfologija: sferični oblik -dulje $t_{1/2}$ naspram otopine MT -postupno oslobađanje MT iz formulacije	-zečevi: ispitivanje nazalnog klirensa pomoću radioaktivnog nuklida ^{99m}Tc - manji klirens naspram otopine MT, 2 h nakon primjene u nosu se zadržava 80 % mikrosfera naspram 30 % otopine MT	(Mao i sur., 2004)
Otopine / suspencije	HP β -CD RM β -CD Tween 80	-stabilnost: veća K_s za MT-RM β CD ($263,9 \text{ M}^{-1}$) u usporedbi s MT-HP β CD ($193,6 \text{ M}^{-1}$) -CD djeluju kao solubilizatori, topljivost MT se linearno povećava s povećanjem koncentracije CD u sustavu	-humane epitelne stanice (EpiAirway-100™): permeacija je poboljšana pri niskim koncentracijama (1%, m/V), a otežana pri visokim koncentracijama CD (5-10%, m/V)	(Babu i sur., 2008)

CD – ciklodekstrin; HP β -CD – hidroksipropil β ciklodekstrin; IC_{50} – koncentracija koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju mitohondrijske aktivnosti unutar stanice; i.n. – intranazalno; i.v. – intravenski; K_s – konstanta stabilnosti; MT – melatonin; PDI – indeks polidisperznosti; p.o. – peroralno; RM β -CD – nasumično metilirani β ciklodekstrin; $t_{1/2}$ – vrijeme polueliminacije lijeka; t_{max} – vrijeme postizanja vršne koncentracije lijeka nakon jednokratnog doziranja

1.3. Nanosuspenzije

Nanotehnologija se definira kao proizvodnja i uporaba materijala, sustava i uređaja nanometarskih veličina (Agrawal i Patel, 2011; Moschwitzer, 2010). Primjena nanotehnologije u svrhu postavljanja dijagnoze, prevencije ili liječenja bolesti područje je znanosti koje se naziva nanomedicina (Moschwitzer, 2010). Nanosuspenzije, nanoemulzije, liposomi, micle i dendrimeri samo su neki od primjera nanosustava koji se koriste u oblikovanju lijeka u svrhu poboljšanja njegovih farmakokinetičkih svojstava (Gaur, 2021; Verma i sur., 2021).

Nanosuspenzije kao farmaceutski oblik predstavljaju koloidne disperzije nanokristala djelatne tvari, odnosno bifazični sustav sastavljen od kristalnih ili amorfnih čestica djelatne tvari te tekućeg medija stabiliziranog surfaktantima (Aref i sur., 2022; Bose i sur., 2021; Moschwitzer, 2010; Oktay i sur., 2020). Veličina čestica nanosuspenzija najčešće je u rasponu između 200 i 600 nm (Verma i sur., 2021). Svojtven im je veliki kapacitet uklapanja djelatne tvari, kemijska stabilnost i mala sistemska toksičnost (Aref i sur., 2022). Nanosuspenzije su zbog male veličine čestica prikladni farmaceutski oblik slabo topljivih djelatnih tvari (BCS skupina II i IV) jer značajno povećavaju njihovu topljivost, brzinu otapanja i biorasploživost (Bose i sur., 2021; Pinar i sur., 2022). Nanosuspenzije se razvijaju za različite putove primjene kao što su oralni, nazalni, topikalni, pulmonalni, intravenski i oftalmički (Aref i sur., 2022, 2021; Gaur, 2021; Onugwu i sur., 2023; Tashan i sur., 2019). Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *The United States Food and Drug Administration*, FDA) je 2000. godine odobrila Rapamune® (sirolimus), prvi lijek u obliku nanokristala koji se kao imunosupresiv koristi za prevenciju odbacivanja organa nakon transplantacije, a u ovom obliku značajno mu je povećana biorasploživost (Park i sur., 2022; Verma i sur., 2021). Od tada se na tržištu pojavilo više od 50 nanolijekova te se predviđa da će do 2030. godine vrijednost ovog tržišta globalno iznositi više od 350 milijardi dolara (Sushant i sur., 2022; Weissig i sur., 2021).

1.3.1. Prednosti i nedostaci nanosuspenzija

Smanjena veličina i povećana ukupna površina čestica nanosuspenzija rezultiraju boljim fizičko-kemijskim i biofarmaceutskim svojstvima lijeka kao što su povećana topljivost i brzina otapanja te veća biorasploživost (Aref i sur., 2021; Lu i sur., 2022; Oktay i sur., 2020). Povećanje topljivosti moguće je postići i za hidrofilne i lipofilne djelatne tvari u odgovarajućem

otapalu (Agrawal i Patel, 2011). Djelatne tvari s visokim vrijednostima tališta, logP, molekulske mase i doze su pak najbolji kandidati za oblikovanje tom metodom (Jacob i sur., 2020; Park i sur., 2022). Više od trećine postojećih te 90 % djelatnih tvari u razvoju slabo su topljive u vodi, što govori o potencijalu nanotehnologije u razvoju lijekova (Patel i sur., 2016; Verma i sur., 2021). Uslijed povećane topljivosti i brzine otapanja, razvojem nanosuspenzija omogućeno je brže i potpunije oslobađanje lijeka u probavnom sustavu i time bolja apsorpcija te veća bioraspoloživost (Ma i sur., 2023).

Prednosti čestica nanometarskih veličina također se očituju pri intravenskoj primjeni nanosuspenzija slabo topljivih lijekova jer ne uzrokuju vaskularnu emboliju i sigurne su za primjenu (Agrawal i Patel, 2011; Ma i sur., 2023). Povećana bioraspoloživost rezultira smanjenjem doze koja uz smanjenu učestalost doziranja lijeka poboljšava adherenciju bolesnika te posljedično smanjuje troškove i poboljšava ishod liječenja (Agrawal i Patel, 2011; Bose i sur., 2021; Ma i sur., 2023; Spreen i sur., 2014). Moguća je i ciljana dostava lijeka u obliku nanokristala (Agrawal i Patel, 2011; Bose i sur., 2021; Ma i sur., 2023). Primjerice, limfociti citofagijom mogu dostaviti nanočestice iz probavnog sustava na mjesto djelovanja izbjegavajući razgradnju prvim prolaskom kroz jetru (Ma i sur., 2023).

Oblikovanje lijeka u nanosuspenzije poboljšava učinkovitost te sigurnost primjene lijeka; primjerice, smanjuje razliku u bioraspoloživosti lijeka pri primjeni uz obrok ili natašte, smanjuje dozu lijeka koja je potrebna za postizanje terapijskog učinka, minimalizira sistemske nuspojave i interindividualne razlike u terapiji te omogućuje kontrolirano oslobađanje lijeka kada je to potrebno (Bose i sur., 2021; Gaur, 2021; Ma i sur., 2023; Tashan i sur., 2019).

Nanosuspenzije sadrže veliki udio djelatne tvari te minimalnu količinu potencijalno štetnih otapala i surfaktanata što s jedne strane smanjuje toksičnost formulacije, a s druge omogućava dostavu potrebne doze lijeka u manjem volumenu dozirnog oblika (Aref i sur., 2022, 2021; Ferrar i sur., 2020; Lu i sur., 2022). Transdermalna primjena nanosuspenzija pruža bolji terapijski učinak i smanjuje iritaciju kože uz primjenu manjih doza lijeka usporedno s ostalim tehnološkim oblicima (Ma i sur., 2023). Još jedna prednost nanosuspenzija je mogućnost maskiranja neugodnog okusa lijeka što uvelike povećava adherenciju, pogotovo pedijatrijskih pacijenata (Ma i sur., 2023). Proces povećanja proizvodnje nanosuspenzija s laboratorijskog na industrijsko mjerilo relativno je jednostavan u odnosu na druge tehnološke postupke te je ekonomski isplativ (Oktay i sur., 2020).

Nanosuspenzije se mogu primjenjivati različitim putovima primjene, uklopljene u različite farmaceutske oblike kao što su tablete, kapsule, tekuće nanosuspenzije, liofilizirani prašci za injekcije, hidrogelovi, masti, supozitoriji i prašci za inhalaciju (Jacob i sur., 2020; Patel i sur., 2016).

Nanometarska veličina i velika ukupna površina čestica također uzrokuju i neke nedostatke nanosuspenzija kao što su aglomeracija, sedimentacija i rast kristala, odnosno Ostwaldovo zrenje (Ma i sur., 2023; Oktay i sur., 2020). Iz tog razloga nanosuspenzije mogu predstavljati termodinamički nestabilne koloidne sustave (Oktay i sur., 2020). Stabilnost nanosuspenzija može se povećati prikladnim odabirom metode izrade nanosuspenzija i uporabom odgovarajućih surfaktanata u potrebnoj koncentraciji. Ujednačenost veličine čestica u nanosuspenziji sprječava rast kristala i održava sustav stabilnim (Ma i sur., 2023; Patravale i sur., 2010). Kao stabilizatori nanosuspenzija koriste se ionski (natrijev dodecil sulfat) ili neionski surfaktanti te polimeri (polisorbat, polietilenglikol, polimeri celuloze, poloksameri) (Ma i sur., 2023). Nestabilni oblici nanosuspenzija s nejednolikom raspodjelom i veličinom čestica lijeka mogu uzrokovati različite probleme pa tako agregirane čestice nanosuspenzija veće od 5 μm mogu uzrokovati emboliju krvnih žila pri intravenskoj primjeni (Patravale i sur., 2010). Štetnost nanočestica u vidu citotoksičnosti, alergijskih i upalnih reakcija spominje se kao mogući rizični faktor u primjeni nanosuspenzija (Onoue i sur., 2014; Spreen i sur., 2014). Povezanost nije u potpunosti dokazana, a pretpostavlja se da veći rizik predstavljaju čestice manje od 100 nm (Onoue i sur., 2014).

1.3.2. Vlažno mljevenje kao metoda izrade nanosuspenzija

Priprema nanosuspenzija može se provoditi povećanjem (engl. *bottom up* metodom), smanjenjem veličine čestica (engl. *top down* metodom) ili kombinacijom tih dvaju principa (Liu i sur., 2020; Tashan i sur., 2019; Verma i sur., 2021). *Bottom up* metoda se naziva još i metodom kontrolirane precipitacije jer se nakon otapanja djelatne tvari u odgovarajućem organskom otapalu nanočestice precipitiraju promjenom temperature ili dodatkom drugog otapala u kojem djelatna tvar nije topljiva (Aghrbi i sur., 2021; Patel i sur., 2016; Tashan i sur., 2019). S druge strane, *top down* metoda zasniva se na fizičkom smanjenju većih čestica lijeka na nanometarsku veličinu (Tashan i sur., 2019; Verma i sur., 2021). U toj metodi primjenjuju se principi mljevenja i visokotlačne homogenizacije koji se temelje na koliziji, sudaranju i trošenju čestica

te silama smicanja (Tashan i sur., 2019; Verma i sur., 2021). Visokotlačna homogenizacija koristi veliku energiju i silu trenja za smanjenje veličine čestica, a za to se najčešće upotrebljavaju tehnike visokosmične homogenizacije (engl. *piston gap*) i mikrofluidizacije (Tashan i sur., 2019).

Mljevenje je jedna od najučestalijih metoda pripreme nanosuspenzija korištenih u farmaceutskoj industriji. Razvili su je Liversidge i suradnici 1992. godine u svrhu smanjenja veličine čestica lijeka, a može se provoditi u suhom ili, češće, vlažnom mediju (Ma i sur., 2023; Tashan i sur., 2019; Verma i sur., 2021). Mljevenje koje se provodi mlazom komprimiranog zraka velike brzine te koristi visokoenergetski sudar čestica za nanonizaciju naziva se suhim mljevenjem, dok je princip vlažnog mljevenja utemeljen na niskoenergetskom pristupu koji koristi kuglice za mehaničko usitnjavanje čestica lijeka (Verma i sur., 2021). Potonji proces odvija se u dva koraka gdje je prvi priprema suspenzije koja sadrži djelatnu tvar, surfaktante i vodu, dok je drugi mljevenje u zatvorenoj komori s kuglicama različitih veličina načinjenih od tvrdog stakla, keramike ili nehrđajućeg čelika. Kuglice pod utjecajem rotacije mehaničkom silom udaraju u čestice i trenjem nanoniziraju lijek (Jacob i sur., 2020; Ma i sur., 2023; Patel i sur., 2016; Verma i sur., 2021). Neke od prednosti metode vlažnog mljevenja su niska potrošnja energije, jednostavna aparatura i troškovi izrade, izbjegnuto korištenje organskih otapala, dobra kontrola veličine čestica, male razlike u različitim serijama proizvodnje (dobra reproducibilnost) i relativno jednostavno uvećanje procesa na industrijsko mjerilo (Jacob i sur., 2020; Liu i sur., 2020; Ma i sur., 2023; Patel i sur., 2016). Zahvaljujući primjeni ovog postupka, patentirana je jedna od prvih nanosuspenzija na tržištu, Megace® (megestrol acetat) koja se primjenjuje kod uznapredovalog karcinoma dojke (Verma i sur., 2021).

