

Matej Pintur

**Prikladnost metode spontanog emulgiranja u
izradi nanoemulzija za oftalmičku primjenu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Neizmjerne se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasmini Lovrić na uloženom vremenu, trudu, razumijevanju i savjetima pri pisanju ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem Biseri Jurišić, mag. pharm. na ugodnoj suradnji i pruženoj pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na strpljenju i bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog studija.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. NANOEMULZIJE	1
1.2. STABILNOST NANOEMULZIJA	1
1.3. SURFAKTANTI PRI IZRADI NANOEMULZIJA	3
1.4. METODE PRIPRAVE NANOEMULZIJA.....	4
1.4.1. VISOKOENERGETSKE METODE	4
1.4.2. NISKOENERGETSKE METODE	4
1.4.2.1. PIT METODA	5
1.4.2.2. METODA SPONTANOG EMULGIRANJA	5
1.5. NANOEMULZIJE ZA OFTALMIČKU PRIMJENU	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	7
3. MATERIJALI I METODE.....	8
3.1. MATERIJALI	8
3.2. METODE	8
3.2.1. IZRADA NANOEMULZIJA METODOM SPONTANOG EMULGIRANJA	8
3.2.2. MJERENJE VELIČINE ČESTICA I INDEKSA POLIDISPERZNOSTI	9
3.2.3. MJERENJE ZETA POTENCIJALA	9
3.2.4. ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI DEKSAMETAZONA U MIGLYOLU 812.....	9
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	10
4.1. KARAKTERIZACIJA NANOEMULZIJA	10
4.1.1. MIGLYOL 812 I CREMOPHOR EL	10
4.1.2. MIGLYOL 812 I CREMOPHOR EL S DODATKOM STEARILAMINA.....	14
4.1.3. MIGLYOL 812 I CREMOPHOR EL S DODATKOM KITOZANA	17
4.1.4. SOJINO ULJE I CREMOPHOR EL	18
4.1.5. SEZAMOVO ULJE I CREMOPHOR EL	19
4.1.6. MIGLYOL 812 I TWEEN 80.....	21
4.1.7. MIGLYOL 812 I TWEEN 60.....	22
4.1.8. MIGLYOL 812 I TWEEN 85.....	23
4.1.9. RICINUSOVO ULJE I CREMOPHOR EL.....	24
4.2. TOPLJIVOST DEKSAMETAZONA U MIGLYOLU 812.....	25
5. ZAKLJUČAK.....	26
6. LITERATURA	27
7. SAŽETAK / SUMMARY.....	30
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD. 31	

1. UVOD

1.1. NANOEMULZIJE

Nanoemulzije se definiraju kao sustavi koji se sastoje od dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, pri čemu je unutarnja faza raspršena u vanjskoj fazi u obliku kapljica promjera 20-200 nm (Solans i sur., 2005; Anton, 2008; Eccleston, 2013). Osim vanjske i unutarnje faze, često se susreću i pojmovi uljna i vodena faza, zbog činjenice da je jedna faza nepolarna (npr. biljno ili mineralno ulje, trigliceridi i sl.), a druga polarna (npr. voda ili vodena otopina). U tom smislu, najčešće riječ o emulzijama tipa U/V, kada je vanjska faza vodena, ili V/U, kada je vanjska faza uljna. Nanoemulzije su po vanjskom izgledu transparentne ili opalescentne. Često se primijećuje plavkasta boja nanoemulzije, koja je posljedica Rayleighovog raspršenja svjetlosti (Mason i sur., 2006).

Zbog vanjskog izgleda i veličine kapljica, nanoemulzije se često poistovjećuju s mikroemulzijama, no među njima postoje znatne razlike. Mikroemulzije su termodinamički stabilne i nastaju spontano, te imaju drugačiju građu na submikronskoj razini (McClements, 2012; Eccleston, 2013). Suprotno tome, nanoemulzije nisu termodinamički stabilne i ne nastaju spontano. U tom smislu, mnogo su sličnije makroemulzijama, a jedina prava sličnost koju dijele s mikroemulzijama je red veličina kapljica.

1.2. STABILNOST NANOEMULZIJA

Kao i makroemulzije, nanoemulzije su termodinamički nestabilni sustavi (Sadurni i sur., 2005; Eccleston, 2013). Kako bi uopće nastale, potrebno je u sustav dovesti energiju izvana, zbog čega će se sustav naći u stanju povišene slobodne površinske energije (Eccleston, 2013). Za takvo stanje karakteristična je visoka sila napetosti na granici faza. Sustav se stoga nastoji vratiti u stanje minimalne slobodne površinske energije, što se može dogoditi na nekoliko načina: koalescencijom, Ostwaldovim zrenjem, sedimentacijom i sl. Svim tim procesima zajedničko je povećanje čestica unutarnje faze, što za posljedicu ima smanjenje dodirne površine među fazama, a time i smanjenje slobodne površinske energije. Taj proces se nastavlja do potpunog razdvajanja faza. Zbog termodinamičke nestabilnosti, nanoemulzije je potrebno kinetički stabilizirati dodatkom emulgatora. Uloga emulgatora je održavanje

emulzije u stanju povišene slobodne energije kroz dulji vremenski period nakon prestanka unošenja energije izvana. Drugim riječima, daju kinetičku stabilnost emulzijama tako što inhibiraju procese koalescencije i Ostwaldovog zrenja (Komaiko i McClements, 2014). Kao emulgatori se najčešće koriste površinski aktivne tvari ili surfaktanti, iako su dokumentirane i nanoemulzije s lipidnim i proteinskim emulgatorima (Gupta i sur., 2016).

Kinetički stabilna emulzija definirana je kao ona u kojoj kapljice unutarnje faze zadržavaju početna svojstva i ostaju jednoliko dispergirane u vanjskoj fazi (Eccleston, 2013; Komaiko i McClements, 2015). U farmaceutskoj praksi, stabilnost ima šire značenje i uglavnom se izjednačuje s rokom trajanja gotovog proizvoda, što znači da emulzija koja dođe na tržište osim kinetičke stabilnosti mora zadržati i početni izgled, miris i konzistenciju te ne smije biti mikrobiološki kontaminirana. Kinetika destabilizacije nanoemulzija je sporija nego kod makroemulzija, stoga se smatra da nanoemulzije posjeduju relativno visoku kinetičku stabilnost i manju sklonost ka koalescenciji u odnosu na makroemulzije. Koalescencija je ireverzibilan proces pri kojem se čestice unutarnje faze spajaju, stvarajući veće čestice. Taj će se proces nastaviti sve do potpunog razdvajanja faza. Događa se kada čestice unutarnje faze mogu prijeći energetska barijera i doći u stanje primarnog minimuma. Kako je udio unutarnje faze u nanoemulzijama manji nego u makroemulzijama, a i same čestice su manje veličine, mnogo je manja vjerojatnost da će se one sudariti. Osim toga, relativno visoka koncentracija surfaktanta pridonosi jačim odbojnim silama među česticama unutarnje faze. Osim stabilnosti, prednost nanoemulzija kao farmaceutskih pripravaka u odnosu na konvencionalne emulzije je i bolja apsorpcija preko epitelnih barijera, što za posljedicu ima veću bioraspoloživost lijeka (Anton i Vandamme, 2009).

Dominantni mehanizam destabilizacije nanoemulzija je Ostwaldovo zrenje (Eccleston, 2013; Komaiko i McClements, 2016). To je ireverzibilan proces koji uključuje rast velikih čestica nauštrb manjih. Objasnjeno je Kelvinovim efektom iz kojeg proizlazi da molekule na površini manjih čestica lakše odvajaju zbog slabijih kohezijskih sila, što je posljedica manjeg polumjera zakrivljenosti. Kako bi došli u stanje ravnoteže, male kapljice difundiraju kroz vanjsku fazu i ulaze u veće kapljice, koje tada rastu („zriju“). Do Ostwaldovog zrenja dolazi zbog velike polidisperznosti čestica unutarnje faze. Stoga su ključni parametri koji se treba kontrolirati u proizvodnji veličina čestica, indeks polidisperznosti, a i zeta potencijal. Važan parametar koji ima utjecaj na Ostwaldovo zrenje je i viskoznost vanjske faze.

1.3. SURFAKTANTI PRI IZRADI NANOEMULZIJA

Surfaktanti su površinski aktivne tvari. Prilikom nastajanja nanoemulzije stvaraju film na granici između vanjske i unutarnje faze te pospješuju elektrostatsko ili steričko odbijanje između čestica unutarnje faze, nadvladavajući privlačne van der Waalsove sile među njima (Solans i sur, 2005; Eccleston, 2013). Kod neionskih emulgatora, radi se prije svega o steričkoj stabilizaciji, a kod ionskih o elektrostatskoj stabilizaciji. Smještaj na granici faza omogućuje im njihova molekularna struktura, koju čini jedan ili više nepolarnih repova, koji se sastoje od jednog ili više ugljikovodičnih lanaca koji mogu biti zasićeni i nezasićeni i različitih duljina, iako se u praksi najčešće koriste lanci od 12 do 18 ugljikovih atoma (Eccleston, 2013), te polarna glava, koja sadrži hidrofilnu funkcionalnu skupinu koja može biti neionska ili ionska. Repovi se orijentiraju prema uljnoj fazi, a glave prema vodenoj. U praksi se uglavnom koriste sintetski surfaktanti, no njihov je nedostatak toksičnost u većim koncentracijama, što znatno ograničava izbor surfaktanata za izradu nanoemulzija obzirom na njihovu veliku specifičnu površinu koja zahtjeva veliku koncentraciju surfaktanata. Najtoksičniji su kationski, a najmanje toksični neionski surfaktanti. Stoga se ionski surfaktanti koriste samo za topikalne pripravke, i to u malim koncentracijama (Eccleston, 2013).

Izbor surfaktanta vrši se prije svega na temelju njihove HLB (engl. *hydrophilic-lipophilic balance*) vrijednosti. HLB vrijednost je brojčani podatak koji se izračunava na temelju udjela hidrofilnih i lipofilnih dijelova u ukupnoj molekularnoj masi surfaktanta. Što je veća HLB vrijednost, surfaktant je hidrofilniji. Za emulzije tipa U/V pogodne su HLB vrijednosti 10-18. Valja napomenuti da iako HLB vrijednost znatno olakšava i sužava izbor emulgatora, zbog činjenice da je temeljena isključivo na strukturi molekule, ne uzima u obzir afinitet emulgatora prema vodenoj i uljnoj fazi. Zbog toga korištenje jednog ili više emulgatora teoretski odgovarajuće HLB vrijednosti u praksi može rezultirati nestabilnom emulzijom ili njezino nastajanje potpuno izostaje. Također, HLB ne uzima u obzir temperaturu ni druge ekscipijense koji se mogu naći u pripravku (Eccleston, 2013).