Osiguravanje stabilnosti ovih sustava često je veoma zahtjevno, zbog čega se posebna pozornost treba obratiti na odabir odgovarajućih pomoćnih tvari, od kojih su se hidrofilni polimeri i surfaktanti pokazali iznimno učinkovitima (Liu i sur., 2020). Problemi se mogu pojaviti i zbog trošenja materijala za mljevenje koji mogu kontaminirati farmaceutski pripravak pa je stoga potrebna uporaba otpornih i mehanički stabilnih materijala (Agrawal i Patel, 2011; Jacob i sur., 2020; Patel i sur., 2016). Nadalje, mljevenje u duljem trajanju od optimalnog može rezultirati povećanjem amorfne frakcije u sustavu i, posljedično, nestabilnošću (Agrawal i Patel., 2011; Jacob i sur., 2020). Sama izrada je vremenski dugotrajna i u neodgovarajućim uvjetima pripreme je moguća kontaminacija vodene faze mikroorganizmima (Jacob i sur., 2020).

Zbog svega navedenog potrebna je pažljiva optimizacija procesa, uključujući korištenje prikladnih surfaktanata, odabir kuglica za mljevenje pogodne veličine i materijala u prikladnoj količini, kao i odabir prikladne temperature mljevenja (Ma i sur., 2023). Što je veći broj kuglica za mljevenje, veća je vjerojatnost sudara čestica, a što su kuglice manje, usitnjene čestice će biti manje. U procesu mljevenja treba voditi računa i o mogućoj neželjenoj agregaciji čestica uslijed površinskog naboja ili preniske koncentracije surfaktanata (Ma i sur., 2023). Sniženje temperature može pak usporiti agregaciju pa se dodatkom tekućeg dušika ili nekim drugim postupkom hlađenja komore za mljevenje mogu postići manje veličine čestica djelatne tvari, s užom raspodjelom, uz izbjegavanje agregacije čestica (Ma i sur., 2023).

1.3.3. Ispitivanje fizičke stabilnosti nanosuspenzija

Nanosuspenzijama se prvenstveno određuje fizička ili kratkotrajna stabilnost koja podrazumijeva uniformnu raspodjelu veličina čestica djelatne tvari bez agregacije i rasta kristala u određenom vremenskom periodu (Tashan i sur., 2019). Srednja veličina čestica, indeks polidisperznosti (parametar koja opisuje raspodjelu veličina čestica u disperznom sustavu (Gaur, 2021; Oktay i sur., 2020)) i zeta potencijal u vremenu govore o takvoj stabilnosti nanosuspenzija (Kakad i Kshirsagar, 2021; Tashan i sur., 2019).

Za fizičku stabilnost nanosuspenzija iznimno je važan i odabir odgovarajućeg surfaktanta u prikladnoj koncentraciji jer se njegovim vezanjem na površinu suspendiranih čestica može spriječiti rast kristala i agregacija (Oktay i sur., 2020).

Prema ICH Q1A smjernicama koje donosi Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) svrha ispitivanja stabilnosti lijekova je pružiti dokaze o tome kako kvaliteta varira s vremenom pod utjecajem različitih okolišnih čimbenika kao što su temperatura, vlaga i svjetlost. Tim ispitivanjima moguće je odrediti rok trajanja, kao i preporučene uvijete čuvanja lijeka ("ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products," 2003). Dugotrajna stabilnost nanosuspenzija ispituje se pri povišenoj temperaturi (40 °C) u vremenu od šest mjeseci (Gaur, 2021; Kakad i Kshirsagar, 2021; Kakad i sur., 2022).

1.3.4. Primjena nanosuspenzija u biomedicini

Nanosustavi se u biomedicini koriste u dijagnostici, prevenciji i liječenju bolesti, a prema sastavu se mogu podijeliti na organske i anorganske (Nikzmir i sur., 2021). Neki od poznatijih primjera uporabe nanotehnologije su primjena biosenzora, implantata i ostalih dijagnostičkih aparata te nanolijekova za ciljanu dostavu u tumorska tkiva (Nikzmir i sur., 2021; Ramos i sur., 2017). Zahvaljujući maloj veličini čestica mogu se jednostavno primijeniti željenim putem primjene u određeno tkivo, a zbog posljedično velike površine karakteriziraju ih poboljšana mehanička, katalitička, magnetska i optička svojstva (Nikzmir i sur., 2021).

Nanočestice su pogodne za dijagnostičke i terapijske svrhe jer ih je moguće konjugirati sa specifičnim biološkim molekulama koristeći fizikalne ili biološke reakcije, primjerice, vezanje protutijela s antigenom (Ramos i sur., 2017). Takvom modifikacijom površine čestica moguće je ostvariti ciljanu dostavu u određeno tkivo (Nikzmir i sur., 2021; Ramos i sur., 2017). Primjer je aktivna dostava nanočestica paklitaksela obloženih staničnim membranama glioma stanica i specifičnim ligandima peptidne strukture za dostavu lijeka u mozak (Fan i sur., 2021). Takva dostava lijeka ima prednosti u vidu efektivnog prolaska krvno-moždane barijere, koja je zbog svoje građe nepropusna za većinu lijekova i ksenobiotika, kao i smanjenih sistemskih nuspojava (Fan i sur., 2021). Dostava nanolijekova u tumorsko tkivo može biti i pasivna (Nikzmir i sur., 2021). Pasivna dostava u tumorsko tkivo proizlazi iz povećane permeabilnosti krvnih žila tumora i smanjene limfne drenaže (engl. *enhanced permeability and retention*, EPR) (John i sur., 2021; Nikzmir i sur., 2021). Čestice nanometarske veličine mogu proći kroz endotelne prolaze pasivnom difuzijom u tumorsko tkivo (Nikzmir i sur., 2021). Još jedan mehanizam ciljane dostave lijeka je korištenje mononuklearnih fagocita za prijenos nanočestica (Agrawal i Patel, 2011). Primjenjuje se kod unutarstaničnih infekcija gljivicama, mikobakterijama i lišmanijom (Agrawal i Patel, 2011).

Temeljni zahtjevi za sve nanočestice koje se koriste u biomedicini su biokompatibilnost, neimunogenost, netoksičnost i stabilnost u fiziološkim uvjetima (Nikzmir i sur., 2021).

Zbog višestrukih poželjnih svojstava nanosuspenzija djelatne tvari, poput boljih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava, povoljnijeg sigurnosnog profila, jednostavnosti te ekonomičnosti pripreme naspram klasičnih oblika, istražuju se za razne indikacije i putove njihove primjene (Patel i sur., 2016; Verma i sur., 2021). Činjenica da se u proizvodnji koriste samo djelatna tvar i mala količina surfaktanata, koji su većinom odobreni u

kategoriji GRAS (engl. *Generally recognized as safe*), olakšava kompleksni regulatorni proces odobravanja farmaceutskog oblika (Verma i sur., 2021).

Nanosuspenzije za oralnu primjenu primarno osiguravaju veću topljivost i brzinu otapanja djelatne tvari te smanjenje doze (Bose i sur., 2021; Jacob i sur., 2020). Povećana topljivost slabo topljivih lijekova uz bolju mukoadheziju u probavnom sustavu rezultira većom apsorpcijom i bioraspoloživošću. Primjerice, razvoj nanosuspenzije slabo topljivog lijeka fenofibrata rezultirao je dvostrukim povećanjem bioraspoloživosti u odnosu na bioraspoloživost istog lijeka u mikroniziranom obliku (Jacob i sur., 2020; Patel i sur., 2016). Uspoređujući klasične oblike tableta i suspenzija naproksena s nanosuspenzijama, utvrđene su pet puta veće vrijednosti površine ispod krivulje ovisnosti koncentracije lijeka u plazmi u vremenu (AUC) i 50 % kraće vrijeme postizanja vršne koncentracije lijeka u plazmi (T_{max}) za nanosuspenzije (Jacob i sur., 2020). Ostale prednosti oralne primjene ovog tehnološkog oblika su neovisnost opsega apsorpcije i bioraspoloživosti o uzimanju hrane, smanjenje sistemskih nuspojava uvjetovano smanjenjem doze i specifičnom dostavom lijeka te minimaliziranje inter- i intra-individualnih razlika u apsorpciji lijeka (Bose i sur., 2021; Jacob i sur., 2020; Pinar i sur., 2022; Verma i sur., 2021). Nanosuspenzije dodatno mogu maskirati neugodan okus lijeka (Patel i sur., 2016). Zbog osiguranja dugoročne stabilnosti i jednostavnosti primjene, nanosuspenzije se mogu uklopiti u različite oblike kao što su tablete, kapsule, peleti i dr. (Agrawal i Patel, 2011; Jacob i sur., 2020; Verma i sur., 2021). Primjer uspješno uklopljene nanosuspenzije ketoprofena u pelete pokazuje poželjna svojstva kontroliranog oslobađanja tijekom 24 sata (Agrawal i Patel, 2011).

Nanosuspenzije se razvijaju i za bukalnu primjenu, kako bi se povećala bioraspoloživost lijeka i smanjila razgradnja prvim prolaskom kroz jetru (Jacob i sur., 2020).

Parenteralni put je također često korišten put primjene nanosuspenzija zbog povoljnih svojstava kao što su sigurnost intravenske primjene čestica nanometarske veličine, izbjegavanje toksičnih otapala i polimera, smanjenje doze, smanjenje lokalne iritacije i alergijskih reakcija (Jacob i sur., 2020). U praksi je dokazana povećana sigurnost i učinkovitost parenteralne primjene nanosuspenzije naspram klasičnih injekcijskih otopina paklitaksela (Agrawal i Patel, 2011; Jacob i sur., 2020). Intramuskularna i supkutana primjena nanosuspenzije kabotegravira omogućuje produljeno oslobađanje od čak 52 tjedna u terapiji bolesnika sa sindromom stečene imunodeficiencije (engl. *Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS*) (Bowers i sur., 2016).

Budezonid i flutikazon primjeri su inhalacijskih kortikosteroida koji su uspješno oblikovani kao nanosuspenzije (Patel i sur., 2016). Nanometarska veličina čestica omogućava jednoliku raspodjelu lijeka u svim kapljicama aerosola što rezultira ravnomjernom dostavom lijeka u pluća, a postupak inhalacije je moguć uporabom bilo koje vrste nebulizatora (Agrawal i Patel, 2011; Patravale i sur., 2010). Osiguranje brzog početka djelovanja u kombinaciji s kontroliranim oslobađanjem lijeka tijekom duljeg vremenskog perioda vrlo je korisno u liječenju većine plućnih bolesti (Patravale i sur., 2010). Smanjene su lokalne i sistemske nuspojave zbog ciljane dostave lijeka u pluća bez neželjenog odlaganja u ustima i ždrijelu (Patravale i sur., 2010). Primjeri još nekih lijekova koji su uspješno oblikovani kao nanosuspenzije i primijenjeni pulmonalno su ibuprofen, indometacin, itrakonazol, nifedipin i doksorubicin (Agrawal i Patel, 2011).

1.3.5. Nanosuspenzije za nazalnu primjenu

Nanosuspenzije za nazalnu primjenu, formulirane kao suspenzije nanokristala djelatne tvari slabo topljive u vodi, pripravljene uz dodatak surfaktanta, pružaju preciznije doziranje u odnosu na nenanonizirane čestice lijeka, kao i produljeno zadržavanje lijeka u nosnoj šupljini zbog poboljšanih mukoadezivnih svojstava (Nižić Nodilo i sur., 2022). Također, uslijed povećane topljivosti povezane s usitnjavanjem čestica do nanometarske veličine, omogućuju primjenu nižih doza lijeka (Nižić Nodilo i sur., 2022). Nanosuspenzije za nazalnu primjenu u novije vrijeme se intenzivnije istražuju. Nanosuspenzija loratadina, lijeka slabo topljivog u vodi, ispitivana je *in vivo* u štakora. Formulaciji je, sa svrhom produljenog zadržavanja na mjestu primjene, dodan biokompatibilni, biorazgradljivi i neimunogenični mukoadezivni polimer natrijev hijaluronat (Alshweiat i sur., 2020). Najveća bioraspoloživost loratadina postignuta je nazalnom primjenom nanosuspenzije usporedno s oralnom primjenom istog oblika te nazalnom primjenom neprocesuiranog lijeka (Alshweiat i sur., 2020). U drugom istraživanju ispitan je potencijal nazalne primjene mukoadezivne nanosuspenzije ivermektina u liječenju blagog oblika bolesti COVID-19. Dokazano je da je taj oblik liječenja siguran i učinkovit te da smanjuje trajanje posljedica bolesti COVID-19 u vidu kraćeg trajanja gubitka osjeta njuha ili anosmije, kašlja i dispneje (Aref i sur., 2022, 2021). Metodom vlažnog mljevenja uspješno je pripravljena *in situ* gelirajuća nanosuspenzija flutikazonpropionata koja se pokazala stabilnom i biokompatibilnom, s većom topljivošću u odnosu na mikronizirani oblik lijeka te boljim mukoadezivnim svojstvima u odnosu na *in situ* gelirajuću suspenziju pripravljenu s mikroniziranim česticama lijeka te konvencionalnu suspenziju pripravljenu s nanoniziranim ili

mikroniziranim česticama lijeka (Nižić Nodilo i sur., 2022). Nanosuspenzije meloksikama (Bartos i sur., 2015) i resveratrola (Hao i sur., 2016) te *in situ* gelirajuća nanosuspenzija karvedilola (Saindane i sur., 2013) još su neki od primjera istraživanih nanosuspenzija za nazalnu primjenu.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Melatonin je neurohormon indolamidne strukture kojeg izlučuje epifiza. Svjetlost suprimira njegovo izlučivanje zbog čega se u osoba s normalnim dnevnim ritmom vršna koncentracija postiže u noćnim satima. Melatonin ima važnu ulogu u regulaciji cirkadijanog ritma, promociji sna, regulaciji imunskog odgovora te regulaciji drugih hormonskih sustava (Vasey i sur., 2021). Trenutno se koristi u terapiji različitih poremećaja sna, a zbog svojeg antioksidativnog, antiinflamatornog i neuroprotektivnog djelovanja istražuje se i u liječenju neurodegenerativnih, kardiovaskularnih, karcinomskih i drugih bolesti (Jayachandra Babu i sur., 2011; Sun i sur., 2016; Talib i sur., 2021).