1.4. METODE PRIPRAVE NANOEMULZIJA

Općenito se metode za pripravu nanoemulzija dijele u dvije glavne skupine na temelju količine energije koja se mora uvesti u sustav izvana kako bi došlo do nastajanja nanoemulzija. To su visokoenergetske i niskoenergetske metode.

1.4.1. VISOKOENERGETSKE METODE

Visokoenergetske metode koriste uređaje koji mehaničkom energijom razbijaju unutarnju fazu u pojedinačne kapljice. Primjeri takvih uređaja su visokotlačni homogenizatori koji „guraju“ smjesu kroz sitne otvore pod visokim tlakom. Zbog sudara tekućine sa čvrstom površinom dolazi do smicanja i turbulentnog tečenja te dolazi do stvaranja sitnih kapljica. Još jedan primjer su mikrofluidizatori koji rade na način da se vodena i uljna faza odvojeno pumpama dovode u kanale u kojima se zbog velikih sila uslijed sudara pri velikim brzinama raspršuju u kapljice. Ultrasonikatori koriste ultrazvučnu sondu kako bi razbili makroemulziju na manje čestice (Anton i Vandamme, 2009). Svi su ti uređaji velike snage ($10^8 - 10^{10}$ W/kg) (Gupta i sur., 2016), ali samo mali dio uložene energije se iskoristi na proces stvaranja emulzije (Tadros i sur., 2004). Visoka cijena ovih metoda te ograničen broj tvari koji nisu osjetljive na ove procese je jedan od razloga zbog kojeg nanoemulzije još uvijek nisu široko rasprostranjene kao farmaceutski oblik, te se istraživanja sve više okreću prema niskoenergetskim metodama.

1.4.2. NISKOENERGETSKE METODE

Za razliku od visokoenergetskih metoda, niskoenergetske metode ne zahtijevaju skupe uređaje jer se koriste intrinzična fizičko-kemijska svojstva surfaktanata, kosurfaktanata i ulja kako bi nastala nanoemulzija. Dvije najčešće opisane niskoenergetske metode su metoda temperature fazne inverzije (engl. *phase inversion temperature*, PIT) i metoda spontanog emulgiranja (engl. *spontaneous emulsification*) (Anton i sur., 2008). Potrebno je istaknuti da se obje metode, iako se razlikuju po izvedbi, temelje na sličnim fizičko-kemijskim principima (Anton i Vandamme, 2009). Zbog niske cijene i jednostavnosti ove metode postaju sve zanimljivije za istraživanje.

1.4.2.1. PIT METODA

Ova metoda koristi različitu topljivost surfaktanta pri različitim temperaturama za stvaranje nanoemulzije. Primijećeno je da neki surfaktanti, naročito polioksietilirani, zagrijavanjem postaju lipofilniji zbog dehidracije polioksietilenskih skupina (Komaiko i McClements, 2016). Prvo se pripremi U/V makroemulzija koja se zatim zagrijava. Povećanjem temperature, surfaktant postaje sve lipofilniji, a iznad određene kritične temperature (temperatura fazne inverzije, PIT) surfaktant je potpuno solubiliziran i dolazi do inverzije emulzije u V/U. Nakon toga, sustav se izlaže nagloj promjeni temperature tako da se ohladi ili se razrijedi vodenom fazom sobne temperature. U tom trenutku surfaktant ponovno postaje hidrofilan i naglo prelazi iz uljne faze u vodenu, pri čemu nastaje U/V nanoemulzija.

1.4.2.2. METODA SPONTANOG EMULGIRANJA

Ova se metoda temelji na difuziji otapala ili samog surfaktanta iz uljne faze u vodenu. Pritom je važno da se otapalo ili surfaktant na početku nalazi u uljnoj fazi. Iako su se rani eksperimenti većinom temeljili na difuziji organskog otapala kao što su etanol ili aceton, u posljednjih nekoliko godina opisano je mnogo slučajeva uspješne pripreme nanoemulzija u kojima je komponenta koja difundira iz uljne u vodenu fazu sam surfaktant (Anton i Vandamme, 2009; Komaiko i McClements, 2016). Na početku se smjesa uljne faze i surfaktanta homogenizira te se uz miješanje dodaje jedna faza u drugu. Iako je u većini literature opisano dodavanje uljne faze u vodenu, opisano je i dodavanje vodene faze u uljnu, naročito u slučajevima kad je udio uljne faze vrlo malen te je ona viskozna. Ta se metoda može koristiti pri sobnoj temperaturi, iako je primijećeno da pri većim temperaturama nastaju nanoemulzije s manjim česticama unutarnje faze (Komaiko i McClements, 2016). Također je opisano i smanjenje veličine čestica povećanjem brzine miješanja.

1.5. NANOEMULZIJE ZA OFTALMIČKU PRIMJENU

Kompleksna struktura oka, koja uključuje nekoliko barijera, ograničava bioraspoloživost lijeka u oku nakon topikalne oftalmičke primjene. Manje od 5% lijeka absorbira se preko rožnice te dolazi do unutrašnjih tkiva oka. Osim toga, u tkivima oka postoje efluksni transporter, npr. P-glikoprotein, MRP i BCPR, koji također ograničavaju bioraspoloživost lijekova. Za liječenje mnogih oftalmičkih bolesti koriste se lijekovi niske topljivosti u vodi.

Lipidni nanosutavi, kao što su nanoemulzije imaju nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalne oblike (najčešće vodne otopine i suspenzije), kao što je povećanje bioraspoloživosti slabo topljivih lijekova, ciljano i kontrolirano oslobađanje i smanjena učestalost nuspojava (Gan i sur., 2013).

Sam suzni film predstavlja barijeru. Suze se luče i otklanjaju brzinom od 1,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, a nakon primjene lijeka dolazi do refleksnog lučenja do 400 $\mu\text{l}/\text{min}$. Osim toga, u donjem dijelu filma prisutan je mukozni sloj koji stvara hidrofilni gel koji se kreće duž glikokaliksa i uklanja ostatke odumrlih stanica, strana tijela i patogene, ali predstavlja i barijeru za prolaz lijekova. Što je veći volumen primjene, brže će se isprati iz prekornealnog prostora. Pretpostavlja se da je vrijeme kontakta vodene otopine lijeka s površinama preko kojih se apsorbiraju tek nekoliko minuta (Sasaki i sur., 1996; Tamilavan i Benita, 2004; Gan i sur., 2013).

Glavni putevi apsorpcije oftalmičkih pripravaka su transkornealni i transkonjunktivalni put. Općenito se smatra da se lipofilniji lijekovi češće apsorbiraju transkornealnim putem, dok manje lipofilni češće idu transkonjunktivalnim putem (Tamilavan i Benita, 2004).

Rožnica se sastoji od epitela, Bowmanove membrane, strome, Descementove membrane i endotela. Ti slojevi imaju naizmjenice negativne i pozitivne naboje. Takva struktura „nalik sendviču“ čini rožnicom ključnom barijerom. Epitel rožnice sastoji se od 5-6 slojeva stanica koje su gusto pakirane i povezane čvrstim vezama (Tadros i sur., 2014; Gan i sur., 2013).

Lipidnim nanoemulzijama nastoji se povećati bioraspoloživost oftalmičkih pripravaka na način da se osigura produljeno zadržavanje na površini oka i/ili potencirajući transkornealnu ili transkonjunktivalnu apsorpciju lijeka. U literaturi su zabilježeni pokušaji izrade anionskih i kationskih nanoemulzija, iako se općenito smatra da kationske imaju najviše potencijala jer pospješuju dulje zadržavanje vezanjem na negativno nabijenu površinu rožnice (Tamilavan i Benita, 2004). Neki autori ističu da postoji mogućnost da se lipidne komponente unutarnje faze nešto duže zadržavaju na mjestu primjene, dok se komponente vodene faze brzo ispiru suzama. Ovakvo dulje zadržavanje omogućilo bi bolju bioraspoloživost lijeka, što ujedno znači da bi se mogle primijeniti manje doze, a to dovodi i do manje vjerojatnosti pojave neželjenih učinaka, bilo da se radi o nuspojavama ili toksičnosti djelatne ili neke od pomoćnih tvari (Beilin i sur., 1995; Sasaki i sur., 1996; Tamilavan i Benita, 2004).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nanotehnologija je od sve većeg interesa za mnoge grane znanosti uključujući farmaciju. Različiti nanosustavi zbog svojih fizičko-kemijskih svojstava, koji proizlaze iz čestica malih dimenzija, postaju sve zanimljiviji kao potencijalni terapijski sustavi jer omogućuju nove pristupe liječenju zbog dublje penetracije u tkiva te preciznije i specifičnije dostave lijeka na mjesto djelovanja. Na taj način povećavaju učinkovitost liječenja, a istodobno smanjuju toksičnost i vjerojatnost uzrokovanja nuspojava (Solans i sur., 2005; Anton i Vandamme, 2009; Eccleston, 2013; Komaiko i McClements, 2015, 2016; Gupta i sur., 2016).

Iako se unatrag nekoliko godina sve više proučavaju različiti nanosustavi koji pokazuju sve veći potencijal, još uvijek je vrlo malen broj komercijalno dostupnih pripravaka koji se temelje na njima. Dijelom jer se radi o relativno novoj grani znanosti u kojoj i dalje postoji mnogo nepoznanica koje tek treba otkriti, a dijelom i zbog visokih troškova koji se vežu uz istraživanje i razvoj nanotehnologije. To ukazuje na potrebu da se ulažu još veći napor u pronalaženje sve boljih rješenja za postojeće i buduće terapijske probleme, ali i potrebu za optimizacijom procesa proizvodnje kako bi takvi terapijski sustavi postali što dostupniji.

Oko kao ciljni organ za farmakoterapiju još uvijek predstavlja veliki izazov zbog svoje kompleksne strukture koja obiluje različitim barijerama koje ograničavaju apsorpciju lijeka i njegovo prodiranje u dublja tkiva. Nanoemulzije predstavljaju jedno od mogućih rješenja tog problema upravo zbog pozitivnog učinka na apsorpciju čime pospješuju bioraspoloživost lijeka kao što je opisano u literaturi (Tamilavan i Benita, 2004; Gan i sur., 2013).