Ograničena sistemska raspoloživost melatonina nakon oralne primjene zahtijeva istraživanje alternativnih načina sistemske dostave među kojima je i nazalna primjena. Nazalna primjena lijekova prvi je izbor u lokalnom liječenju bolesti sluznice nosa, međutim pruža i mogućnost sistemske dostave lijeka (Nižić i sur., 2020). Prednosti nazalne primjene melatonina uključuju izbjegavanje razgradnje u probavnom sustavu i metabolizma prvim prolaskom kroz jetru te moguću izravnu dostavu lijeka u mozak putem olfaktornog i trigeminalnog živca zaobilazeći krvno-moždanu barijeru (Hafner i sur., 2014; Jayachandra Babu i sur., 2011). Ograničenje nazalne primjene lijekova u prvom redu odnosi se na mukocilijarno čišćenje koje skraćuje vrijeme zadržavanja lijeka na sluznici nosa. Kao potencijalno rješenje istražuje se upotreba mukoadhezivnih polimera i *in situ* gelirajućih sustava koji se, zbog inicijalne male viskoznosti, mogu primijeniti jednostavnim raspršivanjem u nosnu šupljinu, dok uslijed geliranja i povećanja viskoznosti u kontaktu s nosnom sluznicom osiguravaju dulje zadržavanje na mjestu primjene (Nižić i sur., 2020).

Zbog male veličine i velike ukupne površine suspendiranih čestica lijeka, nanosuspenzije osiguravaju poboljšana fizikalno-kemijska i biofarmaceutska svojstva slabo topljivih djelatnih tvari u odnosu na klasične farmaceutske oblike (Aref i sur., 2021; Lu i sur., 2022; Oktay i sur., 2020). S druge strane, aglomeracija, sedimentacija i rast kristala predstavljaju vidove nestabilnosti navedenog sustava. U svrhu povećanja stabilnosti nanosuspenzija, odabire se prikladna metoda izrade kao i odgovarajući surfaktant u prikladnoj koncentraciji (Ma i sur., 2023; Patravale i sur., 2010). Vlažno mljevenje često je primjenjivana metoda izrade nanosuspenzija. Nakon pripreme suspenzije koja sadrži djelatnu tvar, surfaktante i vodu, mljevenje se provodi u zatvorenoj komori s kuglicama načinjenim od čvrstog materijala. Prednosti te metode uključuju ekonomsku isplativost, izbjegavanje organskih otapala, dobru

kontrolu veličine čestica, dobru reproducibilnost i relativno jednostavno uvećanje procesa na industrijsko mjerilo (Jacob i sur., 2020; Liu i sur., 2020; Ma i sur., 2023; Patel i sur., 2016).

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost pripreve *in situ* gelirajuće nanosuspenzije melatonina koristeći polisorbata 80 kao surfaktant i pektin kao gelirajući mukoadhezivni polimer te metodu vlažnog mljevenja za usitnjavanje kristala melatonina.

Specifični ciljevi:

- Pripraviti nanosuspenzije melatonina metodom vlažnog mljevenja, pri različitim masenim omjerima melatonina i polisorbata 80
- Ispitati utjecaj masenog omjera melatonina i polisorbata 80 na veličinu čestica, indeks polidisperznosti i stabilnost nanosuspenzija
- Pripraviti *in situ* gelirajuće nanosuspenzije melatonina korištenjem polisorbata 80 kao površinski aktivne tvari i pektina kao gelirajućeg i mukoadhezivnog polimera
- Provesti reološku karakterizaciju pripremljenih *in situ* gelirajućih nanosuspenzija prije i/ili nakon geliranja (odrediti linearno viskoelastično područje, vrijeme geliranja i/ili krivulju viskoznosti)
- Ispitati utjecaj nanokristala melatonina i polisorbata 80 u *in situ* gelirajućem sustavu na vrijeme geliranja i svojstva formiranog pektinskog gela

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za pripravu nanosuspenzija melatonina u ovom istraživanju korišteni su melatonin (Biosynth Ltd, Slovačka), polisorbat 80 (Sigma-Aldrich, Njemačka) te pektin (Pectin Amid CF 025, ljubazno doniran od Herbstreith & Fox KG, Njemačka). U postupku vlažnog mljevenja korištene su kuglice od itrijevog stabiliziranog cirkonijevog oksida različitih promjera (0,1 mm, 0,2 mm te 0,4 – 0,6 mm). Umjetni nosni fluid (engl. *simulated nasal fluid*, SNF) izrađen je otapanjem natrijevog klorida (Gram-Mol, Hrvatska) u koncentraciji od 150 mM, kalijevog klorida (Gram-Mol, Hrvatska) u koncentraciji od 40 mM i kalcijevog klorida dihidrata (Gram-mol, Hrvatska) u koncentraciji od 5,3 mM u pročišćenoj vodi.

3.2. Metode

3.2.1. Izrada nanosuspenzija melatonina

Nanosuspenzije melatonina pripravljene su vlažnim mljevenjem prema ranije opisanoj metodi (Bano, 2019). Same suspenzije pripravljene su postupnim rastrljavanjem melatonina s polisorbatom 80 širokim staklenim štapićem, uz dodatak pročišćene vode u sljedećem koraku do željene koncentracije melatonina i polisorbata 80. Sustav je homogeniziran na magnetskoj miješalici u tamnoj komori zbog fotosjetljivosti melatonina (Andrisano i sur., 2000; Peng i sur., 2013). U staklene vijale dimenzija 2 × 6 cm dodane su redom kuglice za mljevenje promjera 0,1 mm, 0,2 mm i 0,4 – 0,6 mm, po 0,5 g svake vrste, zatim suspenzija mase 2,5 g te na kraju 5 magnetskih mješača dimenzija 10 × 6 mm. Postupak vlažnog mljevenja pripremljenih suspenzija proveden je u tamnoj komori miješanjem sadržaja staklenih vijala na magnetskoj miješalici pri 350 okretaja u minuti tijekom 24 sata (Slika 1.). Nanosuspenzije su pripravljene u triplikatu pri masenom omjeru melatonina i polisorbata od 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 i 10:1 (Tablica 2.).



Slika 1. Prikaz pripreve nanosuspenzija melatonina metodom vlažnog mljevenja

Tablica 2. Sastav pripremljenih nanosuspenzija melatonina

UZORAK	Melatonin (%, <i>m/V</i>)	Polisorbat 80 (%, <i>m/V</i>)	Maseni omjer melatonina i polisorbata 80
M1P2	0,143	0,286	1:2
M1P1	0,286	0,286	1:1
M2P1	0,572	0,286	2:1
M3P1	0,858	0,286	3:1
M4P1	1,140	0,286	4:1
M5P1	1,430	0,286	5:1
M6P1	1,720	0,286	6:1
M10P1	2,860	0,286	10:1

3.2.2. Određivanje veličine čestica i stabilnosti nanosuspenzija melatonina

Karakterizacija nanosuspenzija melatonina s obzirom na veličinu čestica i indeks polidisperznosti provedena je metodom fotonske korelacijske spektroskopije pomoću uređaja Zetasizer Ultra (Malvern Pananalytical, UK). Pripravljene nanosuspenzije pomoću šprice i igle odvojene su od kuglica za mljevenje te prenesene u plastične kivete. Mjerenja su rađena u triplikatu pri temperaturi od 25 °C i vremenu ekvibracije od 120 sekundi. Stabilnost nanosuspenzija praćena je mjerenjem veličine čestica kroz 14 dana od priprave, kako je prikazano na Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz vremenskog tijeka ispitivanja stabilnosti nanosuspenzija melatonina

	t ₁ (0 h)	t ₂ (24 h)	t ₃ (48 h)	t ₄ (72 h)	t ₅ (120 h)	t ₆ (144 h)	t ₇ (168 h)	t ₈ (216 h)	t ₉ (240 h)	t ₁₀ (336 h)
M1P2	×	×	×		×	×	×	×		×
M1P1	×	×	×		×	×	×			
M2P1	×								×	
M3P1	×									
M4P1	×									
M5P1	×									
M6P1	×									
M10P1	×	×	×	×						

3.2.3. Priprema *in situ* gelirajućih nanosuspenzija melatonina

Za izradu *in situ* gelirajućih nanosuspenzija melatonina pripremljene su inicijalne otopine polimera pektina u koncentracijama od 1,4 % (*m/V*) i 1,6 % (*m/V*). Pektin je otopljen u pročišćenoj vodi uz miješanje na magnetskoj miješalici nakon čega su otopine profiltrirane. Pripravljene su i koncentrirane nanosuspenzije melatonina i polisorbata 80 u masenom omjeru 1:2. Prva nanosuspenzija pripremljena je pri koncentraciji melatonina i polisorbata 80 od 0,572 % (*m/V*) i 1,144 % (*m/V*), a druga pri koncentraciji od 0,286 % (*m/V*) i 0,572 % (*m/V*). Otopine pektina pomiješane su u volumnom omjeru 1:1 s nanosuspenzijama na magnetskoj miješalici tvoreći *in situ* gelirajuće formulacije željene koncentracije lijeka i pomoćnih tvari (Tablica 4.).

Tablica 4. Sastav *in situ* gelirajućih nanosuspenzija melatonina

UZORAK	Pektin (% <i>m/V</i>)	Melatonin (% <i>m/V</i>)	Polisorbat 80 (% <i>m/V</i>)
F1	0,7	0,286	0,572
F2	0,8	0,286	0,572
F3	0,8	0,143	0,286

3.2.4. Reološka karakterizacija *in situ* gelirajućih nanosuspenzija melatonina

Reološka ispitivanja provedena su na reometru MCR 102 (Anton Paar GmbH, Austrija), dok su rezultati analizirani pomoću računalnog softvera RheoCompass™.

3.2.4.1. Test promjene amplitude

Oscilacijski test promjene amplitude (engl. *amplitude sweep test*) pokazuje odnos vrijednosti modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') u ovisnosti o smičnoj deformaciji (γ). Za provođenje testa korišten je mjerni sustav paralelnih ploča PP50 (engl. *parallel plate*, promjera 50 mm). Udaljenost između gornje i donje mjerne ploče postavljena je na 0,5 mm. Temperatura pri kojoj je proveden test iznosila je 34 °C, a kutna frekvencija 6,28 rad s⁻¹. Promatrana je smična deformacija u rasponu od 0,01 do 100 %. Neposredno prije mjerenja uzorci su u volumnom omjeru 1:1 pomiješani sa SNF-om na magnetskoj miješalici u trajanju od jedne minute. Mjerenja na reometru provedena su u duplikatu.

3.2.4.2. Test vremena geliranja

Oscilacijski test vremena geliranja (engl. *gelation time test*) pokazuje ovisnost modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') u vremenu. Za provođenje testa korišten je mjerni sustav paralelnih ploča PP50. Udaljenost između gornje i donje mjerne ploče postavljena je na 0,5 mm. Temperatura pri kojoj je proveden test iznosila je 34 °C, kutna frekvencija 6,28 rad s⁻¹, a smična deformacija 0,1 % (iz linearnog viskoelastičnog područja). Neposredno prije mjerenja uzorci su u volumnom omjeru 1:1 pomiješani sa SNF-om na magnetskoj miješalici u trajanju od jedne minute. Mjerenja na reometru provedena su u duplikatu.

3.2.4.3. Određivanje krivulje viskoznosti

Krivulja viskoznosti (engl. *viscosity curve*) pokazuje ovisnost prividne viskoznosti (η) o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$). Rotacijski test određivanja krivulje viskoznosti proveden je uz korištenje mjernog sustava stožac-ploča CP50-1 (engl. *cone plate*, promjera 50 mm i nagiba 1°). Udaljenost između gornjeg mjernog tijela (stošca) i donje mjerne ploče postavljena je na 0,102 mm. Navedenim testom karakterizirani su *in situ* gelirajući sustavi prije i nakon dodatka SNF-a u volumnom omjeru 1:1, pri temperaturi redom od 25 i 34 °C. Miješanje uzoraka sa SNF-om provedeno je na magnetskoj miješalici u trajanju od jedne minute. Mjerenja na reometru provedena su u duplikatu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprema nanosuspenzija melatonina

U ovom radu ispitana je mogućnost razvoja nanosuspenzije melatonina za pripravu *in situ* gelirajućeg sustava za nazalnu primjenu. Nanosuspenzije lijekova slabo topljivih u vodi kao što je melatonin (0,143 mg/mL) pružaju potencijal povećanja topljivosti, nazalne permeabilnosti i bioraspoloživosti naspram klasičnih oblika (De Oliveira Junior i sur., 2019).