Ovaj se diplomski rad bavi nanoemulzijama kao oblikom koji je opisan u literaturi u posljednjih dvadesetak godina i koji je jedan od znanosti najzanimljivijih nanosustava jer su opisane relativno jednostavne i jeftine metode dobivanja istih, te se one temelje na principima koji su slični kao i kod konvencionalnih emulzija te su stoga dobro poznati (Anton i Vandamme, 2009). U sklopu diplomskog rada izrađeno je nekoliko nanoemulzija različitog sastava te su ispitivana određena svojstva ciljem pronalaženja formulacije potencijalno pogodna za oftalmičku primjenu. Također je ispitivana topljivost deksametazona kao jednog od najčešćih lijekova u oftalmologiji s ciljem njegovog uklapanja u nanoemulzije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korišteni su Miglyol 812, sezamovo ulje, sojino ulje i ricinusovo ulje proizvođača (Kemig, Hrvatska), Cremophor EL (BASF, Njemačka); Tween 60, Tween 80, Tween 85, stearylamin i metanol (Sigma-Aldrich, SAD) te kitozan stupnja deacetilacije >90% i molekulske mase 50-150 kDa (NovaMatrix, Norveška).

3.2. METODE

3.2.1. IZRADA NANOEMULZIJA METODOM SPONTANOG EMULGIRANJA

Prije opisa metode potrebno je pojasniti kratice SOR i SOWR. SOR (engl. *surfactant-oil ratio*) se odnosi na maseni udio surfaktanta u ukupnoj masi surfaktanta i uljne faze, izračunat kao $SOR = 100 \cdot w_{\text{surfaktant}} / (w_{\text{surfaktant}} + w_{\text{uljna faza}})$, pri čemu je w maseni udio pojedine komponente. Izražava se kao postotak ili razlomak. SOWR (engl. *surfactant-oil/water ratio*) predstavlja zajednički udio surfaktanta i uljne faze u cjelokupnom pripravku, prema formuli $SOWR = 100 \cdot w_{\text{surfaktant} + \text{ulje}} / (w_{\text{surfaktant} + \text{ulje}} + w_{\text{voda}})$, pri čemu je w maseni udio pojedine komponente. Najčešće se izražava kao postotak.

U sklopu ovog diplomskog rada izrađene su nanoemulzije SOR vrijednosti 60%, te SOWR vrijednosti 5% i 10%, pri sobnoj temperaturi i pri 70°C. Sve nanoemulzije pripravljene su istim postupkom. Prvo su se zajedno izvagali ulje i surfaktant te se smjesa nekoliko minuta homogenizirala na magnetskom mješaču. Zatim se toj smjesi uz miješanje dodala pročišćena voda. Ukoliko se proces odvijao pri 70°C, obje su se faze prije dodatka vode zagrijale na tu temperaturu pomoću termobloka s ugrađenim mješačem. Nakon dodatka vode, nanoemulzije su se miješale 30 minuta brzinom od 900 rpm. Nakon miješanja (i po potrebi hlađenja na sobnu temperaturu) vršila su se ispitivanja veličine čestica i zeta potencijala. Nanoemulzije koje su zadovoljavale kriterije čuvane su pri 4°C.

3.2.2. MJERENJE VELIČINE ČESTICA I INDEKSA POLIDISPERZNOSTI

Veličina čestica izmjerena je foton-korelacijskom spektroskopijom na uređaju Malvern[®] Zetasizer 3000. Ova se metoda temelji na mjerenju promjene intenziteta raspršene svjetlosti kao funkciji vremena, iz čega se na temelju Stokes-Einsteinove relacije softverski izračunava promjer čestica unutarnje faze (Staniforth i Taylor, 2013). Kao izvor svjetlosti koristi se He-Ne laser, a detekcija se vrši pod kutem od 90°C. Prije mjerenja uzorak je razrijeđen pročišćenom vodom do primjerene koncentracije.

3.2.3. MJERENJE ZETA POTENCIJALA

Zeta potencijal nanoemulzija izmjeren je na uređaju Malvern[®] Zetasizer 3000. Izračunava se na temelju elektroforetske pokretljivosti čestica. Prije mjerenja, uzorak je primjereno razrijeđen 10 mM otopinom natrijevog klorida.

3.2.4. ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI DEKSAMETAZONA U MIGLYOLU 812

Uzorak za ispitivanje topljivosti pripremio se miješanjem 0,01 g deksametazona s 5 g Miglyola 812. Uzorak u triplicatu se ostavio 24 h na tresilici pri 120 rpm. Nakon toga se filtrirao kroz mikrobiološki filter veličine pora 0,45 µm te se filtrat razrijedio 100 puta metanolom, nakon čega je izmjerena apsorbancija UV/Vis spektrofotometrom pri 241 nm. Koncentracija deksametazona u svakom uzorku izračunata je ne temelju baždarnog pravca dobivenog mjerenjem različitih koncentracija deksametazona u metanolu uz dodatak odgovarajuće količine Miglyola 812, uz metanol s Miglyolom 812 kao slijepu probu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

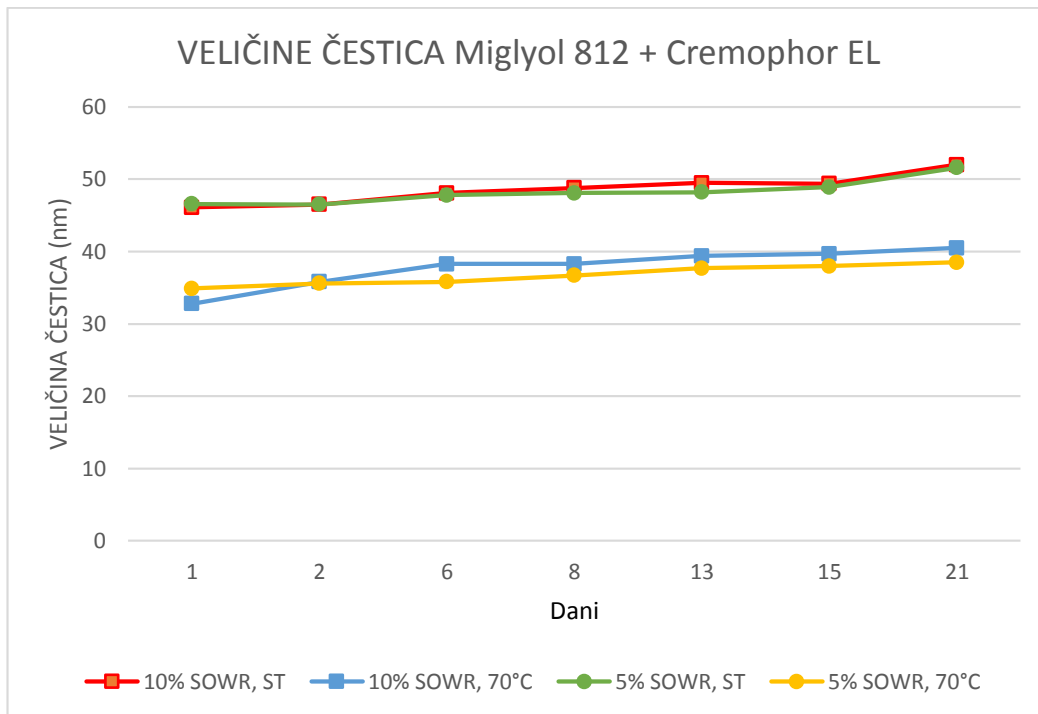
4.1. KARAKTERIZACIJA NANOEMULZIJA

4.1.1. MIGLYOL 812 I CREMOPHOR EL

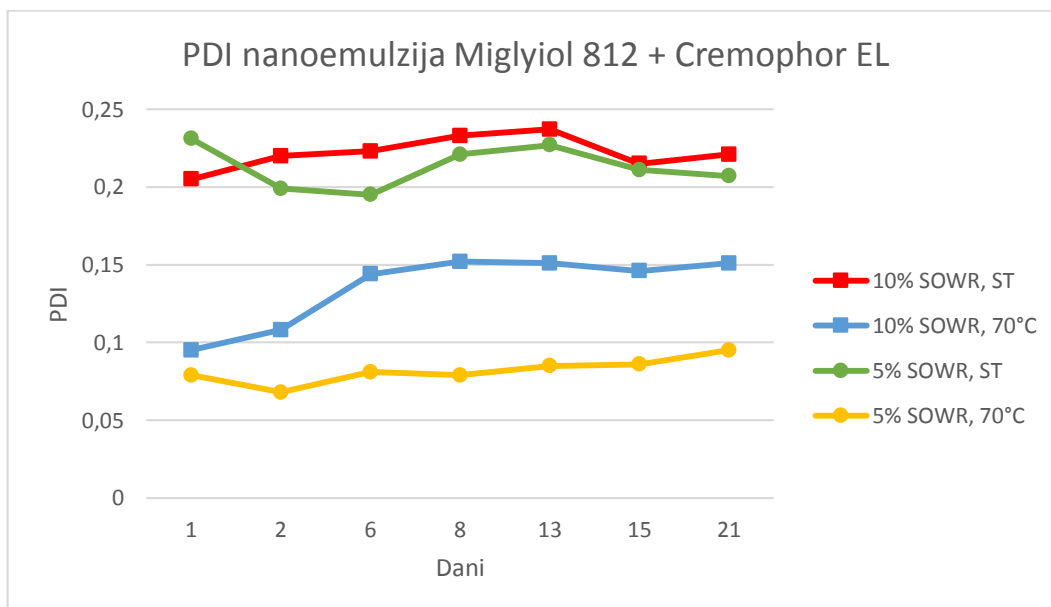
Miglyol 812 je smjesa srednjelančanih triglicerida i često se koristi u farmaceutici pri izradi oralnih, parenteralnih i topikalnih pripravaka. U velikom broju radova koristi se za izradu nanoemulzija jer se pokazao prihvatljivim zbog tehnološke kompatibilnosti s djelatnim i pomoćnim tvarima, fiziološke podnošljivosti i stabilnosti na oksidaciju te su opisane nanoemulzije prihvatljivih dimenzija izrađene koristeći Miglyol 812 kao uljnu fazu (Anton i Vandamme, 2009; Rowe i Quinn, 2009; Komaiko i McClements, 2016).

Cremophor EL je neionski surfaktant koji se dobva polioksietiliranjem 35 mola etilenoksida na 1 mol ricinusovog ulja. Vrlo se često koristi u farmaceutskoj industriji kao surfaktant, otapalo ili solubilizator za hidrofobne tvari. Emulzije s Cremophorom EL stabilne su pri niskim koncentracijama elektrolita. Nije toksičan i ne izaziva iritacije u koncentracijama koje se uobičajeno koriste u farmaceutici (Rowe i Quinn, 2009).

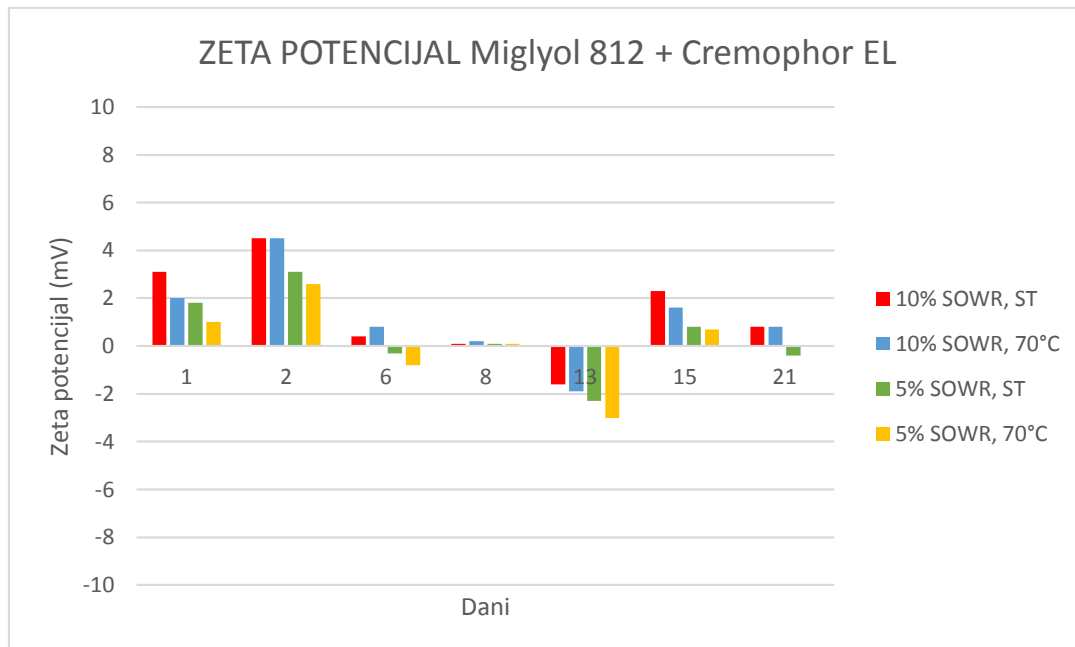
U sklopu ovog diplomskog rada izrađene su nanoemulzije koje sadrže Cremophor EL kao surfaktant i Miglyol 812 kao uljnu fazu, u omjeru 60/40 (SOR), pri čemu je njihov ukupan udio u emulziji iznosio 5% odnosno 10% te su pripremljene emulzije pri sobnoj temperaturi i pri 70°C. Kroz 20 dana praćena im je veličina čestica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Rezultati su dani u grafičkom prikazu:



Slika 1: Veličina čestica unutarnje faze u nanoemulzijama s Cremophorom EL i Miglyolom 812 tijekom 21 dan.

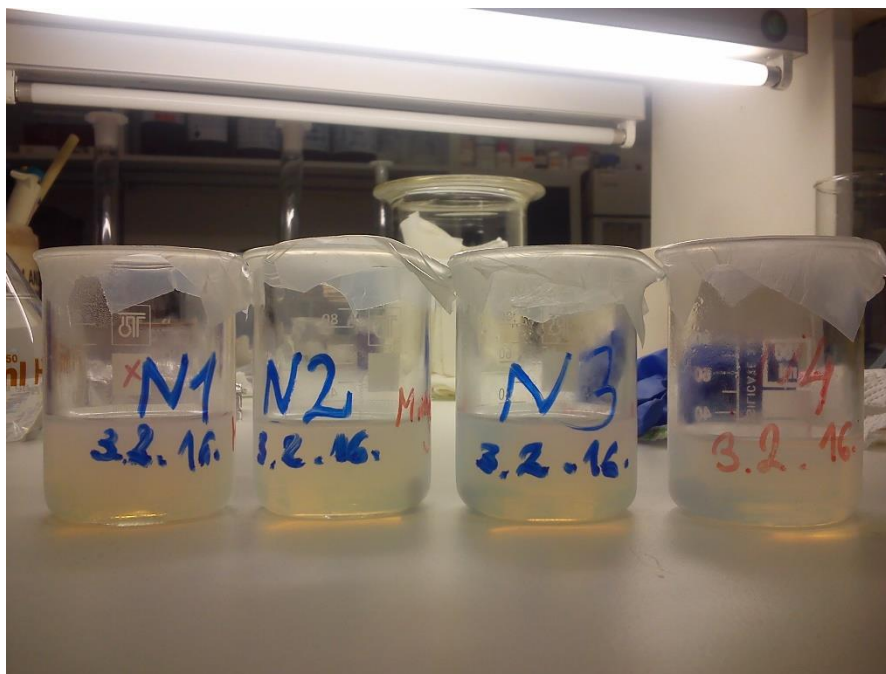


Slika 2: Indeks polidisperznosti nanoemulzija s Cremophorom EL i Miglyolom 812 tijekom 21 dan.

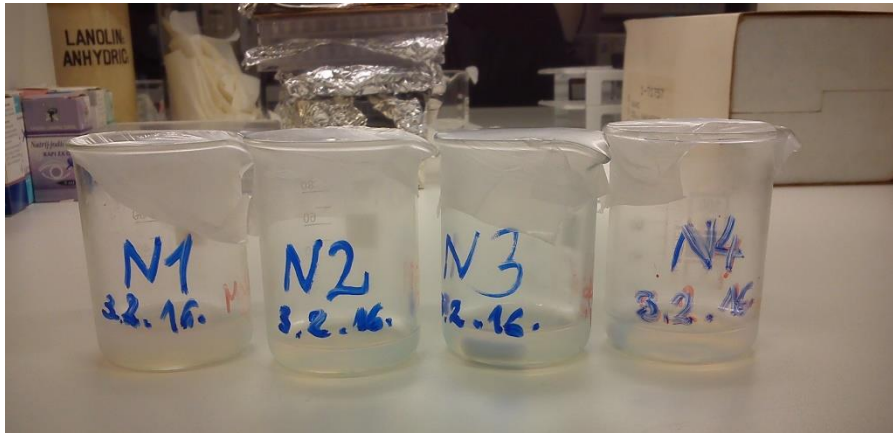


Slika 3: Zeta potencijal nanoemulzija s Cremophorom EL i Miglyolom 812 tijekom 21 dan.

Osim praćenja ključnih parametara, nanoemulzije su fotografirane tijekom 21 dan.



Slika 4: Nanoemulzije s Cremophorom EL i Miglyolom 812, odmah nakon pripreme (N1 – 10% SOWR pri sobnoj temperaturi, N2 – 10% SOWR pri 70°C, N3 – 5% SOWR pri sobnoj temperaturi, N4 - 5% SOWR pri 70°C).



Slika 5: Nanoemulzije s Cremophorom EL i Miglyolom 812, 20 dana nakon izrade (N1 – 10% SOWR pri sobnoj temperaturi, N2 – 10% SOWR pri 70°C, N3 – 5% SOWR pri sobnoj temperaturi, N4 - 5% SOWR pri 70°C).

Iz priloženih podataka vidljivo je da su korištenjem Miglyola 812 kao uljne faze i Cremophora EL kao surfaktanta uspješno izrađene nanoemulzije čija prosječna veličina čestica tijekom 20 dana ostaje u nanometarskom području bez obzira na SOWR i temperaturu (Slika 1). Može se primijetiti da su nanoemulzije izrađene pri 70°C imale nešto manje čestice unutarnje faze u odnosu na one koje su izrađene pri sobnoj temperaturi. Moguće objašnjenje za takvu razliku je manja viskoznost cijelog sustava, a naročito uljne faze pri višim temperaturama, što olakšava difuziju surfaktanta iz uljne prema vodenoj fazi. Osim toga, moguće je i da je povećanjem temperature došlo i do povećanja afiniteta surfaktanta za uljnu fazu te je uslijed nagle difuzije nakon miješanja faza došlo do stvaranja čestica manje veličine. Također postoji i mogućnost da je zagrijavanjem došlo do smanjenja napetosti na granici faza (Sadurni i sur., 2005; Anton i Vandamme, 2009; Komaiko i McClements, 2015, 2016).

Osim veličine čestica, nanoemulzije koje su pripremljene pri višoj temperaturi pokazuju i manji indeks polidisperznosti (PDI), pri čemu je ona s manjim SOWR tijekom cjelokupnog praćenja zadržala vrijednosti PDI ispod 0,1 dok je ona s većim SOWR dosegla PDI od 0,15 (Slika 2) što se u nekim izvorima ne smatra dovoljno niskim (Sadurni i sur., 2005). Nanoemulzije nastale pri sobnoj temperaturi pokazuju PDI iznad 0,2 što ih čini previše polidisperznima. Visoka polidisperznost povećava vjerojatnost pojave Ostwaldovog zrenja. To ukazuje da osim temperature, i količina surfaktanta i uljne faze utječe na polidisperznost nanoemulzija. Moguće objašnjenje za to je u manjoj viskoznosti konačne nanoemulzije pri manjem udjelu uljne faze i višim temperaturama (Komaiko i McClements, 2016).

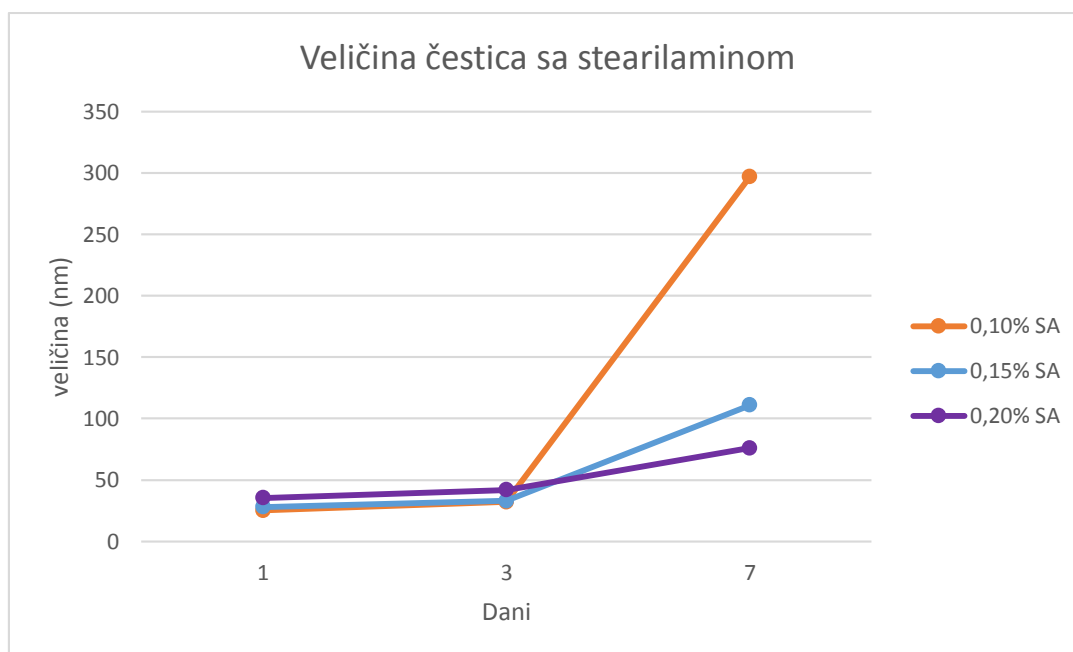
Rezultati mjerenja zeta potencijala pokazuju da nanoemulzije s 10% SOWR imaju veće vrijednosti zeta potencijala od onih s 5% SOWR, a također je vidljivo i da zeta potencijal

opada s povišenjem temperature, iako SOWR ima veću ulogu. Vidljive su i fluktuacije zeta potencijala tijekom 20 dana, no obzirom da to pokazuju sve nanoemulzije u podjednakoj mjeri, može se zaključiti da je to povezano sa samim procesom mjerenja ili pripreme uzoraka, a najvjerojatnije nije posljedica sastava. Vrijednosti zeta potencijala svih nanoemulzija su se tijekom cijelog vremenskog razdoblja u kojem su promatrane kretali oko 0 (Slika 3), što je i za očekivati obzirom da je korišten neionski surfaktant.