Za pripravu nanosuspenzija melatonina kao površinski aktivna tvar korišten je polisorbat 80. Polisorbat 80 (Tween 80) neionski je hidrofilni surfaktant polioksietilen-20-sorbitan monooleatne strukture, HLB (engl. *hydrophilic-lipophilic balance*) vrijednosti 15. HLB označava omjer masenog udjela hidrofilnih i lipofilnih skupina unutar molekule surfaktanta (Rahaman i sur., 2023). Zbog niske toksičnosti i kompatibilnosti s mnogim djelatnim tvarima, nalazi široku primjenu u oblikovanju lijekova (Velloso i sur., 2021). Pogodan je za nazalnu primjenu jer povećava nazalnu permeabilnost (Clementino i sur., 2021), apsorpciju i raspodjelu lijeka u mozak (Gao i sur., 2019), kao i stabilnost nanosustava (Noori Siahdasht i sur., 2020).

U ovom radu ispitivana su svojstva nanosuspenzija pripremljenih pri različitim omjerima melatonina i polisorbata 80. Pripremljeno je osam uzoraka nanosuspenzija pri istoj koncentraciji polisorbata 80 (0,286 %, *m/V*) i različitoj koncentraciji melatonina (0,140-2,860 %, *m/V*), rezultirajući rasponom masenog omjera melatonina i polisorbata 80 od 1:10 do 2:1 (Tablica 5.). Nanosuspenzije su pripravljene 24-satnim postupkom vlažnog mljevenja. Ono se pokazalo uspješnim u povećanju topljivosti djelatnih tvari slabo topljivih u vodi kakav je i melatonin (Nižić Nodilo i sur., 2022). Razlog tomu je nastajanje čestica manjeg promjera i uske raspodjele veličina čestica, koje pritom pokazuju i odgovarajuću stabilnost. Osim toga, metoda je ekonomski isplativa, jednostavna za izvedbu te ekološki prihvatljiva zbog činjenice da ne koristi organska otapala (Temprom i sur., 2022).

4.2. Veličina i indeks polidisperznosti nanočestica melatonina u pripremljenim nanosuspenzijama

Metodom fotonske korelacijske spektroskopije određena je veličina čestica i indeks polidisperznosti u pripremljenim nanosuspenzijama melatonina. Rezultati su prikazani u Tablici 5. Veličina čestica kretala se od $99,3 \pm 2,0$ nm do $381,3 \pm 25,8$ nm, a indeks polidisperznosti od $0,145 \pm 0,032$ do $0,478 \pm 0,016$.

Tablica 5. Veličina (srednji promjer) i indeks polidisperznosti (PDI) nanočestica melatonina u pripravljenim nanosuspencijama

UZORAK	Melatonin (%, <i>m/V</i>)	Polisorbat 80 (%, <i>m/V</i>)	Maseni omjer melatonina i polisorbata 80	Veličina čestica (nm)	PDI
M1P2	0,143	0,286	1:2	172,0±0,6	0,145±0,032
M1P1	0,286	0,286	1:1	225,2±6,0	0,177±0,023
M2P1	0,572	0,286	2:1	357,9±19,4	0,155±0,017
M3P1	0,858	0,286	3:1	381,3±25,8	0,160±0,039
M4P1	1,140	0,286	4:1	206,3±0,7	0,198±0,006
M5P1	1,430	0,286	5:1	178,2±1,3	0,282±0,013
M6P1	1,720	0,286	6:1	163,4±8,4	0,295±0,012
M10P1	2,860	0,286	10:1	99,3±2,0	0,478±0,016

PDI – indeks polidisperznosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (n = 3).

Veličina čestica označava srednji promjer čestica i važno je svojstvo nanosuspencija. Smanjena veličina čestica u nanosuspencijama naspram klasičnih oblika omogućuje veću topljivost i brzinu otapanja, kao i veću bioraspoloživost lijeka. Za optimalnu veličinu čestica nanosuspencija važan je odabir odgovarajuće površinski aktivne tvari u prikladnoj koncentraciji. U suprotnom, moguća je nestabilnost sustava uslijed rasta čestica. Koncentracija površinski aktivnih tvari manja od optimalne rezultira samo djelomičnom obloženošću čestica nanokristala te mogućnošću njihove međusobne agregacije i rasta. S druge strane, povećana koncentracija površinski aktivnih tvari može inducirati Ostwaldovo zrenje, odnosno rast i neravnomjernu raspodjelu veličina čestica (Malamatari i sur., 2018).

Indeks polidisperznosti mjera je heterogenosti čestica u sustavu s obzirom na njihovu veličinu. Manje vrijednosti ukazuju na usku raspodjelu veličina čestica i homogenost sustava, dok veće vrijednosti označavaju polidisperznost sustava sa širom raspodjelom veličina čestica (Mudalige i sur., 2019; Pathak i Nagarsenker, 2009). Vrijednosti indeksa polidisperznosti manje od 0,3 smatraju se zadovoljavajućima za nanočestice i označavaju monodisperzne sustave (Said i sur., 2022).

Nanosuspencije melatonina pripravljene pri masenom omjeru melatonina i polisorbata 80 od 1:2, 5:1, 6:1 i 10:1 (uzorci redom M1P2, M5P1, M6P1 i M10P1) karakterizirane su srednjim

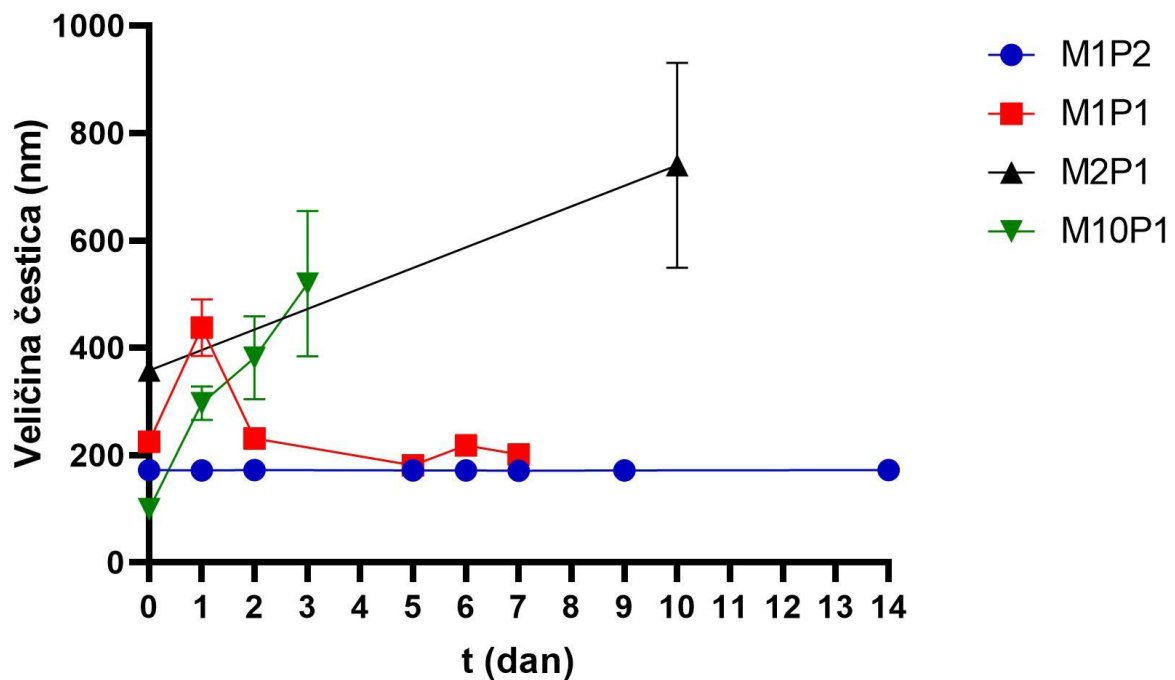
promjerom čestica do 200 nm, od kojih uzorak M10P1 ima najmanju veličinu čestica koja iznosi $99,3 \pm 2,0$ nm.

Vrijednost PDI je zadovoljavajuća u svim ispitivanim nanosuspenzijama, osim u nanosuspenziji M10P1 pripremljenoj pri najvećoj koncentraciji melatonina (0,286 %, *m/V*), gdje PDI prelazi vrijednost od 0,3. Najmanja vrijednost PDI ($0,145 \pm 0,032$) zabilježena je za nanosuspenziju pripremljenu pri masenom omjeru melatonina i polisorbata 1:2 (uzorak M1P2). Zaključno, nanosuspenzija melatonina s polisorbatom 80 u masenom omjeru 1:2 (uzorak M1P2) pokazala je najpoželjnija svojstva s obzirom na veličinu čestica i indeks polidisperznosti.

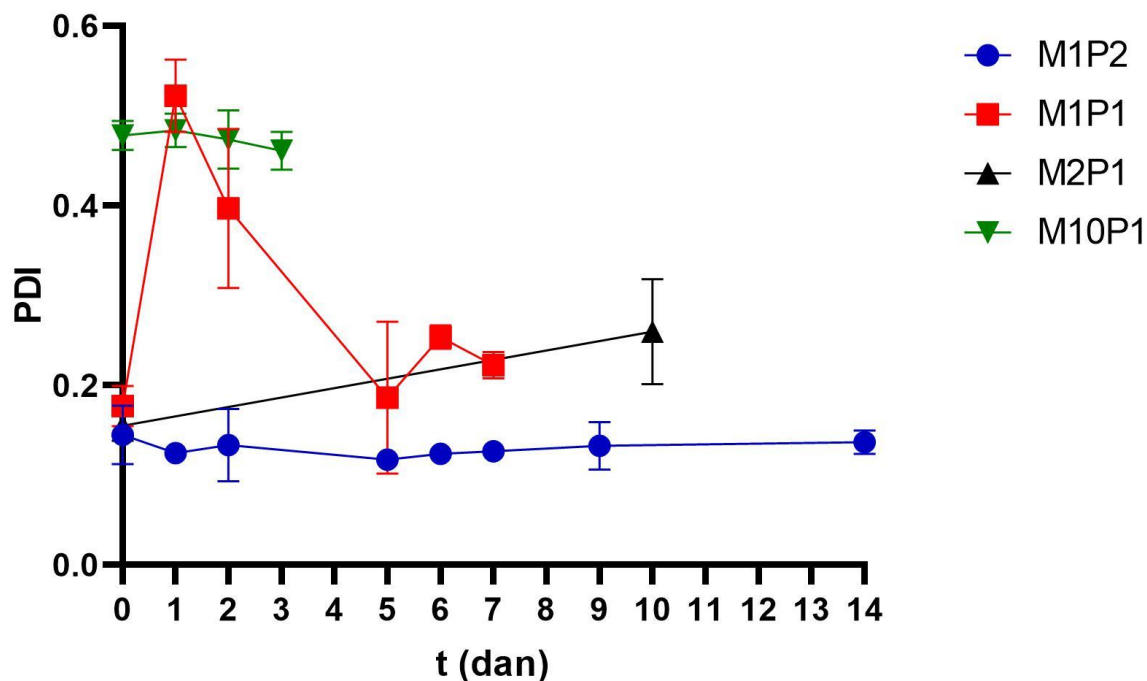
4.3. Stabilnost nanosuspenzija melatonina

Očuvana raspodjela veličina čestica u određenom vremenskom periodu važan je pokazatelj fizičke stabilnosti nanosuspenzije koju karakterizira odsustvo agregacije čestica i rasta kristala. Takav sustav moguće je postići odabirom odgovarajućih površinski aktivnih tvari u prikladnoj koncentraciji za pripravu nanosuspenzije (Oktay i sur., 2020; Tashan i sur., 2019).

Fizička stabilnost određivana je za nanosuspenzije pripravljene pri masenom omjeru melatonina i polisorbata 80 od 1:2, 1:1, 2:1 i 10:1 (uzorci redom M1P2, M1P1, M2P1 i M10P1) mjerenjem veličine čestica i indeksa polidisperznosti u različitim vremenskim točkama unutar 14 dana od pripreve, kako je prikazano na Slikama 2. i 3.



Slika 2. Srednji promjer nanočestica melatonina u nanosuspenzijama pripremljenim pri masenom omjeru melatonina i polisorbata 80 od 1:2, 1:1, 2:1 i 10:1 (uzorci redom M1P2, M1P1, M2P1 i M10P1) u ovisnosti o vremenu skladištenja. Koncentracija polisorbata 80 bila je 0,286 % (m/V) u svim nanosuspenzijama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD ($n=3$).



Slika 3. Indeks polidisperznosti (PDI) nanočestica melatonina u nanosuspenzijama pripravljenim pri masenom omjeru melatonina i polisorbata 80 od 1:2, 1:1, 2:1 i 10:1 (uzorci redom M1P2, M1P1, M2P1 i M10P1) u ovisnosti o vremenu skladištenja. Koncentracija polisorbata 80 bila je 0,286 % (m/V) u svim nanosuspenzijama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD ($n=3$).

Iz priloženih grafova vidljivo je da jedino nanosuspenzija pripravljena pri masenom omjeru melatonina i polisorbata 80 od 1:2 (uzorak M1P2) pokazuje fizičku stabilnost, održavanjem veličine čestica i indeksa polidisperznosti konstantnim i unutar željenih vrijednosti tijekom 14 dana skladištenja. Za istu nanosuspenziju razvidno je i najmanje odstupanje (najmanja standardna devijacija) vrijednosti veličine čestica i PDI između triju mjerenih uzoraka.

Ostale formulacije karakterizirane su povećanjem veličine čestica i indeksa polidisperznosti tijekom promatranog perioda skladištenja. Iznimka je M10P1 čiji PDI je konstantan, ali visok što ukazuje na polidisperznost sustava. Uzorak M1P1 karakterizira fluktuacija veličine čestica i PDI, uz povećanje u prvih 24 sati te naknadno smanjenje vrijednosti.

Postizanje fizičke stabilnosti usko je povezano s ujednačenošću veličina čestica nanosuspenzija i odabirom povoljnog surfaktanta. Polisorbata 80 svojim polioksietilenskim lancima sterički štiti nanokristale melatonina i sprječava njihovo agregiranje, a uz to je i prikladan za metodu pripreme nanosuspenzija vlažnim mljevenjem. U jednom od istraživanja, metodom vlažnog mljevenja uspješno su pripravljene nanosuspenzije indometacina s polisorbatom 80 koje su pokazale dugotrajnu fizičku stabilnost s malom promjenom veličine čestica i indeksa

polidisperznosti (Liu i sur., 2011). U drugom su istraživanju nanosuspenzije ketoprofena s polisorbatom 80 okarakterizirane dugotrajnom fizičkom stabilnošću i odsustvom rasta kristala (Ismanelly Hanum i sur., 2023).

Maseni omjer lijeka i surfaktanta važan je parametar optimizacije procesa pripreme nanosuspenzija što su istražili Ghosh i suradnici (2012) na primjeru vitamin E TPGS (D-alfa-tokoferil polietilen glikol 1000 sukcinata) kao surfaktanta. U slučaju manjka surfaktanta, površina nanokristala lijeka nije bila u potpunosti prekrivena što smanjuje steričko odbijanje nanočestica unutar suspenzije.

4.4. Priprema *in situ* gelirajućih nanosuspenzija melatonina

Kao gelirajući mukoadhezivni polimer za izradu *in situ* gelirajućih nanosuspenzija melatonina korišten je pektin. On pripada skupini često korištenih pomoćnih tvari u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te se nalazi na GRAS listi bez ograničenja u njegovom dnevnom unosu. Linearni je polisaharid i većinom se sastoji od galakturonske kiseline povezane $\alpha(1,4)$ -glikozidnom vezom što ostavlja karboksilne skupine slobodnima (Sriamornsak, 2003). Pogodan je za nazalnu primjenu lijekova zbog mogućnosti stvaranja gela u kontaktu s nosnom sluznicom. Formirani gel osigurava dulje zadržavanje na mjestu primjene i adekvatno oslobađanje djelatne tvari. Sami pektin se ne apsorbira preko nosne sluznice, već se uklanja fiziološkim procesom mukocilijarnog čišćenja (Watts i Smith, 2009).

Geliranje *in situ* gelirajućih sustava temeljenih na pektinu može se opisati kao stvaranje trodimenzionalne mreže polimernih lanaca potaknuto promjenom pH, dodatkom otapala ili iona (Chan i sur., 2017). U ovom istraživanju korišten je niskometoksilirani amidirani pektin koji gelira pod utjecajem kationa prisutnih u nosnom fluidu. Umjetni nazalni fluid (SNF) simulira medij koji inducira geliranje. Naime, dvovalentni kationi, prvenstveno kalcijevi ioni, stvaraju veze sa slobodnim negativno nabijenim karboksilnim skupinama galakturonske kiseline dvaju pektinskih lanaca i tako ih povezuju u polimernu mrežu (Watts i Smith, 2009). Uporaba niskometoksiliranog pektina poželjna je za nazalnu primjenu baš zbog njegovog mehanizma geliranja za koji nisu potrebne egzogene tvari već sam fiziološki nosni fluid (Wang i sur., 2013). Amidacija pektina dodatno poboljšava njegova mukoadhezivna svojstva, što ga uz biokompatibilnost s nazalnom sluznicom i izostankom nadraživanja sluznice čini prikladnim gelirajućim polimerom u sustavima za nazalnu primjenu (Nižić i sur., 2020).

Zbog povoljnih svojstava, pektin je ranije korišten u izradi naprednih farmaceutskih oblika melatonina. Primjerice, ispitivane su pektinske nanočestice s melatoninom u svrhu liječenja

upalnih bolesti crijeva gdje je pokazano da pektin produljuje vrijeme zadržavanja lijeka na ciljnom mjestu djelovanja (Yener i sur., 2021). U drugom istraživanju su pak uspješno pripravljene mikrosfere s melatoninom za nazalnu primjenu građene od mukoadhezivnih polimera pektina i hipromeloze (Nižić i sur., 2020).

Literaturnim pregledom nađeno je da su za pripremu *in situ* gelirajućih sustava za nazalnu primjenu prikladne koncentracije niskometoksiliranog pektina od 0,5 % do 1,0 % (*m/V*) (Castile i sur., 2013; Jurišić Dukovski i sur., 2019). Galankar i suradnici (2021) pokazali su da sustavi bambuterola s pektinom u rasponu koncentracija od 1 do 2 % (*m/V*) imaju nepovoljna reološka svojstva u vidu prevelike viskoznosti, dok je sustav pripravljen pri koncentraciji pektina od 0,8 % (*m/V*) imao prikladnu viskoznost i svojstva gela.

U ovom istraživanju *in situ* gelirajuće nanosuspenzije melatonina pripravljene su pri koncentraciji niskometoksiliranog amidiranog pektina od 0,7 i 0,8 % (*m/V*), dok je za detaljnu reološku karakterizaciju odabrana formulacija pripravljena pri većoj koncentraciji polimera (0,8 %, *m/V*) (Tablica 4.).

4.5. Reološka svojstva *in situ* gelirajućih nanosuspenzija melatonina

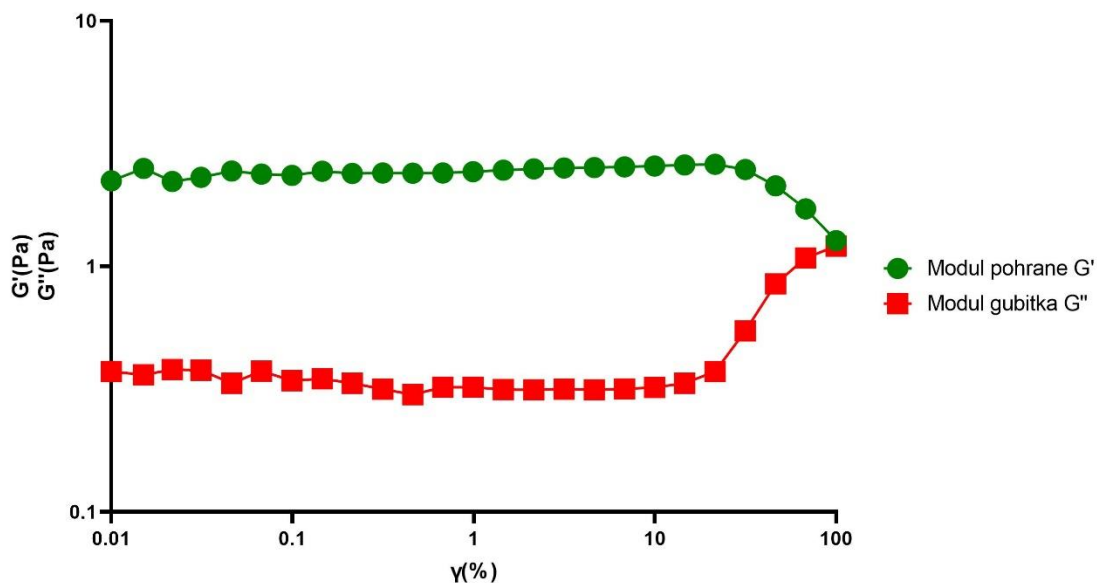
Reologija je znanstvena disciplina koja proučava deformaciju ili tečenje materijala pod utjecajem sile (Ramli i sur., 2022). Reološka karakterizacija *in situ* gelirajućih sustava za nazalnu primjenu nužna je za optimiranje specifičnih reoloških svojstava kao što su viskoznost i svojstva geliranja. Reološka svojstva utječu na dostavu lijeka u ciljna područja nosne šupljine, vrijeme zadržavanja formulacije na nosnoj sluznici te bioraspoloživost lijeka (Hao i sur., 2016). U reološkoj karakterizaciji *in situ* gelirajućih nanosuspenzija melatonina pripremljenih u ovom radu korištena su dva oscilacijska testa - test promjene amplitude i test vremena geliranja, te rotacijski test određivanja krivulje viskoznosti, prije i nakon geliranja.

4.5.1. Linearno viskoelastično područje

Linearno viskoelastično područje određeno je oscilacijskim testom promjene amplitude koji pokazuje odnos modula pohrane (G') i gubitka (G'') u ovisnosti o smičnoj deformaciji. Pri tome modul pohrane predstavlja elastičnu, a modul gubitka viskoznu komponentu sustava (Ramli i sur., 2022). U linearnom viskoelastičnom području, pri niskim amplitudama, moduli pohrane i gubitka su konstantni. Promjena modula pohrane i/ili gubitka pri višim amplitudama karakteristika je narušavanja strukture sustava.

U ovom radu linearno viskoelastično područje određeno je za reprezentativnu *in situ* gelirajuću nanosuspenciju melatonina (pripravljenu pri koncentraciji melatonina, polisorbata 80 i pektina redom od 0,143 %, *m/V*, 0,286 %, *m/V*, i 0,8 %, *m/V* (maseni omjer melatonina i polisorbata 80 od 1:2, formulacija F3, Tablica 4.)) pomiješanu sa SNF-om u volumnom omjeru 1:1 s ciljem simuliranja uvjeta na nosnoj sluznici i poticanja geliranja sustava. Na Slici 4. prikazana je ovisnost modula pohrane i gubitka geliranog sustava (F3+SNF) o smičnoj deformaciji.

Linearno viskoelastično područje određeno je kao raspon smične deformacije od 0,01 do 10 %. U tom području nije zapažena promjena modula pohrane (G') ni modula gubitka (G''), odnosno očuvana je unutarnja struktura sustava. U skladu s navedenim, za daljnja reološka ispitivanja odabrana je smična deformacija od 0,1%.



Slika 4. Ovisnost modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') o smičnoj deformaciji (γ) za *in situ* gelirajuću nanosuspenciju melatonina pripravljenu pri koncentraciji melatonina, polisorbata 80 i pektina redom od 0,143 % (*m/V*), 0,286 % (*m/V*) i 0,8 % (*m/V*) (maseni omjer melatonina i polisorbata 80 od 1:2), pomiješanu sa SNF-om u volumnom omjeru 1:1.

4.5.2. Vrijeme geliranja

In situ gelirajući sustavi pokazuju svojstvo prelaska iz sol u gel stanje pri fiziološkim uvjetima na mjestu primjene. Vrijeme geliranja nazalnih sustava definira se kao vrijeme potrebno za postizanje gel stanja nakon kontakta s nosnom sluznicom ili miješanja sa SNF-om (Sherafudeen i Vasantha, 2015). Može se odrediti oscilacijskim testom promatrajući vrijednosti modula pohrane (G') i gubitka (G'') ispitivanog sustava u ovisnosti o vremenu.

U ovom je istraživanju test vremena geliranja proveden nakon miješanja *in situ* gelirajućih sustava sa SNF-om u volumnom omjeru 1:1 u trajanju od jedne minute pri temperaturi od 34 °C (temperatura nosne sluznice). Period u kojem je modul pohrane dosegnuo vrijednost modula gubitka smatra se vremenom geliranja. Za ispitivane formulacije F1, F2 i F3 vrijeme odmaka geliranja od vremena geliranja vodene otopine pektina (0,8 %, *m/V*) prikazano je u Tablici 6.

Tablica 6. Prikaz odnaka u vremenu geliranja (Δt) za uzorke F1, F2 i F3 od vremena geliranja otopine pektina (0,8 %, *m/V*).

UZORAK	Pektin (%, <i>m/V</i>)	Melatonin (%, <i>m/V</i>)	Polisorbat 80 (%, <i>m/V</i>)	Δt (s)
F1	0,7	0,286	0,572	5,0±2,9
F2	0,8	0,286	0,572	10,8±24,8
F3	0,8	0,143	0,286	8,3±14,1

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD ($n = 2$).