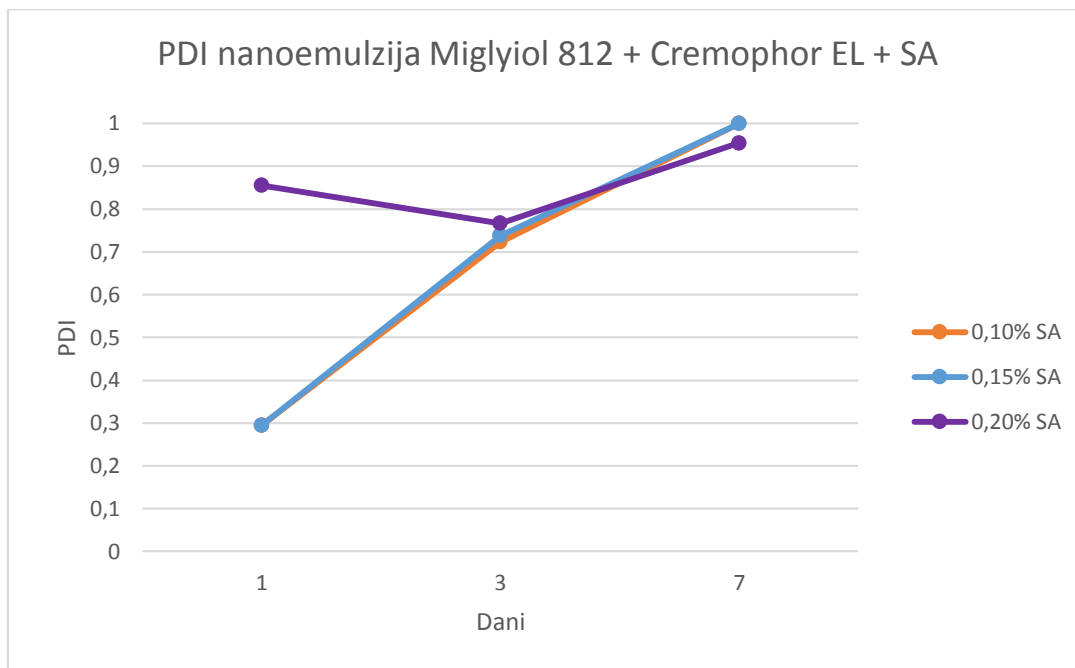
4.1.2. MIGLYOL 812 I CREMOPHOR EL S DODATKOM STEARILAMINA

Stearilamin (oktadecilamin) je ravnolančani primarni amin sa zasićenim lancem od 18 ugljikovih atoma. Iako nije oficinalan, u literaturi je opisano nekoliko slučajeva njegovog uklapanja u razne formulacije, između ostalog i nanoemulzije (Fraga i sur., 2008).

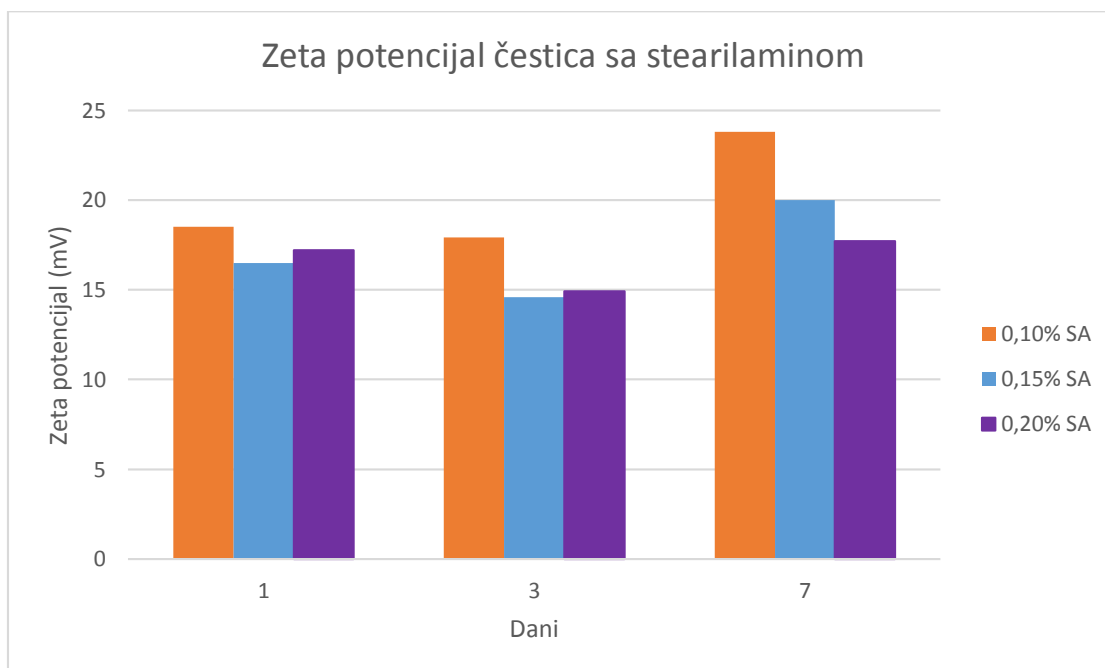
U sklopu ovog diplomskog rada izrađene su nanoemulzije koje sadrže Cremophor EL kao surfaktant i Miglyol 812 kao uljnu fazu, u omjeru 60/40 (SOR), pri čemu je njihov ukupan udio u emulziji iznosio 5%, pri 70°C. Pripremljene su nanoemulzije s 0,10 %, 0,15% i 0,20% stearilamina te im je pH namješten na 7 dodatkom nekoliko kapi 0,1M HCl. Kroz 7 dana praćena im je veličina čestica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Rezultati su dani u grafičkom prikazu:



Slika 6: Veličina čestica unutarnje faze nanoemulzija s Cremophorom EL i Miglyolom 812 uz dodatak stearilamina.

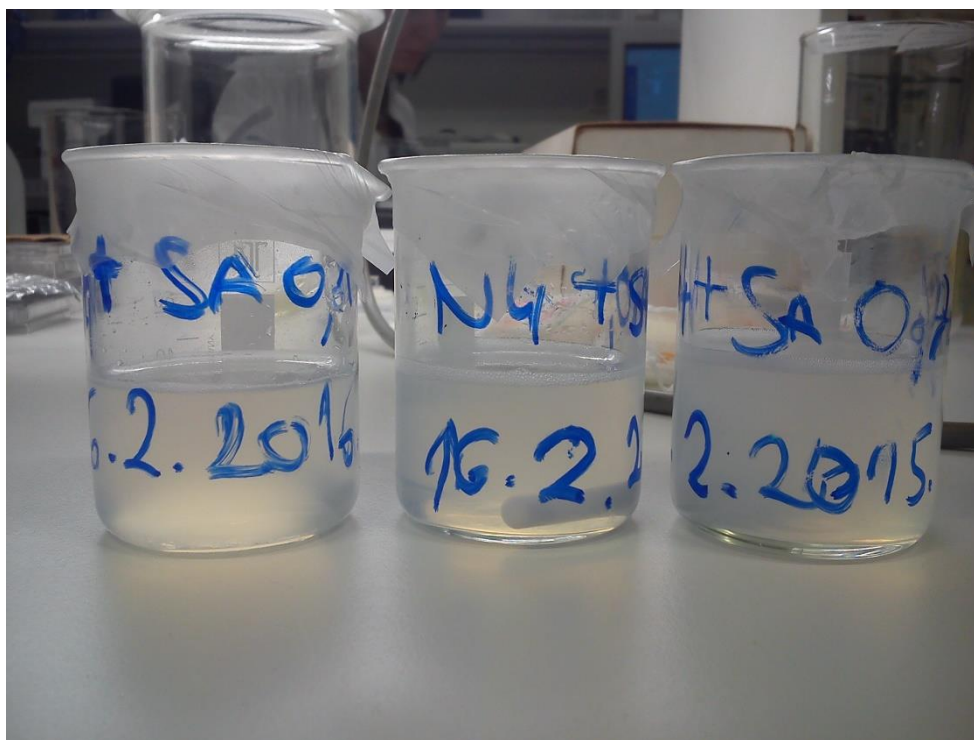


Slika 7: Indeks polidisperznosti nanoemulzija s Cremophorom EL i Miglyolom 812 uz dodatak sterilamina.



Slika 8: Zeta potencijal nanoemulzija s Cremophorom EL i Miglyolom 812 uz dodatak sterilamina.

Osim praćenja ključnih parametara, nanoemulzije su fotografirane nakon izrade.



Slika 9: Nanoemulzije s Miglyolom 812 i Cremophorom EL uz dodatak stearylamina (s lijeva na desno: 0,1% stearylamina, 0,15% stearylamina, 0,2% stearylamina).

Rezultati pokazuju da su u sva tri slučaja nastale nanoemulzije prihvatljivih veličina čestica unutarnje faze, ali ona sa 0,2% stearylamina je već u početku pokazivala veliku polidisperznost (Slika 6 i 7). Nakon tri dana sve tri nanoemulzije pokazuju visoku polidisperznost, a nakon sedam dana sve pokazuju znatno povećanje veličine čestica unutarnje faze, s tim da je kod nanoemulzije s 0,1% stearylamina došlo do naglog skoka na oko 300 nm, što označava visok stupanj agregacije čestica. Obzirom na visoku polidisperznost svih nanoemulzija sa stearylaminom, zaključuje se da nisu stabilne (Sadurni i sur., 2005; Fraga i sur., 2008; Komaiko i McClements, 2015, 2016).

Zeta potencijal svih nanoemulzija sa stearylaminom je veći u odnosu na one bez njega, što znači da pozitivan naboj aminoskupine pri pH 7 doprinosi pozitivnijem zeta potencijalu (Slika 8). Međutim, on je i dalje ispod 30 mV, što ove nanoemulzije čini tek blago pozitivno nabijenim, odnosno gustoća naboja na površini čestica nije dovoljna za značajniju elektrostatsku stabilizaciju nanoemulzije. Zanimljiva je i neočekivana činjenica da je pri većim koncentracijama stearylamina došlo do pada zeta potencijala, što ukazuje na moguće zasićenje površine nanočestica (Fraga i sur., 2008).

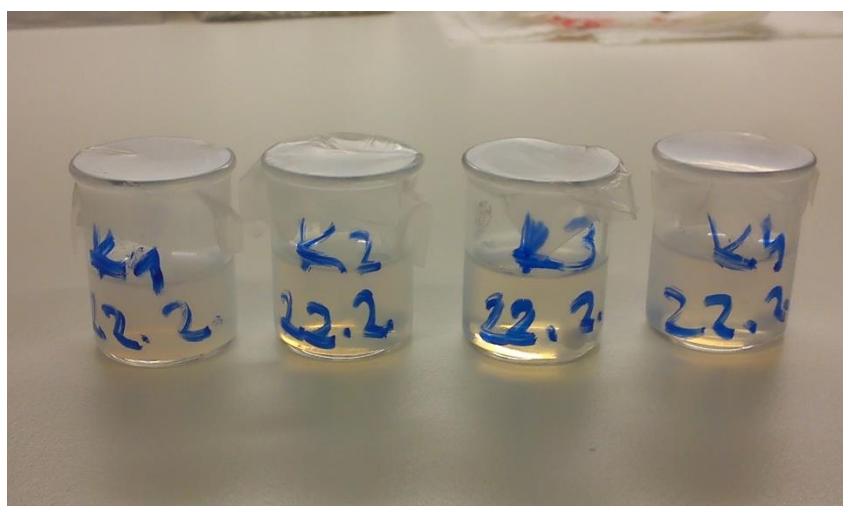
4.1.3. MIGLYOL 812 I CREMOPHOR EL S DODATKOM KITOZANA

Kitozan je kationski poliamin, djelomično deacetilirani i depolimerizirani hitin. Mukodhezivan je, što ga čini vrlo dobrim potencijalnim ekscipijensom u različitim pripravcima, uključujući i oftalmičke nanoemulzije, za koje je posebno zanimljiv jer dobro adherira na negativno nabijene površine kao što je rožnica oka. Već je u širokoj upotrebi, no i dalje se sve više istražuje u farmaceutici, posebno kad su pitanju pripravci produljenog oslobađanja i zadržavanja na sluznicama (Rowe i Quinn, 2009).

U sklopu ovog diplomskog rada izrađene su nanoemulzije koje sadrže Cremophor EL kao surfaktant i Miglyol 812 kao uljnu fazu, u omjeru 60/40 (SOR), pri čemu je njihov ukupan udio u emulziji iznosio 5%, pri 70°C. Pripremljene su nanoemulzije s 0,25% i 0,5% kitozana stupnja deacetilacije >90% i molekulske mase 50-150 kDa. Rezultati su dani u tablici:

Tablica 1: Veličina čestica, PDI, zeta potencijal i pH nanoemulzija s Cremophorom EL i Miglyolom 812 uz dodatak kitozana.

	Veličina čestica (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)	pH
K1	96,4 ± 9,6	0,872 ± 0,078	4,9 ± 0,2	4,93
K2	67,3 ± 2,1	0,569 ± 0,084	5,0 ± 0,6	4,92
K3	60,2 ± 1,0	0,492 ± 0,031	4,9 ± 0,2	5,02
K4	48,7 ± 0,6	0,306 ± 0,084	7,5 ± 5,3	5,04



Slika 10: Nanoemulzije s Cremophorom EL i Miglyolom 812 uz dodatak kitozana.

Formulacije K1 i K2 sadrže 0,25% kitozana, dok K3 i K4 sadrže 0,5% kitozana. K1 i K3 pripremljeni su dodatkom kitozana u gotovu nanoemulziju, a K2 i K4 su pripremljeni dodatkom kitozana u vodenu fazu prije miješanja sa uljnom fazom.

Iz rezultata je vidljivo da veća koncentracija kitozana te njegovo dodavanje u vodenu fazu pogoduje nastajanju manjih čestica unutarne faze, što ukazuje na činjenicu da je lakše uklopiti kitozan u *de novo* procesu nego naknadno, u već stvorenu nanoemulziju (Tablica 1). Iako sve dobivene nanoemulzije zadovoljavaju kriterij veličine, no ne i polidisperznosti, što ove nanoemulzije čini osjetljivim na Ostwaldovo zrenje.

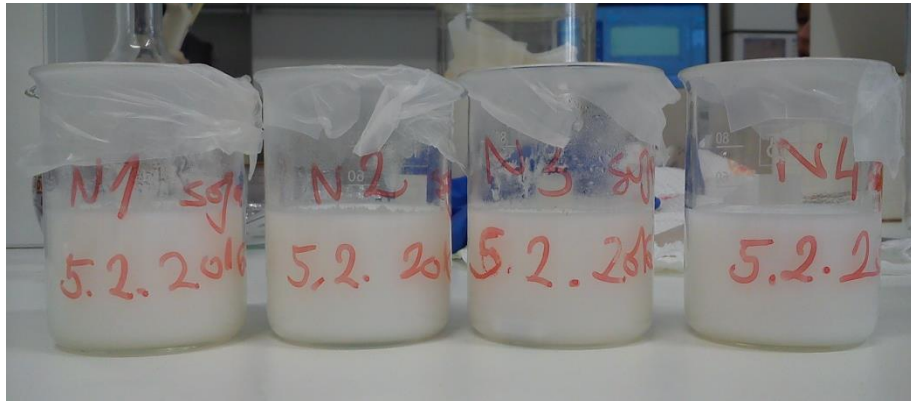
4.1.4. SOJINO ULJE I CREMOPHOR EL

Sojino ulje je vrlo rašireno u farmaceutici i koristi se u mnogim emulzijama i drugim lipidnim terapijskim sustavima. Opisana je i upotreba sojinog ulja u oblikovanju nanosustava, pa tako i nanoemulzija (Sadurni i sur., 2005; Anton, 2008; Rowe i Quinn, 2009; Solans i Sole, 2012; Komaiko i McClements, 2014, 2015, 2016).

U sklopu ovog diplomskog rada izrađene su nanoemulzije koje sadrže Cremophor EL kao surfaktant i sojino ulje kao uljnu fazu, u omjeru 60/40 (SOR), pri čemu je njihov ukupan udio u emulziji iznosio 5% odnosno 10% te su pripremljene emulzije pri sobnoj temperaturi i pri 70°C. Izmjerena je veličina čestica unutarne faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Rezultati su dani u tablici:

Tablica 2: Veličina čestica, PDI i zeta potencijal nanoemulzija s Cremophoorm EL i sojinim uljem (SO1 – SOWR 10% pri sobnoj temperaturi, SO2 – SOWR 10% pri 70°C, SO3 – SOWR 5% pri sobnoj temperaturi, SO4 – SOWR 5% pri 70°C).

	Veličina čestica (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)
SO1	3089,9 ± 568,3	1,000 ± 0,000	3,2 ± 0,4
SO2	389,3 ± 11,4	0,972 ± 0,049	4,0 ± 1,0
SO3	1878,9 ± 577,7	1,000 ± 0,000	2,2 ± 0,6
SO4	279,8 ± 15,8	0,719 ± 0,066	2,3 ± 0,7



Slika 11: Emulzije s Cremophorom EL i sojinim uljem.

Iz dobivenih podataka vidljivo je da iako viša temperatura i manji SOWR pogoduju nastajanju manjih čestica unutarnje faze i manjem indeksu polidisperznosti, niti jedna od emulzija ne zadovoljava uvjete (Tablica 2). Sve pokazuju prevelike čestice, s tim da se one koje su pripravljene pri sobnoj temperaturi nalaze čak u mikrometarskim veličinama. Iz priložene fotografije vidljivo je da su mliječnog izgleda (Slika 11). Sve emulzije su izrazito polidisperzne i kao takve su sklone procesima destabilizacije. Zeta potencijal je po očekivanju blizu 0 zbog neionskog surfaktanta Cremophor EL.

Zbog nepovoljnih rezultata pri prvom mjerenju, ove emulzije nisu dalje razmatrane.

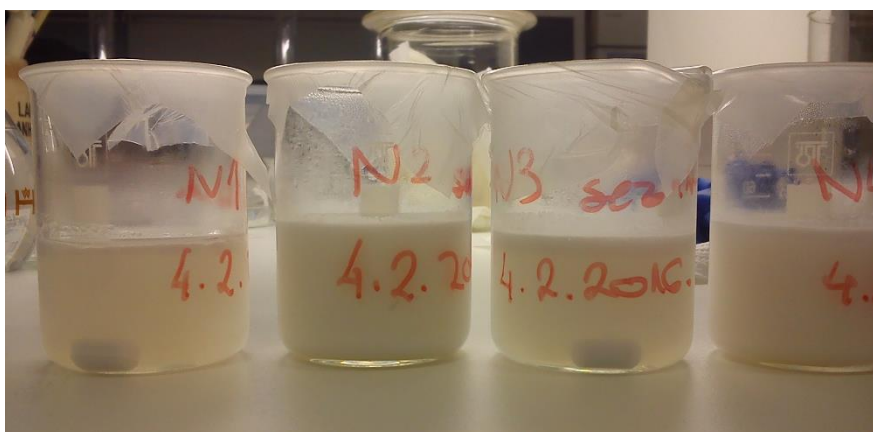
4.1.5. SEZAMOVO ULJE I CREMOPHOR EL

Sezamovo ulje također je dosta rašireno u farmaceutici, najčešće u depo pripravcima steroidnih hormona i drugih lipofinih lijekova. Zabilježeno i njegovo korištenje u oftalmičkim pripravcima, a razvojem nanotehnologije postalo je zanimljivo i u nanosustavima kao što su nanoemulzije (Rowe i Quinn, 2009; Komaiko i McClements, 2016).