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da prisustvo nanokristala melatonina i polisorbata 80 u *in situ* gelirajućim sustavima temeljenim na pektinu nije značajno utjecalo na vrijeme geliranja sustava, uzimajući u obzir vrijeme mukocilijarnog klirensa od 10 do 20 min. To potvrđuje prikladnost ispitivanog pristupa oblikovanja melatonina u svrhu postizanja duljeg zadržavanja na mjestu primjene i veće bioraspoloživosti melatonina nakon nazalne primjene.

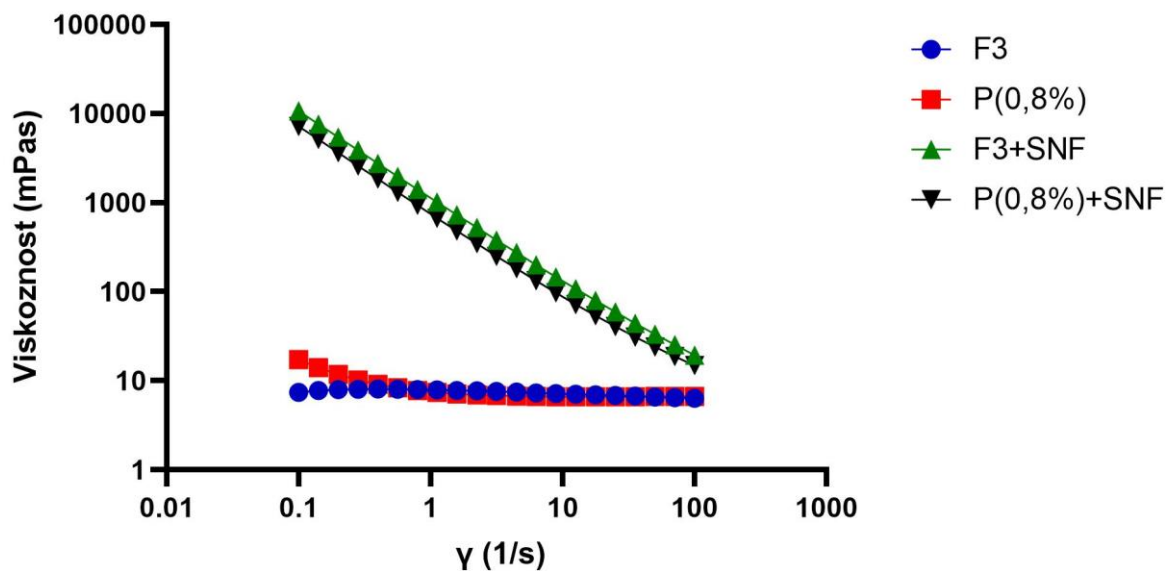
4.5.3. Krivulja viskoznosti

Promjena viskoznosti uzoraka u odnosu na brzinu smicanja (γ) prikazana je krivuljom viskoznosti na Slici 5. Ispitivane su odabrana *in situ* gelirajuća nanosuspencija (F3; Tablica 4.) te otopina pektina u odgovarajućoj koncentraciji (0,8 %, *m/V*), prije i nakon miješanja sa SNF-om.

Vidljiv je značajan porast viskoznosti ispitivanih *in situ* gelirajućih sustava (formulacija F3 i otopina pektina) nakon miješanja sa SNF-om. To je očekivano s obzirom na već opisani mehanizam geliranja pektina s kationima SNF-a (Chen i sur., 2020). Povećana viskoznost uslijed geliranja pruža potencijal produljenog zadržavanja formulacije u nosnoj šupljini, a time i opsežnije apsorpcije lijeka.

Pseudoplastične, ne-Newtonove sustave karakterizira smanjenje viskoznosti s povećanjem brzine smicanja što je ispitano ovim rotacijskim testom. Otopina pektina sa i bez dodatka SNF-a te *in situ* gelirajuća nanosuspenzija melatonina (F3) s dodatkom SNF-a pokazuju takva pseudoplastična svojstva. *In situ* gelirajući pseudoplastični sustavi u doticaju s nosnim fluidom prelaze iz sol u gel stanje čime se povećava viskoznost i omogućuje produljeno zadržavanje formulacije, a zatim se pod utjecajem mukocilijarnog čišćenja viskoznost smanjuje, što omogućuje olakšan prolaz do gornjih dijelova nosne šupljine i uspješniju apsorpciju lijeka (Hao i sur., 2016).

Usporedive krivulje viskoznosti gelirane formulacije F3 i gelirane otopine pektina ukazuju na zaključak da prisustvo nanokristala melatonina i polisorbata 80 u sustavu nije utjecalo na promatrana svojstva formiranog pektinskog gela (Slika 5.).



Slika 5. Ovisnost viskoznosti *in situ* gelirajuće nanosuspenzije (F3) i otopine pektina (0,8 %, m/V), prije i nakon miješanja sa SNF-om (1:1, V/V), o brzini smicanja ($\dot{\gamma}$). F3 označava *in situ* gelirajuću nanosuspenziju melatonina pripravljenu pri koncentraciji melatonina, polisorbata 80 i pektina redom od 0,143 % (m/V), 0,286 % (m/V) i 0,8 % (m/V) (maseni omjer melatonina i polisorbata 80 od 1:2).

5. ZAKLJUČCI

- Pripravljene su nanosuspenzije melatonina metodom vlažnog mljevenja, pri koncentraciji površinski aktivne tvari polisorbata 80 od 0,286 % (m/V) i koncentraciji melatonina u rasponu od 0,140 do 2,860 % (m/V), rezultirajući masenim omjerom melatonina i polisorbata 80 od 10:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 1:1 i 1:2.
- Veličina nanokristala melatonina u pripremljenim nanosuspenzijama bila je između $99,3 \pm 2,0$ nm i $381,3 \pm 25,8$ nm, dok je indeks polidisperznosti iznosio od $0,145 \pm 0,032$ do $0,478 \pm 0,016$.
- Nanosuspenzija melatonina pripravljena pri masenom omjeru melatonina i polisorbata 80 od 1:2 (uzorak M1P2) pokazala je najpoželjnija svojstva s obzirom na veličinu čestica i indeks polidisperznosti te fizičku stabilnost tijekom 14 dana skladištenja.
- *In situ* gelirajuće nanosuspenzije melatonina koncentracije 0,143 % i 0,286 % (m/V) uspješno su pripravljene korištenjem surfaktanta polisorbata 80 u koncentraciji redom od 0,286 % i 0,572 % (m/V) te *in situ* gelirajućeg polimera pektina u koncentraciji od 0,7 % ili 0,8 % (m/V).
- Pripravljene *in situ* gelirajuće nanosuspenzije melatonina pokazale su svojstvo geliranja nakon miješanja s umjetnim nosnim fluidom.
- Prisustvo nanokristala melatonina i polisorbata 80 u pripremljenim *in situ* gelirajućim sustavima nije značajno utjecalo na vrijeme geliranja niti svojstva formiranog pektinskog gela.

6. LITERATURA

- Aghrbi, I., Fülöp, V., Jakab, G., Kállai-Szabó, N., Balogh, E., Antal, I., 2021. Nanosuspension with improved saturated solubility and dissolution rate of cilostazol and effect of solidification on stability. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 61, 102165. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102165>
- Agrawal, Y., Patel, V., 2011. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2, 81. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.82950>
- Al-Omary, F.A.M., 2013. Melatonin, in: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. Elsevier, pp. 159–226. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407691-4.00005-8>
- Alshweiat, A., Csóka, I., Tömösi, F., Janáky, T., Kovács, A., Gáspár, R., Sztojkov-Ivanov, A., Ducza, E., Márki, Á., Szabó-Révész, P., Ambrus, R., 2020. Nasal delivery of nanosuspension-based mucoadhesive formulation with improved bioavailability of loratadine: Preparation, characterization, and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 579, 119166. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119166>
- Andrisano, V., Bertucci, C., Battaglia, A., Cavrini, V., 2000. Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, 15–23. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00259-4](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00259-4)
- Aref, Z.F., Bazeed, S.E.E.S., Hassan, M.H., Hassan, A.S., Ghweil, A.A., Sayed, M.A.A., Rashad, A., Mansour, H., Abdelmaksoud, A.A., 2022. Possible Role of Ivermectin Mucoadhesive Nanosuspension Nasal Spray in Recovery of Post-COVID-19 Anosmia. *Infect. Drug Resist.* Volume 15, 5483–5494. <https://doi.org/10.2147/IDR.S381715>
- Aref, Z.F., Bazeed, S.E.E.S., Hassan, M.H., Hassan, A.S., Rashad, A., Hassan, R.G., Abdelmaksoud, A.A., 2021. Clinical, Biochemical and Molecular Evaluations of Ivermectin Mucoadhesive Nanosuspension Nasal Spray in Reducing Upper Respiratory Symptoms of Mild COVID-19. *Int. J. Nanomedicine* Volume 16, 4063–4072. <https://doi.org/10.2147/IJN.S313093>
- Babu, R.J., Dayal, P., Singh, M., 2008. Effect of Cyclodextrins on the Complexation and Nasal Permeation of Melatonin. *Drug Deliv.* 15, 381–388. <https://doi.org/10.1080/10717540802006922>
- Bano, A., 2019. Priprava i karakterizacija nanokristala flutikazonpropionata. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko- biokemijski fakultet, Zagreb.
- Bartos, C., Ambrus, R., Sipos, P., Budai-Szűcs, M., Csányi, E., Gáspár, R., Márki, Á., Seres, A.B., Sztojkov-Ivanov, A., Horváth, T., Szabó-Révész, P., 2015. Study of sodium hyaluronate-based intranasal formulations containing micro- or nanosized meloxicam particles. *Int. J. Pharm.* 491, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.046>

- Bose, S., Sharma, P., Mishra, V., Patial, S., Saraogi, G.K., Tambuwala, M.M., Dua, K., 2021. Comparative *in vitro* evaluation of glimepiride containing nanosuspension drug delivery system developed by different techniques. *J. Mol. Struct.* 1231, 129927. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129927>
- Bowers, G.D., Culp, A., Reese, M.J., Tabolt, G., Moss, L., Piscitelli, S., Huynh, P., Wagner, D., Ford, S.L., Gould, E.P., Pan, R., Lou, Y., Margolis, D.A., Spreen, W.R., 2016. Disposition and metabolism of cabotegravir: a comparison of biotransformation and excretion between different species and routes of administration in humans. *Xenobiotica* 46, 147–162. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1060372>
- Bseiso, E.A., AbdEl-Aal, S.A., Nasr, M., Sammour, O.A., El Gawad, N.A.A., 2022. Nose to brain delivery of melatonin lipidic nanocapsules as a promising post-ischemic neuroprotective therapeutic modality. *Drug Deliv.* 29, 2469–2480. <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2104405>
- Castile, J., Cheng, Y.-H., Simmons, B., Perelman, M., Smith, A., Watts, P., 2013. Development of *in vitro* models to demonstrate the ability of PecSys®, an *in situ* nasal gelling technology, to reduce nasal run-off and drip. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39, 816–824. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.707210>
- Chan, S.Y., Choo, W.S., Young, D.J., Loh, X.J., 2017. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydr. Polym.* 161, 118–139. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.033>
- Chen, Y., Liu, Y., Xie, J., Zheng, Q., Yue, P., Chen, L., Hu, P., Yang, M., 2020. Nose-to-Brain Delivery by Nanosuspensions-Based *in situ* Gel for Breviscapine. *Int. J. Nanomedicine* Volume 15, 10435–10451. <https://doi.org/10.2147/IJN.S265659>
- Chuffa, L.G.D.A., Seiva, F.R.F., Novais, A.A., Simão, V.A., Martín Giménez, V.M., Manucha, W., Zuccari, D.A.P.D.C., Reiter, R.J., 2021. Melatonin-Loaded Nanocarriers: New Horizons for Therapeutic Applications. *Molecules* 26, 3562. <https://doi.org/10.3390/molecules26123562>
- Clementino, A.R., Pellegrini, G., Banella, S., Colombo, G., Cantù, L., Sonvico, F., Del Favero, E., 2021. Structure and Fate of Nanoparticles Designed for the Nasal Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Mol. Pharm.* 18, 3132–3146. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00366>
- De Oliveira Junior, E.R., Nascimento, T.L., Salomão, M.A., Da Silva, A.C.G., Valadares, M.C., Lima, E.M., 2019. Increased Nose-to-Brain Delivery of Melatonin Mediated by Polycaprolactone Nanoparticles for the Treatment of Glioblastoma. *Pharm. Res.* 36, 131. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2662-z>
- Fan, Y., Cui, Y., Hao, W., Chen, M., Liu, Q., Wang, Y., Yang, M., Li, Z., Gong, W., Song, S., Yang, Y., Gao, C., 2021. Carrier-free highly drug-loaded biomimetic nanosuspensions encapsulated by cancer cell membrane based on homology and active targeting for the treatment of glioma. *Bioact. Mater.* 6, 4402–4414. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.027>