U sklopu ovog diplomskog rada izrađene su nanoemulzije koje sadrže Cremophor EL kao surfaktant i sezamovo ulje kao uljnu fazu, u omjeru 60/40 (SOR), pri čemu je njihov ukupan udio u emulziji iznosio 5% odnosno 10% te su pripravljene emulzije pri sobnoj temperaturi i pri 70°C. Izmjerena je veličina čestica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Rezultati su dani u tablici:

Tablica 3: Veličina čestica, PDI i zeta potencijal nanoemulzija s Cremophorom EL i sezamovim uljem.

	Veličina čestica (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)
SE1	4854,6 ± 662,7	1,000 ± 0,000	3,9 ± 0,3
SE2	258,2 ± 3,4	0,276 ± 0,026	3,5 ± 0,2
SE3	1607,0 ± 477,3	1,000 ± 0,000	3,7 ± 0,2
SE4	244,6 ± 5,5	0,383 ± 0,039	3,8 ± 0,6



Slika 12: Emulzije s Cremophorom i sezamovim uljem.

Iz dobivenih podataka vidljivo je da iako viša temperatura i manji SOWR pogoduju nastajanju manjih čestica unutarnje faze i manjem indeksu polidisperznosti, niti jedna od emulzija ne zadovoljava uvjete (Tablica 3). Sve pokazuju prevelike čestice, s tim da se one koje su pripravljene pri sobnoj temperaturi nalaze čak u mikrometarskim veličinama. Iz priložene fotografije vidljivo je da su mliječnog izgleda (Slika 12). Sve emulzije su polidisperzne i kao takve su sklone procesima destabilizacije. Treba napomenuti da emulzije koje su pripravljene pri 70°C ipak pokazuju malo bolja svojstva u odnosu na sojino ulje. Zeta potencijal je po očekivanju blizu 0 zbog neionskog surfaktanta Cremophor EL.

Zbog nepovoljnih rezultata pri prvom mjerenju, ove emulzije nisu dalje razmatrane.

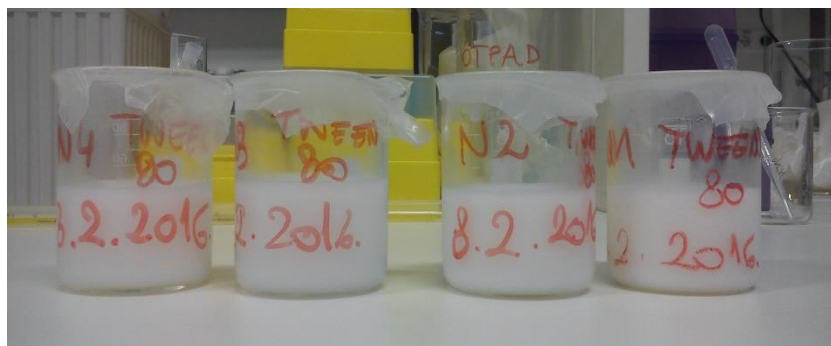
4.1.6. MIGLYOL 812 I TWEEN 80

Tween 80 je neionski surfaktant, monooleatni ester polioksietilen (20) sorbitana, koji se vrlo često koristi u farmaceutici, najčešće upravo pri izradi U/V emulzija. Opisana je i njegova upotreba u pripravi nanoemulzija (Sarduni i sur., 2005; Anton i Vandamme, 2009; Komaiko i McClements, 2015, 2016).

U sklopu ovog diplomskog rada izrađene su nanoemulzije koje sadrže Tween 80 kao surfaktant i Miglyol 812 kao uljnu fazu, u omjeru 60/40 (SOR), pri čemu je njihov ukupan udio u emulziji (SOWR) iznosio 5% odnosno 10% te su pripremljene nanoemulzije pri sobnoj temperaturi i pri 70°C. Također je pripremljena i nanoemulzija s 5% SOWR 0,05% stearilamina pri 70°C. Izmjerena je veličina čestica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Rezultati su dani u tablici:

Tablica 4: Veličina čestica, PDI i zeta potencijal nanoemulzija s Tweenom 80 i Miglyolom 812 (T801 – 10% SOWR pri sobnoj temperaturi, T802 – 10% SOWR pri 70°C, T803 – 5% SOWR pri sobnoj temperaturi, T804 – 5% SOWR pri 70°C).

	Veličina čestica (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)
T801	179,0 ± 3,6	0,300 ± 0,010	0,3 ± 0,3
T802	157,4 ± 1,4	0,286 ± 0,022	0,2 ± 0,5
T803	175,8 ± 7,4	0,377 ± 0,126	0,1 ± 0,4
T804	149,8 ± 4,3	0,315 ± 0,048	0,2 ± 0,5
T80+SA	135,8 ± 3,7	0,439 ± 0,164	13,4 ± 1,0



Slika 13: Nanoemulzije s Tweenom 80 i Miglyolom 812 (s lijeva na desno: T804, T803, T802, T801).



Slika 14: Nanoemulzija s Tweenom 80 i Miglyolom 812 uz dodatak 0,05% stearylamina.

Iz dobivenih podataka vidljivo je da temperatura i SOWR nemaju značajan utjecaj na veličinu čestica unutarnje faze i indeks polidisperznosti (Tablica 4). Iako je veličina čestica unutar prihvatljivog raspona, sve nanoemulzije pokazuju preveliku polidisperznost. Iz priložene fotografije vidljivo je da su nanoemulzije unatoč veličini čestica unutar faze u nanometarskom rasponu mliječnog izgleda (Slika 13). Zeta potencijal je po očekivanju blizu 0 zbog neionskog surfaktanta (Tablica 4). Dodatak stearylamina nije imao značajan utjecaj na veličinu čestice, blago je povećao polidisperznost, što u ovom slučaju nije relevantno budući da su sve nanoemulzije previše polidisperzne. Jedina značajnija razlika je vidljiva u zeta potencijalu koji premašuje 10 mV, iako se ta vrijednost i dalje smatra nedovoljnom za značajniju elektrostatsku stabilizaciju nanoemulzije. Iako se u literaturi Tween 80 navodi kao najpogodniji od svih polisorbata, a srednjelančani trigliceridi kao jedna od najpogodnijih uljnih faza (Komaiko i McClements, 2016), njihova kombinacija se nije pokazala dobrom za izradu nanoemulzija metodom koja se koristila u ovom radu.

Zbog nepovoljnih rezultata pri prvom mjerenju, ove emulzije nisu dalje razmatrane.

4.1.7. MIGLYOL 812 I TWEEN 60

Tween 60 je neionski surfaktant, monostearatni ester polioksietilen (20) sorbitana. Često se koristi u farmaceutici, a opisani su i pokušaji pripreme nanoemulzija s njime (Komaiko i McClements, 2016).

U sklopu ovog diplomskog rada izrađene su nanoemulzije koje sadrže Tween 60 kao surfaktant i Miglyol 812 kao uljnu fazu, u omjeru 60/40 (SOR), pri čemu je njihov ukupan udio u emulziji iznosio 5%, pri temperaturi 70°C. Jednoj od njih dodan je i stearylamin (0,05%). Izmjerena je veličina čestica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Rezultati su dani u tablici:

Tablica 5: Veličina čestica, PDI i zeta potencijal nanoemulzija s Tweenom 60 i Miglyolom 812.

	Veličina čestica (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)
T60	175,7 ± 1,9	0,281 ± 0,022	0,9 ± 0,4
T60+SA	208,4 ± 1,4	0,308 ± 0,005	16,9 ± 0,6

Iz dobivenih podataka vidljivo je da obje emulzije imaju slične vrijednosti veličine čestica unutarnje faze te su polidisperzne. Stearilamin je imao vrlo malen utjecaj na povećanje tih dviju vrijednosti, no značajnije je utjecao na zeta potencijal, što je u skladu s očekivanjima. Kombinacija Tweena 60 i Miglyola 812 nije se pokazala pogodnom za izradu nanoemulzija ovom metodom.



Slika 15: Nanoemulzije s Miglyolom i redom: Tween 60, Tween 85, Tween 60 uz 0,05% steartilamina.

4.1.8. MIGLYOL 812 I TWEEN 85

Tween 85 je neionski surfaktant, trioleatni ester polioksietilen (20) sorbitana. Često se koristi u farmaceutici, a opisani su i pokušaji pripreme nanoemulzija s njime (Komaiko i McClements, 2016).

U sklopu ovog diplomskog rada izrađena je nanoemulzija koja sadrži Tween 85 kao surfaktant i Miglyol 812 kao uljnu fazu, u omjeru 60/40 (SOR), pri čemu je njihov ukupan udio u emulziji iznosio 5%, pri temperaturi 70°C. Izmjerena je veličina čestica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Rezultati su dani u tablici:

Tablica 6: Veličina čestica, PDI i zeta potencijal emulzije s Tweenom 85 i Miglyolom 812.

	Veličina čestica (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)
T85	797,4 ± 1,9	1,000 ± 0,000	0,8 ± 0,4

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da ova emulzija nikako ne zadovoljava uvjete za nanoemulzije zbog velikih čestica unutarnje faze i ogromne polidisperznosti, stoga se može zaključiti da Tween 85 nije pogodan surfaktant u kombinaciji s Miglyolom 812 kao uljnom fazom.

4.1.9. RICINUSOVO ULJE I CREMOPHOR EL

Ricinusovo ulje jedno je od češće korištenih biljnih ulja u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Najčešće se koristi za topikalne emulzije, stoga je interesantan i pri formulaciji nanoemulzija, što je opisano i u literaturi (Tadros i sur., 2004; Sadurni i sur., 2005; Anton, 2008; Anton i Vandamme, 2009; Solans i Sole, 2012; Komaiko i McClements, 2015, 2016).

U sklopu ovog diplomskog rada izrađene su nanoemulzije koje sadrže Cremophor EL kao surfaktant i ricinusovo ulje kao uljnu fazu, u omjeru 60/40 (SOR), pri čemu je njihov ukupan udio u emulziji iznosio 5%, pri temperaturi 70°C. Jednoj od njih dodan je i stearylamin (0,05%). Izmjerena je veličina čestica unutarnje faze, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Rezultati su dani u tablici:

Tablica 7: Veličina čestica, PDI i zeta potencijal emulzije s Cremophorom EL i ricinusovim uljem.

	Veličina čestica (nm)	PDI	Zeta potencijal (mV)
RC	61,9 ± 0,6	0,289 ± 0,010	0,5 ± 0,5
RC+SA	68,9 ± 2,6	0,571 ± 0,104	8,5 ± 1,2

Dobiveni rezultati pokazuju da dodatak stearylamina nema značajan utjecaj na veličinu čestica i slabo povećava zeta potencijal, no značajno povećava polidisperznost sustava, što znači da za dobivanje nanoemulzija ovom metodom nije pogodno kombinirati stearylamin s Cremophorom EL i ricinusovim uljem, no postoji mogućnost da se uz neke dodatne

surfaktante ili uljne faze dobije nanoemulzija prihvatljive veličine čestica i niskog indeksa polidisperznosti.

4.2. TOPLJIVOST DEKSAMETAZONA U MIGLYOLU 812

Deksametazon je kortikosteroid i jedan je od najčešće primijenjenih lijekova u oftalmologiji za liječenje upalnih bolesti oka, bilo samostalno ili u kombinaciji s antibioticima. Primjenjuje se kapi za oko, a kako se radi o lipofilnom lijeku, primjenjuje se suspenzija lijeka u koncentraciji 1 mg/ml. Primjenjuje se i u obliku masti za oko.

U svrhu rada ispitivana je topljivost deksametazona u Miglyolu 812, koji se od svih uljnih faza korištenih tijekom izrade nanoemulzija ispostavio kao najprikladniji, s ciljem eventualnog pokušaja uklapanja u nanoemulzije.

Rezultati su dani u tablici:

Tablica 8: Izmjerene koncentracije deksametazona u Miglyolu 812.

uzorak	Koncentracija (mg/ml)
1	0,3536
2	0,4074*
3	0,3524

*Zbog velikog odstupanja od drugih rezultata, ovaj se ne uzima u obzir. Pretpostavlja se da se radi o pogrešci u metodi.

Iz priloženih rezultata vidljivo je da koncentracija deksametazona u Miglyolu 812 nije dovoljno visoka da bi se postigla terapijska koncentracija. Kako je udio uljne faze u nanoemulzijama u sklopu ovog rada samo 2-4%, koncentracija deksametazona u takvom pripravku bila bi premala, odnosno bio bi potreban veliki volumen primjene da bi se postigla odgovarajuća doza lijeka na mjestu primijene. Iako zbog same prirode nanoemulzija postoji mogućnost da se isti terapijski učinak može postići manjom dozom lijeka u odnosu na otopine i suspenzije, pretpostavlja se da je topljivost deksametazona u Miglyolu 812 i dalje premala za uspješno uklapanje.

5. ZAKLJUČAK

Pripravljeno je nekoliko nanoemulzija različitog sastava, od kojih nisu sve bile uspješne.

Od svih ispitivanih kombinacija, najbolje su se pokazali Miglyol 812 kao uljna faza uz Cremophor EL kako surfaktant. Nanoemulzije pripremljene s tim ekscipijensima bile su stabilne tijekom najmanje 20 dana.

Dodatak stearilamina u formulaciju nije se pokazao uspješnim jer je došlo do destabilizacije te takve nanoemulzije nisu bile stabilne niti sedam dana. Sojino, sezamovo i ricinusovo ulje nije se pokazalo dobrim u kombinaciji s Cremophorom EL.

Dodatkom kitozana postignute su čestice odgovarajuće veličine, ali polidisperznost sustava nije bila zadovoljavajuća.

Korištenjem polisorbata kao surfaktanata u kombinaciji s Miglyolom 812 nisu postignuti zadovoljavajući rezultati.

Općenito se može zaključiti da su manji SOWR i viša temperatura pogodovali nastajanju nanoemulzija boljih svojstava, što je u skladu s literaturnim podacima.

Kao najveći problem pokazala prevelika polidisperznost čestica unutarnje faze, što nanoemulzije čini nestabilnima kroz duže vrijeme.

Topljivost deksametazona u Miglyolu 812 nije dovoljna za postizanje odgovarajuće koncentracije lijeka u pripravku.

6. LITERATURA

Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – a review. *J Control Release*, 2008, 128, 185-199

Anton N, Vandamme TF. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int J Pharm*, 2009, 377, 142-147.

Beilin M, Bar-Ilan A, Amselem S. Ocular retention time of submicron emulsion (SME) and the miotic response to pilocarpine delivered in SME. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36, S166

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

Fraga M, Laux M, Zandona B, Santos GR, dos Santos Giuberti C, de Oliviera MC, Matte U, Ferreira Teixeira H. Optimization of stearylamine-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification process as nucleic acids delivery systems. *J Drug Del Sci Tech*, 2008, 18, 398-403.

Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, Liu J, Gan Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov Today*, 2013, 18, 290-296.

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

Herrera ML. Analytical Techniques for Studying the Physical Properties of Lipid Emulsions. U: SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition. Hartel RW, urednik, New York, Springer, 2013, str. 1-12.

Hunter RJ. Zeta potential in colloid science. London, Academic Press, 1988, str. 5-8; 21-22; 44-51.

Klang S, Frucht_Pery J, Hoffman A, Benita S. Physiochemical characterization and acute toxicity evaluation of positively charged submicron emulsion vehicle. *J Pharm Pharmacol*, 1994, 46, 986-993.

Klang S, Abdulrazik M, Benita S. Influence of emulsion droplet surface charges on indomethacin ocular tissue distribution. *Pharm Dev Technol*, 2000, 5, 521-532.

Komaiko J, McClements DJ. Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: Hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems. *J Colloid Interface Sci*, 2014, 425, 59-66.

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

Komaiko J, McClements DJ. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Comp Rev Food Sci Food Safety*, 2016, 15, 331-352.

Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *J Phys Condens Matter*, 2006, 18, 635-666.

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

Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London, Pharmaceutical Press, 2009, str. 159-160; 429-431; 542-547; 580-584; 614-615; 682-684.

Sadurni N, Solans C, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Studies on the formation of O/W nanoemulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 26, 438-445.

Sasaki H, Yamamura K, Nishida K, Nakamura J, Ichikawa M. Delivery of drugs to the eye by topical application. *Prog Retin Eye Res*, 1996, 15, 583-620.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2005, 30, 258-263.

Solans C, Sole I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2012, 17, 246-254.

Staniforth JN, Taylor KMG. Particle size analysis. U: Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. Aulton M, Taylor KMG, urednici, London, Elseiver, 2013, str. 136-153.

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

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

7. SAŽETAK / SUMMARY

Nanoemulzije predstavljaju relativno nov terpaijski sustav s nekoliko prednosti u usporedbi s klasičnim terpijskim oblicima. Naročito su zanimljivi kao topikalni oftalmički oblici jer omogućuju bolju apsorpciju lijeka kroz barijere oka. Pripravljeno je nekoliko nanoemulzija različitih sastava metodom spontanog emulgiranja te im je ispitana veličina čestica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Najbolja svojstva pokazale su nanoemulzije kod kojih je kao surfaktant korišten Cremophor EL, a kako uljna faza Miglyol 812. Nanoemulzije tog sastava koje su pripravljene pri temperaturi od 70°C pokazale su stabilnost tijekom najmanje 20 dana. Dodatkom stearilamina postignuto je povećanje zeta potencijala, no došlo je do destabilizacije nanoemulzija. Nanoemulzije s dodatkom kitozana imale su prihvatljivu veličinu čestica, ali veći indeks polidisperznosti. Korištenjem polisorbata kao surfaktanata u kombinaciji s Miglyolom 812 te sojinog, sezamovog i ricinusovog ulja u kombinaciji s Cremophorom EL nisu postignute nanoemulzije zadovoljavajućih svojstava.

Nanoemulsions are a relatively new drug delivery system with several advantages compared to classical formulations. They are especially interesting as ophthalmic formulations because they enable better absorption of drugs through the barriers of the eye. Several nanoemulsions of different compositions were prepared by spontaneous emulsification and their particle size, polydispersity index as well as zeta potential were determined. The best properties were observed in nanoemulsions containing Cremophor EL as the surfactant and Miglyol 812 as the oil phase. Nanoemulsions of that composition prepared at 70°C were shown to be stable for a minimum of 20 days. Addition of stearylamine increased the zeta potential but caused destabilization of the nanoemulsions. Nanoemulsions with the addition of chitosan had acceptable particle size but their polydispersity index was larger. Using polysorbates as surfactants in combination with Miglyol 812, as well as using soybean, sesame, and castor oil in combination with Cremophor EL did not yield nanoemulsions of satisfactory properties.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Prikladnost metode spontanog emulgiranja u izradi nanoemulzija za oftalmičku primjenu

Matej Pintur

SAŽETAK

Nanoemulzije predstavljaju relativno nov terpaijski sustav s nekoliko prednosti u usporedbi s klasičnim terpijskim oblicima. Naročito su zanimljivi kao topikalni oftalmički oblici jer omogućuju bolju apsorpciju lijeka kroz barijere oka. Pripravljeno je nekoliko nanoemulzija različitih sastava metodom spontanog emulgiranja te im je ispitana veličina čestica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal. Najbolja svojstva pokazale su nanoemulzije kod kojih je kao surfaktant korišten Cremophor EL, a kako uljna faza Miglyol 812. Nanoemulzije tog sastava koje su pripremljene pri temperaturi od 70°C pokazale su stabilnost tijekom najmanje 20 dana. Dodatkom stearilamina postignuto je povećanje zeta potencijala, no došlo je do destabilizacije nanoemulzija. Nanoemulzije s dodatkom kitozana imale su prihvatljivu veličinu čestica, ali veći indeks polidisperznosti. Korištenjem polisorbata kao surfkatanata u kombinaciji s Miglyolom 812 te sojinog, sezamovog i ricinusovog ulja u kombinaciji s Cremophorom EL nisu postignute nanoemulzije zadovoljavajućih svojstava.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 15 grafičkih prikaza, 8 tablica i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanoemulzije, metoda spontanog emulgiranja, oftalmička primjena, Miglyol 812, Cremophor EL

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

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

Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: siječanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Suitability of the spontaneous emulsification method in the preparation of nanoemulsions for ophthalmic application

Matej Pintur

SUMMARY

Nanoemulsions are a relatively new drug delivery system with several advantages compared to classical formulations. They are especially interesting as ophthalmic formulations because they enable better absorption of drugs through the barriers of the eye. Several nanoemulsions of different compositions were prepared by spontaneous emulsification and their particle size, polydispersity index as well as zeta potential were determined. The best properties were observed in nanoemulsions containing Cremophor EL as the surfactant and Miglyol 812 as the oil phase. Nanoemulsions of that composition prepared at 70°C were shown to be stable for a minimum of 20 days. Addition of stearylamine increased the zeta potential but caused destabilization of the nanoemulsions. Nanoemulsions with the addition of chitosan had acceptable particle size but their polydispersity index was larger. Using polysorbates as surfactants in combination with Miglyol 812, as well as using soybean, sesame, and castor oil in combination with Cremophor EL did not yield nanoemulsions of satisfactory properties.

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

Thesis includes: 30 pages, 15 figures, 8 tables and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoemulsions, spontaneous emulsification, ophthalmic application, Miglyol 812, Cremophor EL

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

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

The thesis was accepted: January 2017.