- Ferrar, J.A., Sellers, B.D., Chan, C., Leung, D.H., 2020. Towards an improved understanding of drug excipient interactions to enable rapid optimization of nanosuspension formulations. *Int. J. Pharm.* 578, 119094. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119094>
- Galankar, V.P., 2021. FORMULATION, DEVELOPMENT AND IN-VITRO EVALUATION OF A BAMBUTEROL HYDROCHLORIDE IN-SITU GELLING SYSTEM FOR NASAL DELIVERY. *J. Med. Pharm. Allied Sci.* 5–8. <https://doi.org/10.22270/jmpas.VIC111.1906>
- Gao, M., Mei, D., Huo, Y., Mao, S., 2019. Effect of polysorbate 80 on the intranasal absorption and brain distribution of tetramethylpyrazine phosphate in rats. *Drug Deliv. Transl. Res.* 9, 311–318. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0580-y>
- Gaur, P.K., 2021. Nanosuspension of flavonoid-rich fraction from *Psidium guajava* Linn for improved type 2-diabetes potential. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 62, 102358. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102358>
- Ghosh, I., Schenck, D., Bose, S., Ruegger, C., 2012. Optimization of formulation and process parameters for the production of nanosuspension by wet media milling technique: Effect of Vitamin E TPGS and nanocrystal particle size on oral absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 718–728. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.08.011>
- Hafner, A., Škrinjar, D., Filipović-Grčić, J., 2014. Mogućnosti nazalne primjene lijekova. *Farm. Glas.* 70, 303–321.
- Hao, J., Zhao, J., Zhang, S., Tong, T., Zhuang, Q., Jin, K., Chen, W., Tang, H., 2016. Fabrication of an ionic-sensitive in situ gel loaded with resveratrol nanosuspensions intended for direct nose-to-brain delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 147, 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.011>
- ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products, 2003.
- Ismanelly Hanum, T., Nasution, A., Sumaiyah, S., Bangun, H., 2023. Physical stability and dissolution of ketoprofen nanosuspension formulation: Polyvinylpyrrolidone and Tween 80 as stabilizers. *Pharmacia* 70, 209–215. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e96593>
- Jacob, S., Nair, A.B., Shah, J., 2020. Emerging role of nanosuspensions in drug delivery systems. *Biomater. Res.* 24, 3. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-0184-8>
- Jayachandra Babu, R., Dayal, P.P., Pawar, K., Singh, M., 2011. Nose-to-brain transport of melatonin from polymer gel suspensions: a microdialysis study in rats. *J. Drug Target.* 19, 731–740. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.558090>

- John, R., Dalal, B., Shankarkumar, A., Devarajan, P.V., 2021. Innovative Betulin Nanosuspension exhibits enhanced anticancer activity in a Triple Negative Breast Cancer Cell line and Zebrafish angiogenesis model. *Int. J. Pharm.* 600, 120511. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120511>
- Jurišić Dukovski, B., Mrak, L., Winnicka, K., Szekalska, M., Juretić, M., Filipović-Grčić, J., Pepić, I., Lovrić, J., Hafner, A., 2019. Spray-dried nanoparticle-loaded pectin microspheres for dexamethasone nasal delivery. *Dry. Technol.* 37, 1915–1925. <https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1545783>
- Kakad, S., Kshirsagar, S., 2021. Nose to brain delivery of Efavirenz nanosuspension for effective neuro AIDS therapy: in-vitro, in-vivo and pharmacokinetic assessment. *Heliyon* 7, e08368. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08368>
- Kakad, S.P., Gangurde, T.D., Kshirsagar, S.J., Mundhe, V.G., 2022. Nose to brain delivery of nanosuspensions with first line antiviral agents is alternative treatment option to Neuro-AIDS treatment. *Heliyon* 8, e09925. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09925>
- Lalanne, S., Fougerou-Leurent, C., Anderson, G.M., Schroder, C.M., Nir, T., Chokron, S., Delorme, R., Claustrat, B., Bellissant, E., Kermarrec, S., Franco, P., Denis, L., Tordjman, S., 2021. Melatonin: From Pharmacokinetics to Clinical Use in Autism Spectrum Disorder. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1490. <https://doi.org/10.3390/ijms22031490>
- Liu, P., Rong, X., Laru, J., Van Veen, B., Kiesvaara, J., Hirvonen, J., Laaksonen, T., Peltonen, L., 2011. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: Preparation and development by wet milling. *Int. J. Pharm.* 411, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.050>
- Liu, Q., Mai, Y., Gu, X., Zhao, Y., Di, X., Ma, X., Yang, J., 2020. A wet-milling method for the preparation of cilnidipine nanosuspension with enhanced dissolution and oral bioavailability. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 55, 101371. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101371>
- Lu, Xinyue, Lu, Xiaoyu, Yang, P., Zhang, Z., Lv, H., 2022. Honokiol nanosuspensions loaded thermosensitive hydrogels as the local delivery system in combination with systemic paclitaxel for synergistic therapy of breast cancer. *Eur. J. Pharm. Sci.* 175, 106212. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106212>
- Ma, Y., Cong, Z., Gao, P., Wang, Y., 2023. Nanosuspensions technology as a master key for nature products drug delivery and In vivo fate. *Eur. J. Pharm. Sci.* 185, 106425. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106425>
- Malamatari, M., Taylor, K.M.G., Malamataris, S., Douroumis, D., Kachrimanis, K., 2018. Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discov. Today* 23, 534–547. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.016>
- Mao, S., Chen, J., Wei, Z., Liu, H., Bi, D., 2004. Intranasal administration of melatonin starch microspheres. *Int. J. Pharm.* 272, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.11.028>

- Moschwitz, J., 2010. Special Aspects of Nanomedicine Viewpoint from the Industry.
- Mudalige, T., Qu, H., Van Haute, D., Ansar, S.M., Paredes, A., Ingle, T., 2019. Characterization of Nanomaterials, in: *Nanomaterials for Food Applications*. Elsevier, pp. 313–353. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7>
- Nikzamid, M., Akbarzadeh, A., Panahi, Y., 2021. An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 61, 102316. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102316>
- Nižić, L., Potaš, J., Winnicka, K., Szekalska, M., Erak, I., Gretić, M., Jug, M., Hafner, A., 2020. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres. *Eur. J. Pharm. Sci.* 141, 105115. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105115>
- Nižić Nodilo, L., Perkušić, M., Ugrina, I., Špoljarić, D., Jakobušić Brala, C., Amidžić Klarić, D., Lovrić, J., Saršon, V., Safundžić Kučuk, M., Zadavec, D., Kalogjera, L., Pepić, I., Hafner, A., 2022a. In situ gelling nanosuspension as an advanced platform for fluticasone propionate nasal delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 175, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.04.009>
- Noori Siahdasht, F., Farhadian, N., Karimi, M., Hafizi, L., 2020. Enhanced delivery of melatonin loaded nanostructured lipid carriers during *in vitro* fertilization: NLC formulation, optimization and IVF efficacy. *RSC Adv.* 10, 9462–9475. <https://doi.org/10.1039/C9RA10867J>
- Oktay, A.N., Ilbasmis-Tamer, S., Karakucuk, A., Celebi, N., 2020a. Screening of stabilizing agents to optimize flurbiprofen nanosuspensions using experimental design. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 57, 101690. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101690>
- Onoue, S., Yamada, S., Chan, K., 2014. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int. J. Nanomedicine* 1025. <https://doi.org/10.2147/IJN.S38378>
- Onugwu, A.L., Nwagwu, C.S., Onugwu, O.S., Echezona, A.C., Agbo, C.P., Ihim, S.A., Emeh, P., Nnamani, P.O., Attama, A.A., Khutoryanskiy, V.V., 2023. Nanotechnology based drug delivery systems for the treatment of anterior segment eye diseases. *J. Controlled Release* 354, 465–488. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.01.018>
- Ozer, A.Y., 2007. Alternative Applications for Drug Delivery: Nasal and Pulmonary Routes, in: Mozafari, M.R. (Ed.), *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 99–112. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6289-6_6
- Park, H., Otte, A., Park, K., 2022. Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. *J. Controlled Release* 342, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>
- Patel, H.M., Patel, B.B., Shah, C.N., 2016. Nanosuspension: A novel approach to enhance solubility of poorly water soluble drugs - A review. *Int. J. Adv. Pharm.* 5.

- Pathak, P., Nagarsenker, M., 2009. Formulation and Evaluation of Lidocaine Lipid Nanosystems for Dermal Delivery. *AAPS PharmSciTech* 10, 985. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9287-1>
- Patravale, V.B., Date, A.A., Kulkarni, R.M., 2010. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 827–840. <https://doi.org/10.1211/0022357023691>
- Peng, H.T., Bouak, F., Vartanian, O., Cheung, B., 2013. A physiologically based pharmacokinetics model for melatonin—Effects of light and routes of administration. *Int. J. Pharm.* 458, 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.033>
- Pinar, S.G., Canpınar, H., Tan, Ç., Çelebi, N., 2022. A new nanosuspension prepared with wet milling method for oral delivery of highly variable drug Cyclosporine A: development, optimization and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 171, 106123. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106123>
- Priprem, A., Johns, J.R., Limsitthichaikoon, S., Limphirat, W., Mahakunakorn, P., Johns, N.P., 2017. Intranasal melatonin nanoniosomes: pharmacokinetic, pharmacodynamics and toxicity studies. *Ther. Deliv.* 8, 373–390. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0005>
- Rahaman, S.M., Bhattarai, A., Kumar, D., Singh, B., Saha, B., 2023. Application of biosurfactants as emulsifiers in the processing of food products with diverse utilization in the baked goods, in: *Applications of Next Generation Biosurfactants in the Food Sector*. Elsevier, pp. 203–237. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824283-4.00021-6>
- Ramli, H., Zainal, N.F.A., Hess, M., Chan, C.H., 2022. Basic principle and good practices of rheology for polymers for teachers and beginners. *Chem. Teach. Int.* 4, 307–326. <https://doi.org/10.1515/cti-2022-0010>
- Ramos, A.P., Cruz, M.A.E., Tovani, C.B., Ciancaglini, P., 2017. Biomedical applications of nanotechnology. *Biophys. Rev.* 9, 79–89. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0246-2>
- Said, D.E., Amer, E.I., Sheta, E., Makled, S., Diab, H.E., Arafa, F.M., 2022. Nano-Encapsulated Melatonin: A Promising Mucosal Adjuvant in Intranasal Immunization against Chronic Experimental *T. gondii* Infection. *Trop. Med. Infect. Dis.* 7, 401. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7120401>
- Saindane, N.S., Pagar, K.P., Vavia, P.R., 2013. Nanosuspension Based In Situ Gelling Nasal Spray of Carvedilol: Development, In Vitro and In Vivo Characterization. *AAPS PharmSciTech* 14, 189–199. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9896-y>
- Sherafudeen, S.P., Vasantha, P.V., 2015. Development and evaluation of in situ nasal gel formulations of loratadine. *Res. Pharm. Sci.* 10, 466–476.

- Spreen, W., Williams, P., Margolis, D., Ford, S.L., Crauwels, H., Lou, Y., Gould, E., Stevens, M., Piscitelli, S., 2014. Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability With Repeat Doses of GSK1265744 and Rilpivirine (TMC278) Long-Acting Nanosuspensions in Healthy Adults. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 67, 487–492.
<https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000365>
- Sriamornsak, P., 2003. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses : A Review. *Silpakorn Univ Int J* 3, 206–228.
- Sun, H., Gusdon, A.M., Qu, S., 2016. Effects of melatonin on cardiovascular diseases: progress in the past year. *Curr. Opin. Lipidol.* 27, 408–413.
<https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000314>
- Sushant, T., Avinash, G., Onkar, S., 2022. Nanomedicine Market by Modality (Diagnostics and Treatment), Application (Drug Delivery, Diagnostic Imaging, Vaccines, Regenerative Medicine, Implants, and Others), and Indication (Clinical Oncology, Infectious Diseases, Clinical Cardiology, Orthopedics, Neurology, Urology, Ophthalmology, Immunology And Others): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021-2030. *Allied Mark. Res.* 215.
- Talib, W.H., Alsayed, A.R., Abuawad, A., Daoud, S., Mahmud, A.I., 2021. Melatonin in Cancer Treatment: Current Knowledge and Future Opportunities. *Molecules* 26, 2506.
<https://doi.org/10.3390/molecules26092506>
- Tashan, E., Karakucuk, A., Celebi, N., 2019a. Optimization and in vitro evaluation of ziprasidone nanosuspensions produced by a top-down approach. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 52, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.024>
- Temprom, L., Kongsuk, S., Thapphasaraphong, S., Priperm, A., Namuangruk, S., 2022. A novel preparation and characterization of melatonin loaded niosomes based on using a ball milling method. *Mater. Today Commun.* 31, 103340.
<https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103340>
- Türker, S., Onur, E., Ózer, Y., 2004. Nasal route and drug delivery systems. *Pharm. World Sci.* 26, 137–142. <https://doi.org/10.1023/B:PHAR.0000026823.82950.ff>
- Vasey, C., McBride, J., Penta, K., 2021. Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin. *Nutrients* 13, 3480. <https://doi.org/10.3390/nu13103480>
- Velloso, M.I., Andreetta, H.A., Landoni, M.F., 2021. Effect of two surfactants on in vitro permeation of butorphanol through horse nasal mucosa. *Uniciencia* 35, 1–9.
<https://doi.org/10.15359/ru.35-2.1>
- Verma, V., Ryan, K.M., Padrela, L., 2021. Production and isolation of pharmaceutical drug nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 603, 120708.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120708>

- Wang, X., Liu, G., Ma, J., Guo, S., Gao, L., Jia, Y., Li, X., Zhang, Q., 2013. In Situ Gel-Forming System: An Attractive Alternative for Nasal Drug Delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 30, 411–434. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2013007362>
- Watts, P., Smith, A., 2009. PecSys: *in situ* gelling system for optimised nasal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 543–552. <https://doi.org/10.1517/17425240902939135>
- Weissig, V., Elbayoumi, T., Flühmann, B., Barton, A., 2021. The Growing Field of Nanomedicine and Its Relevance to Pharmacy Curricula. *Am. J. Pharm. Educ.* 85, 8331. <https://doi.org/10.5688/ajpe8331>
- Yener, S., Akbulut, K.G., Karakuş, R., Erdoğan, D., Acartürk, F., 2021. In Vitro and in Vivo Evaluation of Pectin-based Melatonin Nanoparticles for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-303104/v1>
- Zhdanova, I.V., 2014. Melatonin, in: *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. Elsevier, pp. 1030–1033. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00559-5>

7. SAŽETAK

Melatonin je neurohormon koji se istražuje u liječenju brojnih bolesti i stanja zbog svojih hipnotičkih, antioksidativnih, protuupalnih i imunomodulatornih svojstava. Slaba topljivost u vodi, kratko vrijeme polueliminacije, intenzivni metabolizam i otežani prolazak krvno-moždane barijere nepovoljna su svojstva melatonina zbog kojih se intenzivno istražuju inovativni oblici i putovi njegove primjene. Nazalna primjena osigurava sistemsku raspoloživost melatonina izbjegavajući razgradnju u probavnom sustavu i prvi prolazak kroz jetru te pruža mogućnost izravne dostave u mozak zaobilazeći krvno-moždanu barijeru. Nanosuspencije predstavljaju prikladan farmaceutski oblik za nazalnu primjenu slabo topljivog melatonina. Vlažno mljevenje prikladna je metoda pripreme nanosuspencija zbog dobre reproducibilnosti i kontrole veličine čestica, izbjegavanja organskih otapala i ekonomske isplativosti.

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost pripreme *in situ* gelirajuće nanosuspencije melatonina koristeći polisorbata 80 kao surfaktant i pektin kao gelirajući mukoadhezivni polimer te metodu vlažnog mljevenja za usitnjavanje kristala melatonina. Pripravljene su nanosuspencije melatonina pri koncentraciji polisorbata 80 od 0,286 % (*m/V*) i različitoj koncentraciji melatonina (0,140-2,860 %, *m/V*), rezultirajući rasponom masenog omjera melatonina i polisorbata 80 od 1:10 do 2:1. Veličina čestica i indeks polidisperznosti ispitani su nakon 24-satnog mljevenja metodom fotonske korelacijske spektroskopije. Veličina nanokristala melatonina kretala se između $99,3 \pm 2,0$ nm i $381,3 \pm 25,8$ nm, a indeks polidisperznosti između $0,145 \pm 0,032$ i $0,478 \pm 0,016$. Nanosuspencija melatonina s masenim omjerom melatonina i polisorbata 80 od 1:2 karakterizirana je prikladnom veličinom čestica i relativno malim indeksom polidisperznosti te odgovarajućom fizičkom stabilnošću tijekom 14 dana skladištenja. Maseni omjer melatonina i polisorbata 80 od 1:2 stoga je odabran za daljnju pripremu *in situ* gelirajućih nanosuspencija melatonina. Navedeni sustavi pripremljeni su pri koncentraciji melatonina od 0,143 % i 0,286 % (*m/V*) uz korištenje neionskog surfaktanta polisorbata 80 u koncentraciji redom od 0,286 % i 0,572 % (*m/V*) te *in situ* gelirajućeg mukoadhezivnog polimera pektina u koncentraciji od 0,7 % ili 0,8 % (*m/V*). Pripravljene *in situ* gelirajuće sustave gelirali su u prisustvu umjetnog nosnog fluida. Provedenim reološkim ispitivanjima utvrđeno je da prisustvo nanokristala melatonina i polisorbata 80 nije značajno utjecalo na vrijeme geliranja niti svojstva formiranog pektinskog gela.

7. SUMMARY

Melatonin is a neurohormone which is being investigated in the treatment of numerous diseases and medical states due to its hypnotic, antioxidative, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Poor water solubility, short half-life, intense metabolism and difficult passage through the blood-brain barrier are unfavorable properties of melatonin, hence innovative forms and routes of its application are being intensely researched. Nasal administration ensures the systemic availability of melatonin avoiding gastrointestinal and first-pass metabolism, and provides the possibility of direct drug delivery to the brain, bypassing the blood-brain barrier. Nanosuspensions present a suitable pharmaceutical form for nasal administration of poorly water-soluble melatonin. Wet milling is a suitable method for the preparation of nanosuspensions due to good reproducibility and control of particle size, avoidance of organic solvents, and cost-effectiveness.

The aim of this study was to examine the possibility of preparing an *in situ* gelling nanosuspension of melatonin using polysorbate 80 as a surfactant and pectin as a gelling mucoadhesive polymer, and the wet milling method for reducing the size of melatonin crystals. Melatonin nanosuspensions were prepared at a polysorbate 80 concentration of 0.286% (*w/v*) and different melatonin concentrations (0.140-2.860%, *w/v*), resulting in a range of melatonin to polysorbate 80 weight ratios from 1:10 to 2:1. Particle size and polydispersity index were examined after 24-hour milling using the photon correlation spectroscopy method. The size of melatonin nanocrystals ranged between 99.3 ± 2.0 nm and 381.3 ± 25.8 nm, and the polydispersity index between 0.145 ± 0.032 and 0.478 ± 0.016 . The melatonin nanosuspension with a weight ratio of melatonin to polysorbate 80 of 1:2 is characterized by a suitable particle size and a relatively low polydispersity index, as well as adequate physical stability during 14 days of storage. A weight ratio of melatonin to polysorbate 80 of 1:2 was therefore chosen for the further preparation of *in situ* gelling nanosuspensions of melatonin. The mentioned systems were prepared at a concentration of melatonin of 0.143% and 0.286% (*w/v*) with the use of nonionic surfactant polysorbate 80 at a concentration of 0.286% and 0.572% (*w/v*), respectively, and *in situ* gelling mucoadhesive polymer pectin at a concentration of 0.7 % or 0.8 % (*w/v*). The prepared *in situ* gelling systems formed gel in the presence of simulated nasal fluid. The conducted rheological tests determined that the presence of melatonin nanocrystals and polysorbate 80 showed no significant effect on the gelation time or the properties of the formed pectin gel.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

RAZVOJ *IN SITU* GELIRAJUĆE NANOSUSPENZIJE MELATONINA ZA NAZALNU PRIMJENU

Veronika Ria Tus

SAŽETAK

Melatonin je neurohormon koji se istražuje u liječenju brojnih bolesti i stanja zbog svojih hipnotičkih, antioksidativnih, protuupalnih i imunomodulatornih svojstava. Slaba topljivost u vodi, kratko vrijeme polueliminacije, intenzivni metabolizam i otežani prolazak krvno-moždane barijere nepovoljna su svojstva melatonina zbog kojih se intenzivno istražuju inovativni oblici i putovi njegove primjene. Nazalna primjena osigurava sistemsku raspoloživost melatonina izbjegavajući razgradnju u probavnom sustavu i prvi prolazak kroz jetru te pruža mogućnost izravne dostave u mozak zaobilazeći krvno-moždanu barijeru. Nanosuspencije predstavljaju prikladan farmaceutski oblik za nazalnu primjenu slabo topljivog melatonina. Vlažno mljevenje prikladna je metoda pripreme nanosuspencija zbog dobre reproducibilnosti i kontrole veličine čestica, izbjegavanja organskih otapala i ekonomske isplativosti. Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost pripreme *in situ* gelirajuće nanosuspencije melatonina koristeći polisorbata 80 kao surfaktant i pektin kao gelirajući mukoadhezivni polimer te metodu vlažnog mljevenja za usitnjavanje kristala melatonina. Pripravljene su nanosuspencije melatonina pri koncentraciji polisorbata 80 od 0,286 % (*m/V*) i različitoj koncentraciji melatonina (0,140-2,860 % *m/V*), rezultirajući rasponom masenog omjera melatonina i polisorbata 80 od 1:10 do 2:1. Veličina čestica i indeks polidisperznosti ispitani su nakon 24-satnog mljevenja metodom fotonske korelacijske spektroskopije. Veličina nanokristala melatonina kretala se između $99,3 \pm 2,0$ nm i $381,3 \pm 25,8$ nm, a indeks polidisperznosti između $0,145 \pm 0,032$ i $0,478 \pm 0,016$. Nanosuspencija melatonina s masenim omjerom melatonina i polisorbata 80 od 1:2 karakterizirana je prikladnom veličinom čestica i relativno malim indeksom polidisperznosti te odgovarajućom fizičkom stabilnošću tijekom 14 dana skladištenja. Maseni omjer melatonina i polisorbata 80 od 1:2 stoga je odabran za daljnju pripravu *in situ* gelirajućih nanosuspencija melatonina. Navedeni sustavi pripremljeni su pri koncentraciji melatonina od 0,143 % i 0,286 % (*m/V*) uz korištenje neionskog surfaktanta polisorbata 80 u koncentraciji redom od 0,286 % i 0,572 % (*m/V*) te *in situ* gelirajućeg mukoadhezivnog polimera pektina u koncentraciji od 0,7 % ili 0,8 % (*m/V*). Pripravljene *in situ* gelirajući sustavi gelirali su u prisustvu umjetnog nosnog fluida. Provedenim reološkim ispitivanjima utvrđeno je da prisustvo nanokristala melatonina i polisorbata 80 nije značajno utjecalo na vrijeme geliranja niti svojstva formiranog pektinskog gela.

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

Rad sadrži: 41 stranica, 5 grafičkih prikaza, 6 tablica i 81 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: melatonin; nazalna primjena; nanosuspencije; *in situ* gelirajući sustavi; vlažno mljevenje

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

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

Dr. sc. Marijana Zovko Končić, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Kneza Domagoja Street 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF *IN SITU* GELLING MELATONIN NANOSUSPENSION FOR NASAL ADMINISTRATION

Veronika Ria Tus

SUMMARY

Melatonin is a neurohormone which is being investigated in the treatment of numerous diseases and medical states due to its hypnotic, antioxidative, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Poor water solubility, short half-life, intense metabolism and difficult passage through the blood-brain barrier are unfavorable properties of melatonin, hence innovative forms and routes of its application are being intensely researched. Nasal administration ensures the systemic availability of melatonin avoiding gastrointestinal and first-pass metabolism, and provides the possibility of direct drug delivery to the brain, bypassing the blood-brain barrier. Nanosuspensions present a suitable pharmaceutical form for nasal administration of poorly water-soluble melatonin. Wet milling is a suitable method for the preparation of nanosuspensions due to good reproducibility and control of particle size, avoidance of organic solvents, and cost-effectiveness. The aim of this study was to examine the possibility of preparing an *in situ* gelling nanosuspension of melatonin using polysorbate 80 as a surfactant and pectin as a gelling mucoadhesive polymer, and the wet milling method for reducing the size of melatonin crystals. Melatonin nanosuspensions were prepared at a polysorbate 80 concentration of 0.286% (*w/v*) and different melatonin concentrations (0.140-2.860%, *w/v*), resulting in a range of melatonin to polysorbate 80 weight ratios from 1:10 to 2:1. Particle size and polydispersity index were examined after 24-hour milling using the photon correlation spectroscopy method. The size of melatonin nanocrystals ranged between 99.3 ± 2.0 nm and 381.3 ± 25.8 nm, and the polydispersity index between 0.145 ± 0.032 and 0.478 ± 0.016 . The melatonin nanosuspension with a weight ratio of melatonin to polysorbate 80 of 1:2 is characterized by a suitable particle size and a relatively low polydispersity index, as well as adequate physical stability during 14 days of storage. A weight ratio of melatonin to polysorbate 80 of 1:2 was therefore chosen for the further preparation of *in situ* gelling nanosuspensions of melatonin. The mentioned systems were prepared at a concentration of melatonin of 0.143% and 0.286% (*w/v*) with the use of nonionic surfactant polysorbate 80 at a concentration of 0.286% and 0.572% (*w/v*), respectively, and *in situ* gelling mucoadhesive polymer pectin at a concentration of 0.7 % or 0.8 % (*w/v*). The prepared *in situ* gelling systems formed gel in the presence of simulated nasal fluid. The conducted rheological tests determined that the presence of melatonin nanocrystals and polysorbate 80 showed no significant effect on the gelation time or the properties of the formed pectin gel.

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

Thesis includes: 41 pages, 5 figures, 6 tables and 81 references. Original is in Croatian language.

Keywords: melatonin; nasal administration; nanosuspensions; *in situ* gelling systems; wet milling

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

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

Marijana Zovko Končić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2023.